

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

Optimisation de la biodégradation de phénol par des cultures mixtes

Présentées par :

REBIHI Wahiba et KABOUCHE Bouchra khadra

Devant le jury :

Président(e)

Sifi Ibrahim

Maitre de conférences B

Examineur

Madouri Redouane

Maitre de conférences B

Promoteur

Benaceur Farouk

Maitre de conférences A

Co-promotrice

Rezzoug Asma

Doctorante

Soutenu publiquement le : 26 / 06/2022

Remerciements

Avant toute chose, nous remercier Allah, le tout puissant, pour nous 'avoir donné la force et la patience pour mener à terminer ce travail.

Nombreux sont ceux qui ont contribué d'une façon ou d'une autre l'aboutissement de ce travail.

En premier lieu, je tiens à remercier vivement mon encadreur ; Dr. Asmaa Rezzoug Pour avoir accepté de diriger ce travail, et de nous avoir toujours soutenu et mis à notre disposition tout le matériel nécessaire afin de réaliser cette étude et pour leur aide inestimable.

Nous adresse nos vifs remerciements à Pr. GOUZI Hicham pour ces efforts, sa disponibilité, l'assistance pendant notre projet et ses conseils.

Nos remerciements aux honorables membres du jury Bennacer .F,Sifi Ibrahim , Gouzi Hicham pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements les plus sincères sont adressés à mes enseignants, qui ont contribué durant mes études à l'université Ammar Telidji.

Un grand merci au responsable des laboratoires du Département de Biologie , et spécialement Melle Aicha Latrache, et aux ingénieurs de laboratoires : d'avoir mis à notre entière disposition le matériel nécessaire à la réalisation de ce travail.

Une pensée amicale à nos amis Labiadh Meriem, et Asmaet nos collègues de promotion 2022, spécialité Microbiologie appliquée. Enfin, nous veut laisser un petit mot à ceux qui, d'une façon ou d'une autre, ont contribué à rendre notre journée plus agréable.

Dédicaces

Je dédie ce travail

À mes deux parents qui par leur propos et encouragements me boostent et me poussent à aller aussi loin que possible, à poursuivre mes ambitions même si elles sont enfouies dans des constellations célestes.

A mon père ,Merci d'avoir toujours ces niveaux d'énergie inépuisables et d'être à la hauteur de mes exigences incessantes. Je t'aime papa, merci pour tous.

A mon mère, Si l'offran de exprime mêmesigne de l'amour, à c'elle avec qui j'ai connu le sens de la vie, à c'elle qui était contente pour moi avantA c'elle qui à sacrifier sa vie pour moi, au diamant da maA mes chers sœurs A ceux qui me sont les plus chères, a ceux qui m'ont montréCe qui est plus beaux que la vie elle.

A mes intims Kabouche Bouchra et Bensaleh Rokia pour les belles moments que nous partageant ensemble

*A ceux que j'ai appris à trouver et qui m'ont appris à ne pas les
Tous ceux ou celles qui me sont chers et que j'ai omis involontairement de citer
Je manifeste également une grande reconnaissance à tout le corps professoral de la Faculté des Sciences de la nature et de la vieet plus spécialement à l'égard de mon encadrant, en l'occurrence, Monsieur Gouzi Hicham qui a toujours fait preuve de disponibilité en me prodiguant des conseils O combien utiles, qui m'ont permis de parfaire la rédaction et la conception du document que vous avez entre vos mains ou sous vos yeux.*

Le chemin a été long et pavé d'arbustes peut-être, l'aventure, jonchées d'adversités mais ce qui importe véritablement, c'est la finalité, le dénouement...Et je suis de ceux qui croient que, la fin d'une chose vaut mieux que son début...Au demeurant, que les bénédictions soient !

REBIHI WAHIBA

Dédicaces

J'aimerai dédier ce travail à mes chers parents J'aurais les mots ne saurais exprimer ma gratitude, mon amour et mon attachement envers vous pour votre patience, votre dévouement, votre tendresse, votre attention et vos encouragements pour m'avoir facilité le chemin souvent à dépens.

J'espère pouvoir réaliser tous vos souhaits et être à la hauteur de vos espérances Que dieu vous préserve !

A mes chères sœurs et mes frères Que dieu vous protège et vous accorde le bonheur et la réussite dans tous ce que vous entreprend Que la vie ne puisse jamais nous séparer.

A mon camarade REBIHI wahiba Qui ensemble nous avons pu partager rêves, peine et sourires et avec qui en apprenant les petits secrets de la nature, nous apprenons les grands secrets de la vie. Merci pour eux A mon amis A tous ceux qui m'aiment avec toute mon affection.

KABOUCHE BOUCHRA

Liste des abréviations :

Ab : Absorbance

ADH: décarboxylation de l'acide aminé arginine

AMY: fermentation de l'amygdaline (glycoside)

ARA: fermentation de l'arabinose (sucre pentose)

C° : Degrés celsius

µm : Micro mètre

CIT: citrate comme seule source de carbone

DO Densité optique

MM Milieu Minérale

GEL: test de production de l'enzyme gélatinase qui liquéfie la gélatine

GLU: fermentation du glucose (sucre hexose)

H₂S: sulfure d'hydrogène

HAP : Hydrocarbures Aromatiques polycycliques

IND: Test Indole - production d'indole à partir de tryptophane par l'enzyme tryptophanase.

INO: fermentation de l'inositol (polyalcool cyclique)

INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité

LB : Luria Bertani

LDC: décarboxylations de l'acide aminé lysine

MAN: fermentation du mannose (sucre hexose)

MEL: fermentation du mélibiose (disaccharide)

ODC: décarboxylations de l'acide aminé ornithine

ONPG: test de l'enzyme β-galactosidase

RHA: fermentation du rhamnose (sucre de méthyl pentose)

SAC: fermentation du saccharose (disaccharide)

SOR: fermentation du sorbitol (sucre d'alcool)

TDA: Tryptophane désaminase

URE: test de l'enzyme uréase

VP: le test de Voges-Proskauer pour la détection de l'acétoïne (acétylméthylcarbinol)

µl : Microlitre

Liste des figures :

Figure	titre	page
01	principale contribution annuelle pour la pollution pétrolière mondiale 2019	04
02	Structure moléculaire de base des principaux hydrocarbures pétroliers	04
03	Structure de quelques hydrocarbures aromatiques polycycliques abondants (HAP) dans l'environnement	06
04	Structure chimique de phénol	07
05	Devenir d'un polluant organique au niveau du sol	10
06	Mise en évidence des phénomènes d'adaptation des microorganismes dans les sols.	11
07	Voie aérobie pour le métabolisme du phénol	12
08	Migration des hydrocarbures dans les sols	13
09	.Les facteurs qui influence la biodégradation	16
10	Communauté microbienne impliquée dans la dégradation des hydrocarbures pétroliers	17
11	Localisation des sites d'échantillonnage	19
12	Photos de prélèvement d'échantillonnage	20
13	procédé de dilution de la solution du sol	21
14	Méthode d'ensemencement par la technique de quadrant	22
15	Conservation des souches dans des tubes inclinés	26
16	Résultats du dosage colorimétrique de phénol des cultures unique après incubation des bactéries isolées à 37°C	27
17	Aspect macroscopique des souches isolées	29
18	observation microscopiques Coloration de Gram de quelques Souches isolées capables a dégradé le phénol (grossissement×100	30
19	Figure 19 : Le pourcentage d'homologie des résultats des test biochimiques des souches G et H (base de donné la galerie API 20 ^E biomerieux France)	31
20	La Cinétique de biodégradation du phénol par la souche <i>Brevudimonasspet</i> la production de la biomasse au cours de temp (h)	34
21	La Cinétique de biodégradation du phénol par la souche <i>Bacillus spet</i> la production de la biomasse au cours de temp (h)	35
22	La Cinétique de biodégradation du phénol par la souche <i>Pseudomonas spet</i> la production	35

	de la biomasse au cours de temp (h)	
23	La Cinétique de biodégradation du phénol par la souche <i>Serratiamarcesens</i> et la production de la biomasse au cours de temp (h)	36
24	La Cinétique de biodégradation du phénol par la souche A Cocci à gram - et la production de la biomasse au cours de temp (h)	37
25	la biodégradation du phénol par la souche <i>Pantoeaspla</i> production de la biomasse au cours de temp (h)	37
26	La Cinétique de biodégradation du phénol par les cultures mixtes et la production de la biomasse au cours de temp (h)	39

Liste des tableaux :

tableau	titre	page
01	Propriétés physico-chimiques des phénols.	08
02	Aspect des échantillons des sols prélevés (noir /odeur++) (marron /odeur+)	20
03	Caractéristique des souches bactériennes provenat d'un autre site contaminé.	25
04	Aspect macroscopique des colonies isolées	28
05	Aspects microscopiques des souches isolées	29
06	Résultats des tests biochimiques des isolats bactériens	31

Sommaire

Liste des abréviations	I
Liste des figures	III
Liste des tableaux	V

Introduction	01
--------------	----

Partie bibliographique

1. Définition la pollution	04
2. Définition des hydrocarbures	04
2.2. Impact des hydrocarbures sur l'environnement	06
3. Définition de phénol	06
3.1. Effets toxiques du phénol	08
3.1.1. sur l'environnement	08
3.1.2. sur les eaux	09
3.1.3. Impact sur le sol	09
3.1.4. Chez l'homme et l'animal	10
4. L'adaptation des microorganismes aux xénobiotiques	11
5. Les principaux processus de transformation des xénobiotiques	11
6. Mécanisme de biodégradation de phénol	12
6.1. Biodégradation anaérobie	13
Biodégradation aérobie	14
Les enzymes impliquées dans la biodégradation aérobie	15
Phénol-hydroxylases	15
Catéchol dioxygénases	15
7. Optimisation des conditions pour une biodégradation améliorée des phénols	16
8. Les microorganismes impliqués dans la biodégradation de phénol	17
9. Approches moléculaires	17

10. traitement des sols pollués par les hydrocarbures	18
---	----

Matériel et méthodes

1.Site de prélèvement	19
1.1.Etat de sol (observation a l'œil nu)	20
2.L'isolement de la microflore cultivable	21
2.1.Préparation des dilution décimale	21
2.2.Purification des souches bactériennes	21
3.Etude et optimisation de la dégradation du phénol	22
3.1. La culture minérale et .Dosage colorimétrie	22
3.1.1. La culture minérale et condition d'incubation	22
3.1. 2.Dosage colorimétrique	23
3.2. Teste de biodégradation du phénol (sélection des bactéries d'intérêt)	23
3.3.identification des souches bactériennes d'intérêt	23
.Aspect macroscopique et microscopique	23
Aspect macroscopique	23
.Aspect microscopique	23
Coloration de Gram	24
Identification biochimique	24
.La galerie biochimique miniaturisé API 20 ^E	24
Etude cinétique de la dégradation du phénol par des cultures uniques	25
Etude cinétique de la dégradation du phénol par des cultures mixtes	25
La Conservation des souches	26

Résultats et discussion

1.Test de biodégradation de phénol par les isolats bactériens	27
1.1Résultats de l'identification des bactéries capables de métaboliser le phénol	27
2..Etude morphologique	28
2.1.Aspect macroscopique et l'aspect microscopique des souches isolées	29
3.Caractéristiques biochimiques des bactéries isolées	30
L'identification des isolats dégradants le phénol	32
5.L'étude de la Cinétique de biodégradation de phénol	34
1.Les Cinétiques de la dégradation de phénol par les cultures bactériennes uniques	34
5.2. La Cinétique de biodégradation du phénol par les cultures mixtes	38
Discussion	39
Conclusion	42

Partie bibliographique

Annexes

Résumé

Introduction

Au cours des dernières décennies, l'augmentation rapide des populations et l'évolution de l'industrialisation ont entraîné des polluants environnementaux dans l'air, le sol et l'eau. (Sun et al., 2015).

La pollution, c'est la présence de toute substance polluante dans l'environnement. Ce qui provoque une perturbation des systèmes environnementaux lorsque ces systèmes peuvent cesser de remplir leur rôle naturel à la surface du globe (Kamali et al., 2021).

La pollution des milieux terrestres et aquatiques constitue un problème environnemental majeur parce que, du fait de l'échelle massive à laquelle elle intervient son impact sur la santé humaine et sur la biosphère est devenu très préoccupant. Les hydrocarbures sont les polluants organiques les plus fréquents, ce qui est compréhensible étant donné les quantités énormes utilisées pour la production d'énergie (**production mondiale de pétrole 1999**)

les composés organiques phénoliques présentent un grand problème, sont généralement présents dans les effluents émergents de diverses activités industrielles comme les dérivées pétrolières ; ceux-ci peuvent causer de graves problèmes écotoxicologiques et liés à la santé s'ils sont rejetés dans l'environnement approprié (Kamali et al., 2021) car sont des polluants ubiquistes et persistants dont certains posent de réels problèmes pour l'environnement et la santé publique.

Le phénol, avantage et inconvénient ou monohydroxybenzène, de masse molaire 94,11, est à température ambiante à 20°C, d'aiguille incolore, il est soluble dans nombreux solvants organiques, (éthanol notamment).

Le phénol utilisé en industrie des matières plastiques, et les fibres synthétiques, dans le raffinage de pétrole dans l'industrie pharmaceutique, ainsi, la fabrication des détergents.

De plus, la pollution par les phénols a également entraîné la diminution de la croissance et de la population des communautés microbiennes. Ces dernières, présentent des effets toxiques chez les animaux domestiques en dysfonctionnement de leur système biochimique (Yahaya et al., 2019), a également des effets toxiques sur les animaux terrestres et aquatiques. (Duan et al., 2018).

Un grand nombre de composés organiques naturels et synthétiques sont biodégradables par les micro-organismes dans le cadre de leur métabolisme normal pour tirent le carbone comme source d'énergie en rompant les liaisons chimiques et en transférant les électrons loin du polluant Les micro-organismes utilisent l'énergie produite à la suite du transfert

d'électrons avec la source de carbone pour la division et la continuité (Kulshreshtha et al., 2014).

D'autre part , des micro-organismes naturels définis capables de tolérer le phénol ont été largement utilisés comme nouvel outil de biodégradation pour dégrader le phénol hautement toxique et ses dérivés en composés moins toxiques ou inoffensifs (**Al Defieryet Reddy.,2014**).

Certains microorganisme est capable de métaboliser les dérivées phénoliques en culture seule, par exemple, les cyanobactéries représentent d'anciens procaryotes photosynthétiques , autotrophes , anaérobies, présent une fonction remarquable sur la biodégradation des hydrocarbures pétroliers(**Al-Hasan et al.,2001**), ainsi les bactéries gram-négatives telles que Burkholderiaspp. et les espèces deMoraxella(**Prakash et al. ,1996; Suresh et al.,2006; Vasanthara et al. 2017**).

Ce que nous permet d'étudier la cinétique et la capacité d'un nombre des bactéries à maintenir leur biodégradation d'un composé phénolique et la production de biomasse dans des conditions favorables (température, ph.etc.) , en culture unique et autre cultures mixtes.

Selon Bull, 1984, les chercheurs de l'époque pensaient que la culture pure pouvait être un modèle approprié pour les études scientifiques par rapport à la culture mixte et il était difficile de mener une analyse expérimentale à l'aide de cultures mixtes.

Les interactions synergiques conduit à la dégradation des polluants entre les membres des associations bactériennes mixtes (**Cerqueira et al., 2011**) et sa capacité à évoluer efficacement en fonction de sa condition environnementale (**Arnosti et al., 2016**) rend cette culture mixte technique un meilleur candidat à appliquer dans la biodégradation. Il a été affirmé que les intermédiaires du métabolisme catabolique d'une souche peuvent être d'avantage dégradés à l'aide d'une autre souche en raison de l'interaction synergique entre les membres des associations, ce qui se traduit par un métabolisme plus efficace et une dégradation complète (**Bhattacharya et al., 2015**).

Les principaux objectifs de ce travail :

- Isolement des souches d'intérêt qui dégradent le phénol.
- Etude de la cinétique de biodégradation de chaque souche de culture unique.

- Etude de la cinétique de biodégradation de culture mixte.

Ce mémoire est composé de deux parties, une partie de synthèse bibliographique présentant les informations essentielles sur la pollution environnementale par les dérivées pétrolières, la capacité de biodégradation de phénol par les microorganismes, et une seconde partie qui regroupe la méthodologie choisie pour la réalisation de ce travail ainsi que les principaux résultats, leur discussion et une conclusion générale avec des perspectives

Synthèse bibliographique

Chapitre 01 : La biodegradation de phénol par la microbiot des sols polluées

1. Définition de la pollution :

La pollution peut se définir comme une modification défavorable de l'équilibre naturel susceptible des ressources biologiques, ce que met en danger la santé humaine puis, la faune et la flore en danger (**Brigitte et al., 2003**). Cette modification résulte en totalité de l'action humaine.

Parmi les les pollutions les plus redoutables sur l'environnement, la pollution pétrolière qui relève à la fois de la pollution chimique et celle organique.

La présence des hydrocarbures généralement c'est de l'apport de matières ou de l'accumulation des polluants (**Brigitte et al., 2003**). Dont plusieurs provoquant des intoxications des organismes affectes en perturbant vitale pouvant entrainer la mort (**Ramade., 2000**).

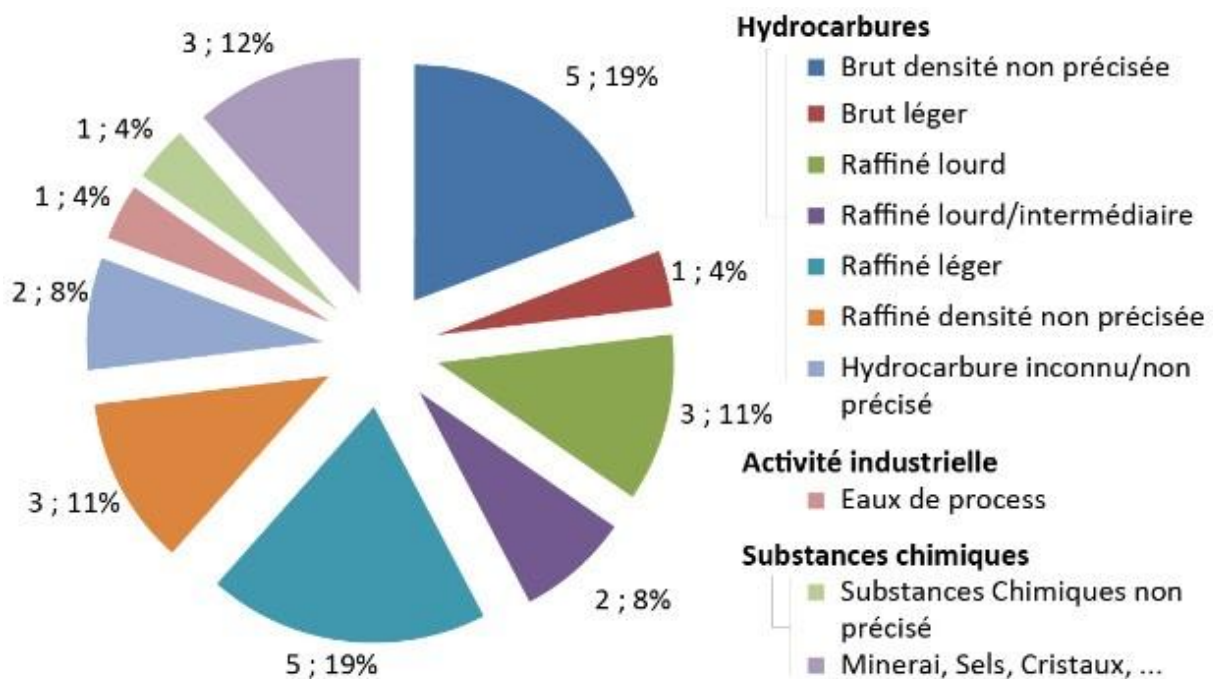


Figure 01 : principale contribution annuelle pour la pollution pétrolière mondiale 2019 (**cedre ,2019**)

2. Définition des hydrocarbures

Sont des composés organiques contenant seulement du carbone et de l'hydrogène et hautement insoluble dans l'eau, les hydrocarbures de faible poids moléculaire sont gazeux, tandis que ceux d'un poids moléculaire plus élevé sont liquides, ou solides, à la température ambiante (**Michael et John, 2007**). Le carbone et l'hydrogène peuvent former des molécules saturées, linéaires ou cycliques, et parmi les molécules cycliques, certaines

Chapitre 01 : La biodegradation de phénol par la microbiot des sols polluées

grâce à un type particulier instauration ont des propriétés particulières qui les font classer à part (Dali., 2018). On distingue donc trois types hydrocarbures:

1. Les hydrocarbures saturés à chaîne ouverte ou cyclique.
2. Les hydrocarbures insaturés à double ou triple liaison et qui peuvent aussi être cycliques Ouacycliques.
3. Les hydrocarbures aromatiques monocycliques ou polycycliques (Dali.,2018).

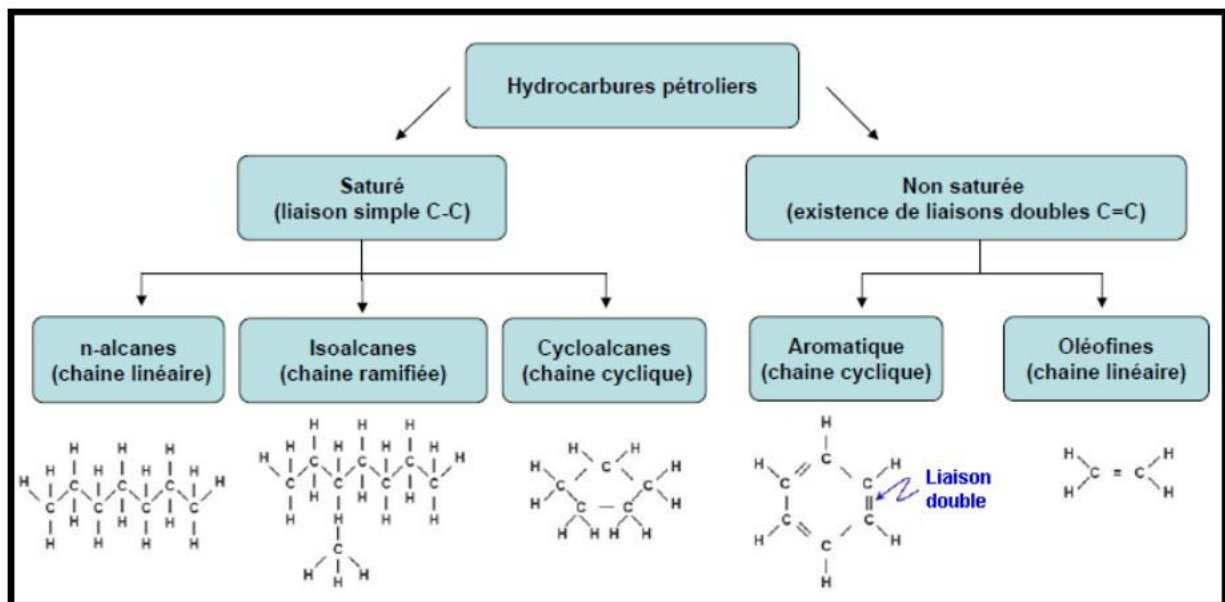


Figure 02 : Structure moléculaire de base des principaux hydrocarbures pétroliers(Colombano et al 2008)

Les hydrocarbures regroupent différents produits pétroliers (pétrole brut, pétrole raffiné, kérosène, essences, fuel, lubrifiants, huiles à moteurs (Jeannot et al., 2001). Les hydrocarbures constituent généralement 10% à 30% des hydrocarbures totaux du pétrole (Soltani., 2004). Les hydrocarbures déversés dans l'environnement subissent une série de transformations aboutissant à plus ou moins long terme à leur disparition totale ou partielle. Les transformations microbiennes par les microorganismes sont à elles seules à l'origine de la disparition de la majeure partie des hydrocarbures (Arris., 2008), car ces microorganismes, principalement les bactéries utilisent les hydrocarbures comme substrats de croissance (Scriban, 1999).

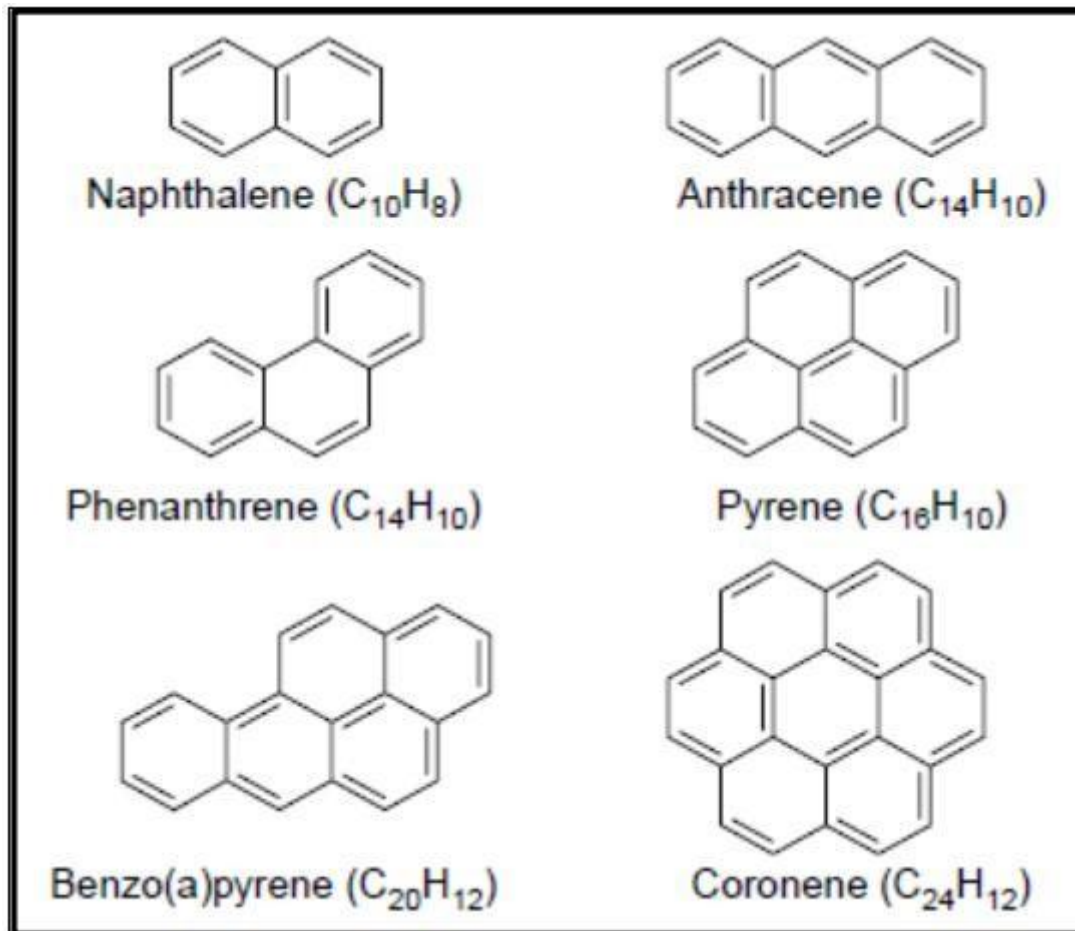


Figure 03 :Structure de quelques hydrocarbures aromatiques polycycliques abondants (HAP) dans l'environnement (Benchouk,2017)

2. 2.Impact des hydrocarbures sur l'environnement :

Les aspects les plus évidents sont les grandes catastrophes très médiatisées courir les pollutions par les hydrocarbures, 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 de la chaîne alimentaire c'est le phénomène de bioaccumulation avec le piégeage par les végétaux et les animaux des polluants ou de leurs produits de dégradation jusqu'à des teneurs toxicité (Soltani.,2004). Au niveau de la phase gazeuse dans le 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 (Dali., 2018).

3. Définition phénol :

Le phénol, un composé chimique inclus dans le groupe des hydrocarbures aromatiques, est également connu sous de nombreux noms tels que l'hydroxybenzène, l'acide

Chapitre 01 : La biodegradation de phénol par la microbiot des sols polluées

phénique, l'acidephénique, l'acide carbolique ou l'alcool phénolique. Généralement, la dégradation et l'oxydation des composés organiques polyaromatiques, y compris le benzène et les polymères, entraîneront la production de phénol (Naghanetal.,2015). Il a la formule structurelle de C₆H₅OH (Figure4) avec une composition en pourcentage de 76,57 % de carbone, 17 % d'oxygène et 6,43 % d'hydrogène et un poids moléculaire de 94,11 g/mol (Babich et Davis., 1981).. Cette substance cristalline incolore en forme d'aiguille a une odeur caractéristique, une nature corrosive et est considérablement soluble dans l'eau ainsi que dans les solvants organiques, y compris le pétrole, l'alcool, chloroforme, glycérol et éther (Mazukiet al.,2019)

Le phénol est fabriqué en tant qu'intermédiaire de la préparation d'autres produits chimiques et il peut être libéré comme sous-produit ou contaminant. et par les échappements des moteurs thermiques et la dégradation photochimique du benzène émettent aussi du phénol dans l'atmosphère. Il en est de même pour les usines de cokéfaction et de carbonisation à basse température, de la combustion du bois et du tabac le phénol est présent dans de nombreux végétaux. il est couramment utilisé comme un produit chimique pour diverses activités. dans le cadre d'un mélange dans le laboratoire.

A l'heure actuelle le phénol est généralement préparé par le procédé Hock qui consiste à oxyder l'isopropylbenzène par le dioxygène de l'air.

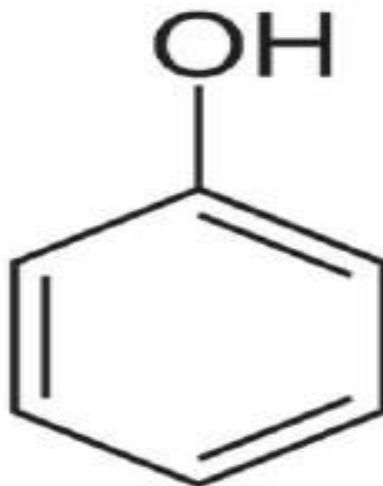


Figure 04: Structure chimique de phénol

Chapitre 01 : La biodegradation de phénol par la microbiot des sols polluées

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques des phénols.

Propriété	Phénol
Formule chimique	C ₆ H ₅ OH
Masse molaire	94,14g.mol ⁻¹
Solubilité dans l'eau (25°C)	87g.l ⁻¹
Point de fusion	43°C
Point d'ébullition	181,8°C
pKa	2 9,95

3.1. Effetstoxiques du phénol:

3.1.1. Effettoxiqnessurenvironnement:

Le phénol est considéré comme un polluant prioritaire. Les phénols synthétiques étant plus toxiques que ceux existant à l'état naturel. Les personnes manipulant du phénol doivent notamment éviter le contact cutané et l'inhalation de ces produits. Il pénètre rapidement dans l'organisme par toutes les voies. Les intoxications industrielles résultent de contact cutanés et d'exposition aux vapeurs, qui pénètrent dans l'organisme non seulement par voie pulmonaire mais également à travers la peau intacte (Arris., 2008.Agency., 2008).

le phénol comme intermédiaire dans plusieurs procédés de synthèse et de fabrication et parfois il est produit au cours de différentes réactions de transformation. Par conséquent, on le trouve dans les rejets des raffineries du pétrole, des industries de papetiers, des usines de fabrication de résines, de peintures, de textiles, de pesticides, cosmétiques, des industries pharmaceutiques,... etc. Il est trouvé même dans les cokeries et toutes les usines de transformation du charbon. Le rejet du phénol dans la nature, sans traitement et sans contrôle peut modifier les écosystèmes aquatiques et causer des dommages aux ressources précieuses. La faune et la flore sont les principales cibles de ces effluents. Le phénol est un produit répandu et nuisible à la vie aquatique. Il est très toxique dans l'eau, polluant du sol et conduit à de

Chapitre 01 : La biodegradation de phénol par la microbiot des sols polluées

nombreux effets indésirables sur l'environnement et sur la santé (KavilasniSubramaniam et al., 2020) .

3.1.2. Impact sur les eaux :

Dans l'eau, le phénol forme des solutions toxiques. En raison de sa forte toxicité, sa solubilité dans l'eau, le phénol dans la catégorie de risque de pollution de l'eau. Ce dernier est susceptible d'atteindre les sources d'eau potable en aval des rejets. Le phénol donne un goût désagréable même à faibles concentrations et des odeurs dans l'eau potable. Il peut avoir aussi des effets négatifs sur les différents processus biologiques et ce par accumulation. La bioaccumulation du phénol a été étudiée.. Il est prouvé qu'il peut également causer des dommages génétiques pour les poissons car ces derniers sont très sensibles . Les phénols chlorés aussi sont très toxiques pour les hommes et les animaux. En présence de chlore, le phénol forme des chlorophénols qui sont facilement absorbés par tractus gastro-intestinal provoquant une toxicité aiguë. Ils augmentent aussi la fréquence respiratoire, suivie de vomissements et de nausées. Même pour des concentrations aussi faibles de l'ordre de 0,1 mg /L, les chlorophénols produisent un goût désagréable lorsqu'ils sont mélangés avec de l'eau potable . La toxicité augmente avec le degré de chloration qui pourrait générer des composés de chlorophénols mutagènes et cancérigènes (KavilasniSubramaniam et al., 2020).

3.1.3. Impact sur le sol :

Dans le sol, le phénol subit une dégradation microbienne aérobie ou anaérobie, de sorte que l'effet d'accumulation reste limité. L'accumulation est fonction de la présence de minéraux argileux (forte affinité avec l'oxyde d'aluminium). Comme le phénol est soluble dans l'eau et modérément volatil, il est très mobile dans les sols. Par conséquent, le phénol peut être lessivé facilement des sols et ainsi contaminé la nappe phréatique. Le phénol a tendance à se biodégrader rapidement dans le sol et dans les sédiments. Les microorganismes aérobies autant qu'anaérobies peuvent utiliser le phénol comme substrat de croissance, bien que la décomposition dans les conditions aérobies soit plus rapide. Dans les plantes, malgré que le phénol est absorbé par les racines, il ne s'achemine pas vers les pousses mais joue un rôle dans la résistance aux dommages des plantes causées par les insectes.

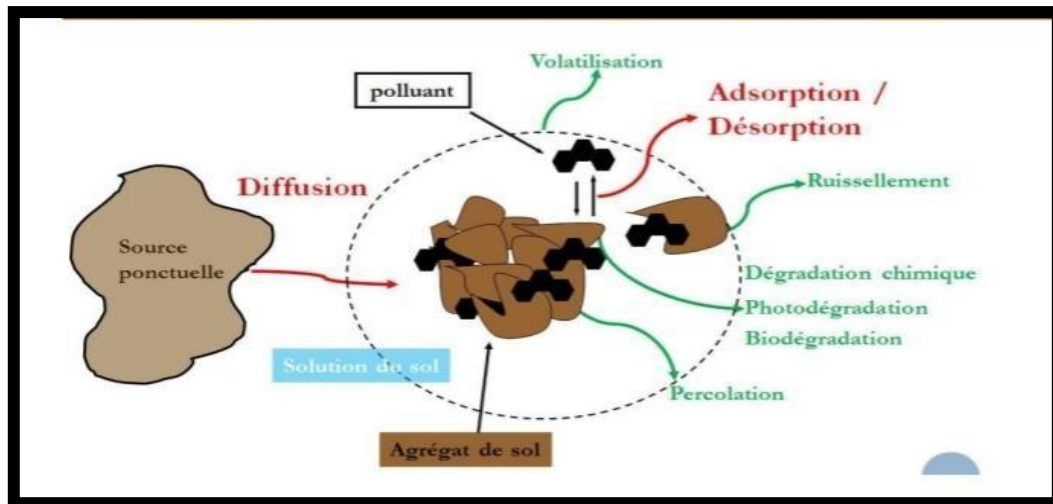


Figure 05: Devenir d'un polluant organique au niveau du sol (FokouMbogne, 2017)

3.1.4. Chez homme

L'exposition aiguë ou chronique au phénol peut entraîner des effets nocifs chez l'homme. Une exposition aiguë au phénol peut entraîner une irritation de la peau, un inconfort gastro-intestinal ainsi que des maux de tête.

La nature corrosive du phénol peut provoquer des brûlures chimiques au site de contact (Basha *et al.*, 2010). De plus, le phénol peut être très dangereux lorsqu'il entre en contact avec les yeux, car il peut provoquer une altération de la vision. Abussaud *et al.*, 2016 Étant donné que le phénol a un effet anesthésique local, une douleur minime ou nulle peut être ressentie au premier contact.

Les dommages cutanés causés par le phénol résultent de la coagulation liée à la réaction du phénol avec les acides aminés contenus dans la kératine de l'épiderme et le collagène de la peau interne. Une exposition répétée ou prolongée au phénol ou à ses vapeurs peut être toxique pour le système nerveux, le cœur, les reins et le foie, car il est facilement absorbé par la peau et les muqueuses (Pradeep *et al.*, 2015). La consommation de phénol peut entraîner un avortement et un arrêt accru du développement embryonnaire précoce (Renzy-Martin *et al.*, 2014).

3.1.5. Chez L'animal

En outre, le phénol a également des effets toxiques sur les animaux terrestres et aquatiques. (Duan *et al.*, 2018). L'inhalation de l'air avec des niveaux élevés de phénol peut causer des irritations des poumons, les expositions induisent des tremblements du muscle, une perte de

Chapitre 01 : La biodegradation de phénol par la microbiot des sols polluées

coordination, cette exposition a haute concentration à partir de l'atmosphère pour plusieurs semaines provoque de paralysies sévères altérations au cœur, foie, reins et pommons, et dans certain cas la mort (Agency., 2008).

4. L'adaptation des microorganismes aux xénobiotiques

De nombreuse agent polluant peuvent etretransformé à la fois par des réactions physiques ou chimiques et biologiques , tous fois décomposition et transformation sont généralement plus rapide dans des envirenements comportant une microflore que dans les envirenements stériles l'implification des micoorganismes dans la dégradation des polluants est indirectement établie l'existence d'une phase de latence correspondant a d'adaptation de la microflore dans laquelle provoquant une raccourcissement.

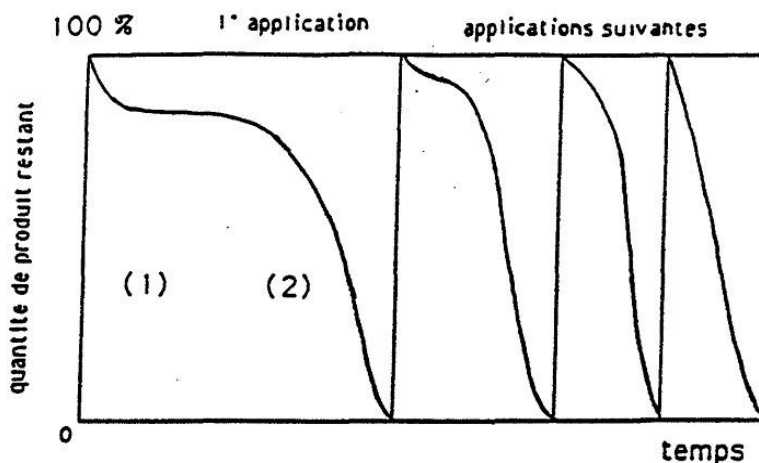


Figure 06: Mise en évidence des phénomènes d'adaptation des microorganismes dans les sols (Martins, 1993).

5. Les principaux processus de transformation des xénobiotiques

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

La biotransformation d'une molécule de polluant peut faire intervenir un ou plusieurs processus simultanément ou successivement et conduire à la formation de différents produits issus du métabolisme d'un ou plusieurs micro-organismes(Bollag et Liu.,1990).

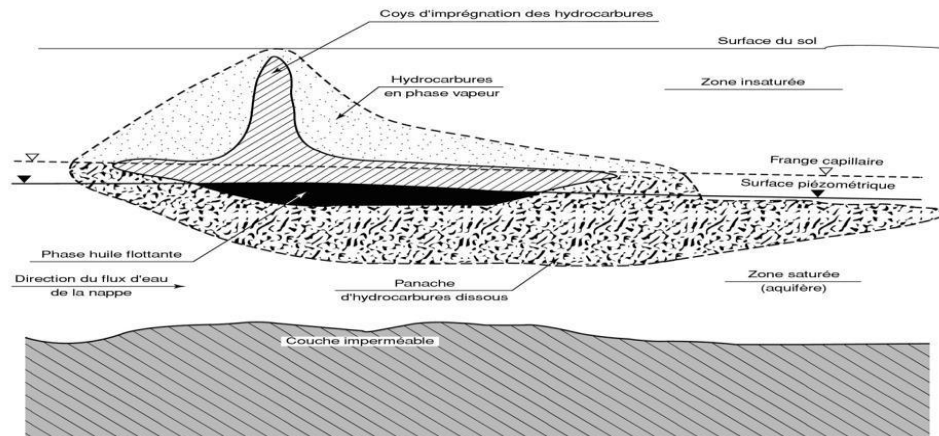


Figure 08 - Migration des hydrocarbures dans les sols (vandecasteele et al.,2002)

L'huile résiduelle constitue une source continue d'hydrocarbures susceptibles de contaminer la nappe sur de longues périodes.

La dégradation du phénol par les bactéries est possible via l'action de diverses enzymes telles que les oxygénases, les hydroxylases, les peroxydases, les tyrosinases et les oxydases (Nair et al., 2008).

6.1. La biodegradation anaérobie

La dégradation des composées organiques en milieu anaérobie est plus complexe (Picot.,2013). Les enzymes ne sont pas toujours spécifiques et sont capables de s'attaquer à des structures chimiques similaires aux substances naturelles. La spécificité des microorganismes est également très variable et ils s'attaquent souvent à une gamme plus ou moins large de composés organiques (Picot et al.,2013). Dans cette voie le phénol carboxylé en 4-hydroxybenzoate par décarboxylase qui est la première étape clé dans la voie anaérobie (Basha et al., 2010 ; Sarwade et Gawai, 2014). L'enzyme impliquée est le benzoate 4-hydroxy carboxylase. La dégradation anaérobie de plusieurs autres composés aromatiques a été démontrée qu'inclure une réaction de carboxylation. Les microorganismes capables de dégrader le phénol dans des conditions anaérobies étaient *Thaueraaromatica* et *Desulphobacteriumphenolicum* (Patil.,2014).

6.2. La biodégradation aérobie

La première étape du métabolisme aérobie est l'hydroxylation des phénols en catéchol par la phénol-hydroxylase, une enzyme dépendante du NAD(P)H. Cette enzyme incorpore un atome

Chapitre 01 : La biodegradation de phénol par la microbiot des sols polluées

d'oxygène dans le cycle aromatique pour former le catéchol qui subit alors un clivage du noyau par une dioxygénase . Le catéchol est dégradé par ortho- ou meta-fission en intermédiaires du métabolisme central . La fission initiale du noyau aromatique est catalysée par une enzyme de clivage ortho, la catéchol 1,2-dioxygénase ou par une enzyme de clivage meta, la catéchol 2,3dioxygénase .

Les catéchols sont donc clivés soit par orthofission (intradiol, c'est-à-dire par liaison carbone entre deux groupes hydroxyle, soit par meta-fission (diol supplémentaire, c'est-à-dire entre un des groupes hydroxyle et un carbone non hydroxylé) Après plusieurs étapes ultérieures, les produits des deux voies ortho et meta sont incorporés en tant qu'intermédiaires du cycle de Krebs. L'ortho-clivage est la voie la plus productive pour l'organisme car il implique moins de dépenses d'énergie. Les composés aromatiques sont généralement convertis en. Les intermédiaires dans la biodégradation des phénols sont le catéchol, le cis, cis-muconate, le β cétoadipate, le succinate et l'acétate .(Harzallahbasma.,2018).

Les organismes qui utilisent le phénol par voie aérobie sont *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Rhodococcus*(Hasan et Jabeen., 2015),*Streptococcus* sp. (Mohite et Jalgaonwala., 2011 in Patil, 2014),*Candidatropicalis*(Tuah et al., 2009 in Patli, 2014), *Acinetobacter*; *Alcaligenes* r,(Hasan et Jabeen., 2015)

La dégradation se fait aussi par la volatilisation en phase gazeuse des polluants à l'interface eau-air dans les sols, avec dégazage vers l'atmosphère et la transformation où la dégradation des HAP par voie chimique se fait soit par oxydation chimique, soit par photo-oxydation sous l'action des rayonnements ultraviolets (UV), de l'ozone, du peroxyde d'hydrogène, du dioxygène ou de radicaux $-OH$ (Letho et al., 2003).

6.2.1. Les enzymes impliquées dans la biodégradation aérobie :

6.2.1.1. Phénol-hydroxylases:

Sont des enzymes importantes, responsables de la monohydroxylation impliquées dans la biodégradation aérobie des composées phénoliques monoaromatiques.

phénol hydroxylase introduisent un atome d'oxygène dans le substrat correspondant, à la position *ortho* du cycle aromatique, hydroxylant ainsi le phénol en catéchol.(Bashaet al., 2010).

Chapitre 01 : La biodegradation de phénol par la microbiot des sols polluées

Dans le genre *Pseudomonas*, le gène structural (*phy A*) de la phénol-hydroxylase a été identifié dans un plasmide et le gène a été cloné et séquencé (**Hanson et Berliner, 2009**).

6.2.1.2. Catéchol dioxygénases: Deux classes de ces enzymes sont identifiées sur la base des mécanismes de clivage des cycles aromatiques:

Les extradiolsdioxygénases qui utilisent du Fe ou d'autres ions métalliques, pour cliver le noyau aromatique en *metaposition* par rapport aux groupes hydroxyles.

Les intradiolsdioxygénases: les dioxygénases intradiols, qui utilisent le Fe pour cliver le cycle aromatique en position *ortho* par rapport aux substituants hydroxyles.

7. Optimisation des conditions pour une biodégradation améliorée des phénols

La biodégradation des phénols par les microorganismes dépend d'un certain nombre de facteurs et il est tout à fait essentiel de comprendre comment ces facteurs affectent ce processus de dégradation. Chacun de ces facteurs devrait donc être optimisé pour que l'organisme choisi atteigne la dégradation maximale du composé phénolique sélectionné. L'optimisation de la concentration du substrat dans la biodégradation des phénols est particulièrement importante, car il est connu que la biodégradation des phénols par les cellules microbiennes est inhibée par les phénols eux-mêmes, en particulier à des concentrations élevées ($\geq 200\text{mg.l}^{-1}$). Bien que les phénols soient biodégradables à la fois en aérobiose et en anaérobiose, ils peuvent inhiber la croissance de microorganismes à des concentrations élevées, même pour les espèces qui peuvent les utiliser comme substrat de croissance (**Al-Khalid et El-Naas, 2012**).

L'amplitude de la transformation dépend de différents facteurs biotiques et abiotiques comme la présence de microorganismes compétents, La disponibilité d'accepteurs d'électrons nécessaires à l'action microbienne, La teneur en eau, Le potentiel hydrogène (pH), La température, La disponibilité de nutriments minéraux (azote (N), phosphore (P), potassium (K)), la concentration et la bio accessibilité des polluants. (**Tarayre, 2012**).

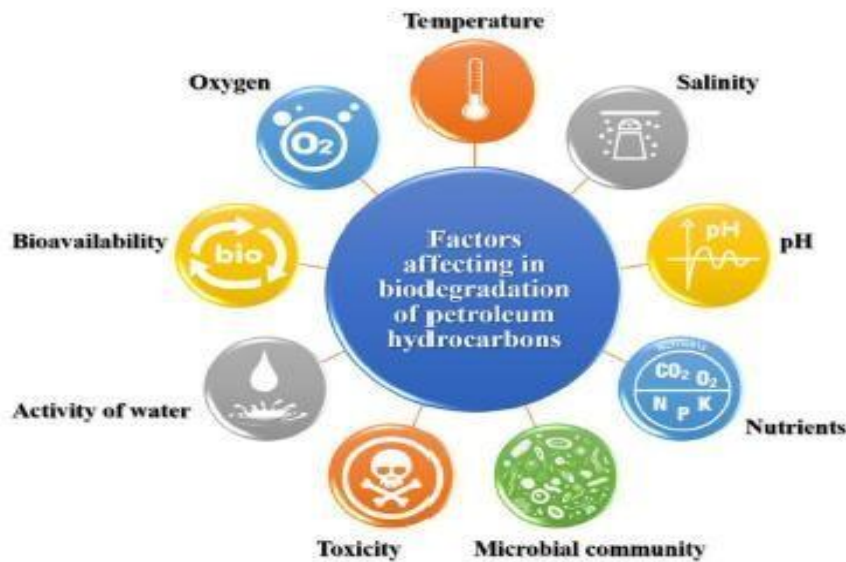


Figure09 :Les facteurs influence la biodégradation (hassanshahian et al.,2020)

8. Les microorganismes impliquent dans la biodégradation de phénol :

L'étude de la biodégradation des HAP a débuté par l'isolement et l'identification des cultures mixtes dégradantes. Il s'agissait d'identifier un panel de souches bactériennes pré-sélectionnées pour leurs capacités à dégrader le phénole et les souches bactériennes issues du sol contaminé par les dérivés pétroliers (Johnsen et al., 2005).

De nombreux microorganismes, se distinguent les organismes dégradateurs d'hydrocarbures obligatoires pour lesquels la présence d'hydrocarbures est obligatoire à leur survie et des organismes dégradateurs opportunistes capables d'utiliser les hydrocarbures comme source de carbone parmi d'autres sources possibles (Ortmann et Lu 2015).

Dans la littérature, plusieurs rapports peuvent être trouvés indiquant que des souches microbiennes telles *basilensis* (Blanco., 2019), *P. putida* et les souches *E. coli*.

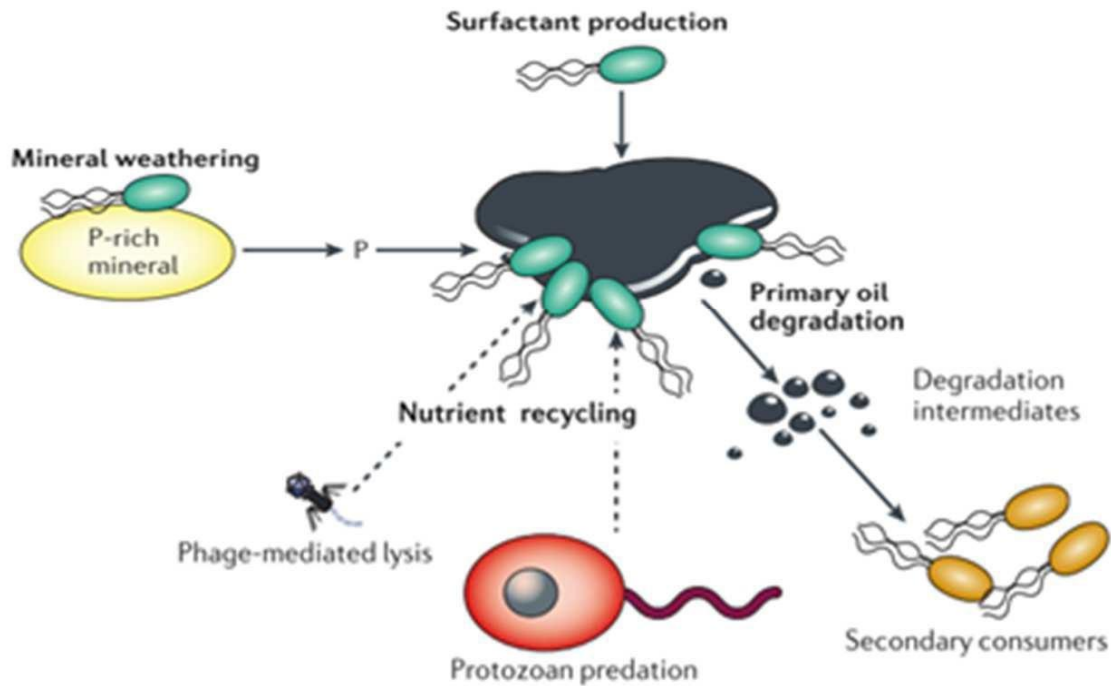


Figure 10 : Communauté microbienne impliquée dans la dégradation des hydrocarbures pétroliers
(Head *et al.*, 2006)

La biodégradation des hydrocarbures pétroliers implique plusieurs composants biologiques qui agissent de concert. Les bactéries dégradant le pétrole sont indiquées en vert. Les flèches pleines indiquent les flux de matières et les flèches en pointillés indiquent les interactions directes entre organismes .

9.Approches moléculaire:

L'hybridation ADN/ADN (southern blot), une technique très intéressante, permet d'explorer des gènes codant pour les enzymes avec cette activité de phénol hydroxylase, qui montre la similarité entre les séquences nucléotidiques d'ADN. Par conséquent, ces souches probablement possèdent les mêmes gènes de biodégradation .

Maintenant, la métagénomique sert à étudier l'écologie microbienne en permettant de mieux connaître la composition et les interactions synergiques dans un consortium bactérien présent dans l'environnement.

En ce qui concerne les espèces microbiennes, seulement 5% de la diversité microbienne serait connue à ce jour et donc 95% reste encore à explorer (Srivastava *et al.*, 2014).

Chapitre 01 : La biodegradation de phénol par la microbiot des sols polluées

La biologie moléculaire appliquées des stratégies ont permis la découverte et l'identification de nouvelles bactéries et de leurs gènes cataboliques impliqués dans la dégradation des xénobiotiques, puis, le utilisées dans la bioremédiation des sols polluées. **(HARZALLAH Besma., 2018).**

10. Traitement des sols pollués par les hydrocarbures

Il existe de nombreuses techniques de dépollution pour traiter les sols contaminés par des composés pétroliers, plus ou moins efficaces selon la nature du contaminant. Parmi ces techniques il y a l'incinération, le lavage des sols, L'oxydation chimique, l'extraction chimique, **(Roberts, 1998).**

Parmi les meilleures technologies de traiter les effluents fortement pollués, le système à boues activées a été largement mis en oeuvre pour le traitement les effluents industriels ,labioremédiation qui est basée sur l'utilisation des micro-organismes **(Dufresne, 2013)**, les traitement physique, thermique comme combustion catalytique, incinération, et des traitement biologique.

L'intérêt d'une méthode de traitement des sols pollués par les hydrocarbures se mesure à son efficacité, à son cout, à la facilité de sa mise en oeuvre, à la qualité du sol obtenu après traitement qu'à la facilité de retraitement des sous-produits générés **(Bekenniche, 2014).**

Partie expérimentale

1.Site de prélèvement

Le sol contaminé par les dérivés pétroliers utilisés pour cette étude et obtenu comme un échantillon composite provient d'une décharge propre au niveau d'une station de service Aiwaz située dans la wilaya de Laghouat La procédure de prélèvement et la préparation du sol est reporté par **(Rahbal.h.,etal 2020)**.

Les échantillons sont prélevés dans la couche superficielle du sol (0-20cm) où l'activité biologique est maximale dans l'horizon de surface et décroît plus au moins rapidement avec la profondeur **(Itab, 2002)**. La prise des échantillons est faite dans la même condition physiques (température ; humidité) .les échantillons sont récupéré aseptiquement a l'aide d'une spatule dans les flacons stériles qui sont acheminé jusqu'au laboratoire avec soin, puis ils ont été Conservés dans des flacons stériles à 4°C pour garder leur humidité car le séchage des échantillons de sol tue une partie de la microflore et rend impossible la détermination de la biomasse microbienne **(Itab, 2002)**.



Figure11 : Localisation des sites d'échantillonnage (Google maps 2021).



Etat de sol (observations a l'œil nu) :

La caractérisation des deux échantillons de sol porte essentiellement sur la couleur, la texture en raison de différence endroit de prélèvement et de la nature de polluant dans le but de cerner la nature et l'origine d'une pollution.



Figure 12: Photos des deux sites de prélèvement d'échantillonnage (originale.,2022).

Tableau 02 : Aspect des échantillons des sols prélevés (noir /odeur++) (marron /odeur+)

Sol	Couleur /l'odeur
Echantillon:SO1 	Marron/odeur (+).
Echantillon :ST02 	Noir/odeur (++).

2. Isolement de la flore bactérienne cultivable

2.1 Préparation des dilutions décimales (en cascade)

Les dilutions sont réalisées en eau physiologique stérile variant de 10^{-1} à 10^{-6} , la solution mères est constitué de 1g de sol dans 9ml d'eau physiologique et considéré comme étant la dilution 10^{-1} .

A partir de chaque dilution, un volume de 100 μ l est ensemencé sur la surface de milieu gélosé LB par étalement à l'aide d'un râteau (technique d'inondation) et incubée à 30°C pendant 24 heures.

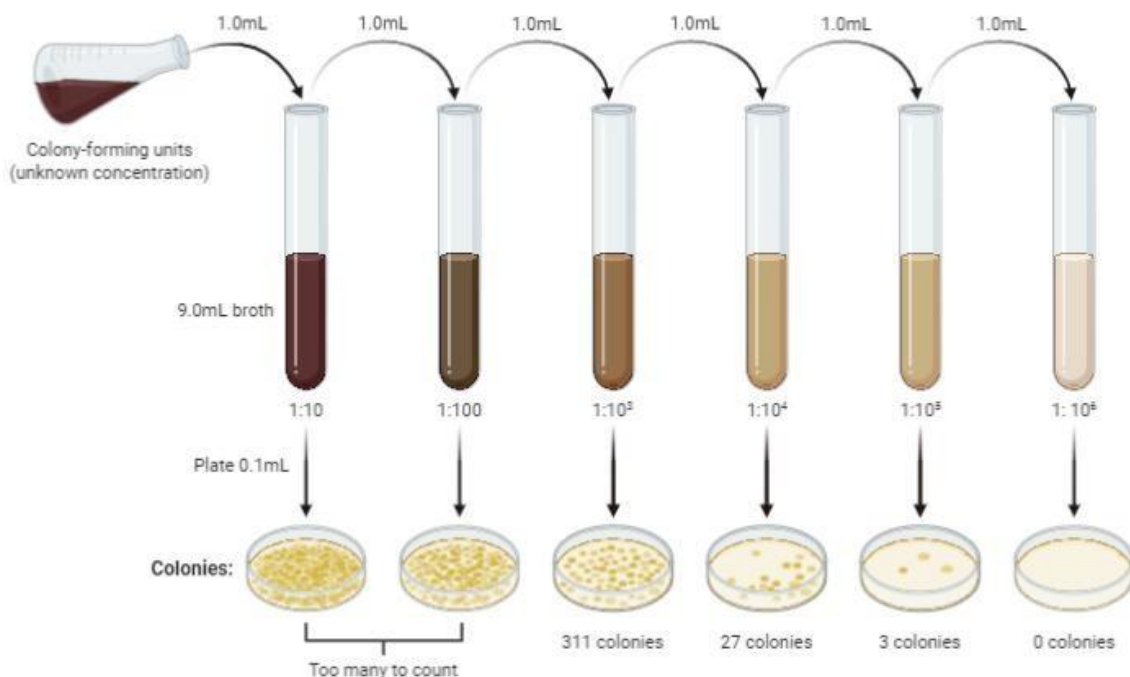


Figure 13: procédé de dilution de la solution du sol (AnupamaSapkota.,2022)

2.2 Purification de souches bactériennes

Un seul type de microorganisme ne peut pas être étudié dans une culture mélange. On a besoin d'une culture pure (population provenant d'une seule cellule) pour caractériser une espèce individuellement (Lansingetal.,2010). Les colonies suspectes ont été sélectionnées par rapport à leur aspect macroscopique.

La technique de purification procédée est la technique d'épuisement par quatre quadrants. Dans des boîtes coulées par le milieu LB, nous avons ensemencées à partir de chaque type de colonie des stries par cette technique, ensuite, les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 24h.

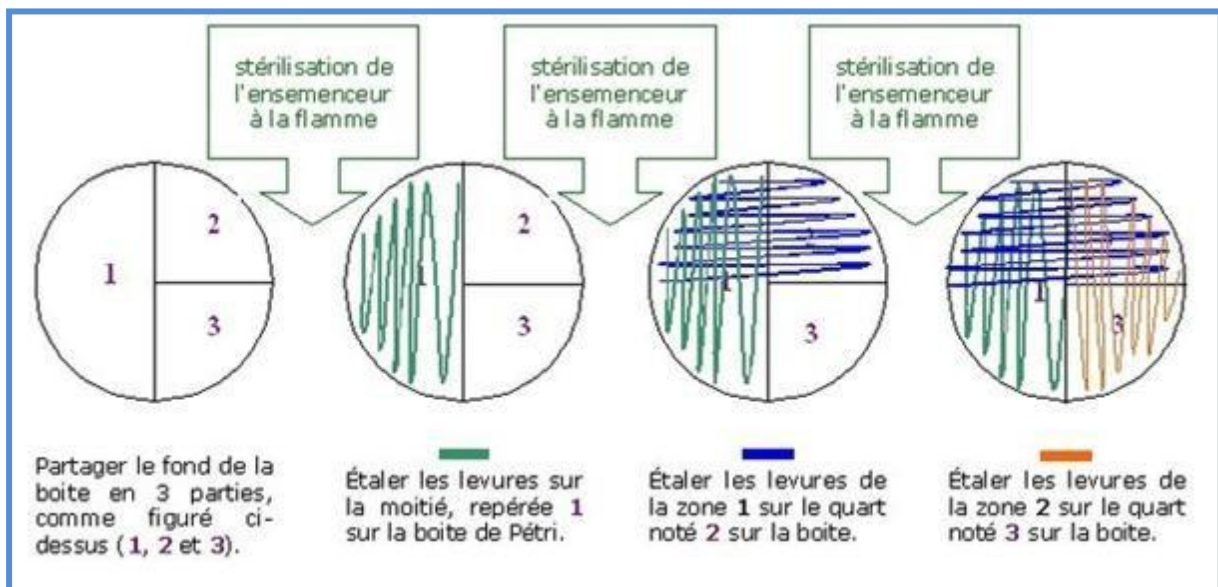


Figure 14 : Méthode d'ensemencement par la technique de quadrant(INRS, Santé et sécurité au travail)

3. Etude et optimisation de la dégradation de phénol

3.1 culture minérale et dosage colorimétrique de phénol

3.1.1.La culture minérale et conditions d'incubation:

A pour but de mettre le phénol comme la seule source de carbone pour la croissance microbienne (Bared et al., 2010), nous avons utilisé un milieu minérale (Yi Li et al., 2010) (figure 16) (Annexe 01) qui contient les sels minéraux nécessaires à la croissance des bactéries (Bared et al., 2010), le milieu est ajusté a un pH de 7 à 7,2 avec une solution de NaOH à 1N ou le HCl car c'est le pH optimal de la biodégradation (Daffri et Bousseboua, 2014).

Dans des flacons contenant un volume de 45 ml de milieu minérale autoclavé à 1B pendant 20 min, on ajoute aseptiquement un volume de phénol à partir d'une solution préparé à 1% (annexe 01) et la bactérie, les flacons sont incubés à 30 °C sans agitation mécanique (Jiang et al., 2007 ; Garcia et al., 1998 ; Calvario-Rivera et al., 2008). ces conditions physicochimiques sont maintenus pour toutes les cultures minérale de cette etudes.

3.1.2. Le dosage colorimétrique:

Dans un tube qui contient un volume de d'eau distillé, nous avons déposé un volume de 100 µl de la culture minérale dans un tube (après la centrifugation de la suspension pendant 5 minutes par 3500 rotation/min pour l'élimination de la biomasse microbienne) ensuite on dépose 200 µl de réactif de folin-ciocalteu. Après 3 minutes on a ajouté 600 µl de solution carbonate de calcium (CaCO₃).

Le dosage colorimétrique sert a dosé le phénol dans la culture minérale, les traces de phénol sont traduites par la formation d'une couleur bleu foncé a bleu claire (selon la concentration de phénol) et la mesure de cette intensité est estimé par la détermination de l'absorbance a une longueur d'onde de 765 nm au Spectrophotom-ètre UV-visible (OPTIMA).

3.2 Test de biodégradation du phénol (sélection des bactéries d'intérêt)

Dans cette etude nous avons présélectionné les souches aptes de dégrader le phénol par un test de biodégradation à partir des isolats déjà purifiés. Nous avons mis chaque souche en culture dans un milieu minérale avec une concentration de phénol pour mettre en évidence la capacité des bactéries à métaboliser le phénol comme seule source de carbone, les cultures ont été mises en incubation à 30°C pendant une semaine avec un flacon témoin qui ne contient pas de bactéries. Les resultats positives de dégradation sont traduits par l'absence de trace de phénol après dosage colorimétrique.

3.3 Identification des souches bactériennes d'intérêt

3.3.1 Aspect macroscopique et microscopique

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

3.3.1.1. 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, les éléments d'identification macroscopique sont : La forme des colonies, La chromogènes, L'élévation, L'opacité, La surface .

3.3.1.2.Aspect microscopique :

3.3.1.2.1. Coloration de Gram

Après la préparation d'un frottis sur une lame par la suspension bactérienne, nous avons réalisé notre coloration :

Le violet de Gentien : Toutes les bactéries sont colorées en violet.

Le lugol : Le mordantage : cette étape permet de stabiliser la couleur violette.

L'alcool : La décoloration : pénètre dans la bactérie, la coloration au violet de Gentiane disparaît, les bactéries décolorées sont des bactéries Gram-. Si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries Gram+.

La fuschine ou safranine : les bactéries à Gram – sont colorés en rose. (Kouadri, 2014).

- Observation microscopique à l'objectif 100 (Par l'ajout d'huile à immersion)

3.3.2 Identification biochimique

3.3.2.1.La galerie biochimique miniaturisé API 20E:

API 20 E est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés,

Elle comporte 20 micro tubes contenant des substrats déshydratés. Les micro tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

- Réincuber la galerie 24 heures (\pm 2 heures) de plus sans rajouter les réactifs.

- Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs .

• Identification :Elle est réalisée à partir de la base de données à l'aide du Catalogue Analytique :Rechercher le profil numérique dans la liste des profils.

3.4 Etude de la biodégradation de phénol par les cultures bactériennes pure

Dans la présente étude, nous avons utilisé nos souches bactériennes isolés a partir d'un sol contaminé par les dérivés pétrolière, le cas d'une station de service comme nous avons utilisée aussi 3 souches bactériennes isolé en 2019 a partir d'un sol contaminé par les hydrocarbures (le cas d'un gisement pétrolier situé a la région de hassimessaoud). Ces derniers ont été conservé à -20°C et elles sont subi une revivication sur milieu LB et un test de biodégradation

avant leur utilisation dans l'étude de la cinétique de biodégradation de phénol. Les 3 souches sont identifiées par le séquençage de gène 16S et identifiées comme la suite:

Tableau 03 : Caractéristique des souches bactériennes provenant d'un autre site contaminé:

La souche	identification	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
<i>S12</i>	<i>Brevudimonas</i> sp	Beiges Circulaire Bombée	Bacille Gram-
<i>S18</i>	<i>Pseudomonas</i> sp	Bombée Ovale Convexe	Coccobacille G -
<i>DOI</i>	<i>Bacillus</i> sp	Ronde	Bacille G +

Nous avons réalisé des cultures minérales pour chaque souche compétente bien purifiée (*A, G, H, S12, S18, DOI*).

Pour la cinétique de dégradation de phénol par les cultures bactériennes uniques nous utilisons une concentration de 44 mg/l de phénol dans un volume de 45 ml de milieu minérale déjà autoclavé, chaque bactérie est ensuite ajoutée à partir d'une culture solide dans des conditions d'asepsie stricte. Un flacon témoin est mis en culture dans les mêmes conditions sans l'ajout de la bactérie. Tous les flacons ont été mis en incubation. A T_0 (au moment de la mise en culture) on fait la mesure de la biomasse à 620 nm, et on mesure l'absorbance de phénol après dosage colorimétrique. Le suivi de développement de la biomasse et la dégradation de phénol est fait par mesure de ces deux éléments chaque 2 heures.

3.5 Etude de la biodégradation de phénol par les cultures bactériennes mixtes

Pour l'étude de la biodégradation de phénol par les cultures bactériennes mixtes, nous avons utilisé plusieurs combinaisons bactériennes en fixant les mêmes conditions de culture de l'étape précédente. nous avons sélectionnés trois cultures mixtes différentes :

Culture mixte N°1: *S18* & *H*.

Culture mixte N°2: *DOI* & *G*.

Culture mixte N°3: *S12* & *H* & *A*.

4. conservation des bactéries

Les souches isolées purifiées sont conservées dans des tubes à essai contenant de la gélose nutritive LB inclinée. Sur la pente de la gélose, une colonie de chaque souche à été ensemencé à l'aide d'une pipette pasteur par la méthode des stries puis incubées à 30C° pendant 24h. Les tubes dans lesquels il y a eu une croissance seront bouchés et conservés à 4C° pour une durée de 4 à 6 semaines. Afin de pouvoir toujours disposer de souches viables, la réactivation doit de faire tous les mois (**Marchal et Bourdon, 1982**).



Figure 15 : Conservation des souches dans des tubes inclinés.
(originale 2022)

Résultats et discussions

1. Test de biodégradation de phénol par les isolats bactériens:

Les résultats de la culture des bactéries isolées à partir du sol contaminé par les hydrocarbures dans un milieu minéral additionné de phénol 44 mg/L comme seule source de carbone et d'énergie, montrent que seulement six souches bactériennes sont capables de pousser dans ce milieu. Le dosage colorimétrique du phénol par la méthode de FolinCiocalteu montre que les bactéries transforment totalement le phénol qui se trouve dans le milieu minéral (Figure 16).

Le résultat de la métabolisation de phénol par ces isolats est révélé dans les tubes qui ont donné une transparence (pas de formation de tungstène bleu). Alors que les tubes qui ont montrés un virage de couleur bleu (présence de phénol) ont été considérés comme résultat négatif c'est-à-dire pas de dégradation.

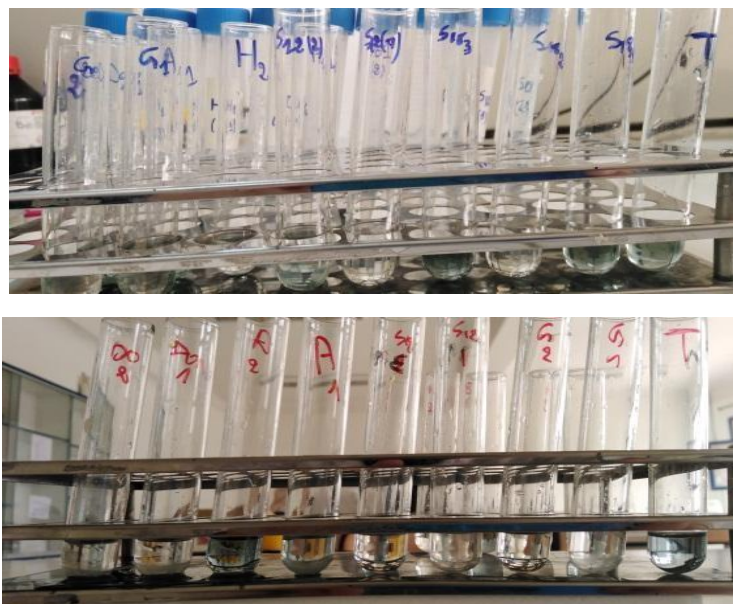


Figure 16 : Résultats du dosage colorimétrique de phénol des cultures unique après incubation des bactéries isolées à 37°C(*originale.,2022*)

1.1.Résultats de l'identification des bactéries capables de métaboliser le phénol :

Parmi les 32 souches bactériennes isolés à partir des sols contaminés, seulement les six isolats bactériennes et qui présentent un pouvoir de dégradation ont été identifié par leur aspect macro et microscopique, et leurs caractères biochimiques. Les isolats sélectionnés ont été nommé comme la suite: S12 /S18/DO1/H/G/A.

2. Etude morphologique :

2.1 Aspect macroscopique :

Après ensemencement des bactéries purifiées sur milieu LB, on a observé une variabilité au niveau de la couleur, de la forme et de surface.

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

Tableau 04 : Aspect macroscopique des colonies isolées.

Critère souche	Chromogénèse	Forme	Élévation	Contour	Opacité	Surface	consistance
<i>Serratia(G)</i>	Beiges	Circulaire	Bombée	Régulier	Opaque	Lisse	Crémeuse
<i>Pseudomonas</i>	Vert	Ovale	Convexe	Irrégulier	Translucide	Brillante	Muqueuse
<i>Bacillus</i>	Beige	Ronde	Convexe	Irrégulier	Opaque	Lisse	Crémeuse
<i>Pantoesp(H)</i>	Beige	ronde	convexe	régulière	translucide	lisse	crémeuse
<i>Brevundimonas sp</i>	Beige à crevette	Ovale	Convexe	Irrégulier	Translucide	Brillante	Muqueuse

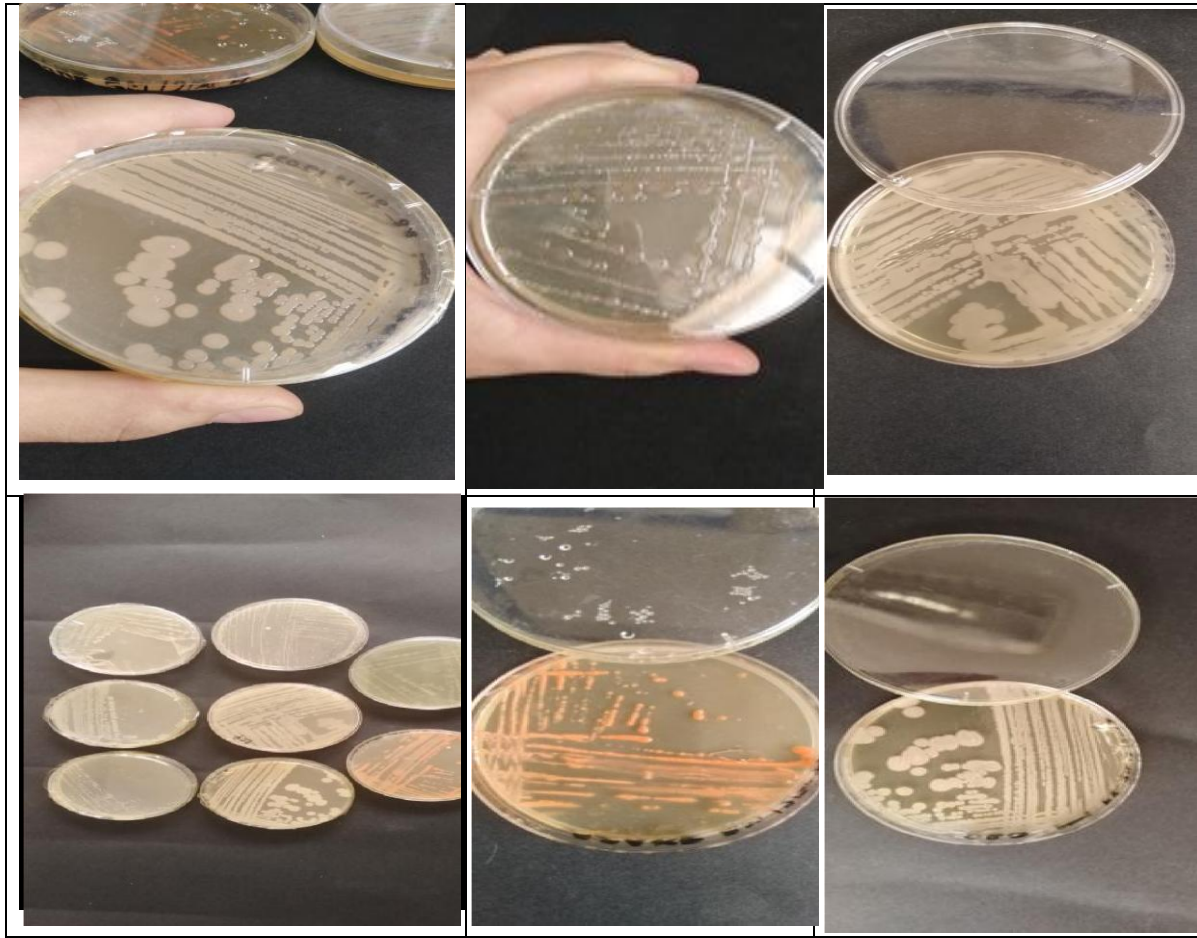


Figure 17 : Aspect macroscopique des isolats bactérienne sur le milieu LB (originale.,2022).

Aspect microscopique:

Les résultats de la coloration du Gram sont consignés dans le tableau. Les bactéries Isolées appartiennent aux groupes des bactéries à Gram (+) et à Gram (-) ayant des formes différentes : bacille, coccobacille ou cocci (Figure 18). Elles sont assemblées en différents arrangements soit en paire, en amas, en chainettes en grappe de raisin, ou même isolées.

Tableau 3 : Aspects microscopiques des souches isolées

Isolat	Gram	Forme
<i>Serratia(G)</i>	+	Bacille
<i>Pantoesp(H)</i>	+	Coccobacille
(A)	+	Cocci

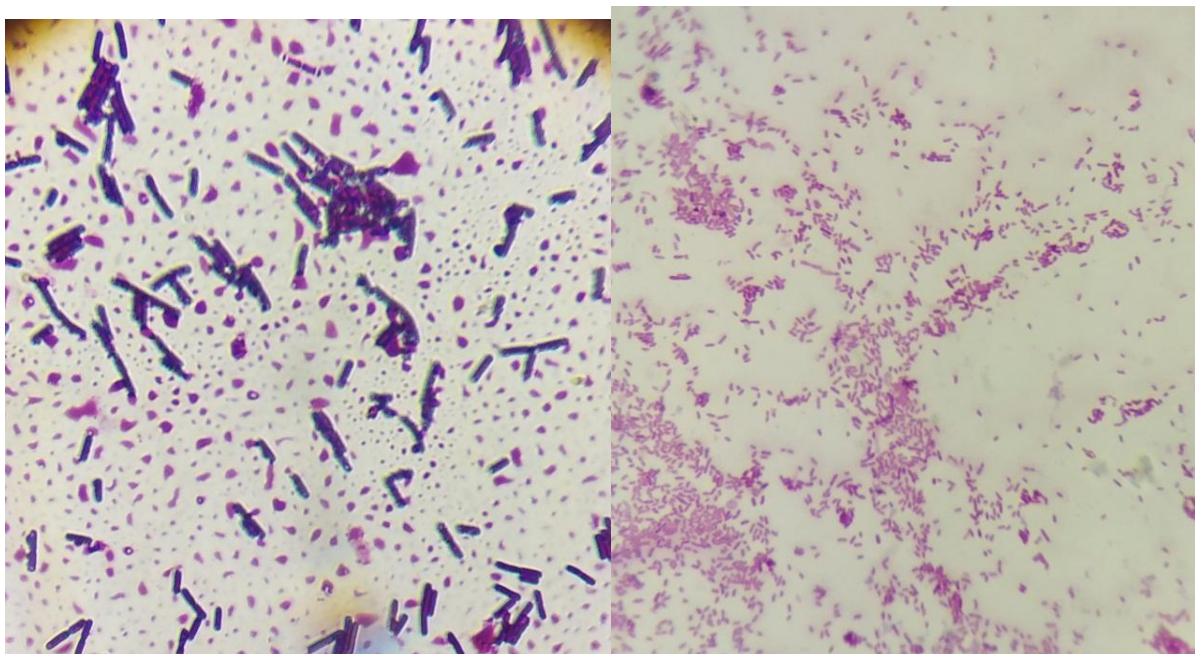


Figure 18 : observation microscopiques Coloration de Gram de quelques Souches isolées capables a dégradé le phénol (grossissement×100) (**originale.,2022**).

Les souches les plus fréquemment décrites dans la biodégradation des hydrocarbures appartiennent aux genres de Gram positif. D'autres souches Gram négatives ont la capacité de dégradation des hydrocarbures assez large (**Vandercastele., 2005 ; Boudershem., 2011**).

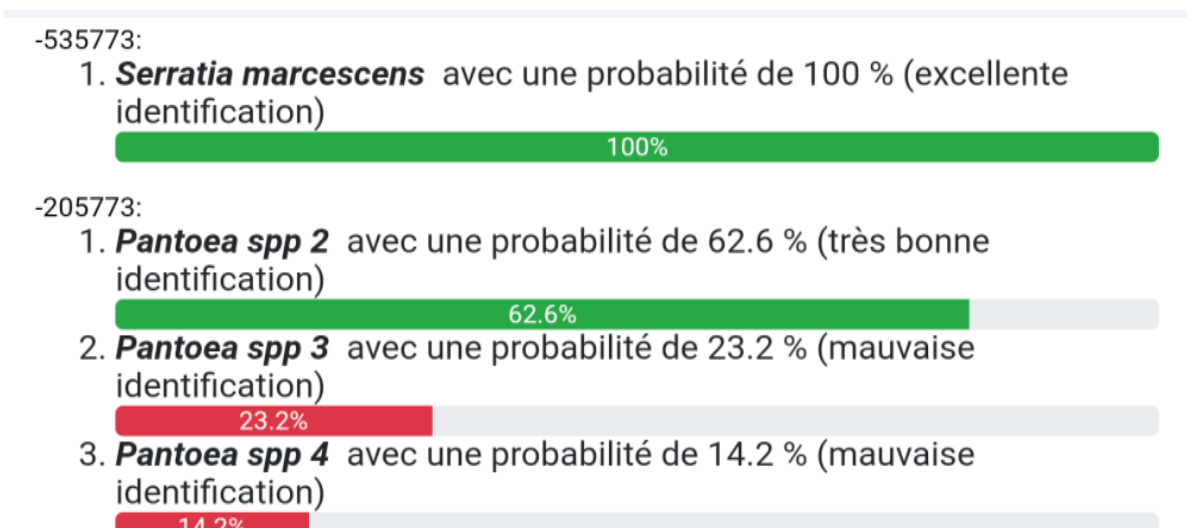
3.Caractéristiques biochimiques des bactéries:

Les résultats des tests biochimiques effectués sur les isolats bactériens sont regroupés dans le tableau suivant.

Tableau 04 : Résultats des tests biochimiques des isolats bactériens

Les tests biochimiques		Le résultat	
		La soucheH	La soucheG
Test			
1.	ARA	-	+
2.	ONPG	-	-
3.	ADH	-	+
4.	LCD	-	+
5.	ODC	+	+
6.	CIT	-	-
7.	H ₂ S	-	-
8.	UREE	:	:
9.	TDA	:	:
10.	IND	-	+
11.	VP	+	-
12.	GEL	-	+
13.	GLU	+	+
14.	MAN	+	+
15.	INO	-	+
16.	SOR	-	+
17.	RHA	+	+
18.	SAC	-	+
19.	MEL	-	+
20.	AMY Oxydase catalase	+	+
		-	-
		+	+

Figure 19 : Le pourcentage d'homologie des résultats des test biochimiques des souches G et H (base de donné la galerie API 20^Ebiomerieux France)



Selon le pourcentage d'homologie donné par la base de données du système API 20^E, le code numérique: 205773 de l'isolat (H) est correspondant respectivement à *Pantoea spp2* avec 62% de confiance, à *Pantoeaspp3* avec 23.2% de confiance, et à *Pantoea spp4* avec 14 % de confiance.

L'isolat (G) a été identifié comme *Serratiamarcescens* avec une excellente identification avec un pourcentage de 100 % d'homologie (code 535773).

4.L'identification des isolats dégradants le phénol :

L'identification biochimique a pu être réalisée à l'échelle du genre et de la famille. En effet, parmi les six microorganismes isolées, nous avons pu affilier les isolats selon Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Brenner et al, 2009; De Vos et al., 2009) comme appartenant aux genres suivants:

Pantoeasp

La souche (H) est rattachée à l'espèce *Pantoeasp* une bactérie à Gram négatif. Elle se présente sous forme de bacilles droits mesurant de 0,5 à 1,0 µm de large et de 1,0 à 3,0 µm de long. La plupart des souches sont mobiles à flagelles péritriches. La température optimale de croissance est de 30°C. Les colonies sur milieu gélatiné LB sont lisses, translucides, plus ou moins convexes avec bord entier et peuvent être pigmentées en jaune. Elles sont anaérobies facultative, à oxydase négative et catalase positive. Le D-glucose et d'autres hydrates de carbone sont catabolisés avec production d'acides, mais pas production de gaz. Les souches des espèces appartenant à *Pantoeasp* sont capables de tolérer et éliminer le phénol que se trouvent couramment dans les sols pollués ils ont impliquées dans la détoxification du phénol ; bien que dans une étude récente (Dastager et al., 2009) décrit pour la première fois qu'une souche de *Pantoeasp* a la capacité d'éliminer de fortes concentrations de phénol.

Serratiamarcescens

D'après leur aspect microscopique et leurs caractères biochimiques, la souche (G) est rattachée au genre de *Serratia*. Sont des bactéries à Gram négatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* capable de dégrader le phénol. Cette souche est d'une forme 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 (H₂S). Il s'agit donc d'une bactérie du genre *Serratia* (Washington, Winn et al., 2005).

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

Souche A

Est un isolat bactérien non identifié qui est caractérisé par des colonies beige lisse et brillante avec un contour régulier et des formes cellulaires de type cocci à gram positive, catalase positive et oxydase négative.

Caractères des souches bactériennes identifiées et utilisées dans cette étude

***Brevundimonas* sp**

La souche S12 est identifiée *Brevundimonas* sp. Selon Seger et al 1994, Le genre *Brevundimonas* sont des bacilles à gram négative appartient à la famille de *Caulobacteraceae*, classe d'*Alphaprotéobactérie*, phylum de *Pseudomonadota*. Alors, Ce sont des bacilles aérobies gram négatifs avec des cellules apparaissant sous forme de bâtonnets minces droits lors de la coloration de Gram. Ils sont positifs à l'oxydase et donnent des résultats variables pour la catalase (généralement positive). Les espèces de *Brevundimonas* sp sont omniprésentes dans l'environnement et certains clones ont été récupérés à partir de sols contaminés par des hydrocarbures. Le genre est connu pour la dégradation d'une variété de contaminants phénoliques et certaines de ses espèces peuvent utiliser le carburant diesel comme seule source de carbone et d'énergie. Certaines espèces ont été associées à une augmentation du

potentiel et de l'activité de dégradation des hydrocarbures poly aromatiques (Alejandro Farías, 2022)

***Pseudomonas* sp**

La souche (S18) est le genre *Pseudomonas* sont des *protéobactéries* est classifiées sous la classe de *Gamma protéobactéries*, la classe des *Pseudomonadaceae* (Bergey's manual of systématique), identifiées *Pseudomonas* sp sont des bactéries qui donnent des colonies translucides lisses et brillantes et donnent une pigmentation verte sur milieu LB, avec une forme coccobacilles (Figure 18), isolées ou en amas avec les caractéristiques suivantes : Gram

négatif, oxydase positive et catalase positive (Madigan et Martinko.,2010 ; Singleton., 1999).

Leurs bases physiologiques et génétiques reliées à la dégradation des phénols ont été décrites par de nombreux chercheurs (Chandana et Sridevi.,2009).

Bacillus sp

La souche (DO1) Cette Genre des bactéries faire partie de l'embranchement des *Firmicutes*, et la famille de *Bacillaceae*(Ehrenberg,1835), Il est affiliée au genre *Bacillus*spen raison de leur morphologie de forme de bacille, Gram positif, et leur séquence de gène 16S. Ce sont des bactéries sporulé, catalase positive, oxydase négative, elle oxyde le glucose, citrate perméase positive, ONPG négative, mobile, aérobie strict, la souche a été affiliée au genre *Bacillus*, espèce non identifié (Lotfabad et al., 2009).

Les Cinétiques de la dégradation de phénol par les cultures bactériennes unique

5.La Cinétique de biodégradation

5.1.Les Cinétiques de la dégradation de phénol par les cultures bactériennes uniques

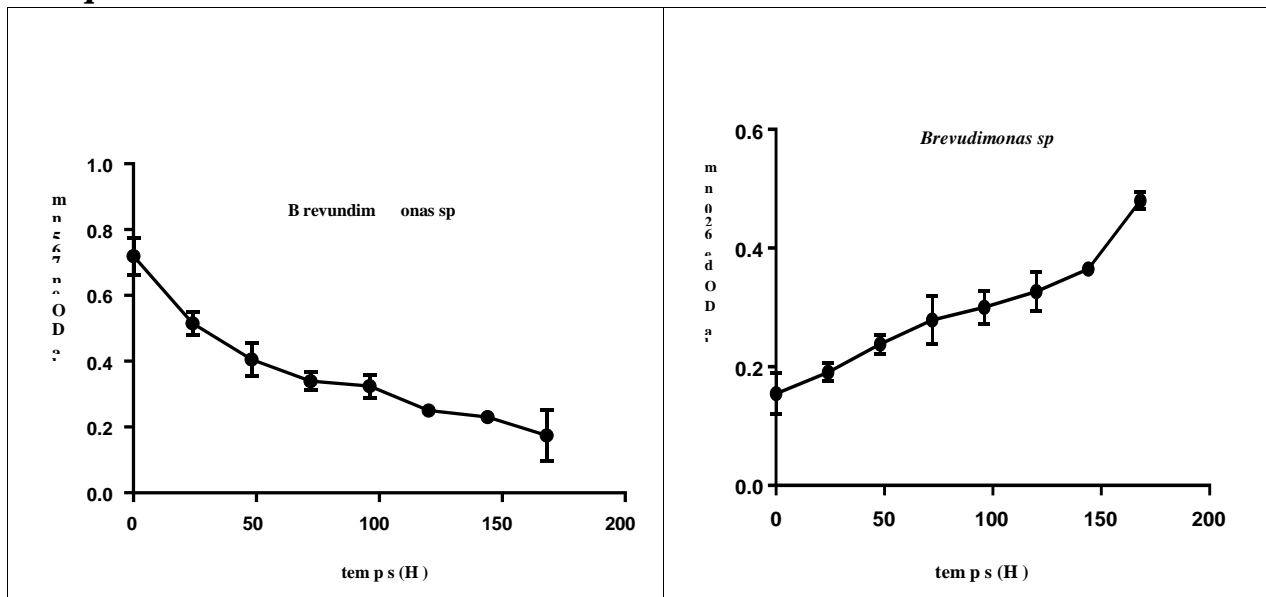


Figure 20:La Cinétique de biodégradation du phénol par la souche *Brevudimonas*spet la production de la biomasse au cours de temp (h).

L'évaluation de potentielle de la biodégradation de phénol par les isolats du microbiote des sols pollués par les huiles pétrolières, mise en culture discontinue (batch) dans un milieu minérale avec une concentration initiale de 44mg/L de phénol.

La figure représente la cinétique de dégradation de phénol par *Brevudimonassp* qui métabolise le phénol parfaitement au cours du temps et cette métabolisation est liée avec un développement important d'une biomasse microbienne de cette dernière. La diminution de la concentration de phénol est corrélée négativement avec l'augmentation de la biomasse (coefficient de corrélation = 0,005). Cette bactérie dégrade 50% de phénol en 50 h et à 90 % de concentration initiale de phénol en presque 160 h. nous n'avons pas marqué une dégradation complète de phénol il y avait un arrêt de croissance au bout de 170h.

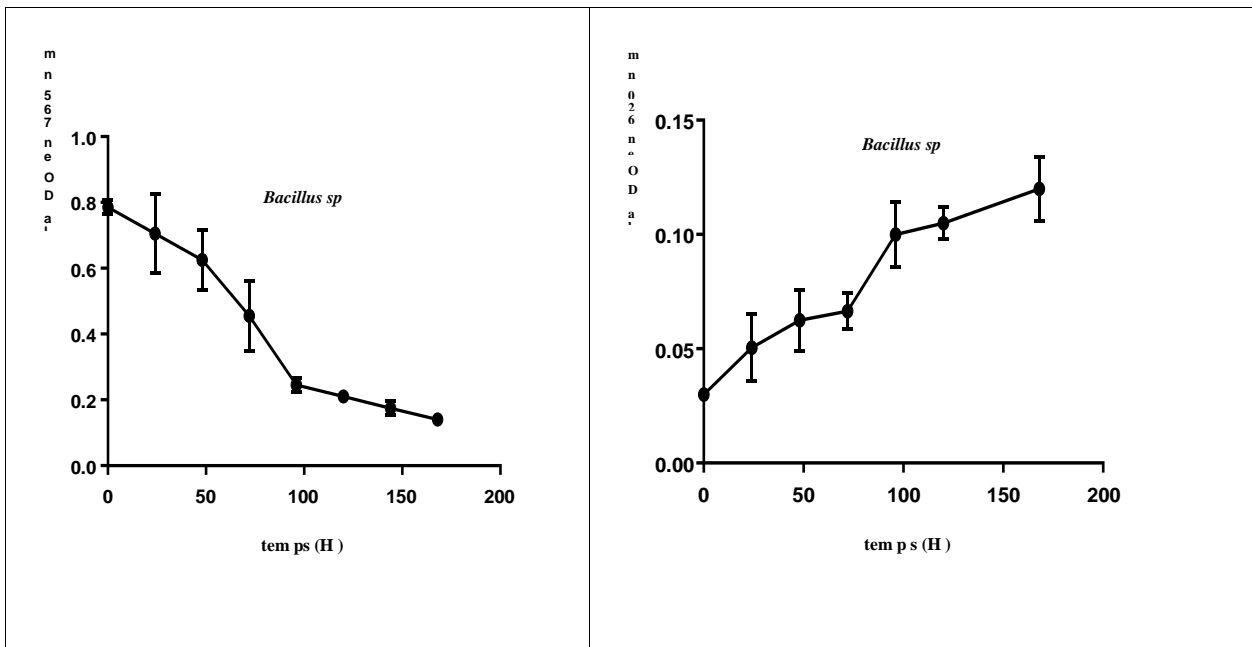


Figure 21 : La Cinétique de biodégradation du phénol par la souche *Bacillus sp* et la production de la biomasse au cours de temps (h).

les graphes montrent que cette bactérie utilise le phénol comme source de carbone et d'énergie pour leur croissance, ou on observe qu'il existe une biodégradation liée fortement à l'accroissement progressive de la biomasse. Cette bactérie dégrade 50% de phénol en 80 h (coefficient de corrélation = 0,0047).

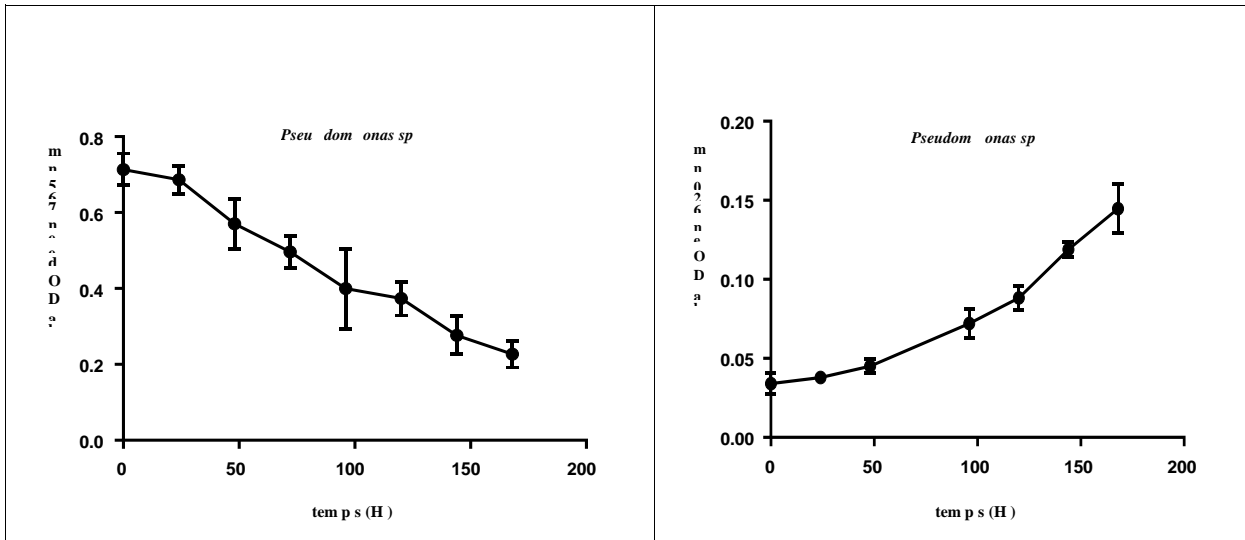


Figure 22 :La Cinétique de biodégradation du phénol par la souche *Pseudomonas spet* la production de la biomasse au cours de temps (h).

La souche *Pseudomonas sp* est capable de dégradée le phénol comme il est signalée dans la figure 23 et de produire une biomasse bactérienne importante. Cette bactérie dégrade 50 % de la concentration initiale de phénol dans un temps marqué 100 h. la concentration initiale de phénol est presque épuisée au bout de 160 h.

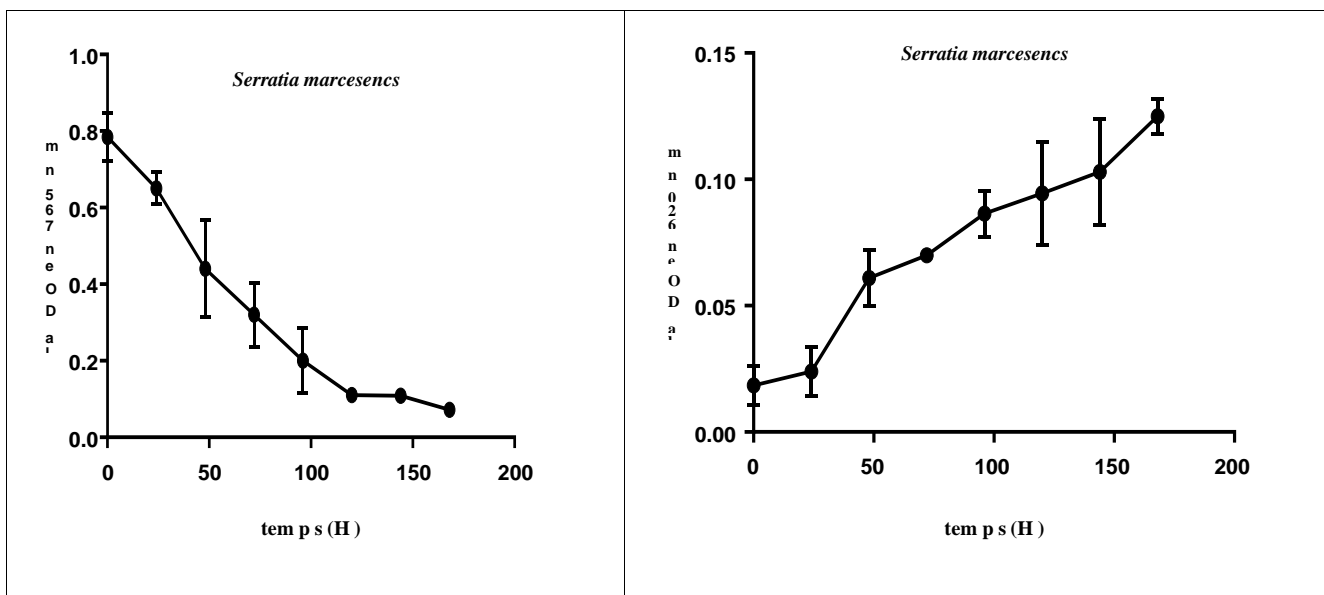


Figure 23: La Cinétique de biodégradation du phénol par la souche *Serratiamarcesens* et la production de la biomasse au cours de temps (h).

La figure présente une baisse de densité optique qui correspond aux concentrations de phénol, rapporte à une croissance bactérienne plus au moins rapide. cette bactérie dégrade 50% de phénol en 60 h.

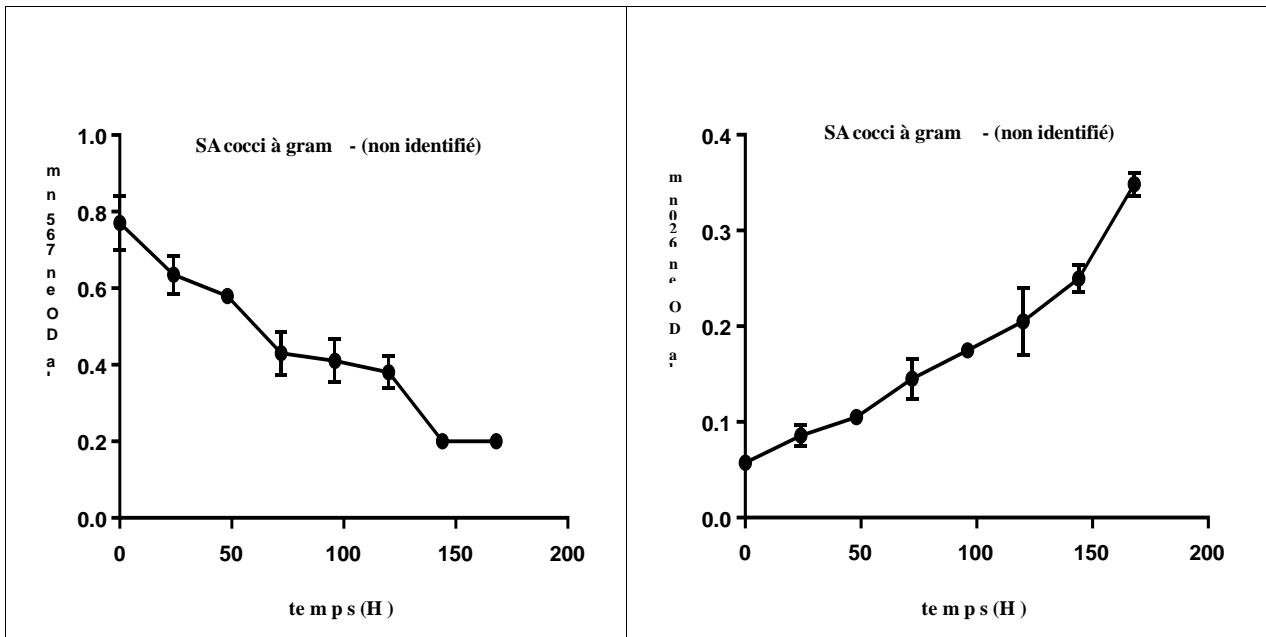


Figure 24: La Cinétique de biodégradation du phénol par la souche A Cocci à gram - et la production de la biomasse au cours de temps (h).

les graphes désigne l'aptitude de biodégradation de phénol par la souche A, ou on remarque qu'il y a une augmentation cellulaire au cours de temps (H) et une dégradation de phénol en parallèle, cette bactérie dégrade 50 % de phénol en 70 h.

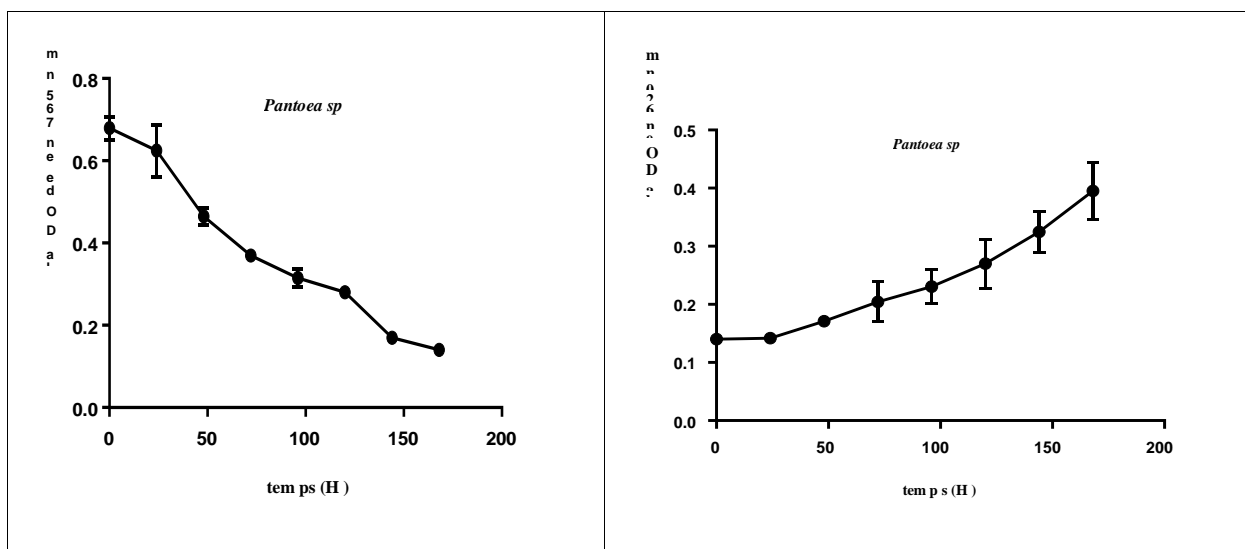


Figure 25: de biodégradation du phénol par la souche *Pantoeaspla* la production de la biomasse au cours de temp (h).

pantoea spp2 appartient à l'ordre des Enterobacteriales, sous le famille des Erwiniaceae (Gavini et al.,1989) la figure établir la corrélation existe entre L'évaluation de la DO de phénol et l'augmentation de la biomasse. Cette bactérie dégrade 50 % de phénol en 60 h.

5.2 Etude de la dégradation de phénol par des cultures bactériennes mixtes :

Les cultures mixte sont des combinaisons bactériennes mise en culture dans un milieu minérale in batch, incubées avec les mêmes conditions avec les cultures unique, et toujours avec une concentration initiale de 44 mg /L de phénol.

Chaque culture présent un ensemble des bactéries qui ont été choisi aléatoirement pour

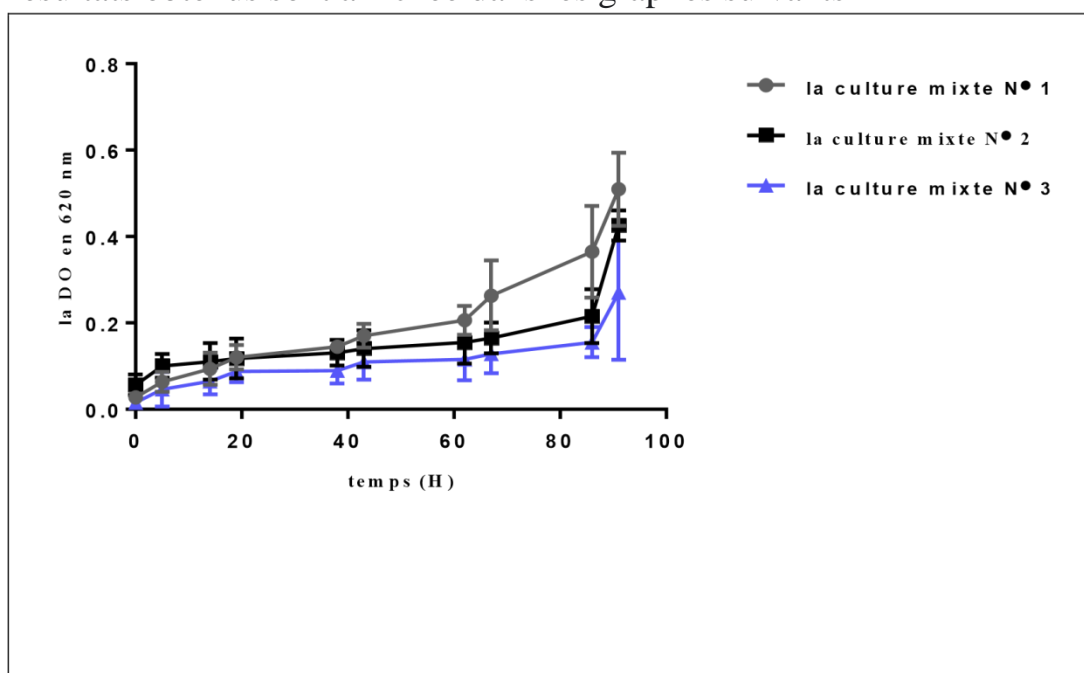
Evaluer leur pouvoir de dégradation de phénol et déterminer la meilleure combinaison bactérienne de dégrader ce dernier.

La culture N°1 est composé de *Pseudomonas sp* et *Pantoeasp 2*. La

culture N°2 comporte de *Brevundimonas sp*, *Serratiamarscecens*.

culture N°3 inclue les souches *Bacillus sp*, *Pantoeasp*, A et la souche a Cocci gram négative non identifiée.

Les résultats obtenus sont affichée dans les graphes suivants



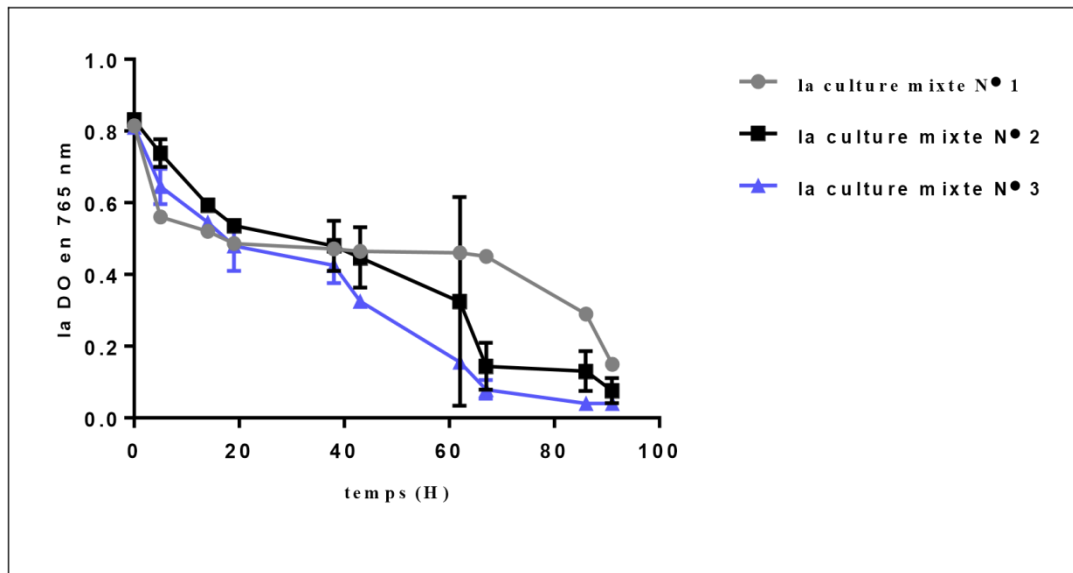


Figure 26: La Cinétique de biodégradation du phénol par les cultures mixtes et la production de la biomasse au cours de temps (h).

Toutes les cultures mixtes présentent des résultats similaires, il existe une forte assimilation de phénol et une production considérable de biomasse.

Nous observons que les cultures mixtes prennent la moitié du temps de dégradation de phénol par rapport aux cultures uniques. Un taux moindre de dégradation que les bactéries en culture unique. La culture n°1 dégrade 50 % de phénol en 70 h, la deuxième dégrade 50% de phénol en 50h, puis la troisième culture capable d'absorber le 50% de phénol en 45 h, et la dégradation presque complète dans une courte période (tableau 05).

Discussion

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer le potentiel des cultures mixtes par rapport aux cultures uniques dans la dégradation de phénol.

Le genre *Brevundimonas*, sont omniprésentes dans l'environnement, et certains clones ont été récupérés à partir de sols contaminés par des hydrocarbures (Macaulay, et Rees., 2014).

Nos résultats sont en accord avec plusieurs auteurs, qui ont aussi utilisé des souches du même genre.

Certaines espèces ont été associées à une augmentation du potentiel et de l'activité de dégradation des hydrocarbures polycycliques aromatiques (Viñas., et al 2005),

Pseudomonas spont un potentiel de dégradation très élevée, il sont considéré par cette aspect comme les espèces bactériennes les plus efficace de la bioremédiation des phénol, elle sont capable d'assimiler jusqu'au 85 % de 2600mg/l de phénol en 150 h (Afzal et al., 2007)

Le espèces de *Brevundimonas*, connu pour la dégradation d'une variété de contaminants phénoliques (Wang, et al., 2014).

Une étude montre qu'une souche bactérienne nommé *Serratiamarscecens* est capable d'utiliser le phénol comme seule source de carbone et qui a été isolée des échantillons de sol, collectés à proximité d'une usine de traitement des eaux usées industrielles d'une unité de fabrication de phénol. Cette bactérie est capable de dégrader le composé phénolique hautement toxique à une concentration optimale de 2500 mgL⁻¹ en 120 h à environ un pH neutre de 8 (Atun Roychoudhury.,2018)

Khan et al.,2016 ont identifié des souches de *Brevundimonas diminuta* capables de dégrader significativement les hydrocarbures aliphatiques, aromatiques et polycycliques à chaînes courtes et longues.

Aussi, Felshia et al. 2017, ont identifié des souches de *Bacillus licheniformis* qui démontrent une dégradation du phénol jusqu'à 2000 mg L⁻¹

Serratiamarscecens est capable de dégrader le composé phénolique hautement toxique à une concentration optimale de 2500mg L⁻¹ à 120 h, un pH neutre de 8.

Il n'a été documenté que les souches de *Pantoeasp* présente une activité de biodégradation sur divers polluants chimiques du sol et de l'eau, y compris les polluants toxiques.

Pseudomonas agglomerans empêche la pénétration de contaminants industriels nocifs dans les parties plus profondes du sol par la formation de biofilm. Ainsi, cette bactérie apparaît comme un bioremédiateur précieux qui, dans certains cas, peut être acquis comme une forme d'énergie bon marché. (Dutkiewicz, J. et al 2016).

Aussi, différentes études ont démontré la capacité de certaines espèces de *Bacillus sp* à former des consortiums bactériens capables de dégrader l'huile (Reyes et al., 2018). les résidus d'huiles lubrifiantes et les hydrocarbures pétroliers dans les sols contaminés par le pétrole brut (Chirre et al.,2019).

Les auteurs ont conclu que le phénol et le crésol sont métabolisés par le même mécanisme *meta*. Les deux catégories de catéchol dioxygénase impliquées dans la biodégradation de divers composés phénoliques ont également été trouvées chez des souches de *Pseudomonas* et d'autres espèces étroitement apparentées (Lillis et al., 2010).

Divers travaux et études ont montré une haute performance de dégradation des polluants par les cultures mixtes par rapport aux cultures uniques (**Pradhan et al., 2012 ; Barman et al., 2017**).

Selon Farias et al., 2022 ; un consortium de *Bacillus sp* et *Brevidomonassp* isolés à partir des effluents d'une industrie de tannin ont montré une grande capacité de dégrader le furfural jusqu'à 4516 mg/L (**Alejandro Farías et al., 2022**)

Une autre culture mixte composée de *Bacillus sp.* SB4, *Pseudomonassp.* SC8, *Serratiasp.* SC11 et *Acinetobactersp.* SC12 a été soumise pour la dégradation des huiles. Les résultats ont révélé que ces quatre souches bactériennes étaient capables d'utiliser le pétrole comme source d'énergie (**Yemisi Dorcas Obafemi et al., 2018**).

Tableau 05 : Comparaison des temps de dégradation entre les cultures uniques et mixtes.

La culture	Le temps de dégradation de 50% de phénol	Le temps de dégradation complète
<i>Brevundimonas sp</i> seule	50 h	160 h
<i>Pseudomonas sp</i> seule	80h	170 h
<i>Bacillus sp</i> seule	h100	160 h
<i>Serratiamarscecens</i> seule	60h	170 h (dégradation complète)
<i>Pantoea sp</i> seule	70 h	170 h
Souche A seule	60 h	170 h
La culture mixte N°1	70 h	90 h (dégradation complète)
La culture mixte N°2	50 h	90 h (dégradation complète)
La culture mixte N°3	45 h	90 h (dégradation complète)

Conclusion

Conclusion et perspective

La station de service des carburants constitue un milieu naturel pour l'isolement des Bactéries capables de dégrader les polluants organiques tels que les hydrocarbures Aromatiques, les phénols, etc.

Cette étude à montrer l'existence d'une micro flore bactérienne au niveau du sol contaminé par les dérivés pétroliers. Cette flore était répartie de manière hétérogène d'un échantillon à un autre. Les analyses microbiologiques indiquent la présence de bactéries de différentes formes avec présence des bacilles, des coccobacilles et des cocci. Des genres bactériens trouvés sont *Serratiamarscecens*. Et *Pantoeasp*. Le genre *Pseudomonas spet Brevudimonasspet Bacillus sp*, des espèces omniprésente dans le sol.

Les espèces isolées sont capables d'assimiler le phénol comme seule source de carbone, Et d'énergie et pour la croissance. Les cultures mixtes présent une forte activité de biodégradation de phénol par apport les cultures unique, aussi que la culture mixte trois, qui comporte les bactéries : *Serratiamarscecens*, *Pantoeasp* et la souche Adégrade significativement le phénol afficher la meilleure pouvoir de biodégradation de phénol, car elle dégrade 50% de concentration initiale de phénol en 45 h, peut être utilisée dans la bio dépollution des sols polluées par les dérivées pétrolières, et pour l'élimination des déchets organiques présents dans les eaux usées provenant des activités industrielles et pharmaceutique. Afin de compléter cette étude, il serait envisageable d'identifier les bactéries à l'échelle moléculaire par la méthode de PCR et de déterminer les conditions optimales de dégradation du phénol par les bactéries les plus actives sur ce dernier, et Dans une optique de bio remédiation, l'originalité de notre approche consiste donc à utiliser le potentiel biotechnologique des consortium bactérienne, même des champignons et de levure et aussi les archeae technologies prometteuses pour le traitement et la récupération des ressources précieuses. cependant l'inhibition du processus complexes dans le sol c'est un défi majeur par techniques durables pour le traitement, et dans le but de l'évaluation le pouvoir de biodégradation vis-à-vis d'autre polluants organiques, et la production de bio surfactants d'origine bactérienne pour le remédiation des milieux naturels.

Références

- ❖ **Al-Tarawneh, A., Khleifat, K. M., Tarawneh, I. N., Shiyab, K., El-Hasan, T., Sprocati, A. R., ...&Alqaraleh, M.,2022.** Phenol biodegradation by plant growth promoting bacterium, *S. odorifera*: kinetic modeling and process optimization. *Archives of Microbiology*, 204(1), 1-14.
- ❖ **Alvarez, A., Saez, J. M., Costa, J. S. D., Colin, V. L., Fuentes, M. S., Cuozzo, S. A., ... & Amoroso, M. J.,2017.** Actinobacteria: current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. *Chemosphere*, 166, 41-62.
- ❖ **Andrianaivoravelona, R. R.,2015.** *Contribution au traitement des boues et des sols pollués par des hydrocarbures: Optimisation et approche de modélisation* (Doctoral dissertation, UNIVERSITE D'ANTANANARIVO).
- ❖ **Basha, K. M., Rajendran, A., &Thangavelu, V.,2010.** Recent advances in the biodegradation of phenol: a review. *Asian J Exp Biol Sci*, 1(2), 219-234
- ❖ **Basuki, W.,2017.** Biodegradation of Used Synthetic Lubricating Oil by *Brevundimonas diminuta* AKL 1.6, *Makara Journal of Science*, Vol. 21, No. 3, pp 136-142, <https://doi.org/10.7454/mss.v21i3.7382>
- ❖ **Benimeli, C.,2004.** Biodegradation of Organochlorine Pesticides by Aquatic Actinomycetes, *Thèse de doctorat*, Université nationale de Tucumán, Tucumán, Argentine.
- ❖ **Bouhamida, A., &Lahreche, R.,2017.** Capacité de biodégradation du gasoil par des bactéries autochtones isolées de sols contaminés.
- ❖ **Cazier, F., Woisel, P., &Veignie, E.,2004.** Intérêt des champignons telluriques dans des processus de bioremédiation de sols pollués par des hydrocarbures aromatiques polycycliques. *Environnement, Ingénierie&Développement*.
- ❖ **Chirre Flores, J., Patiño, G. A. and Erazo, E. R.,2019.** Study of the biodegradation of lubricating oil residues retained in bentonite using the bacterial consortium oil eating microbes (*Rhodococcus*, *Pseudomonas* and *Bacillus*), *Journal of the Peruvia Chemical Society*, Vol. 85, No. 2. pp 163-174, <https://doi.org/10.37761/rsqp.v85i2.75>
- ❖ culture microbienne mixte. *Technologies propres etpolitique environnementale* 16(1): 113-126.
- ❖ **Dutkiewicz, J., Mackiewicz, B., Lemieszek, M. K., Golec, M., &Milanowski, J.**

- .,2016. Pantoeaagglomerans: a mysterious bacterium of evil and good. Part IV. Beneficial effects. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 23(2).
- ❖ **Edalatmanesh, M., Mehrvar, M., &Dhib, R.,2008.** Optimization of phenol degradation in a combined photochemical–biological wastewater treatment system. *Chemical Engineering Research and Design*, 86(11), 1243-1252.
 - ❖ **Felshia, S. C., Karthick N. A., Thilagam R., Chandralekha A., Raghavarao K.S.M.S. and Gnanamani A., 2017.**Efficacy of free and encapsulated *Bacillus licheniformis*strain SL10 on degradation of phenol: A comparative study of degradation kinetics, *Journal of Environmental Management*, Vol. 197, pp 373-383, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.04.005>
 - ❖ Ghosh, A. Screening and Optimization of Process Parameters for Perchlorate Biodegradation by Burkholderia sp. and Pseudoxanthomonas sp. Utilizing Succinate and Phenol as Respective C-source.
 - ❖ Harzallah, B., Bousseboua, H., &Jouanneau, Y. *Étude de la biodégradation de composés phénoliques par le microbiote des effluents de la raffinerie de pétrole de Skikda* (Doctoral dissertation, جامعة الإخوة منتوري قسنطينة).
 - ❖ **Hassanshahian, M., Amirinejad, N., &AskarinejadBehzadi, M.,2020.**Crude oil pollution and biodegradation at the Persian Gulf: A comprehensive and review study. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 18(2), 1415-1435.
 - ❖ <https://doi.org/10.10>
 - ❖ **Igeño, M., Macias, D. et Blanco, R.,2019.**Un cas d'évolution adaptative en laboratoire
(ALE): biodégradation du furfural 10, n° 7, p.499,
<https://doi.org/10.3390/genes10070499>
 - ❖ **Kamali, M., Aminabhavi, T. M., Tarelho, L. A., Hellemans, R., Cuypers, J., Capela, I., ...&Appels, L.,2022.** Acclimatized activated sludge for enhanced phenolic wastewater treatment using pinewood biochar. *Chemical Engineering Journal*, 427, 131708.
 - ❖ **Krzmarzick, M. J., Taylor, D. K., Fu, X., &McCutchan, A. L.,2018.** Diversity and niche of archaea in bioremediation. *Archaea*, 2018.

- ❖ **Macaulay, BM et Rees, D.,2014.**Biorestauration des déversements d'hydrocarbures : un examen des défis pour l'avancement de la recherche, *Annals of Environmental Science*, Vol. 8, pp 9-37.
- ❖ Mazukiet *al.*, 2019; Babich et Davis, 1981
- ❖ Nair et *al.*, 2008 in Patil, 2014 ; Basha et *al.*, 2010).
- ❖ **Omirebekov, S.,2020.***Remédiation des sols pollués par injection des mousses tensioactifs: expériences et changement d'échelle* (Doctoral dissertation, Paris, HESAM).

- ❖ **Reyes-Reyes, M. A., Puentes-Cala E. A., Casanova-Montes E. L., Lopez-Deluche F, Panqueva-Alvarez J.H. and Castillo-Villamizar G. A.,2018.**Immobilization of potentially crude oil degrading bacteria in natural and synthetic organic matrices, *RevistaInternacional de ContaminaciónAmbiental*, Vol. 34, No. 4, pp. 597-609, <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.04.04>

- ❖ **Rhbal, H., Souabi, S., Safi, M., Terta, M., Arad, M., Anouzla, A., &Hafidi, M.,2020.** decontamination des sols pollues par les hydrocarbures. *Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 21(1), 1-16.

- ❖ **Saravanan, P., Pakshirajan, K., &Saha, P.,2008.** Growth kinetics of an indigenous mixed microbial consortium during phenol degradation in a batch reactor. *Bioresource Technology*, 99(1), 205-209.

- ❖ **Senthilvelan, T., Kanagaraj, J., Panda, RC et Mandal, AB.,2014.** Biodégradation du phénol par les communautés bactériennes

- ❖ **Subramaniam, K., Ahmad, S. A., &Shaharuddin, N. A.,2020.** Mini review on phenol biodegradation in Antarctica using native microorganisms. *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol*, 28, 77-89.

- ❖ **Vandecasteele, J. P., Monot, F., &Ballerini, D.,2002.**La microbiologie des produits pétroliers et ses applications. *Actualite Chimique*, (8/9), 58-62.

- ❖ **Viñas, M., Sabaté, J., Espuny, MJ et Solanas, AM.,2005** Dynamique des communautés bactériennes et dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques lors de la bioremédiation des Sol contaminé à la créosote, *microbiologie appliquée et environnementale*, Vol. 71, n° 11, pages 7008-7018, 2005, <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7008-7018.2005>].

- ❖ Voie métabolique de l'hydroxyméthylfurfural (HMF) dans le nouvel isolat *Pseudomonas putida* ALS1267, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 190, n° 3, pp 918-930, **2020**, <https://doi.org/10.1007/>.
- ❖ **Wang X., Wang X., Liu M., Zhou L., Gu Z. et Zhao J., 2016.** Bioremédiation de la pollution marine par les hydrocarbures par *Brevundimonas diminuta* : effet de la salinité et des nutriments, *Dessalement et traitement de l'eau*, 57,
- ❖ **Wang, Z., Yang, Y., Sun, W., Xie, S. et Liu, Y., 2014.** Biodégradation du nonylphénol dans les sédiments fluviaux et changements associés dans les structures communautaires des bactéries et des micro-organismes oxydant l'ammoniac, *écotoxicologie et sécurité environnementale*, Vol. 106, pages 1-5,

Annexes

ANNEXE 1**Composition des milieux de cultures****Composition de Milieu LB (Luria Bertani) : (en raison de g/L d'eau distillée)**

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

Composition du milieu minéral (Mm) : (en raison de g/L d'eau distillée)

Na Cl	1, 0
MgSo4.....	0,2
KH2Po4.....	1, 7
NH4cl	0, 1
HK2PE4.....	4, 35
Ca cl2.....	0, 03

PH = 7,4

ANNEXE 2 Réactifs de la coloration de Gram Cristal Violet (Violet de gentiane)

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

Lugol

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

Fuschine de ziehl

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

Alcool (éthanol) 90°

- **Solution de phénol :**

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

- **Solution de carbonate de sodium Naco3 :**

20g de carbonate de sodium Naco3 est ajoutés dans 100ml d'eau physiologique stérile

- **Réactif de folinciocalteu :**

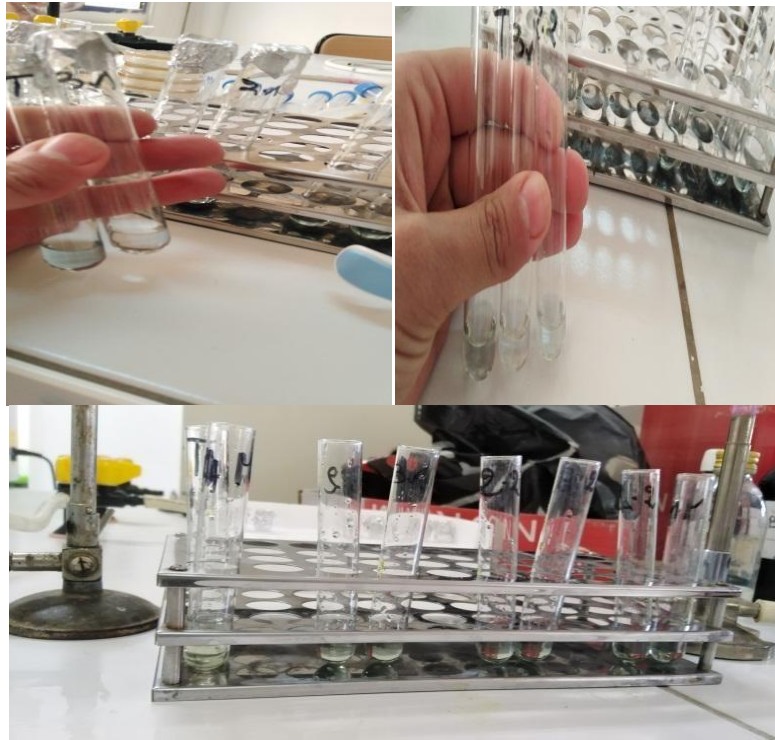
Ce réactif est décrit comme étant tungstate de sodium, du molybdate de sodium, de sulfat de lithium, du brome, de l'acide chlorhydrique concentrée et de l'acide phosphorique.

ANN EXE 3

résultats



Résultat de la galerie API 20 E de la souche G et H



Résultats du dosage colorimétrique de phénol des cultures mixtes.

Resumé :

La pollution par les dérivés pétroliers présente un obstacle environnemental et un effet néfaste sur la santé publique en premier lieu. Notre approche a été principalement fondée sur l'isolement des bactéries qui possèdent une activité de biodégradation de phénol, et d'optimiser cette biodégradation par l'utilisation des cultures bactériennes mixtes. Le support utilisé pour l'isolement de ces bactéries est un sol contaminé par les dérivés pétroliers prélevé d'une station de service d'Aiwaz, située dans la wilaya de Laghouat. Les isolats ont été identifiés par rapport à leur aspect microscopique et leurs caractères biochimiques.

Serratiamarscecens, *Pantoeasp* et une souche à cocci non identifiée, ont été trouvés dans le sol et présentés un pouvoir significatif de dégradation de phénol comme seule source de carbone et d'énergie dans une culture minérale.

La culture mixte composée de *Bacillus sp Pantoeasp*, et la souche à cocci gram négative a montré une performance considérable à métaboliser le phénol et un temps de dégradation réduit par rapport aux cultures uniques marqué 50% de 44 mg/l dans 45h.

Mots clé : Bactéries, phénol, biodégradation, culture mixtes.

Abstract:

Pollution by petroleum derivatives presents an environmental obstacle and adverse effect on public health in the first place. Our approach was mainly based on the isolation of bacteria that possess phenol biodegradation activity, and to optimize this degradation by the use of mixed bacterial cultures. The support used for the isolation of these bacteria is soil contaminated with petroleum derivatives taken from a service station in Aiwas, located in the wilaya of Laghouat. The isolates were identified with respect to their microscopic appearance and their biochemical characters.

Serratiamarscecens, *Pantoeasp* and an unidentified cocci strain were found in soil and showed significant phenol degradation as the sole source of carbon and energy in mineral culture. The mixed culture composed of *Bacillus sp Pantoeasp*, and the gram negative cocci strain showed a considerable performance in metabolizing phenol and a reduced degradation time compared to single cultures marked 50% of 44 mg/l in 45h.

Key words: Bacteria, phenol, biodegradation, mixed culture.

ملخص:

يمثل التلوث بالمشتقات البترولية عقبة بيئية وتأثيرًا سلبيًا على الصحة العامة في المقام الأول. اعتمد نهجنا بشكل أساسي على عزل البكتيريا التي تمتلك نشاط تحلل حيوي للفينول، ولتحسين هذا التدهور باستخدام مزارع بكتيرية مختلطة. والدعم المستخدم لعزل هذه البكتيريا هو التربة الملوثة بالمشتقات البترولية المأخوذة من محطة خدمة في أبواز بولاية الأغواط. تم التعرف على العزلات من حيث المظهر المجهرى وخصائصها البيوكيميائية. تم العثور على *Serratiamarscecens* و *Pantoeasp* وسلالة *cocci* غير محددة في التربة وأظهر تندهورًا كبيرًا في الفينول كمصدر وحيد للكربون والطاقة في الثقافة المعدنية.

أظهرت المزرعة المختلطة المكونة من *Bacillus sp Pantoeasp*، وسلالة *cocci* سالبة الجرام أداءً ملحوظًا في استقلاب الفينول ووقت تحلل منخفض مقارنة بالمزارع الفردية بنسبة 50% من 44 مجم / لتر في 45 ساعة.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا، الفينول، التحلل البيولوجي، الثقافة المختلطة.