

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Amar Telidji -Laghouat

Faculté des Sciences

Département de Biologie

جامعة عمار تليجي - الأغواط

كلية العلوم

قسم البيولوجيا



## *Etude de l'adaptation des souches d'intérêt à l'effet de phénol*

**Pour l'obtention du diplôme :**

Master en Microbiologie Appliquée

**Présenté par :** - Mlle. Helifa Messaouda

- Mlle. Labiodh Meriem

**Jury de soutenance:**

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

ANNEE UNIVERSITAIRE 2019-2020

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Amar Telidji -Laghouat

Faculté des Sciences

Département de Biologie

جامعة عمار تليجي - الأغواط

كلية العلوم

قسم البيولوجيا



## *Etude de l'adaptation des souches d'intérêt à l'effet de phénol*

**Pour l'obtention du diplôme :**

Master en Microbiologie Appliquée

**Présenté par :** - Mlle. Helifa Messaouda

- Mlle. Labiodh Meriem

**Jury de soutenance:**

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

ANNEE UNIVERSITAIRE 2019-2020



# Remerciements

*Nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de notre stage et qui nous ont aidé lors de la rédaction de ce mémoire.*

*Nous voudrions tout d'abord remercier notre directeur de mémoire le Dr. Benaceur Farouk ainsi que notre co-encadreur Dr. Rezzoug Asmaa, nous les remercions de nous avoir orientés, aidés et conseillés.*

*Nous remercions aussi l'ensemble des membres du jury Dr. Chaïbi Rachid et Dr. Chetaha Mohamed pour leurs présence, pour leurs lecture attentive de notre thèse ainsi que pour les conseils qu'ils nous adresseront lors de cette soutenance afin d'améliorer notre travail.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à tous les professeurs leurs conseils et leurs critiques ont été un facteur motivant au cours de notre carrière universitaire.*

# Dédicace

*Avant tout je remercie ALLAH pour tous qui m'ont offert  
dans ma vie*

*Je dédie ce modeste travail*

*A mes très chers parents, sources de tendresse de force  
et de courage, Je vous remercie d'être toujours à mes  
côtés de me soutenir, aimer, Protéger  
et pour tout ce que vous avez fait pour moi.*

*A ma sœur et mes chers frères :*

***Leila, Ahmed Ammar, Mohamed Habib***

*A mes Grands parents, et mes chères tantes et oncles*

*Au martyres de l'épidémie covid-19*

*Mon cher grand père **Hadj MESSAOUDI Mohamed***

*Et mon cher oncle **HELIFA Mohamed***

*A toute les familles: **HELIFA et MESSAOUDI***

*A mes meilleurs amies: **Meriem, Souhila, Zohra,  
Loubna, Ibtihal, Fatiha, Meriem, Sarah et Khadidja.***

***Helifa Messaouda***

# Dédicace

*A ma chère mère, aucune dédicace ne pourrait exprimer mon grand respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez faites pour mon instruction et mon bien être, je te remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance, puisse dieu le tout puissant, vous accorde santé, bonheur et longue vie.*

*A l'âme de mon cher père.*

*A mes support dans ma vie ma sœur **Fatima Zohra** et mes frères **Saddam** et **Khaled**, merci pour vos amours et vos encouragements.*

*A mes meilleures amies : **Souhila, Zohra et Loubna** . qui n'ont jamais cessées de me soutenir*

*Et enfin, je remercie mon binôme, ma sœur **Messaouda** qui a contribué à ce modeste travail.*

**Labiodh Meriem**

## **Table de matières**

### **Résumé**

### **Liste de figures**

### **Liste de tableaux**

### **Liste d'abréviation**

### **Introduction**

## **Partie 01 : Synthèse bibliographique**

### **Chapitre I : pollution des sols**

1	Définition de la pollution:.....	2
2	Les types de polluants :.....	2
2.1	Polychlorobiphényles (PCB) :.....	2
2.2	Les composés organiques volatils (COV) :.....	6
2.3	Pesticides :.....	6
2.4	Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) :.....	6
2.4.1	Définition :.....	7
2.4.2	Origines des hydrocarbures :.....	7
2.4.3	Propriétés des hydrocarbures :.....	7
2.4.4	Classification des hydrocarbures :.....	8
2.4.5	Impacts des hydrocarbures sur l'environnement :.....	8
2.5	Phénols:.....	9
2.5.1	Définition :.....	9
2.5.2	Propriétés physico-chimique :.....	9
2.5.3	Application du phénol :.....	10
2.5.4	L'origine de phénol :.....	11
2.5.5	Toxicité des phénols :.....	11
2.5.5.1	Effet sur l'homme :.....	11
2.5.5.2	Effet sur l'environnement.....	12

### **Chapitre II : Remédiation des sols pollués**

1	Traitement des sols pollués :.....	13
1.1	Traitement physique :.....	13
1.2	Traitement thermique :.....	13
1.3	Traitement chimique :.....	13
1.4	Traitement biologique :.....	14
1.4.1	Phytoremediation :.....	14

1.4.2 Bioremediation :.....	14
1.4.2.1 Les principales méthodes de la bioremédiation :.....	15
1.4.2.1.1 La bioremediation in-situ.....	15
1.4.2.1.2 La bioremediation ex-situ.....	15

### **Chapitre III : Biodégradation des polluants**

1 Mécanismes de dégradation microbienne des hydrocarbures.....	16
1.1 Définition : .....	16
1.2 Intérêt : .....	17
1.3 Les voies métaboliques de la dégradation des hydrocarbures pétroliers : .....	17
1.3.1 La minéralisation : .....	17
1.3.2 Co-métabolisme :.....	17
1.3.3 La biodégradation aérobie :.....	17
1.3.4 La biodégradation anaérobie.....	18
1.4 Les facteurs affectant la biodégradation de phénol.....	18
2 Biodégradabilité de phénol .....	20
2.1 Biodégradation aérobie de phénol.....	20
2.2 Biodégradation anaérobie de phénol :.....	21
2.3 Quelques microorganismes qui dégradent le phénol : .....	23
2.4 Quelques enzymes qui dégradent le phénol :.....	23

### **Partie 02: Matériel et méthodes**

1 L'échantillonnage : .....	25
1.1 Site de prélèvement :.....	25
1.2 Méthode d'échantillonnage :.....	25
1.3 Etat de sol (Analyse macroscopique).....	26
2 L'enrichissement:.....	27
3 L'ensemencement: .....	29
3.1 Préparation des dilutions :.....	29
3.2 Ensemencement en masse :.....	29
3.3 Ensemencement en surface : .....	30
4 Purification des souches bactériennes : .....	32
4.1 Etude morphologique de quelques souches purifiées: .....	33
4.1.1 Aspect macroscopique : .....	33
4.1.2 Aspect microscopique : .....	33
4.2 Conservation des souches .....	36
5 Sélection des souches susceptibles de dégrader le phénol :.....	37

5.1 Le dosage colorimétrique:.....	37
5.2 Étude de l'adaptation microbienne.....	39

### **Partie 03: Résultats et interprétations**

1 Amélioration du taux de dégradation par pré-adaptation : .....	43
1.1 Effet de la concentration de phénol à laquelle les cellules pré-adaptées : .....	43
1.2 Effet de la pré-adaptation répétée à une même concentration .....	49
1.3 Effet des adaptations consécutives par étapes.....	49
2 Mécanisme d'adaptation au niveau de l'enzyme intracellulaire : .....	50

### **Conclusion**

### **Références bibliographiques**

### **Annexe**

## Résumé

Dans cette étude, le phénol est utilisé comme un polluant modèle lors de leur toxicité même à de faibles concentrations, il peut persister dans l'environnement à long terme en raison de son transport à longue distance. Certains microorganismes sont capables d'utiliser le phénol comme seule source d'énergie et de carbone pour leurs croissances. L'objectif de cette étude est d'isoler quelques souches des bactéries capables de dégrader le phénol à partir d'un sol contaminé (zone de hasi messaoud) et d'améliorer le taux d'adaptation et la vitesse de la biodégradation par la pré-adaptation pour obtenir des bactéries bien adaptées. Parmi les résultats, 1500 mg/l de phénol ont été dégradés aussi rapidement qu'en 22 h lorsque la cellule était pré-adaptée à 500 et 1000 et 1200 mg/l de phénol séquentiellement.

**Mots clés :** Sol pollué, biodégradation, phénol, adaptation.

## Study of the adaptation of strains of interest of the effect of phenol

**Abstract :** In this study, phenol is used as a model pollutant for its toxicity even at low concentrations, it may persist in the environment in the long term due to its long-range transport. Some microorganisms are able to use phenol as the sole source of energy and carbon for their growth. The objective of this study is to isolate some strains of bacteria capable of degrading phenol from contaminated soil (hasi messaoud zone) and to improve the adaptation rate and the speed of biodegradation by pre-adaptation to obtain well-adapted bacteria. Among the results, 1500 mg/l of phenol were degraded as quickly as in 22 h when the cell was pre-adapted to 500 and 1000 and 1200 mg/l of phenol sequentially.

**Key words :** Polluted soil, biodegradation, phenol, adaptation.

## دراسة تكيف السلالات ذات الأهمية تأثير الفينول

**ملخص:** في هذه الدراسة ، يستخدم الفينول كملوث نموذجي و هذا لسميته حتى عند التركيزات الضئيلة ، ويمكن أن يستمر في البيئة على المدى الطويل بسبب انتقاله بعيد المدى. بعض الأحياء الدقيقة قادرة على استخدام الفينول كمصدر وحيد للطاقة والكربون لنموها. الهدف من هذه الدراسة هو عزل بعض سلالات البكتيريا القادرة على تفكيك الفينول من التربة الملوثة ( منطقة حاسي مسعود ) وتحسين معدل التكيف وسرعة التحلل البيولوجي عن طريق التكيف المسبق للحصول على بكتيريا حسنة التكيف . من بين النتائج ، تم تدهور 1500 ملغ/لتر من الفينول في فترة 22 ساعة عندما تم تكيف السلالة مسبقا ب 500 و 1000 و 1200 ملغ/لتر من الفينول بالتتابع.

**الكلمات الرئيسية:** التربة الملوثة ، التحلل البيولوجي, الفينول, التكيف.



## Liste de figures

<b>Figure 01</b> : Schéma représentatif de la structure des hydrocarbures.....	<b>06</b>
<b>Figure 02</b> : Schéma représentatif de la structure chimique de phénol.....	<b>09</b>
<b>Figure 03</b> : Influence des paramètres environnementaux, des propriétés des polluants et de la microflore du sol sur la dégradation des HAP.....	<b>19</b>
<b>Figure 04</b> : La biodégradation aérobie de phénol.....	<b>21</b>
<b>Figure 05</b> : La biodégradation anaérobie de phénol.....	<b>22</b>
<b>Figure 06</b> : Localisation du site de prélèvement des échantillons.....	<b>25</b>
<b>Figure 07</b> : Aspect des échantillons du sol.....	<b>26</b>
<b>Figure 08</b> : Les cultures dans le bouillon Nutrient Broth.....	<b>27</b>
<b>Figure 09</b> : La croissance microbienne sur le milieu NB.....	<b>28</b>
<b>Figure 10</b> : Schéma représentatif de la technique de dilution.....	<b>29</b>
<b>Figure 11</b> : Méthode d'ensemencement par la technique de quadrant.....	<b>30</b>
<b>Figure 12</b> : Incubation des boîtes de pétri après l'ensemencement.....	<b>30</b>
<b>Figure 13</b> : L'aspect macroscopique de différentes souches microbiennes.....	<b>31</b>
<b>Figure 14</b> : Aspect macroscopique de colonies de quelques souches bactériennes.....	<b>32</b>
<b>Figure 15</b> : Schémas représentatif des parois des bactéries Gram + / Gram -.....	<b>33</b>
<b>Figure 16</b> : Schéma représentatif de la technique de coloration de gram.....	<b>34</b>
<b>Figure 17</b> : Observation microscopique des isolas capables a dégradé le phénol.....	<b>35</b>
<b>Figure 18</b> : Conservation des souches dans des tubes inclinés.....	<b>36</b>
<b>Figure 19</b> : Réalisation du test biodégradation de phénol.....	<b>37</b>
<b>Figure 20</b> : Résultats du dosage colorimétrique de phénol.....	<b>38</b>

<b>Figure 21</b> : Biodégradation du phénol par la bactérie étudiée pour les concentrations initiales.....	<b>42</b>
<b>Figure 22</b> : Biodégradation de phénol par une souche pré-adaptée au 300 mg/l.....	<b>43</b>
<b>Figure 23</b> : Biodégradation de phénol par une souche pré-adaptée au 500 mg/l.....	<b>44</b>
<b>Figure 24</b> : Biodégradation de phénol par une souche pré-adaptée au 700 mg/l.....	<b>44</b>
<b>Figure 25</b> : Biodégradation de phénol par une souche pré-adaptée au 300-700 mg/l et 300-1000mg/l.....	<b>45</b>
<b>Figure 26</b> : Biodégradation de phénol par une souche pré-adaptée au 500-1000 mg/l et 500-1200 mg/l.....	<b>46</b>
<b>Figure 27</b> : Biodégradation de phénol par une souche pré-adaptée au 300-700-1000 mg/l et 300-1000-1000mg/l.....	<b>46</b>
<b>Figure 28</b> : Biodégradation de phénol par une souche pré-adaptées au 500-1000-1000mg/l et 500-1200-1000mg/l.....	<b>47</b>
<b>Figure 29</b> : Biodégradation de phénol par une souche pré-adaptées au 300-700-1000-1200mg/l et 300-1000-1000-1200mg/l.....	<b>47</b>
<b>Figure 30</b> : Biodégradation de phénol par une souche pré-adaptées au 500-1000-1000-1200mg/l et 500-1200-1000-1200mg/l.....	<b>48</b>
<b>Figure 31</b> : Diverses voies d'adaptation pour la dégradation du phénol.....	<b>49</b>

## Liste de tableaux

<b>Tableau 01</b> : Propriétés physiques du phénol.....	<b>10</b>
<b>Tableau 02</b> : Propriétés chimiques du phénol.....	<b>10</b>
<b>Tableau 03</b> : Exemple de quelques microorganismes capables de dégrader le phénol.....	<b>23</b>
<b>Tableau 04</b> : Les différents isolats utilisés pour le test de biodégradation.....	<b>32</b>
<b>Tableau 05</b> : Résultats du dosage colorimétrique de phénol.....	<b>38</b>

## **Liste d'abréviation**

**PCB** : Polychlorobiphényles

**COV** : Composés Organiques Volatils

**HAP** : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

**INRS** : Institut National de Recherche et de Sécurité

**LB** : Luria Bertani

**DO** : Densité optique

**MM** : Milieu Minérale

**µl** : Microlitre

**C12DO** : Catéchol 1-2 Dioxygénase

**C23DO** : Catéchol 2-3 Dioxygénase

**WDR** : whole degradation rate

**ADR** : actual degradation rate



# *Introduction*

La pollution de l'environnement est considérée comme un effet secondaire de la société industrielle moderne. Avec l'immense croissance des industries problème majeur est rencontré que la contamination de l'environnement dangereux et des produits chimiques toxique (International Journal of Research and Review, 2015) pour le système vivant et leur présence dans les habitats aquatiques et terrestres a souvent de graves conséquences écologiques. Parmi ces composés, le phénol, est le composé le plus toxique et il peut persister dans l'environnement à long terme en raison de son transport à longue distance, de sa bioaccumulation dans les tissus humains et animaux et de sa bioamplification dans la chaîne alimentaire (Supriya, Deva neehar, 2014).

Ces produits phénoliques sont rejetés dans les eaux usées des diverses industries telles que la résine de phénol et les produits pharmaceutiques, les raffineries de pétrole, les usines pétrochimiques, les usines de céramique, les usines sidérurgiques et les procédés de conversion du charbon (International Journal of Research and Review, 2015).

La biodégradation apparaît comme la technologie la plus idéale pour éliminer les polluants phénoliques de l'environnement par l'action des microbes, restaurer les sites contaminés et prévenir d'autres pollutions (Supriya, Deva neehar, 2014). La biodégradation est utilisée pour décrire la minéralisation complète du composé de départ à des composés plus simples comme le CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, NO<sub>3</sub> et d'autres composés inorganiques (International Journal of Research and Review, 2015).

En dépit des propriétés toxiques phénoliques, un certain nombre de micro-organismes peuvent utiliser le phénol dans des conditions aérobies comme sources de carbone et d'énergie (Supriya, Deva neehar, 2014).

Les technologies de biodégradation profitent le plus souvent de la capacité de diverses bactéries à nettoyer l'environnement la biorestauration est en constante expansion (Supriya, Deva neehar, 2014).

Plusieurs travaux ont montré que les bactéries isolées du sol exemple : *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Klebsiella*, *Bacillus lentus*, *Ralstonia* ...etc.) Sont capables de dégrader plusieurs types de polluants organiques avec une

certaines variabilité de préférence (Heinaru et al. 1999 ; Sahar zaki, 2006 ; Daffri et al, 2014 ; Opere et al, 2013).

La dégradation du phénol par les micro-organismes est généralement limitée par l'inhibition du substrat (phénol) et faible taux de conversion spécifiques.

Diverses méthodes ont été proposées pour surmonter l'inhibition du substrat afin de traiter concentration élevée de phénol. Parmi ces méthodes : l'adaptation de la cellule à une concentration plus élevée de phénol.

Le mécanisme de l'adaptation microbienne a été expliqué par le changement de membrane cellulaire (Kyung Han Kwon, Sung Ho Yeom, 2008).

Dans cette étude, les adaptations consécutives par étapes ont été proposées comme moyen efficace de dégrader les concentrations élevées de phénol et des voies d'adaptation optimales ont également été suggérées. Le mécanisme d'adaptation a été discuté à nouveau dans conditions d'induction enzymatique intracellulaire (Kyung Han Kwon, Sung Ho Yeom, 2008).

# Partie 01:

# Synthèse Bibliographique

### *Chapitre I : Pollution des sols*

#### **1 Définition de la pollution:**

La pollution et la contamination sont deux expressions couramment employées pour désigner l'accumulation anormale et exogène, généralement due à une activité humaine, d'éléments ou de composés minéraux, organiques ou d'agents pathogènes dans un milieu donné dont la qualité se trouve affectée (Baize, Cambier, Sterckeman, 1996).

Une substance toxique désigne une substance naturelle ou de synthèse, minérale ou organique, présentant une nocivité pour les organismes vivants, pouvant être absorbée par voie foliaire ou racinaire chez les plantes, par inhalation, ingestion ou contact chez les animaux, elle provoque une intoxication des organismes affectés en perturbant une fonction vitale pouvant entraîner la mort (Ramade, 2000).

#### **2 Les types de polluants :**

##### **2.1 Polychlorobiphényles (PCB) :**

Ce sont des substances chlorées très stables, largement utilisées dans la production des condensateurs, transformateurs, fluides hydrauliques, lubrifiants, pesticides ( Pramanik, Williams, Dutta, 2004 ), encres d'imprimeries et dans les peintures ( Barriuso, Calvet et al, 1996 ). Ils peuvent être dégradés à haute température (1200°C), leur combustion peut générer des substances cancérigènes et mutagènes. Les PCB sont insolubles dans l'eau (Pramanik, Williams, Dutta, 2004).

### 2.2 Les composés organiques volatils (COV) :

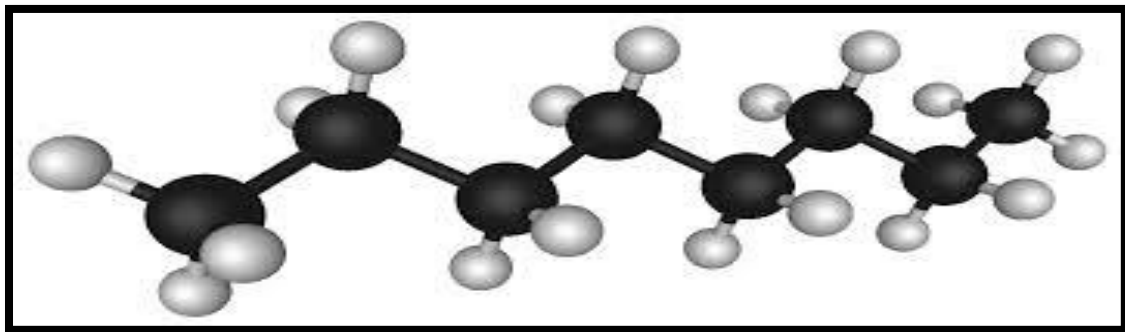
Le terme de composés organiques volatils (COV) englobe un grand nombre de composés appartenant à différentes familles chimiques: alcanes, alcanes substitués, alcènes, alcools, composés aromatiques (benzène), esters, cétones. Les COV font l'objet de nombreuses utilisations en tant que solvants, dégraissants, dissolvants, conservateurs, agents de nettoyage (Lalanne, 2006).

### 2.3 Pesticides :

Couramment appelés produits phytosanitaires. Il s'agit généralement de produits de synthèse qui sont volontairement introduits par l'homme dans l'environnement soit pour protéger les récoltes et les denrées stockées, soit pour protéger les différents secteurs de l'agriculture intensive, soit encore pour lutter contre les vecteurs de maladies ( Fdil, 2004 ).

### 2.4 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) :

L'hydrocarbure est une ressource énergétique qui présente des avantages pour l'économie d'un pays, mais beaucoup de désavantages pour l'environnement (Fdil, 2004).



**Figure 01** : Schéma représentatif de la structure des hydrocarbures (Compendium of Chemical Terminology)

### 2.4.1 Définition :

L'hydrocarbure est composé d'atomes de carbone et d'hydrogène. C'est pour cette raison qu'on lui donne la formule moléculaire HC. On peut le trouver sous forme d'énergie fossile (carbone), ce qui fait de lui une ressource énergétique assez importante pour l'économie des pays, notamment pour alimenter certaines industries et certains secteurs professionnels. Cette énergie est souvent associée au pétrole et au gaz naturel.

Comme c'est une énergie fossile, l'hydrocarbure est non renouvelable et ses gisements commencent à se raréfier depuis ces dernières années. Son utilisation est donc de plus en plus coûteuse et son exploitation de plus en plus difficile. Les derniers gisements se trouvent en majeure partie dans les fonds marins, ce qui rend leur extraction complexe (Fdil, 2004).

### 2.4.2 Origines des hydrocarbures :

La pollution par les hydrocarbures est due à des rejets, volontaires ou non, des produits pétroliers. Les hydrocarbures sont considérés comme étant des polluants à la fois organiques et chimiques. Les hydrocarbures fossiles proviennent de la décomposition d'une grande quantité de matière organique coincée entre deux couches sédimentaires et les hydrocarbures actuels sont produits par des bactéries décomposant la matière organique. Les rejets industriels sont les sources d'hydrocarbures pétroliers pyrolytiques (Dali, Iddir, 2018).

### 2.4.3 Propriétés des hydrocarbures :

À température ambiante, les hydrocarbures sont inflammables, à l'image du pétrole et du gaz naturel, deux carburants importants. Par ailleurs, ils ne se mélangent pas à l'eau. Leur densité est variable. Et leurs températures d'ébullition et de fusion ainsi que leur masse volumique et indice de réfraction, notamment pour les alcanes, dépendent de la longueur de leur chaîne carbonée ainsi que de ses ramifications (Dali, Iddir, 2018).

### 2.4.4 Classification des hydrocarbures :

Les hydrocarbures sont les principaux constituants des pétroles et des gaz naturels.

Comme leur nom l'indique, ils ne comportent que du carbone et de l'hydrogène.

On distingue trois catégories principales selon le type de liaison carbone-carbone de leur molécule :

- les hydrocarbures saturés : Ils ne comportent que des liaisons simples.
- les hydrocarbures non saturés (ou insaturés) : Ils comportent au moins une liaison multiple, double ou triple.
- les hydrocarbures aromatiques : Ils constituent une catégorie particulière de composés non saturés cycliques dont la structure est apparentée à celle du benzène (Dali, Iddir, 2018).

### 2.4.5 Impacts des hydrocarbures sur l'environnement :

Les risques causés par ces polluants organiques dans les milieux souterrains concernent, en premier, la qualité des eaux souterraines qui deviennent impropres pour certaines utilisations. 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. (Dali, Iddir, 2018).

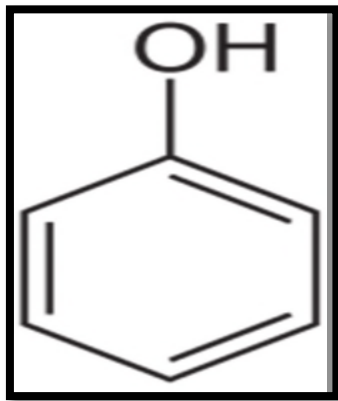
### 2.5 Phénols:

#### 2.5.1 Définition :

Le phénol de formule brute  $C_6H_6O$  sont des composés qui dérivent des hydrocarbures aromatique par remplacement d'un atome d'hydrogène de noyau par un groupement hydroxyle  $-OH$  (Arnaud, 1997).

Il porte aussi les noms d'hydroxyl-benzène, acide phénique ou acide carbonique « loi canadienne sur la protection de l'environnement-phénol. »

Les propriétés de l'hydroxyde soudé à un carbone du noyau aromatique sont suffisamment différentes de celles du même groupement fixé sur un carbone aliphatique. « Loi canadienne sur la protection de l'environnement-phénol »



**Figure 02** : Schéma représentatif de la structure chimique de phénol (INRS, 1997)

#### 2.5.2 Propriétés physico-chimique :

Le phénol est solide à la température ordinaire. Il se présente sous la forme d'une masse cristalline ou d'aiguilles incolores, hygroscopiques et d'odeur particulière à la fois âcre et douce-acre « loi canadienne sur la protection de l'environnement-phénol ».

Le phénol est :

- Soluble dans la plupart des solvants organiques comme les hydrocarbures aromatiques, les alcools, les cétones, les éthers, les acides et les hydrocarbures halogènes
- Partiellement soluble dans l'eau, il devient entièrement soluble dans cette dernière au-delà de  $68^{\circ}C$  « loi canadienne sur la protection de l'environnement-phénol »

Propriétés physiques	
<b>T° fusion</b>	43°C
<b>T° ébullition</b>	182°C
<b>Solubilité à 20°C</b>	97g l <sup>-1</sup>
<b>Masse volumique</b>	1,073 g cm <sup>-3</sup>
<b>T° d'auto-inflammation</b>	715°C
<b>Point d'éclair</b>	79°C
<b>Limites d'explosivité dans l'air</b>	1,36-10% vol
<b>Pression de vapeur saturante à 20°C</b>	47 Pa
<b>Point critique</b>	61,3bar à 421,05°C
<b>Temps de demi-vie dans l'air</b>	env.20 h
<b>Temps de demi-vie dans l'eau</b>	env.55 h

**Tableau 01 : Propriétés physiques du phénol (Moussaoui, 2012)**

Propriétés chimiques	
<b>Formule brute</b>	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O
<b>Masse molaire</b>	94,1112 ± 0,0055 g mol <sup>-1</sup> C: 76,57%, H : 6,43% et O : 17%
<b>pKa</b>	9,99 (phénol\ phénolate)
<b>Moment dipolaire</b>	1,22 ± 0,008 D
<b>Diamètre moléculaire</b>	0,55 nm

**Tableau 02 : Propriétés chimiques du phénol (Moussaoui, 2012)**

### 2.5.3 Application du phénol :

Le phénol constitue un des grands produits intermédiaires de l'industrie chimique (Nasri, 2013)

Environ deux millions de tonnes phénol sont utilisées annuellement dans la communauté européenne (Pichard, 2005).

Il est utilisé dans des fabrications très diverses mais principalement en synthèse organique tels que :

- Le raffinage des pétroles ;
- L'industrie des matières plastiques (phénoplastes, poly-époxydes, polycarbonates.
- L'industrie pharmaceutique (produits désinfectants, aspirine, paracétamol....).
- Les matières explosives (mélinite à base d'acide picrique).

- La fabrication de détergents, pesticides, colorants, etc. (Nasri, 2013) (C.Ouahes, « chimie organique », 2014).

### **2.5.4 L'origine de phénol :**

Le phénol constitue un des grands intermédiaires de l'industrie chimique ; considéré comme matière première pour la production du bisphénol utilisé dans la fabrication des résines thermodurcissables, de coprolactame utilisé dans la fabrication du nylon et dans de nombreuses synthèses en chimie fine (médicaments : aspirine, antiseptiques, paracétamol.....).

Il est également utilisé dans la fabrication des colorants, d'herbicides et d'insecticides.etc.

La combustion du bois et du tabac sont également responsables de la présence de phénol dans l'environnement (Bechac, Mercier, 2012).

### **2.5.5 Toxicité des phénols :**

Les phénols sont probablement les composés organiques les plus souvent associés à des problèmes organoleptiques (SPF Emploi, Travail Et Concertation Sociale, 2004). Leur toxicité se manifeste en général vis-à-vis de l'homme et de la faune aquatique (Oughlis, 2004).

#### **2.5.5.1 Effet sur l'homme :**

Le phénol est rapidement absorbé (70 à 80% en 6 heures) par toutes les voies sensorielles puis rapidement distribué dans les tissus. Le phénol dénature les protéines et détruit les parois cellulaires.

Les organes ciblés sont le cerveau, les reins, le foie, les poumons et la muqueuse gastro-intestinale. « Loi canadienne sur la protection de l'environnement-phénol » (Pichard, 2005).

L'inhalation de vapeurs et les contacts cutanés constituent les deux voies principales de pénétration dans l'organisme.

L'intoxication chronique est responsable de troubles digestifs, respiratoires, rénaux, cutanés et oculaires (Oughlis, 2004).

Le phénol et ses solutions concentrées exercent une action caustique sur la peau ; c'est d'abord une sensation de brûlure qui est ressentie, suivie d'une perte de sensibilité locale de la peau (SPF, Emploi, Travail Et Concertation Sociale, 2004).

Les autres problèmes que le phénol peut provoquer sont :

- Les maux de tête et vomissements.
- La faiblesse musculaire et l'étourdissement.
- Les troubles de la vision et de l'audition.
- La respiration rapide et irrégulière et la mort pouvant survenir par défaillance respiration.
- La perte de conscience (Pichard, 2005), (INRS, « Fiche toxicologique », 1997 ).

### **2.5.5.2 Effet sur l'environnement**

Les études de toxicité réalisées chez les différentes espèces de mammifères montrent que, quelle que soit la voie d'intoxication, les effets systématiques sont identiques et apparaissent rapidement : contraction musculaire, convulsions sévères et perte de conscience (Pichard, 2005),

Le phénol déprécie la saveur des poisons et les rend inconsommables.

Le phénol est plus lourd que l'eau et tend à se déposer .Il se dissout lentement, même dilué, il continue à former des solutions toxiques. A partir des concentrations plus élevées, il se produit une transformation de la microfaune (Pichard, 2005),

### *Chapitre II : Remédiation des sols pollués*

#### **1 Traitement des sols pollués :**

La décontamination des sites pollués est devenue une nécessité croissante. Les zones contaminées sont vouées à être requalifiées. De plus, la diversité des polluants et donc leurs propriétés physico-chimiques accentuent la difficulté de cette décontamination (Dali, Iddir, 2018).

Les hydrocarbures sont connus pour le risque qu'ils présentent sur la santé humaine et les écosystèmes, si leur concentration et leur mobilité sont trop importantes. Afin d'éviter la diffusion des HP des sites contaminés vers les profondeurs des sols, des mesures doivent être prises en considération (Aberkane, Ayache, 2018).

Plusieurs voies d'élimination des hydrocarbures polluants le sol sont étudiées. (Dali, Iddir, 2018).

##### **1.1 Traitement physique :**

Les traitements physiques consistent à transférer et concentrer les polluants, sans les modifier ou les détruire, en se servant de fluides pour transporter la pollution vers des points d'extraction ou pour l'immobilisation (Aberkane, Ayache, 2018).

##### **1.2 Traitement thermique :**

Les traitements thermiques consistent à chauffer le matériel contaminé pour en extraire le polluant et le détruire (ex : incinération), l'isoler (ex : désorption thermique, thermolyse, etc.) (Aberkane, Ayache, 2018).

##### **1.3 Traitement chimique :**

Les techniques chimiques ont pour but de détruire les polluants ou les transformer sous une forme moins nocive pour l'environnement. Elles consistent à utiliser, selon les propriétés

chimiques des polluants, des réactions appropriées afin de les inerte (sorption), les détruire (oxydation) ou les séparer du milieu pollué (surfactant) (Dali, Iddir, 2018)

### **1.4 Traitement biologique :**

Le traitement biologique vise la dégradation de la matière organique essentiellement par l'activité des bactéries déjà présentes dans le sol ou encore par des bactéries spécialement cultivées et l'optimisation de leurs conditions de prolifération. (Dali, Iddir, 2018)

#### **1.4.1 Phytoremediation :**

La phytoremediation (grec phyto : plante, latin remedium : corriger un méfait) est définie comme l'utilisation des plantes pour éliminer ou transformer les polluants (présents dans les sols, les sédiments ou les eaux souterraines) en composés moins toxique (Babou, 2014).

Ces polluants sont soit des molécules organiques comme les pesticides, soit des métaux présents en quantités importantes. Dans le cas des molécules organiques, les processus de décontamination des sols font souvent appel aux microorganismes telluriques qui sont efficaces dans la dégradation de ces composés ce qui en fait chuter la toxicité. Il est possible d'utiliser des végétaux dans la même optique : c'est la phytodégradation (Franck, 2000).

#### **1.4.2 Bioremediation :**

Le terme de bioremédiation est composé de "Bios " qui signifie la vie et se réfère aux organismes vivants et "remédier " qui signifie résoudre un problème.

C'est un ensemble de techniques qui utilisent les capacités enzymatiques des microorganismes (bactéries, algues, champignons) pour dégrader les polluants organiques. Ces organismes peuvent être déjà présents dans la zone polluée (indigènes) ou ajoutés au milieu (exogène), ou encore être prélevés sur le site contaminé, cultivés au laboratoire puis réintroduits dans le sol (Abdely, 2007), (Fakou Mbogne, 2017).

### **1.4.2.1 Les principales méthodes de la bioremédiation :**

#### 1.4.2.1.1 La bioremediation in-situ

Il s'agit de traitements biologiques directement appliqués sur le site à dépolluer. Ils ont l'avantage de ne pas nécessiter d'excavation et de permettre, éventuellement, la poursuite des activités (Hanna, 2004).

#### 1.4.2.1.2 La bioremediation ex-situ

Les traitements hors site peuvent être utilisés dans le cas où les contaminants n'ont pas pénétré trop profondément, les sols peuvent alors être excavés puis traités. L'utilisation de ces procédés hors site permet la plupart du temps une réduction des durées de traitement (Ballerin, 1999).

### *Chapitre III : Biodégradation des polluants*

#### **1 Mécanismes de dégradation microbienne des hydrocarbures**

##### **1.1 Définition :**

Au sens microbiologique, la «biodégradation» signifie la décomposition de toutes les matières organiques qui est effectuée par des formes de vie comprenant principalement des bactéries, des champignons, des protozoaires et d'autres organismes. Grâce à ce processus biologiquement naturel, les contaminants toxiques dangereux sont transformés en substances moins toxiques ou non toxiques (Basha, Rajendran, Thangavelu, 2008).

En présence d'oxygène, deux types de biodégradation de composés organiques peuvent avoir lieu : minéralisation ou biotransformation.

La biotransformation est une biodégradation incomplète qui peut transformer un composé en métabolites organiques stables. Ces derniers peuvent être inoffensifs ou parfois plus toxiques que le polluant initial (Kaufmann, 2004).

La minéralisation est une biodégradation oxydative complète des molécules organiques en composés inorganiques (eau, dioxyde de carbone, ions minéraux) (Alexander, 1994).

La biodégradation est basée sur deux processus: Croissance et co-métabolisme microbiens. Dans le cas de la croissance, les polluants organiques sont utilisés comme sources de carbone et d'énergie. Ce processus conduit à une dégradation complète (minéralisation).

Le co-métabolisme est défini comme un métabolisme d'un composé organique en présence d'un substrat de croissance qui est utilisé comme source primaire de carbone et d'énergie.

Les réactions enzymatiques principales de la biodégradation aérobie sont des oxydations catalysées par des oxygénases et des peroxydases. Cependant, en présence d'une molécule d'oxygène, certains composés (benzoates, phénols, hydrocarbonés aromatiques) sont initialement oxydés par une mono ou une dioxygénase et convertis en catéchols ou protocatechuates, par la suite minéralisés (Laperto, 2006).

La biodégradation dépend de l'activité microbienne et de la biodisponibilité des polluants. La biodisponibilité se définit comme la propriété d'un élément ou d'une substance d'atteindre les membranes cellulaires des organismes vivants (Boucheseiche, Cremille, Pelte et al, 2002).

### **1.2 Intérêt :**

La biodégradation est un important mécanisme d'atténuation de la concentration des contaminants dans les eaux souterraines et le sol.

La biodégradation lorsqu'elle se produit, elle limite la migration des polluants et réduit la masse des contaminants dans le sous-sol (Kadi, 1995).

### **1.3 Les voies métaboliques de la dégradation des hydrocarbures pétroliers :**

#### **1.3.1 La minéralisation :**

La minéralisation est la biodégradation complète des matières organiques à produits inorganiques. Et se produit souvent à travers les activités combinées de consortiums microbiens plutôt que par un seul micro-organisme (Shelton D, Tiedje J, 1984).

#### **1.3.2 Co-métabolisme :**

Le co-métabolisme est le processus par lequel un contaminant est fortuitement dégradé par une enzyme ou un cofacteur produit au cours du métabolisme microbien d'un autre composé. Typiquement, il n'y a aucun avantage apparent au micro-organisme impliqué (Hazen, 2010).

#### **1.3.3 La biodégradation aérobie :**

La biodégradation aérobie se fait au cours d'une respiration bactérienne utilisant l'oxygène comme accepteur terminal d'électrons. Ce métabolisme met en œuvre des mono-ou dioxygénase qui attaquent les molécules par addition d'oxygène (Mounier, 2013).

Est la dégradation des composés par les microorganismes en présence d'oxygène». Dans la biodégradation aérobie, les micro-organismes convertissent l'oxygène en eau en transformant d'autres composants en produits plus simples (Conseil national de recherches, 1994).

La biodégradation aérobie est également connue sous le nom de respiration aérobie (Conseil national de recherches, 1994).

### 1.3.4 La biodégradation anaérobie

En absence d'oxygène, les bactéries métabolisent les HAP par voie anaérobie, mais beaucoup plus lentement qu'en aérobiose (Martin, 2012).

Dans des conditions aérobies ou des conditions environnementales toxiques, l'oxygène agit comme accepteur d'électrons. L'oxydation des composés organiques couplée à la réduction de l'oxygène moléculaire et cela s'appelle la respiration aérobie.

En l'absence d'oxygène (conditions anaérobies), les micro-organismes peuvent utiliser des produits chimiques organiques ou des anions inorganiques comme accepteurs d'électrons alternatifs.

La biodégradation anaérobie peut se produire dans des conditions fermentaires, dénitrifiantes, réductrices de fer, sulfatogènes ou méthanogènes (Kadi 1995).

Les travaux de recherche sur l'oxydation des hydrocarbures par les microorganismes ont montré que ce processus dépend de la structure chimique des hydrocarbures et des conditions environnementales (Coates, Woodward, Allen et al, 1997).

### 1.4 Les facteurs affectant la biodégradation de phénol

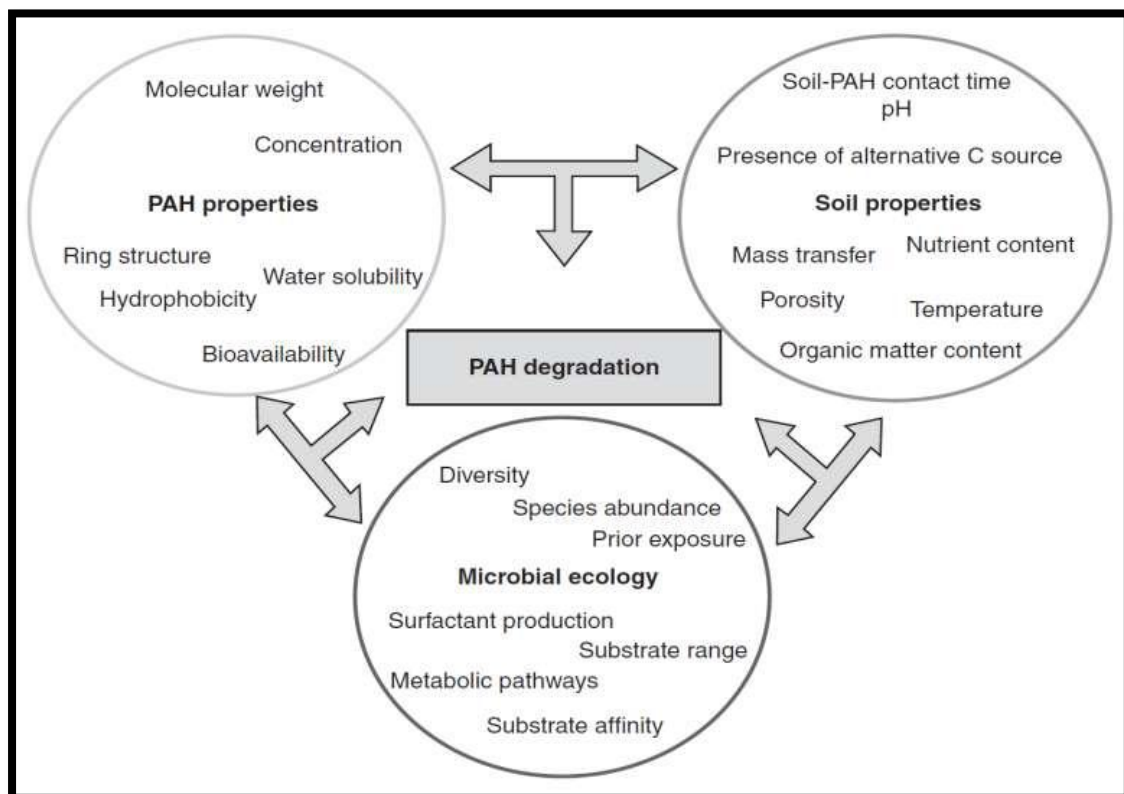
La biodégradation est un processus aux multiples facettes dans lequel de nombreux facteurs biotiques et abiotiques sont impliqués. De nombreux facteurs peuvent affecter la capacité de dégradation ou le métabolisme des microorganismes en empêchant ou en stimulant la croissance des organismes (Al-Khalid, Muftah, 2012). Ces facteurs peuvent inclure :

- La structure et nature du sol (composition structure et diffusion de l'eau et l'air) (Lecomte, 1995).
- La disponibilité (aération et agitation) (Al-Khalid, Muftah, 2012).
- La biodisponibilité ( la disponibilité des contaminants pour les microorganismes) (Al-Khalid, Muftah, 2012).
- la concentration du substrat et les propriétés physiques des contaminants (Al-Khalid, Muftah, 2012).
- La composition chimique des hydrocarbures (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 (Soltani, 2004).

## Synthèse bibliographique

- L'humidité (les faibles humidités inférieures à 2% limitent la vitesse de biodégradation) (Davis, Madsen, 1996)
- (Les trops élevés vont influencer sur la perméabilité des sols aux gaz (Ballerin, 1999).
- Température (entre 20 et 37°C) (Bouderhem, 2011).
- Salinité (diminue le nombre de microorganisme). Les fortes salinités constituent une barrière naturelle pour la biodégradation (Bertrand, 1993).
- Potentiel d'hydrogène (pH) (entre 5 et 9 optimum 7) (Gabet, 2004).
- (le pH acide favorise la solubilisation des métaux lourds) (Bouderhem, 2011).
- Taux d'oxygène. L'oxygène peut être fourni sous plusieurs formes : l'oxygène pure, l'air atmosphérique, le peroxyde d'hydrogène(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou eau oxygénée) (Lecomte, 1995).
- Nutriments (en particulier l'azote et le phosphore) (Sauret, 2011).

Chacun de ces facteurs doit être optimisé pour l'organisme sélectionné afin d'obtenir la dégradation maximale du composé organique de choix. L'optimisation de la concentration du substrat dans la biodégradation du phénol est particulièrement importante (Al-Khalid, Muftah, 2012).



**Figure 03 : Influence des paramètres environnementaux, des propriétés des polluants et de la microflore du sol sur la dégradation des HAP (Doyle, Muckian, Hickey et al, 2008).**

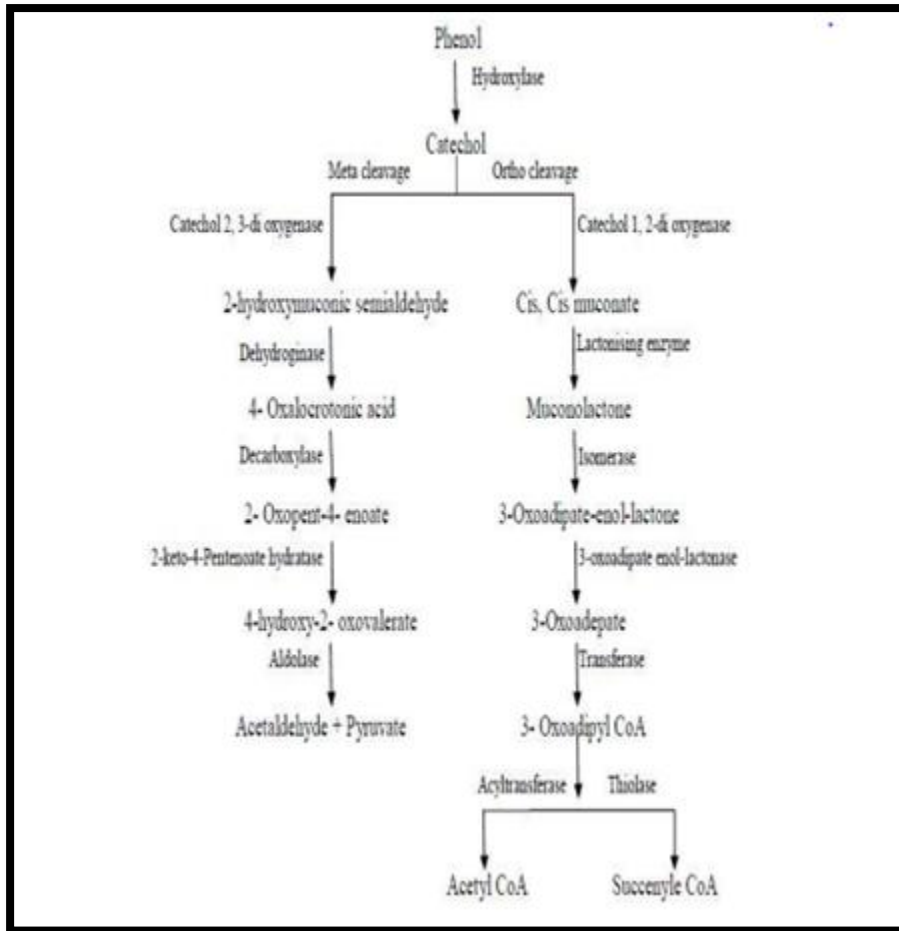
### 2 Biodégradabilité de phénol

Selon les capacités microbiennes à se développer dans des conditions spécifiques, la matière organique peut être dégradée par voie aérobie ou anaérobie. Bien que les microorganismes aérobies et anaérobies soient capables de dégrader le phénol, les procédés aérobies conventionnels sont préférés. Les microorganismes aérobies sont plus efficaces pour dégrader les composés toxiques car ils se développent plus rapidement. Les procédés aérobies sont également préférés en raison des faibles coûts associés à cette option. (Al-Khalid, Muftah, 2012).

#### 2.1 Biodégradation aérobie de phénol

La biodégradation du phénol en condition aérobie est initiée par l'oxygénation dans laquelle le cycle aromatique est initialement monohydroxylé par une mono-oxygénase phénol hydroxylase en position ortho par rapport au groupe hydroxyle préexistant pour former le catéchol. Il s'agit du principal intermédiaire résultant du métabolisme du phénol par différents souches microbiennes (Viraj, 2017).

Les organismes qui utilisent le phénol par voie aérobie sont *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptococcus sp.*, *Candida tropicalis*, *Comamonas testosteroni* ... (Sangram, 2014).



**Figure 04 : La biodégradation aérobie de phénol (Basha et al, 2010)**

## 2.2 Biodégradation anaérobie de phénol :

La dégradation anaérobie du phénol est moins avancée que le processus aérobie. Elle est basée sur l'analogie avec la voie anaérobie du benzoate proposée pour *Paracoccus denitrificans*. La première étape de la voie anaérobie est la carboxylation du phénol en position para en 4-hydroxybenzoate; ici, l'enzyme impliquée est la 4-hydroxy benzoate carboxylase (Viraj, 2017).

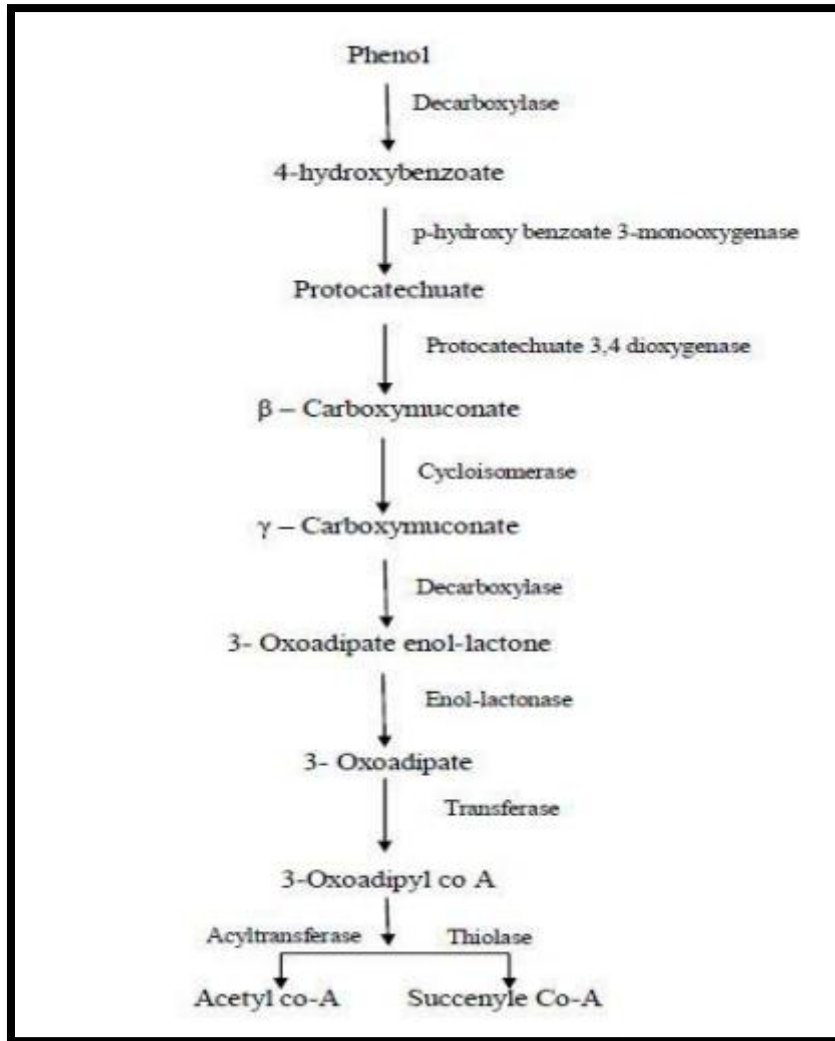


Figure 05 : La biodégradation anaérobie de phénol (Basha et al, 2010)

La plupart des études ont été rapportées dans la littérature à cet égard. Étant donné que la plupart des études sur les traitements biologiques ont utilisé des biomasses aérobies, dans cette étude, nous concentrons sur la biodégradation aérobie (Al-Khalid, Muftah, 2012).

### 2.3 Quelques microorganismes qui dégradent le phénol :

La source	Genre	Espèces
Les bactéries	Alcaligenes	<i>Alcaligenes faecalis</i> <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> Y234
	Anthrobacter	<i>Arthrobacter species</i> <i>Arthrobacter citreus</i> <i>Arthrobacter chlorphenolicus</i> A6
	Pseudomonas	<i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Pseudomonas pictorum</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Cyanobacterium Bacille	<i>Cyanobacterium synechococcus</i> <i>Bacillus species strain PHN1</i> <i>Bacillus brevis</i> <i>Bacillus badius</i>
Champignon	Candida	<i>Candida tropicalis</i> <i>Candida tropicalis</i> NICM 3556
	Fusarium	<i>Fusarium species</i>
	Graphium	<i>Graphium sp.FIB4</i>
	Ochromonas Aspergillus	<i>Ochromonas danica</i> <i>Aspergillus awamori</i> NRRL 3112
Levure	Phanerochaete	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
	Rhodococcus	<i>Rhodococcus erythropolis</i> UPV -1
	Rhodotorula	<i>Rhodotorula creatinivora</i>
	Sphingomonas	<i>Sphingomonas chlorophenolica</i> RA
	Trichosporon	2 <i>Trichosporon species</i> LE3 <i>Trichosporon cutaneum</i> R57

**Tableau 03 : Exemple de quelques microorganismes capables de dégrader le phénol**  
(Rajani, 2015).

### 2.4 Quelques enzymes qui dégradent le phénol :

En raison de la présence répandue de phénol dans l'environnement, nombreux micro-organismes utilisent le phénol comme seule source de carbone et d'énergie qui comprend à la fois des micro-organismes aérobies et anaérobies. Ils produisent plusieurs enzymes comme Polyphénol oxydase, Catéchol 2,3 dioxygénase, Laccase, Peroxydase, Peroxydase de raifort, Tyrosinase, Catéchol 1,2oxygénase etc. (Rajani, 2015).

# Partie 02:

## Matériel et méthodes

### 1 L'échantillonnage :

#### 1.1 Site de prélèvement :

La zone de Hasi messaoud au niveau d'un fourrage de pétrole à Ouargla



**Figure 06 : Localisation du site de prélèvement des échantillons**

(Google maps)

#### 1.2 Méthode d'échantillonnage :

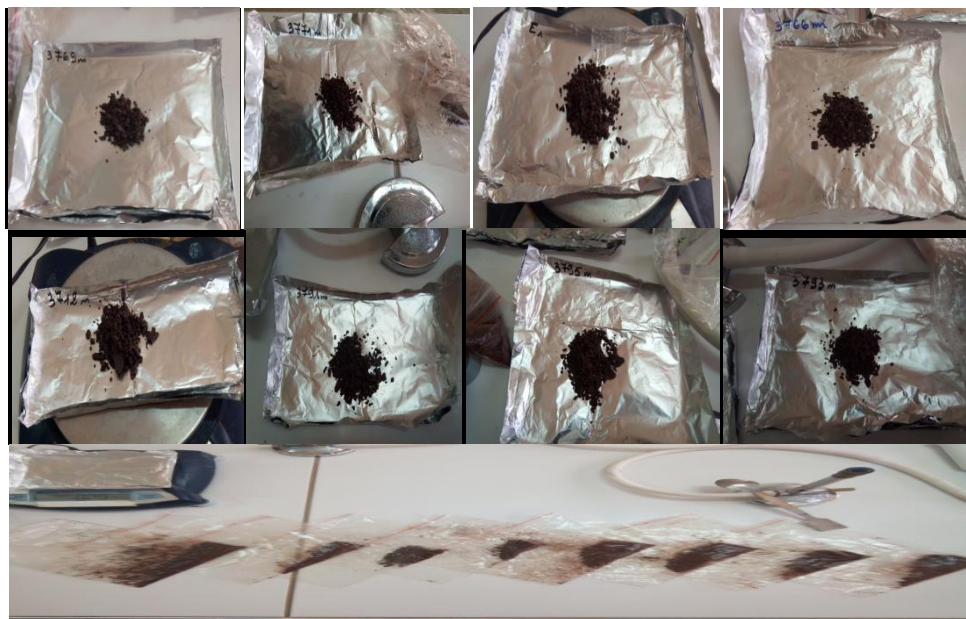
La méthode d'échantillonnage doit aborder les facteurs à contrôler pour garantir la validité des résultats d'essais. La collecte d'échantillons nécessite une bonne connaissance des outils de prélèvement et le choix du matériel utilisé est capital dans l'obtention des objectifs visés. La technique d'échantillonnage à adopter dépend de la profondeur à échantillonner, du type d'échantillon à prélever et du type de sol présent sur le site (M.Pallet, 1993).

Huit prélèvements du sol pollué ont été réalisés à l'aide d'une spatule stérile à des différentes profondeurs (3712m / 3766m / 3769m / 3771m / 3791m / 3795m / E). Les échantillons sont transportés au laboratoire dans des sacs stériles.

### 1.3 Etat de sol (Analyse macroscopique)

La reconnaissance de l'état du sol a pour le but de cerner la nature et l'origine d'une pollution.

- Les huit prélèvements prélevés ont la même couleur (marron foncé) et la même odeur (forte).



**Figure 07** : Aspect des échantillons de sol

### 2 L'enrichissement:

L'enrichissement est une étape qui se réalise quand on veut favoriser la croissance du germe recherché. Cette étape se réalise en milieu Nutrient Broth (Bouillon nutritif), en suivant les étapes suivantes :

Dans la zone d'asepsie, nous avons préparé huit solutions mères en mettant 5 g du sol contaminé dans 45ml du milieu Nutrient Broth. Après l'agitation par l'agitateur vortex, nous avons ajouté à chaque flacon 200ul de phénol à 0.1%. Les flacons ont été incubés à 30°C pendant 24h.

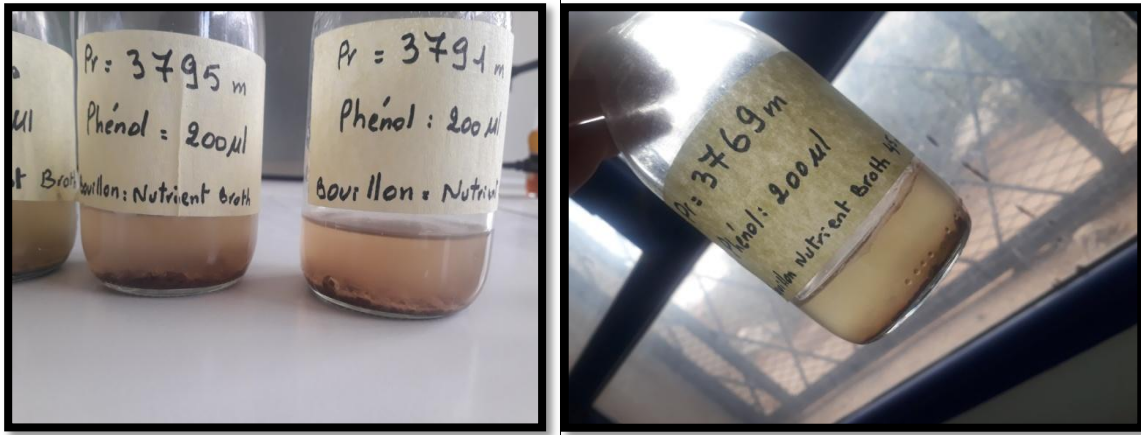


**Figure 08** : Les cultures dans le bouillon Nutrient Broth

## Matériel et méthodes

Après l'incubation à 30C° pendant 24h nous avons remarqué la présence d'un trouble microbien dans les huit flacons, comme les montrent dans les images suivantes (Figure 09) :

= croissance microbienne

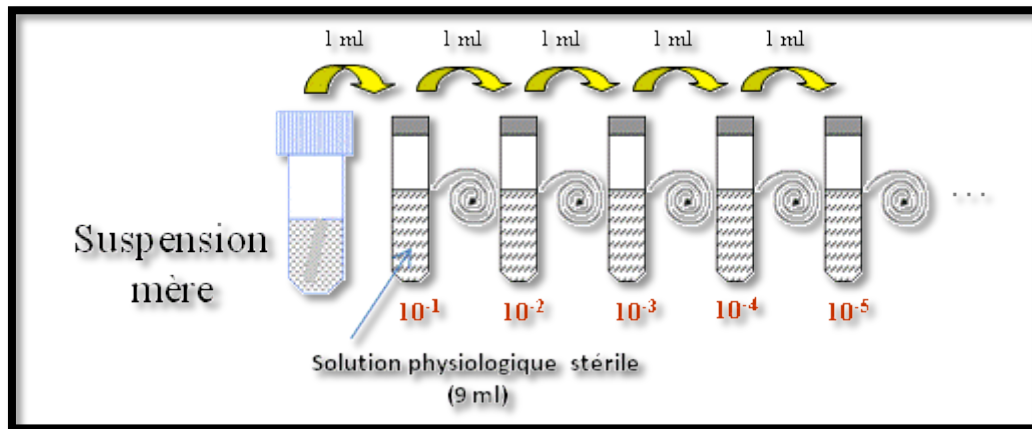


**Figure 09 : La croissance microbienne sur le milieu NB**

### 3 L'ensemencement:

#### 3.1 Préparation des dilutions :

Après l'enrichissement, nous avons préparé une dilution décimale pour les huit flacons après la stérilisation des tubes à essai à 1bar pendant 20 minutes.



**Figure 10 :** Schéma représentatif de la technique de dilution (INRS, Santé et sécurité au travail)

Ensuite à partir de chaque dilution (2 dilutions pour chaque flacon) nous avons réalisés 2 types d'ensemencement :

#### 3.2 Ensemencement en masse :

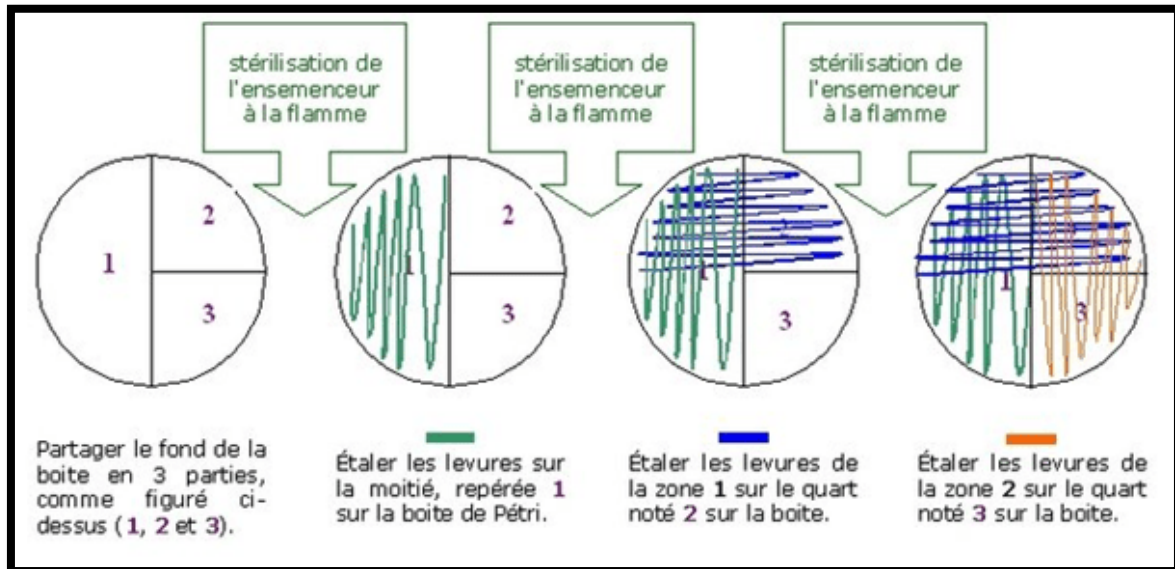
Un ensemencement en masse est le plus souvent réalisé afin de dénombrer des micro-organismes.

1000ul de la suspension mère à été dispersé dans une boîte de pétri vide, avec une quantité de 20ml du milieu LB en surfusion, et on a déplacé la boîte par un mouvement auscultatoire en forme huit (8) pour l'homogénéisation.

### 3.3 Ensemencement en surface :

Dans une boîte coulée par le milieu LB, nous avons étalé un volume de 0.1ml de la suspension mère sur la surface par la technique de quadrants (Figure 11).

Après l'ensemencement, les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 48h (Figure 12).



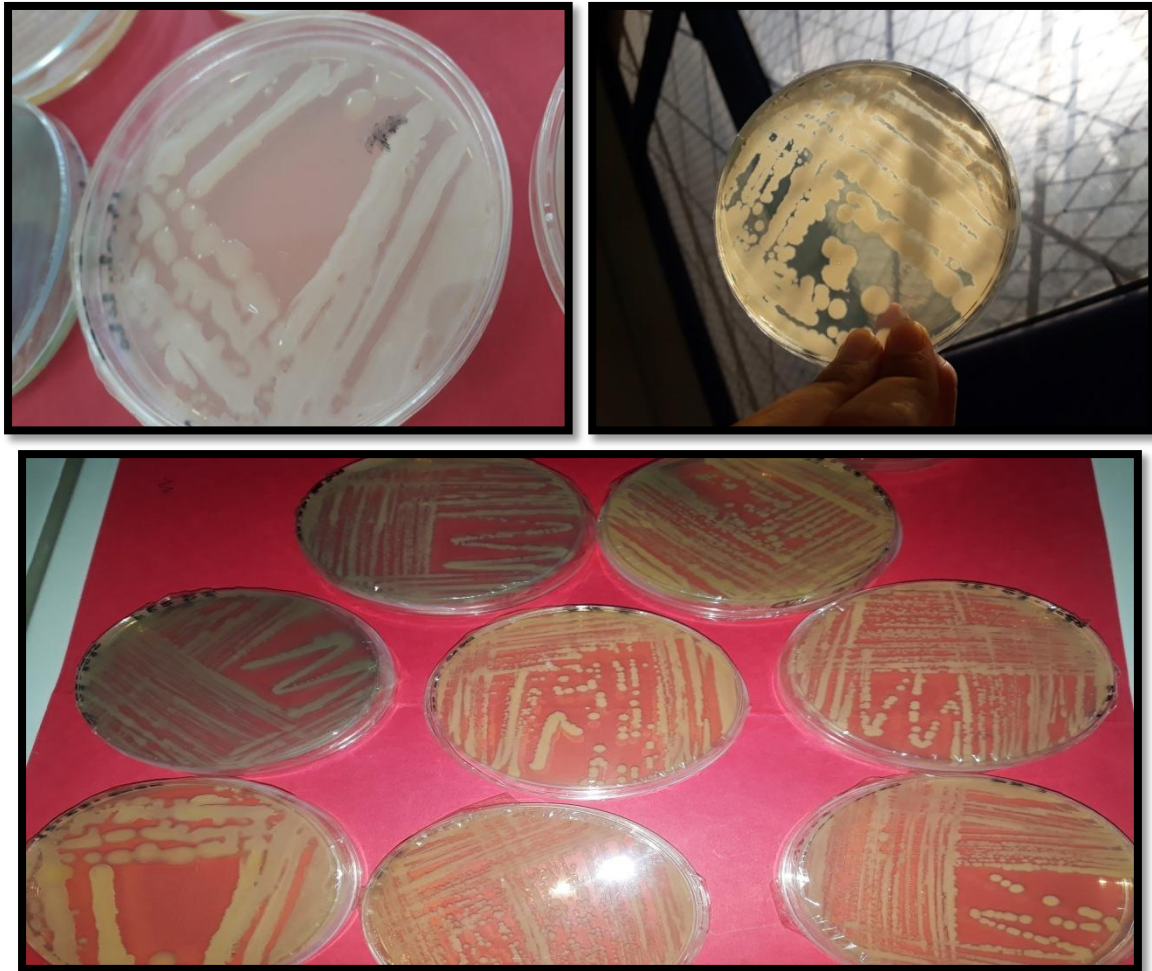
**Figure 11 :** Méthode d'ensemencement par la technique de quadrant (INRS, Santé et sécurité au travail)



**Figure 12 :** Incubation des boîtes de pétri après l'ensemencement

Après l'incubation à 30C° pendant 48h nous avons observés des colonies avec différentes aspects (transparent, verdâtre ...) comme le montrent dans les images suivantes (Figure 13) :

= Les résultats montrent une variété de type bactérienne.



**Figure 13 :** L'aspect macroscopique de différentes souches microbiennes

### 4 Purification des souches bactériennes :

Par l'ensemencement dans la surface du milieu LB par la technique de quadrant.

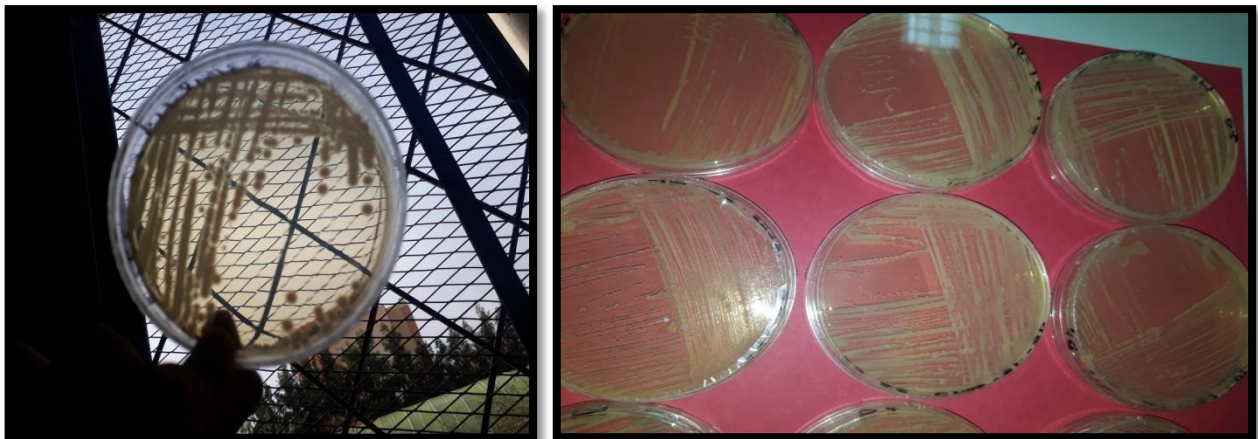
- Incubation à 30°C pendant 48h.

Après la purification des colonies, nous avons obtenues des différents isolats.

Nous avons choisi les souches suivantes pour le test de biodégradation :

Echantillon	Isolats	Couleur	Bordure	Aspect de surface
Echantillon 01	S1/3795	Transparente	Régulier	Briante
Echantillon 02	S2/3795	Transparente	Régulier	Briante
Echantillon 03	SE1	Blanchâtre	Régulier	Lisse
Echantillon 04	S1/3771	Transparente	Dentelé	Lisse
Echantillon 05	S2/3771	Blanchâtre	Régulier	Lisse
Echantillon 06	SE2	Beige	Régulier	Lisse / Bambée
Echantillon 07	S3766	Beige	Ondulé	Lisse / Plat

**Tableau 04 :** Les différents isolats utilisés pour le test de biodégradation



**Figure 14 :** Aspect macroscopique de colonies de quelques souches bactériennes

## 4.1 Etude morphologique de quelques souches purifiées:

### 4.1.1 Aspect macroscopique :

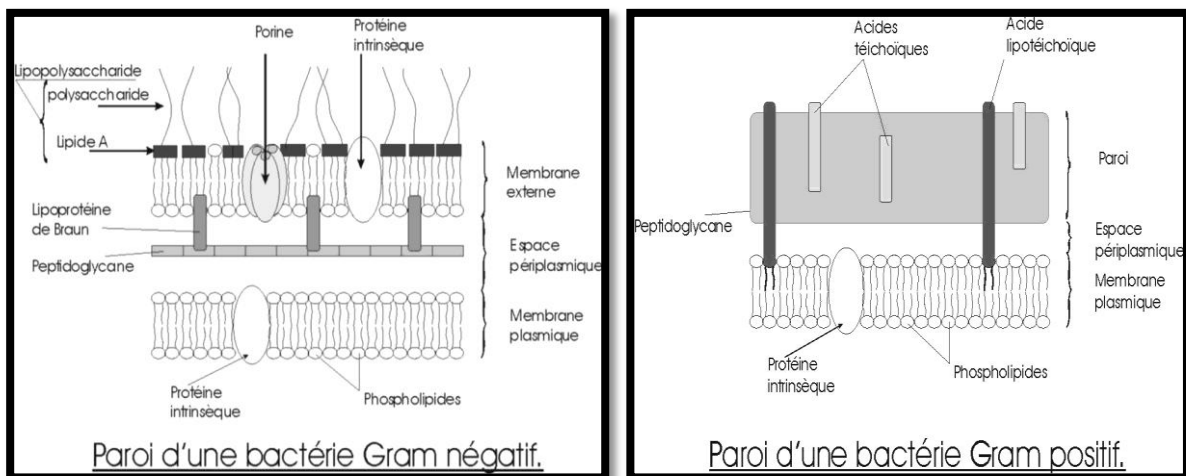
L'observation macroscopique des colonies est l'étude de l'aspect des colonies. Et dont la taille, la forme, la couleur, la consistance sont caractéristiques de chaque espèce. ... (Kouadri, 2014).

### 4.1.2 Aspect microscopique :

La coloration de Gram est la base de l'identification d'une souche bactérienne. Elle doit être parfaitement maîtrisée car c'est le point de départ du choix des examens complémentaires à effectuer, des milieux àensemencer etc.... (Kouadri, 2014).

Au terme du processus de coloration, les bactéries dites « Gram Négatives » apparaissent roses tandis que les bactéries dites « Gram Positives » sont colorés en bleu foncé.

En effet, les différences de coloration des bactéries reposent sur des différences de constitution de la paroi.



**Figure 15 :** Schémas représentatif des parois des bactéries Gram + / Gram - (David et al, 1994)

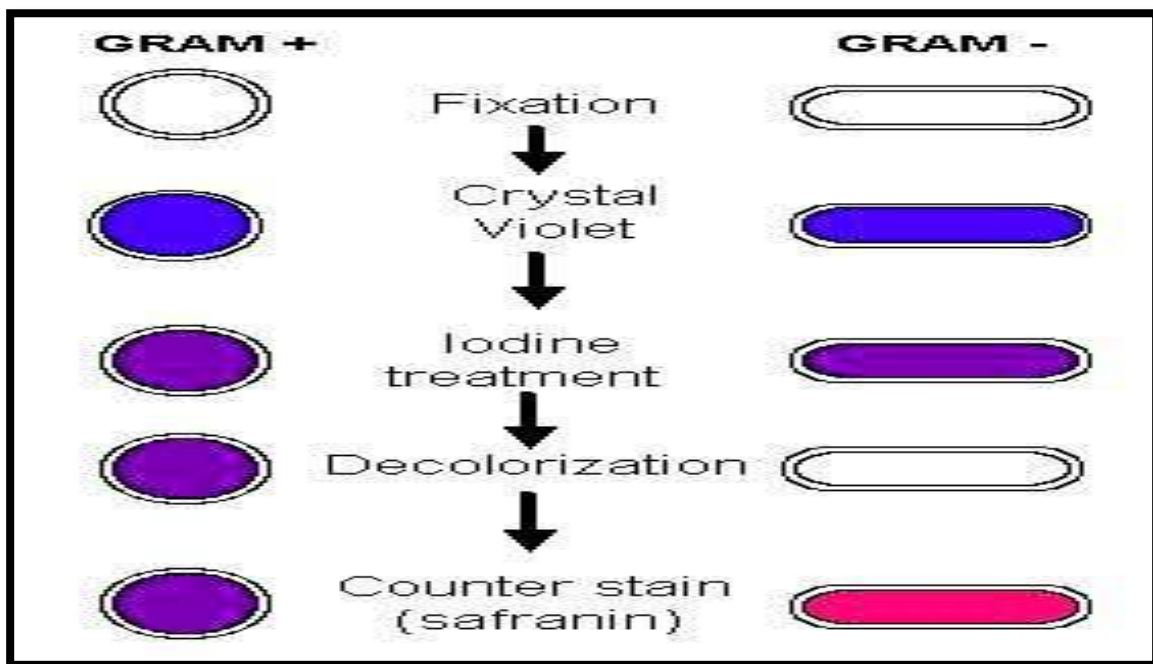
- Cette étape a pour but de vérifier la pureté des souches isolées.

### La méthode :

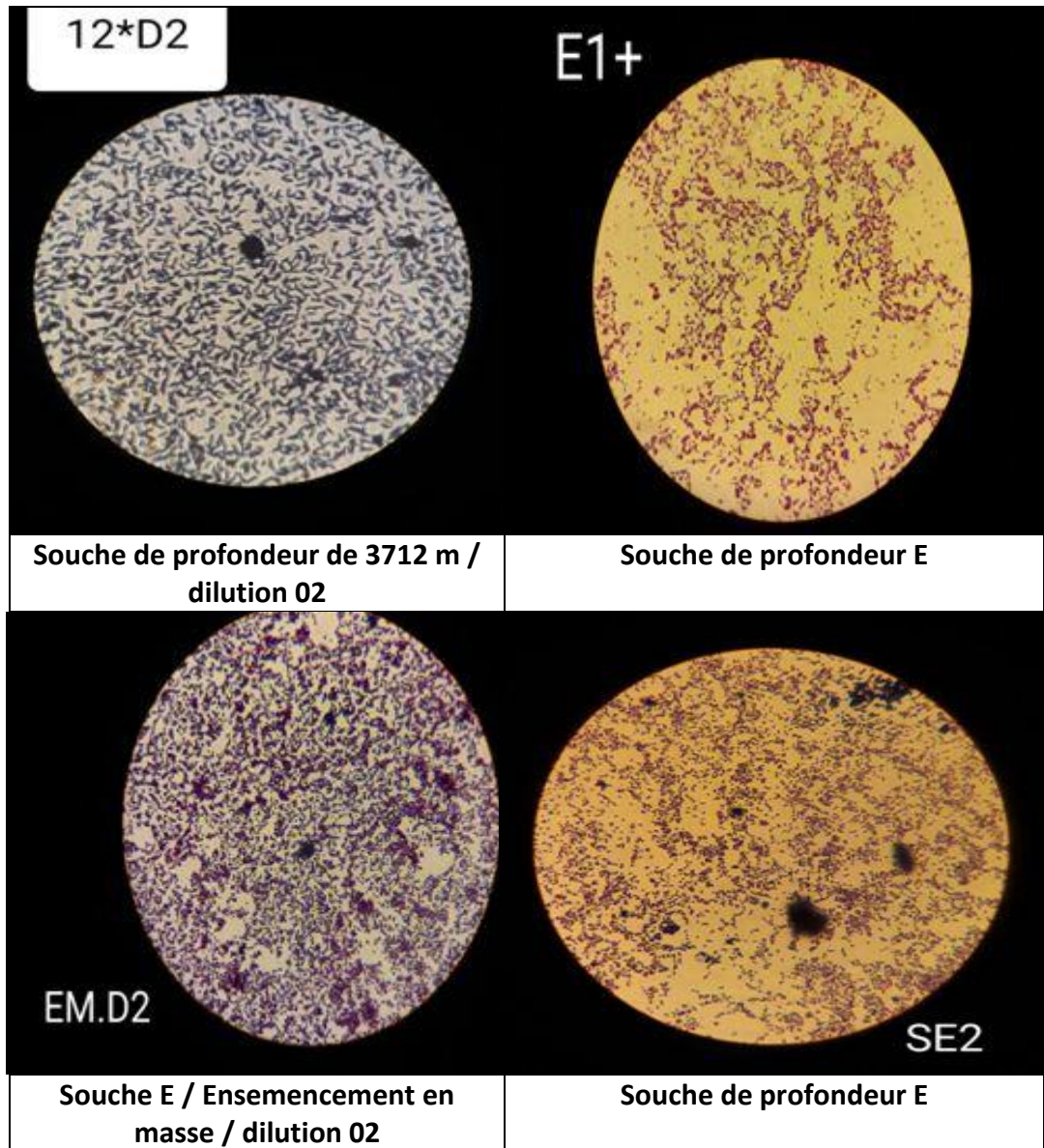
Après la préparation d'un frottis sur une lame par la suspension bactérienne, nous avons réalisé notre coloration :

- 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).



**Figure 16** : Schéma représentatif de la technique de coloration de gram (David et al, 1994)



**Figure 17** : Observation microscopique des isolas capables a dégradé le phénol

### 4.2 Conservation des souches

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



Figure 18 : Conservation des souches dans des tubes inclinés

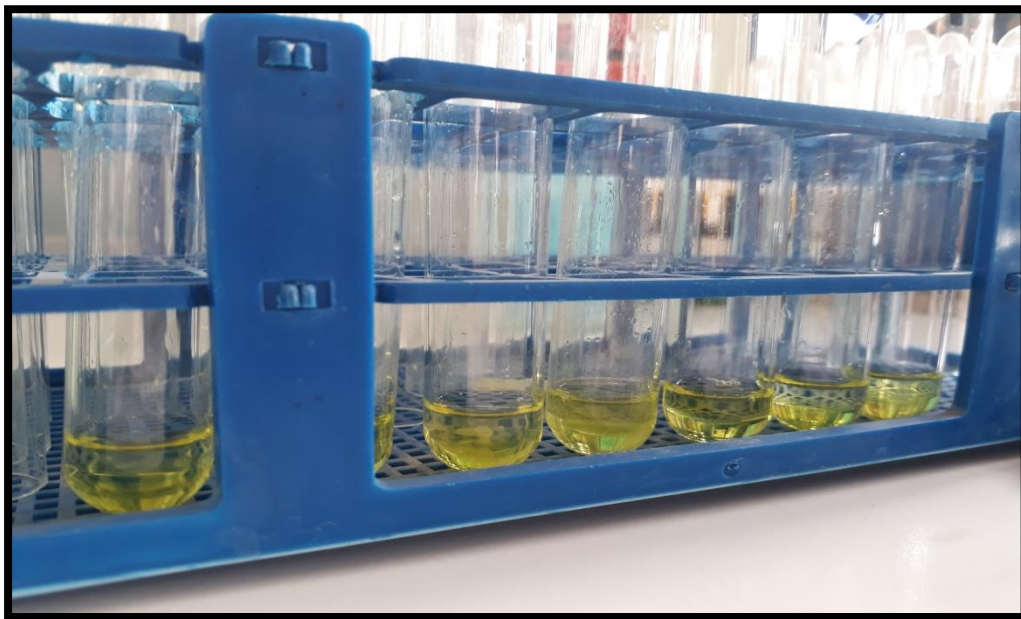
### 5 Sélection des souches susceptibles de dégrader le phénol :

Dans la présente étude 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 48h. Après cette période d'incubation, la lecture des résultats se fait par un dosage colorimétrique de phénol comme la suite :

#### 5.1 Le dosage colorimétrique:

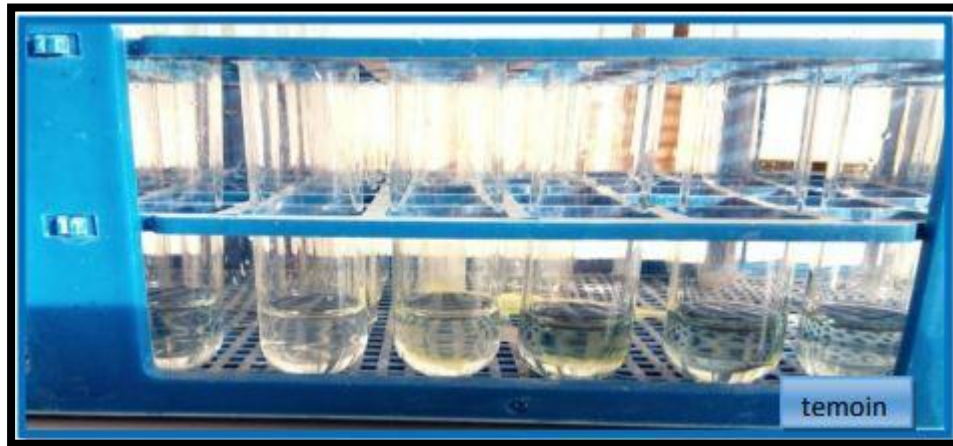
-Dans un tube qui contient un volume d'eau distillé, nous avons déposé 100ul de chaque souche dans un tube (après la centrifugation de la suspension pendant 5 minutes par 3500 rotation/min) avec 200ul de pholin-ciocalteu. Après 3 minutes on a ajouté 600ul de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ).



**Figure 19 :** Réalisation du test biodégradation de phénol

## Matériel et méthodes

- On a obtenu plusieurs isolats de la même souche E qui dégrade complètement le phénol, alors que la couleur devient transparente (par la comparaison avec le témoin).
- Les autres isolats ne sont pas capables de dégrader le phénol (la couleur reste bleue).



**Figure 20 : Résultats du dosage colorimétrique de phénol**

Isolats	Résultats
<b>Témoin</b>	Négative ( Couleur bleu )
<b>S1 / 3795</b>	Négative ( Couleur bleu )
<b>S2 / 3795</b>	Négative ( Couleur bleu )
<b>SE1 / SE2</b>	Positive ( Couleur transparent )
<b>S1 / 3771</b>	Négative ( Couleur bleu )
<b>S2 / 3771</b>	Négative ( Couleur bleu )
<b>S 3766</b>	Négative ( Couleur bleu )

**Tableau 05 : Résultats du dosage colorimétrique de phénol**

### 5.2 Étude de l'adaptation microbienne

Pour cette étape on a utilisé la souche E qui dégrade complètement le phénol.

Premièrement, nous préparons une suspension microbienne dans un tube stérile qui contient 9ml de milieu minéral à partir des colonies de la souche E, et à l'aide du spectrophotomètre on mesure la densité optique à une longueur d'onde de 620nm, la première absorbance est 1.8DO.

Ensuite, dans quatre flacons qui contiennent 45ml de milieu minéral, on dépose à chaque flacon 1 ml de la suspension préparée pour avoir une densité microbienne égale dans tous les flacons et cette densité initiale a été mesurée à une absorbance de 0.001. Ensuite nous avons ajouté des concentrations différentes de phénol à chaque flacon : 300mg/l – 500mg/l – 700mg/l – 1000mg/l. Nous préparons aussi un flacon qui ne contient pas le phénol comme un Témoin et nous agitions les flacons à l'aide de l'agitateur vortex, et le pH de milieu minéral a été mesuré à un pH au 6.5 car c'est le pH optimal de la dégradation de phénol. Les flacons ont été incubés à 30°C sous agitation à l'aide d'un agitateur scheiker à 250rpm.

On mesure la biomasse microbienne et le phénol résiduel chaque 2 heures pour suivre la croissance microbienne et la dégradation de phénol et déterminer le temps nécessaire de la dégradation de chaque concentration.

\* La lecture de la biomasse : la mesure de densité optique par le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620 nm.

\* la lecture de la concentration de phénol : se fait par la méthode de dosage colorimétrique de phénol. Après la centrifugation de la suspension pendant 5min par 3500 rotation/min pour la séparation entre la masse moléculaire et le milieu qui contient le phénol, nous appliquons les étapes du dosage colorimétrique. La mesure de densité optique se fait par le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 765 nm.

Ensuite les souches qui terminent la dégradation de ces concentrations (300 mg/l et 500 mg/l ... etc.) de phénol, la biomasse microbienne adaptée produite de cette dégradation a été récupérée par la suite par une centrifugation à 4000 rotation/min pendant 15 minutes, le caillot formé correspond à notre biomasse adaptée qu'avec laquelle on a fait une deuxième culture avec les mêmes étapes en augmentant les concentrations de phénol d'ordre croissant.

## Matériel et méthodes

- Pour la souche adaptée au 300mg/l de phénol, nous augmentons leur concentration au 700mg/l dans un flacon et 1000mg/l dans une autre.

- Pour la souche adaptée au 500mg/l de phénol, nous augmentons leur concentration au 1000mg/l et au 1200mg/l.

- Et nous mesurons la biomasse et le phénol résiduel chaque 2 heure. Nous suivre les mêmes étapes jusqu'à une concentration de 1500mg/l de phénol comme suite :

- (A300 ; 700) → La nouvelle concentration



Adaptée au 300mg/l

- (A300 ; 1000)
- (A500 ; 1000)
- (A500 ; 1200)
- (A700 ; 1000)
- (A700 ; 1200)
- (A300 ; A700 ; 1000)
- (A300 ; A1000 ; 1000)
- (A500 ; A1000 ; 1000)
- (A500 ; A1200 ; 1000)
- (A700 ; A1000 ; 1000)
- (A700 ; A1200 ; 1000)
- (A300 ; A700 ; A1000 ; 1200)
- (A300 ; A1000 ; A1000 ; 1200)
- (A500 ; A1000 ; A1000 ; 1200)
- (A500 ; A1200 ; A1000 ; 1200)
- (A300 ; A700 ; A1000 ; A1200 ; 1500)
- (A300 ; A1000 ; A1000 ; A1200 ; 1500)
- (A500 ; A1000 ; A1000 ; A1200 ; 1500)
- (A500 ; A1200 ; A1000 ; A1200 ; 1500)

# *Partie 02:*

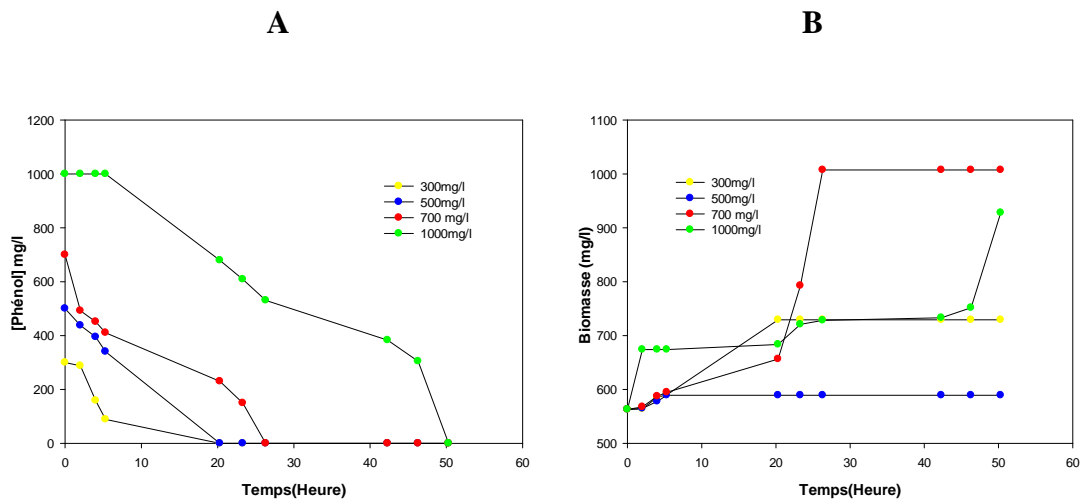
## *Résultats et interprétations*

## Résultats et interprétations

Lorsque les cellules sont nourries avec du phénol, elles ont besoin d'une période d'adaptation où deux phénomènes clés se produisent.

Autrement dit, les cellules induisent diverses enzymes pour dégrader le substrat et peuvent changer la structure de leur membrane pour se protéger du toxique.

Si elles réussissent à survivre à la période d'adaptation, les cellules commencent à dégrader le substrat. Par conséquent, le profil de la dégradation de phénol peut être divisé en deux phases, la période d'adaptation et la période de dégradation réelle et en parallèle l'augmentation de la croissance bactérienne comme les montre la figure suivante :



**Figure 21 : Biodégradation du phénol par la bactérie étudiée pour les concentrations initiales ; (A) Biodégradation des concentrations 300mg/l, 500mg/l, 700mg/l et 1000mg/l de phénol par la souche étudiée en fonction du temps ; (B) Augmentation de la biomasse microbienne en fonction du temps**

La cellule a nécessité un temps d'adaptation différent avec la concentration initiale en phénol.

Par exemple, elle a fallu 7 h de période d'adaptation pour la dégradation de 1000 mg /L de phénol. Par contre, on n'a pas constaté une phase d'adaptation (elle est presque nulle) pour les concentrations 300mg/l 500mg/l et 700mg/l, elle passe directement à la phase de dégradation. À mesure que la concentration initiale de phénol augmentait, la période d'adaptation devenait plus longue.

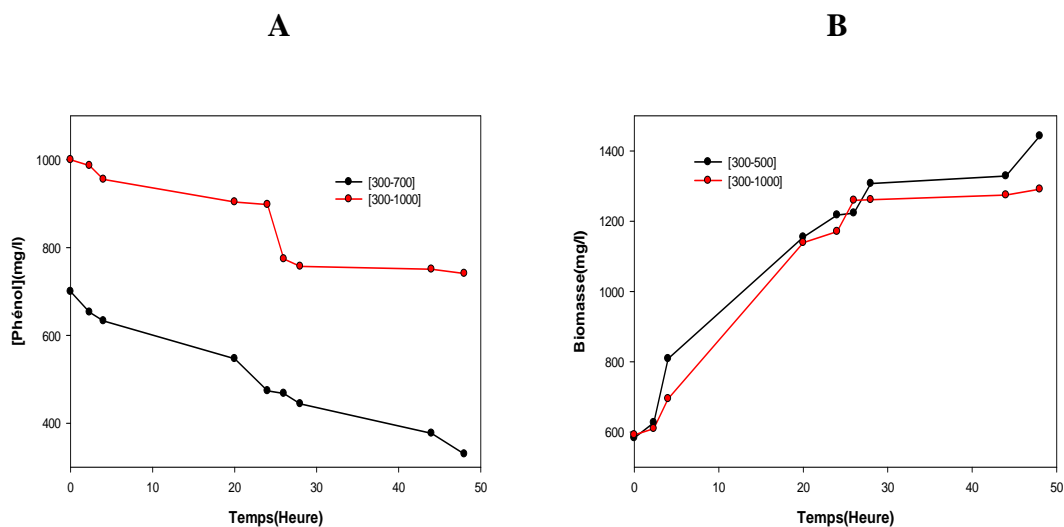
## Résultats et interprétations

Les résultats signifient que la vitesse de dégradation du phénol peut être sensiblement augmentée en éliminant la période d'adaptation et que la concentration en phénol à laquelle les cellules sont supportables et capables de dégrader le phénol peut être prolongée par pré-adaptation.

### 1 Amélioration du taux de dégradation par pré-adaptation :

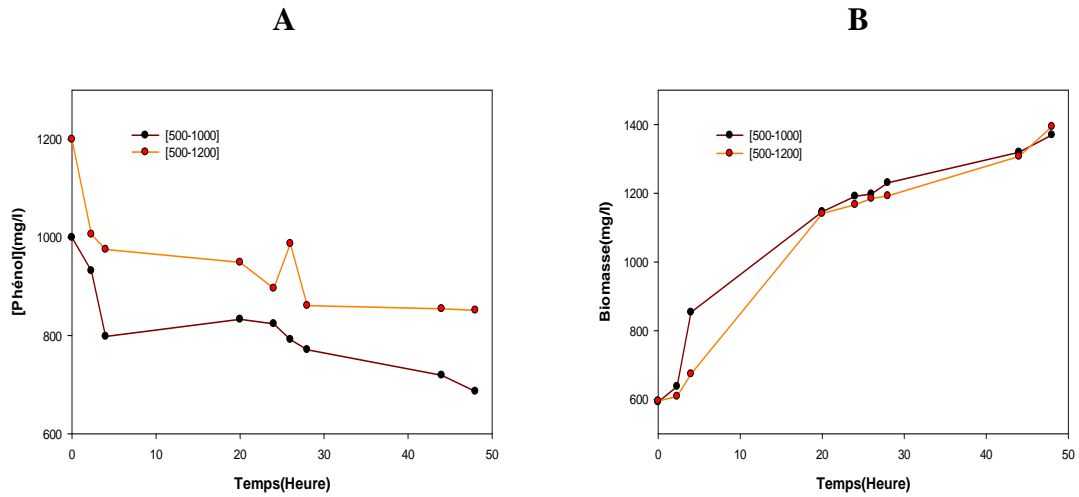
#### 1.1 Effet de la concentration de phénol à laquelle les cellules pré-adaptées :

Comme indiqué ci-dessus, la vitesse de dégradation peut être remarquablement améliorée en utilisant des cellules pré-adaptées.



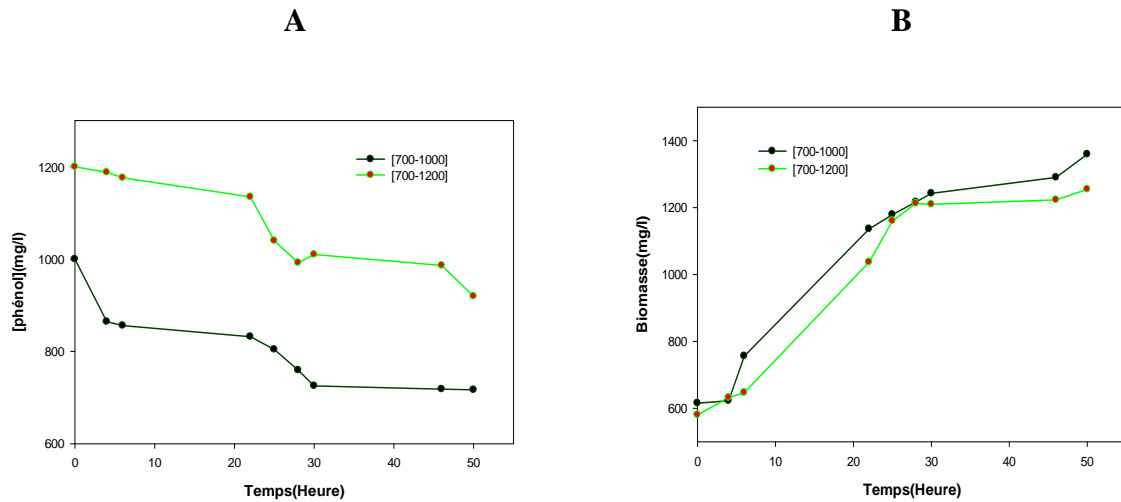
**Figure 22 : Biodégradation de phénol par une souche pré-adaptée au 300mg/l ; (A) Biodégradation des concentrations 700mg/l et 1000mg/l de phénol par une souche pré-adaptée au 300mg/l en fonction du temps ; (B) Augmentation de la biomasse microbienne en fonction du temps**

- Lorsque la souche est adaptée au 300mg/l de phénol, nous augmentons la concentration au 700mg/l et 1000mg/l pour améliorer la vitesse de dégradation. Nous constatons que la phase d'adaptation est presque nulle, tandis qu'elle a fallu 47 heures pour une dégradation incomplète.



**Figure 23 : Biodégradation de phénol par une souche pré-adaptée au 500mg/l ;**  
 (A) Biodégradation des concentrations 1000mg/l et 1200mg/l de phénol par une souche pré-adaptée au 500mg/l en fonction du temps ; (B) Augmentation de la biomasse microbienne en fonction du temps

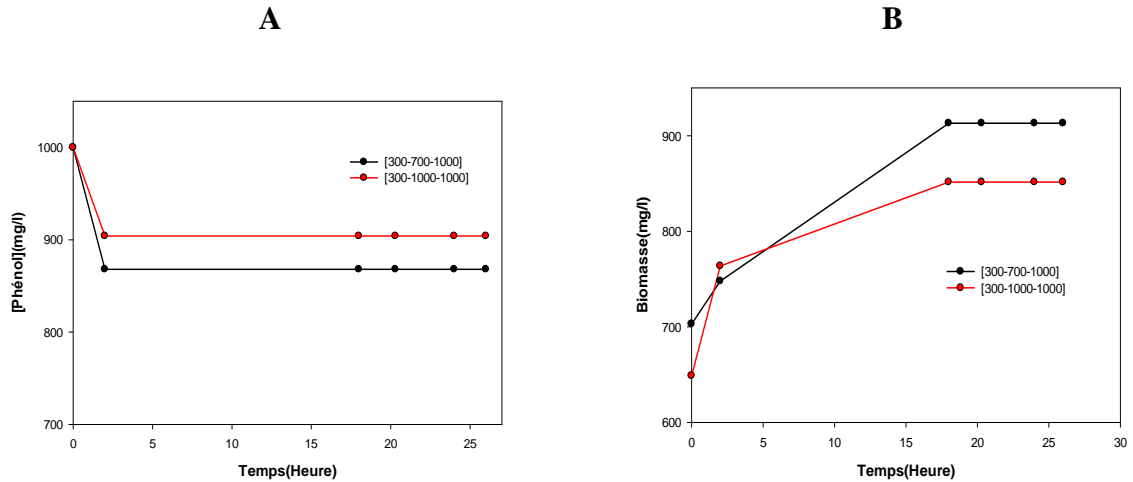
- Concernant la souche adaptée au 500mg/l de phénol, nous améliorons la vitesse de dégradation par l'augmentation de la concentration initiale au 1000mg/l et 1200mg/l. On a constaté qu'il y a une chute libre pour les deux concentrations, tandis qu'elle a fallu 47 heures pour une dégradation incomplète.



**Figure 24: Biodégradation de phénol par une souche pré-adaptée au 700mg/l ;** (A) Biodégradation des concentrations 1000mg/l et 1200mg/l de phénol par une souche pré-adaptée au 700mg/l en fonction du temps ; (B) Augmentation de la biomasse microbienne en fonction du temps

## Résultats et interprétations

- Pour la concentration 700mg/l, lorsque la souche est adaptée nous augmentons la concentration au 1000mg/l et 1200mg/l. Nous constatons une dégradation lente et incomplète pour les deux concentrations.

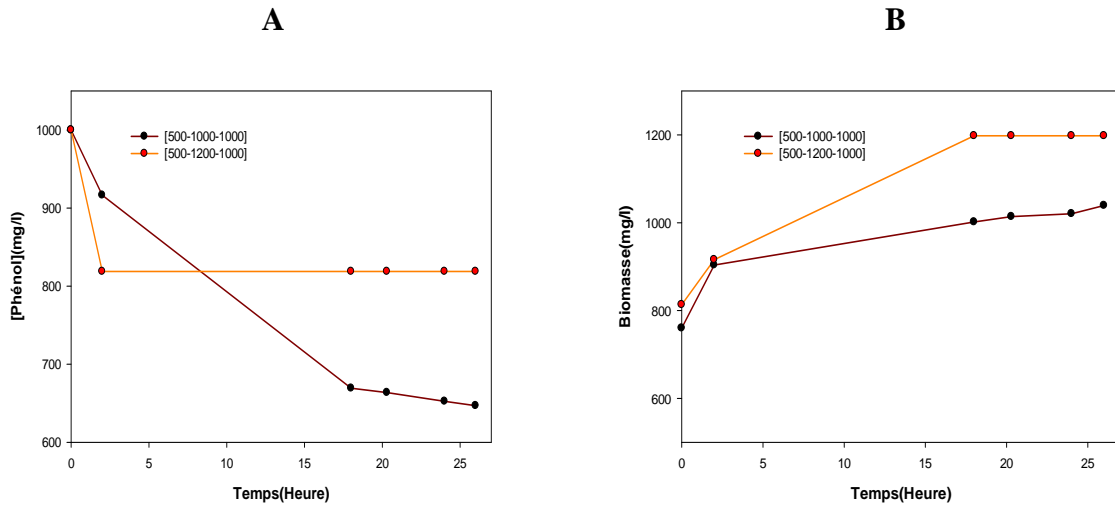


**Figure 25 : Biodégradation de phénol par une souche pré-adaptées au 300-700mg/l et 300-1000mg/l ; (A) Biodégradation d'une concentration de 1000mg/l de phénol par des souches pré-adaptées au 300-700mg/l et 300-1000mg/l en fonction du temps ; (B) Augmentation de la biomasse microbienne en fonction du temps**

- Pour la souche pré-adaptée au 300mg/l et 700mg/l et la souche pré-adaptée au 300mg/l et 1000mg/l, nous améliorons leur vitesse de dégradation par l'augmentation de la concentration au 1000 mg/l.

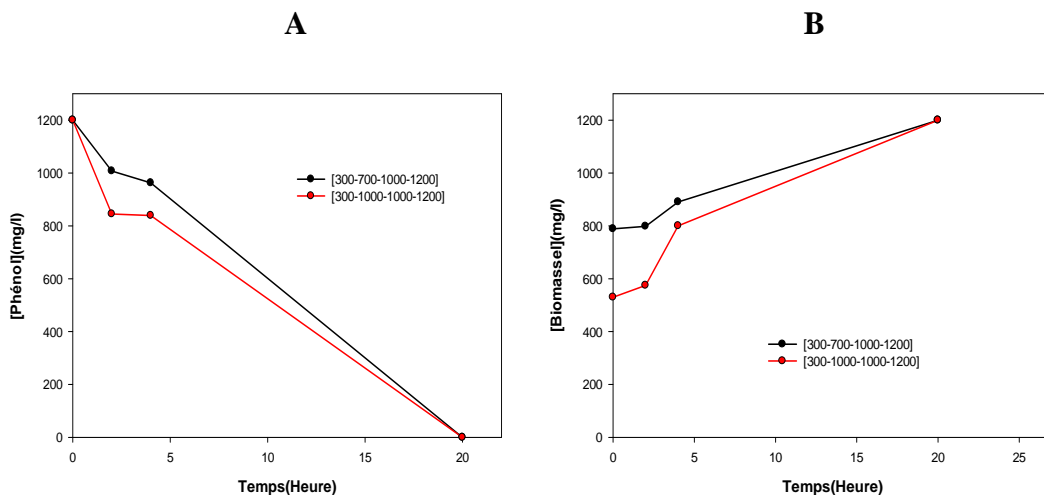
Tandis qu'elle fallu 20 heures pour une dégradation complète de cette concentration de phénol.

## Résultats et interprétations



**Figure 26 : Biodégradation de phénol par une souche pré-adaptées au 500-1000mg/l et 500-1200mg/l ; (A) Biodégradation d'une concentration de 1000mg/l de phénol par des souches pré-adaptées au 500-1000mg/l et 500-1200mg/l en fonction du temps ; (B) Augmentation de la biomasse microbienne en fonction du temps**

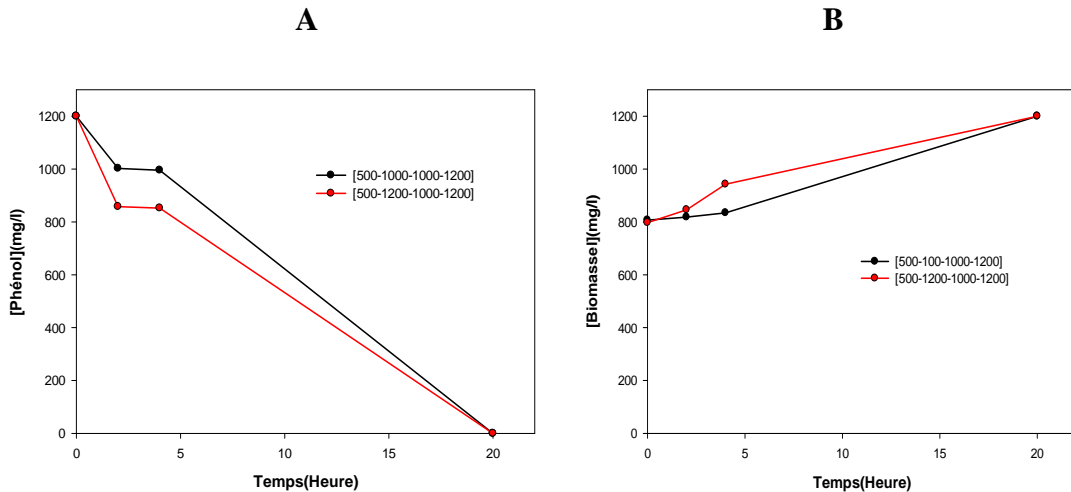
- Concernant la souche pré-adaptée au 500mg/l et 1000mg/l et la souche pré-adaptée au 500mg/l et 1200mg/l, nous augmentons leurs concentrations de phénol au 1000mg/l. Nous remarquons que la première a fallu 27 heures pour une dégradation partielle de phénol, par contre, le deuxième reste 20 heures pour une dégradation complète de 1000mg/l de phénol.



**Figure 27 : Biodégradation de phénol par une souche pré-adaptées au 300-700-1000mg/l et 300-1000-1000mg/l ; (A) Biodégradation d'une concentration de 1200mg/l de phénol par des souches pré-adaptées au 300-700-1000mg/l et 300-1000-1000mg/l en fonction du temps ; (B) Augmentation de la biomasse microbienne en fonction du temps**

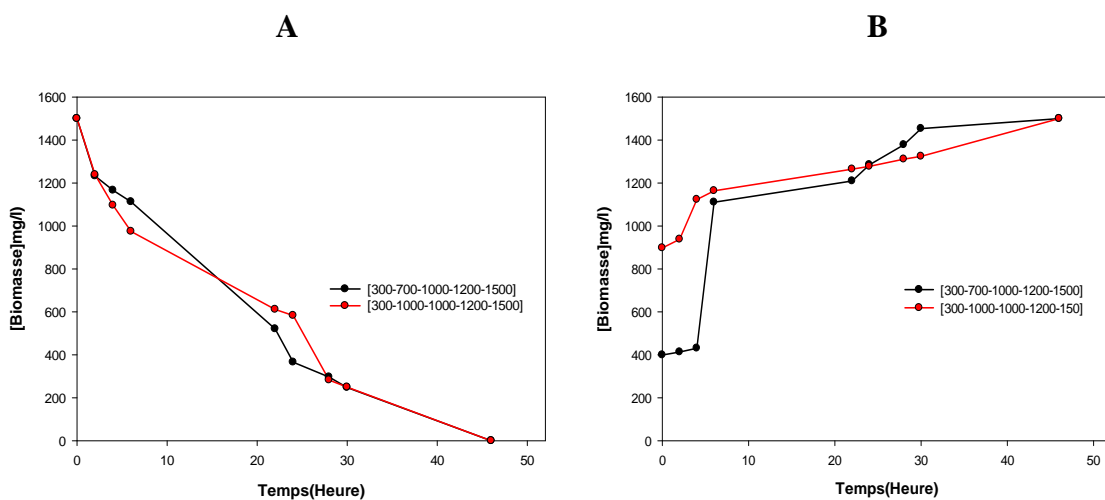
## Résultats et interprétations

- Où la souche pré-adaptée au 300-700mg/l et la souche pré-adaptée au 300-1000mg/l sont aussi adaptées au 1000mg/l, nous augmentons leurs concentrations au 1200mg/l. Nous constatons que la dégradation complète de phénol a fallu 20 heures.



**Figure 28 : Biodégradation de phénol par une souche pré-adaptées au 500-1000-1000mg/l et 500-1200-1000mg/l ; (A) Biodégradation d'une concentration de 1200mg/l de phénol par des souches pré-adaptées au 500-1000-1000mg/l et 500-1200-1000mg/l en fonction du temps ; (B) Augmentation de la biomasse microbienne en fonction du temps**

- La même remarque avec les graphes précédents (Dégradation complète pendant 20 heures).



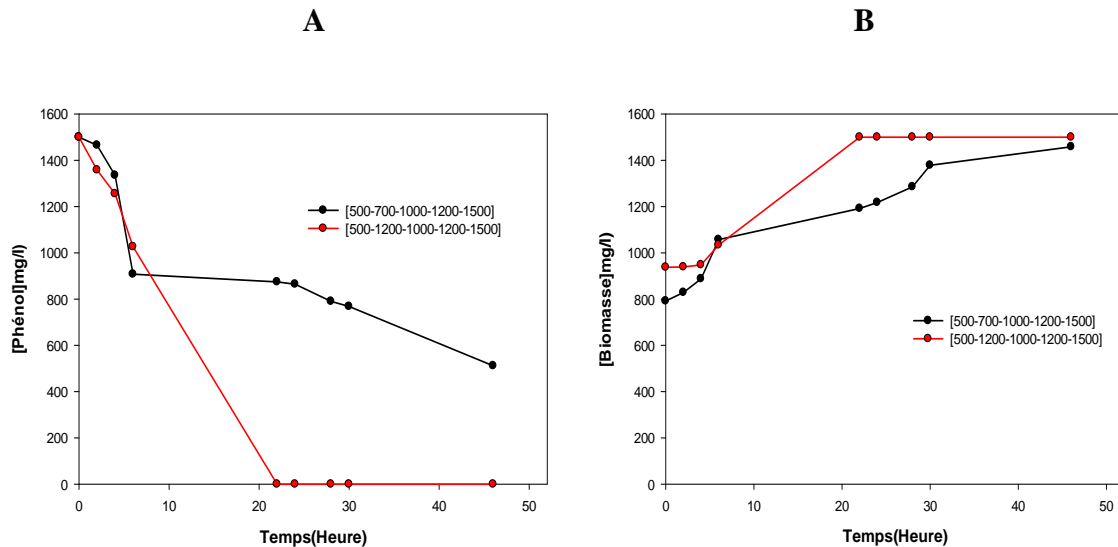
**Figure 29 : Biodégradation de phénol par une souche pré-adaptées au 300-700-1000-1200mg/l et 300-1000-1000-1200mg/l ; (A) Biodégradation d'une concentration de 1500mg/l de phénol par des souches pré-adaptées au 300-700-1000-**

## Résultats et interprétations

1200mg/l et 300-1000-1000-1200mg/l en fonction du temps ; (B) Augmentation de la biomasse microbienne en fonction du temps

- Pour les souches qui adaptent au 1200mg/l, on augmente leur concentration au 1500mg/l.

Il subit une dégradation complète de phénol durant 46 heures.



**Figure 30 : Biodégradation de phénol par une souche pré-adaptées au 500-1000-1000-1200mg/l et 500-1200-1000-1200mg/l ; (A) Biodégradation d'une concentration de 1500mg/l de phénol par des souches pré-adaptées au 500-1000-1000-1200mg/l et 500-1200-1000-1200mg/l en fonction du temps ; (B) Augmentation de la biomasse microbienne en fonction du temps**

- Pour les souches qui adaptent au 1200mg/l, on augmente leur concentration au 1500mg/l. Il subit une dégradation complète de phénol durant 22 heures pour la souche pré-adaptée au 500-1200-1000-1200mg/l. Par contre, la souche pré-adaptée au 500-1000-1000-1200mg/l ne subit pas une dégradation complète.

Les résultats impliquent que les cellules doivent être pré-adaptées au phénol dont la concentration est proche de la concentration de phénol cible pour une dégradation rapide.

Par exemple, les cellules pré-adaptée à 300/700/1000et 1200 mg / L de phénol ont nécessité 46 h pour la dégradation de 1500 mg / L de phénol tandis que la cellule pré-adaptée à 500/1200/1000 et 1200mg / l nécessitait une période de 22 h. Aussi, les seules souches qui ont la capacité de dégrader 1500mg/l de phénol sont les souches pré-adaptées au 300 mg/l et 500 mg/l de phénol. (La meilleure concentration de phénol pour l'adaptation des souches est 500mg/l).

### 1.2 Effet de la pré-adaptation répétée à une même concentration

Il a été démontré que la pré-adaptation à un composé éliminait la majeure partie de la période d'adaptation lors d'une dégradation ultérieure, ce qui entraînait une augmentation du taux de dégradation. Cependant, bien que des cellules pré-adaptées aient été inoculées, elles ont eu besoin d'une autre période d'adaptation de quelques heures dans la dégradation ultérieure. En conséquence, des pré-adaptations répétées pourraient augmenter d'avantages le taux de dégradation.

### 1.3 Effet des adaptations consécutives par étapes

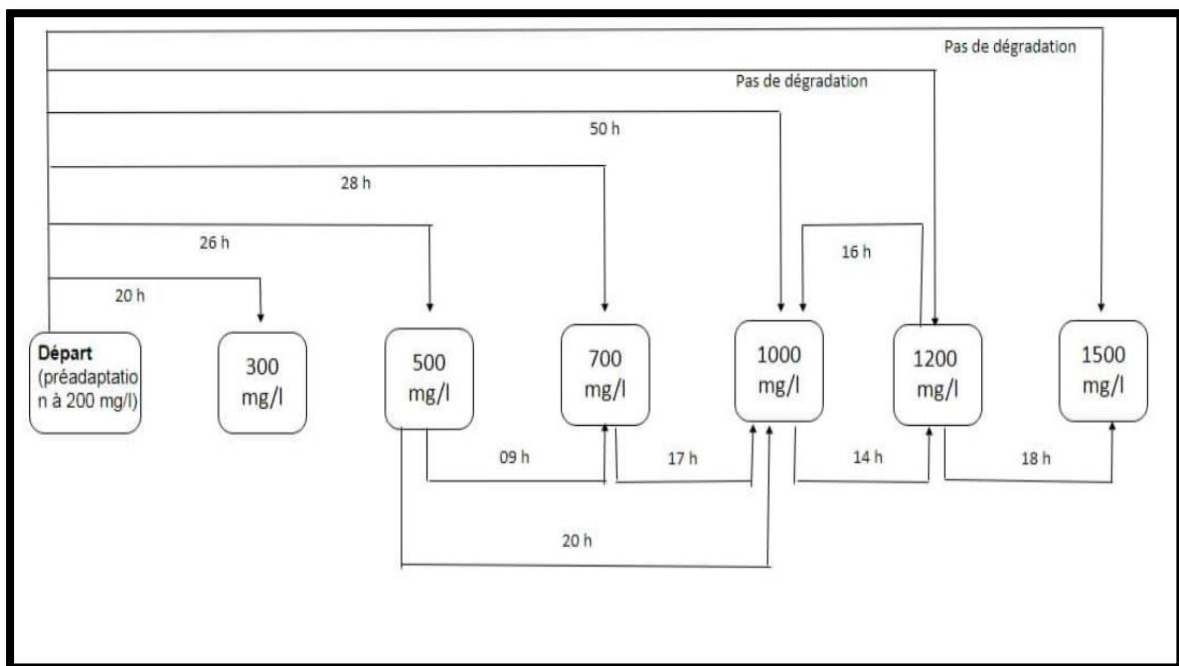


Figure 31 : Diverses voies d'adaptation pour la dégradation du phénol

Le temps de dégradation s'est avéré dépendant de la concentration de phénol à laquelle les cellules avaient été pré-adaptées. Par exemple, lorsque les cellules avaient été pré-adaptées à 500 ou 700 mg/l de phénol, il a fallu 20h ou 17h pour dégrader 1000 mg/l de phénol, respectivement.

L'adaptation à une concentration de phénol plus élevée a entraîné un temps de dégradations plus courtes ou une vitesse de dégradation plus élevée.

Les cellules pré-adaptées trois fois à différentes concentrations de phénol ont nécessité séquentiellement un temps plus court pour dégrader 1500 mg/l de phénol que celles pré-adaptées une fois. Théoriquement, il existe d'innombrables concentrations de phénol auxquelles les cellules peuvent être pré-adaptées avant de dégrader 1500 mg/l de phénol.

### **2 Mécanisme d'adaptation au niveau de l'enzyme intracellulaire :**

Lors de la biodégradation du phénol, le phénol est converti en catéchol ou en dérivés de catéchol (Kyung Han, Sung Ho, 2008) par l'enzyme phénol hydroxylase avant le clivage du cycle aromatique donc le phénol hydroxylase représente la première enzyme dans la voie métabolique de la dégradation du phénol (Al-Khalid, Muftah, 2012).

Le cycle aromatique est ensuite clivé par ortho ou méta-clivage. L'étape de clivage s'est avérée être une étape déterminante dans le métabolisme du phénol et l'enzyme pertinent pour l'étape est la catéchol 1,2dioxygénase (C12DO) pour l'ortho-clivage ou la catéchol 2,3dioxygénase (C23DO) pour le méta-clivage (Kyung Han, Sung Ho, 2008). Le clivage du cycle peut se produire dans deux orientations différentes et cette différence de site de clivage est utilisée pour classer les catéchol dioxygénase en deux groupes; les enzymes de clivage intradiol (comme C12O) et extradiol (comme C23O) (Al-Khalid, Muftah, 2012).

Par conséquent, l'induction d'une activité élevée de C12DO ou C23DO peut augmenter la vitesse de dégradation du phénol (Kyung Han, Sung Ho, 2008).

Une concentration plus élevée en phénol a induit une activité C12DO / C23DO plus élevée responsable de l'étape de détermination du taux dans le métabolisme du phénol, mais une concentration plus élevée en phénol nécessitait auparavant un niveau élevé de C12DO/C23DO. Étant donné qu'une concentration élevée en phénol inhibait gravement la cellule, elle ne pouvait pas induire de C12DO/C23DO. En conséquence, la cellule a nécessité des arrêts pour induire à l'avance une certaine quantité d'enzyme : c'est l'explication de l'adaptation microbienne.

### Résumé d'une autre référence qui a travaillé sur ce sujet :

Afin d'améliorer le taux de dégradation du phénol et d'étendre la concentration de phénol dégradable, une adaptation microbienne avancée a été suggérée dans cette étude. Un micro-organisme capable de dégrader le phénol en tant que seule source de carbone a été isolé à partir d'un sol contaminé par du pétrole brut (*Pseudomonas putidia*). Le micro-organisme a pu dégrader le phénol jusqu'à 700 mg/l. deux types de taux de dégradation ont été considérés dans cette étude, le taux de dégradation total (WDR), y compris la période d'adaptation et le taux de dégradation réel (ADR). Les cellules pré-adaptées à 100–700 mg/l de phénol ont dégradé 1000 mg/l de phénol avec une vitesse de dégradation remarquablement améliorée. Des pré-adaptations répétées à la même concentration de phénol ont montré une augmentation négligeable de la vitesse de dégradation. On a constaté qu'une concentration relativement faible de phénol ne nécessitait qu'une seule pré-adaptation, tandis qu'une concentration élevée effectuait au moins deux pré-adaptation successives par étapes pour la dégradation rapide. Par exemple, 1000 mg /l de phénol ont été dégradés aussi rapidement qu'en 48 h lorsque la cellule a été préadaptée à 100 et 300 mg /l de phénol séquentiellement. Le mécanisme d'adaptation a été bien expliqué en termes d'induction de C12DO (Catéchol 12 Dioxygénase). L'activité de l'enzyme médiant le clivage du cycle aromatique était la plus élevée au milieu de la dégradation du phénol, et une concentration élevée en phénol avait tendance à induire une activité élevée. L'explication de l'adaptation microbienne nécessite encore plus Une concentration plus élevée de phénol induit une activité C12DO plus élevée responsable de l'étape de détermination de la vitesse dans le métabolisme du phénol. L'explication de l'adaptation microbienne nécessite encore plus enquête et preuves.

# Conclusion

Le traitement biologique au phénol a attiré beaucoup d'attention en raison de son approche respectueuse de l'environnement et de sa capacité à minéraliser les composés organiques toxiques. Cependant la dégradation du phénol par les micro-organismes est généralement limitée par l'inhibition du substrat et les faibles taux de conversion spécifiques. L'adaptation microbienne est l'une des méthodes prometteuses pour surmonter l'inhibition du substrat afin de traiter une concentration élevée de phénol. Afin d'augmenter le taux de dégradation du phénol et d'augmenter la concentration de phénol dégradable, une adaptation microbienne avancée a été suggérée dans cette étude.

Un micro-organisme capable de dégrader le phénol comme source de carbone a été isolé d'un sol contaminé par du pétrole brut. Le micro-organisme a pu dégrader le phénol jusqu'à 1500mg /l. Les cellules pré-adaptées à 300–700-1000-1200 mg /l de phénol ont dégradé 1 500 mg /l de phénol avec une vitesse de dégradation remarquablement améliorée. De plus, les cellules pré-adaptées à 500-1000-1200mg /l de phénol ont même dégradé 1500 mg /l de phénol.

Des pré-adaptations répétées à la même concentration de phénol ont montré une augmentation négligeable du taux de dégradation. Il a été constaté qu'une concentration relativement faible de phénol (300-500mg/l) ne nécessitait qu'une seule pré-adaptation tandis qu'une concentration élevée (1500mg /l) effectuait deux ou plusieurs pré-adaptations successives par étapes pour la dégradation rapide. Les résultats impliquent que les cellules doivent être pré-adaptées au phénol dont la concentration est proche de la concentration de phénol cible pour une dégradation rapide.

Le mécanisme d'adaptation a été bien expliqué en termes d'induction de catéchol dioxygénase (C12DO pour la voie orthoclivage et C23DO pour la voie métaclivage). L'activité de l'enzyme médiatrice du clivage du cycle aromatique était la plus élevée au milieu de la dégradation du phénol, et une concentration élevée en phénol avait tendance à induire une activité élevée. Il semblait y avoir différents niveaux de seuil en fonction des concentrations de phénol cibles et le micro-organisme devrait induire une activité enzymatique suffisamment élevée pour franchir le seuil afin de commencer la dégradation du phénol.

L'idée d'une adaptation progressive et d'une voie d'adaptation optimale dans cette étude sera espérons-le appliquée à la dégradation d'autres polluants.

## **Conclusion**

---

A fin de déterminé le genre et l'espèce bactérienne et de complété cette étude, il serait envisageable d'identifier à l'échelle moléculaire par la méthode de PCR (ARN16s).

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

---

- ❖ **Abdely, C. (2007).** Bioremédiation/phytoremediation. Thèse Département des sciences naturelles. Institute supérieur de l'éducation et de la formation continue. Université de Tunisie. P21.
- ❖ **Aberkane M, Ayache R, (2018).**, Essai de bioremédiation de sol pollué au gasoil par des bactéries hydrocarbonoclastes, , Université des frères mentouri Constantine p11.
- ❖ **Al-Khalid., Muftah. H., (2012).**, Biodégradation aérobie des phénols: un examen complet. Université des Émirats arabes unis, p 07.
- ❖ **Arnaud. P., (1997).**, Cours de chimie organique, 16ème édition.
- ❖ **Alexander, M., (1994).** Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, New York (USA).
- ❖ **Albert K, Zlatka A, et Husein Y, (2012),** Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives, Review
- ❖ **Barriuso E., Calvet R., Schiavon M., et Soulas G. (1996).** Les pesticides et les polluants organiques des sols. Transformation et dissipation. Forum le sol, un patrimoine menacé? Paris (France), p 279-292.
- ❖ **Bechac. J. et Mercier. B. (2012).**, optimisation du procédé d'adsorption du phénol dans un réacteur batch par les plans d'expériences, thèse doctorat en sciences.
- ❖ **Babou. F.,** L'action du plomb sur les marqueurs de résistances d'Artiplex halimus L. et d'Artiplex canescens (Pursh) Nutt, Mémoire de magister, p 07.
- ❖ **Ballerin, A. (1999).** Traitements biologiques des sols, Technique de l'Ingénieur.
- ❖ **Ballerini, D., Gatellier, C., Vogel, T. (1998).** Techniques de traitement par voie biologique. Ademe Editions. Angers. P 247
- ❖ **Basha KM, Rajendran A, Thangavelu V. (2008).**, Etudes cinétiques et d'optimisation de la biodégradation de phénol en utilisant Pseudomonas putida, Biochimique., Laboratoire d'ingénierie, Département de chimie Ingénierie, Annamalai Université, Tamilnadu, Inde.
- ❖ **Boucheseiche C., Cremille E., Pelte T. & Pojer K., (2002).** Pollution toxique et écotoxicologique : notions de base. Guide technique N°7. Agence de l'Eau Rhône Méditerranée et Corse, Montpellier (France).
- ❖ **Ballerin, A. (1999).** Traitements biologiques des sols, Technique de l'Ingénieur.

## Références bibliographiques

- ❖ **Bouderhem, A. (2011).** Utilisation des souches bactériennes telluriques autochtones dans la biodétection et la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures. Mémoire magister en Microbiologie appliquée. Université Kasdi Merbah Ouargla, P 5.
- ❖ **Bertrand, J. (1993).** Hydrocarbon Biodegradation and hydrocarbonoclastic bacterial communities composition grown in seawater as a function of sodium chloride concentration.
- ❖ **Coates JD, Woodward J, Allen J, Philp P, Lovley DR (1997).** Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. *Appl. Environ. Microbiol* 358-359.
- ❖ **Chassin P., Baize D., Cambier Ph., et Sterckeman T. (1996).** Les éléments traces métalliques et la qualité des sols : impact à moyen et à long terme. Forum « le sol un patrimoine menacé ? ». Paris (France), p 297-303.
- ❖ **Conseil national de recherches (1994).** Alternatives pour le nettoyage des eaux souterraines: Washington, National Academies Press, p 315.
- ❖ **Compendium of Chemical Terminology (1997),** Version corrigée en ligne : (2006) : Comounds consisting of carbon and hydrogen only.
- ❖ **Daffri.A., Harzellah.B., et Bousseboua H., (2014).** Biodegradation of High Concentration of p-Nitrophenol (PNP) by Wastewater Microflora, *Journal of Agricultural Science and Technology A 4 .P .300-306.*
- ❖ **Doyle E, Muckian L, Hickey AM, Clipson N (2008).** Microbial PAH degradation. *Adv. Appl. Microbiol.* p: 27-66.
- ❖ **David H, Bergey, John G et al, (1994).** *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, p 787.
- ❖ **Davis., Madsen. (1996).** Factors affecting the biodegradation of toluene in soil.
- ❖ *Chemosphere*, vol 33 N 1, p 107-130.
- ❖ **Dali. M., et Iddir. O. (2018).** Etude physico-chimique et microbiologique d'un sol pollué par les hydrocarbures avant et après traitement par phytoremediation, p06.
- ❖ **Erb F, Vasseur P., (1993),.** Toxicologie, environnement, législation. – (Collection Moniteur Internat Tome 1). Paris : Éditions Groupe Liaisons SA, p269-284.
- ❖ **Fdil F. (2004).** Etude de la biodégradation des herbicides chlorophenoxy alcanoniques par des procédés photochimiques et électrochimiques, applications environnementales. Thèse de Doctorat. Université de Marne-La-Vallée (France).
- ❖ **Franck R.,** La phytoremediation des sols pollués par les métaux, rapport de recherche bibliographique , p 12.

## Références bibliographiques

- ❖ **Fokou M, P. (2017).** Bioremédiation augmentée de sols contaminés aux hydrocarbures lourds par ajout de substrats organiques. Mémoire de licence. Université du Québec, P 18
- ❖ **Guivarch. E Z., (2004),** Traitement des polluants organiques en milieux aqueux par procédé électrochimique d'oxydation avancée « Electro-fenton », Application à la minéralisation des colorants synthétiques, Thèse de Doctorat, université.de Manne-lavallée.
  
- ❖ **Gabet, S. (2004).** Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. Thèse de doctorat en Chimie et Microbiologie de l'Eau. Université de Limoges. P 28.
- ❖ **Google maps.**
- ❖ <https://www.geo.fr/environnement/hydrocarbure-definition-classification-et-utilisation-193625>
- ❖ **Hanna, K., (2004).** Étude de faisabilité de l'utilisation de molécules "cage" dans la dépollution des sols : solubilisation et extraction de polluants organiques par les cyclodextrines. Thèse doctorat. Université Lyon. France, P 59
- ❖ **Hazen, T.C. (2010).** Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer-Verlag., Berlin Heidelberg
- ❖ **Hara Mohan. J.,** Biodegradation Study of Phenol by Burkholderia sp. PS3 and Bacillus pumilus OS1 Isolated from Contaminated Soil.
- ❖ **Heinaru.E., Jaak.T., Ulrich.S et Ain.H., (1999).** Three types of phenol and p-cresol catabolism in phenol- and p-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds FEMS Microbiology Ecology 31 pp 195-205.
- ❖ **International Journal of Research and Review (IJRR). (2015),** Microbial Degradation of Phenol- A Review, p46
- ❖ **INRS, (1997)** « fiche toxicologique N° =15-phénol ».
- ❖ **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.** P 168, 125-138.
- ❖ **Kaufmann k., (2004).** Assessment of microbial community changes and limiting factors during bioremediation of hydrocarbon-polluted soil with new miniaturized physiological methods. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne (France).
- ❖ **Kadi, E, (1995).** Modèles d'eaux souterraines pour la gestion de l'analyse des ressources. AI CRC Press, États-Unis.

## Références bibliographiques

- ❖ **Kyung Han. K ., et Sung Ho. Y. (2008).** Optimal Microbial adaptation routes for the rapid degradation of high concentration of phenol, p01.
- ❖ « **loi canadienne sur la protection de l'environnement-phénol** » Canada, santé canada,, ISBN 0-662-84220-0 NO de cat. EN 40-215/45F
  
- ❖ **Laperto M., (2006).** A strategy for xenobiotic removal using photocatalytic treatment, microbial degradation or integrated photocatalytic-biological process. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne (France).
  
- ❖ **Lalanne F. (2006).** Etude des potentialités du lavage biologique pour le traitement d'un mélange complexe de composés volatils. Thèse de Doctorat. L'université de Pau et des Pays de l'Adour (France).
- ❖ **Lecomte, P. (1995).** Les sites polluent: Traitement des sols et des eaux souterraines. Edition Technique et Documentation, Paris.
- ❖ **Lecomte, P. (1995).** Les sites polluent: Traitement des sols et des eaux souterraines. Edition Technique et Documentation, Paris.
- ❖ **Marchal N., Bourdon., Richard. (1991).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries, 4 ème édition, p 32, 39.
- ❖ **Moussaoui. S ., (2012).**, Valorisation des palmes sèches du palmier dattier dans le traitement des eaux contaminées par phénol, mémoire de master, université Kasdi Merbah Ouargla, p 2.
- ❖ **MOUNIER, J. (2013).** Caractérisation fonctionnelle de gènes de Marinobacter Hydrocarbonoclasticus lors du développement de biofilms sur composés organiques
- ❖ Hydrophobes ; Thèse présentée à l'Université de Pau et des Pays de l'Adour - UPPA Ecole doctorale des sciences exactes et leurs applications.
- ❖ **Martin. (2012).** Exploration de la biodiversité bactérienne dans un sol pollué par les hydrocarbures : analyse par marquage isotopique du potentiel métabolique et de la dynamique des communautés impliquées dans la dégradation. Thèse en Chimie Biologie. Université de GRENOBLE.
- ❖ **Nuer., Eyrolles., (1984).**, Traitement des eaux usées, Technique d'ingénieur.
- ❖ **Opere Bolanle O., Oluwafemi S. Obayori\* and Adebajji A. Raji., (2013).** Degradation of cyclohexane and cyclohexanone by Bacillus lentus strain LP32, african journal of biotechnology 6632-6635.
- ❖ **Ouahes. C.,** « chimie organique », office des publications universitaires : 10-

## Références bibliographiques

- ❖ 92, codification : 1.03.2687.
- ❖ **Oughlis. F., (2004).**, Modélisation de phénomène d'adsorption du phénol sur le charbon commercial dans un réacteur turbulaire à lit fixe fonctionnant en circuit fermé », mémoire de magistère, université de Bejaïa
- ❖ **Pramanik S., Williams A., et Dutta S. (2004).** Toxicity of polychlorobiphenyls and its Bioremediation. International Journal of Human Genetics, p 281-290.
- ❖ **Pichard. A. (2005).**, INERIS, « phénol », version N°=2.
- ❖ **Ramade. R. (2000).** Dictionnaire encyclopédique des pollutions. Ediscience international. Paris (France), p 58-365.
- ❖ **Sahar Z., (2006).** Detection of meta- and ortho-cleavage dioxygenases in bacterial phenol-degraders J. Appl. Sci. Environ. Mgt. 10 : 75 – 81.
- ❖ **Supriya, Ch., et Deva, N. (2014).** Journal of Pharmacy, Biodegradation of phenol by aspergillus Niger –IOSR), p11.
- ❖ **SPF Emploi., (2004),** travail et concentration social, « phénol », CRC/CL/0011-F Version 1.
- ❖ **Shelton D, R., Tiedje J, M. (1984).** Isolation and Partial Characterization of Bacteria in an Anaerobic Consortium That Mineralizes 3-Chlorobenzoic Acid. Appl. Environ. Microbiol, P 840-848.
- ❖ **Soltani, M. (2004).** Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse de doctorat de l'université Paris 6, spécialité chimie analytique, P.23.
- ❖ **Sauret, C. (2011).** Ecologies des communautés bactériennes marines soumises a une pollution pétrolière Influence des facteurs environnementaux, de la prédation et de la récurrence des pollutions. Thèse de doctorat de l'université pierre et marie curie, Spécialité Microbiologie environnementale Ecole Doctorale Sciences de l'Environnement d'Ile de France. p129.
- ❖ **US Geological Survey (2010).** Les COV dans les eaux souterraines du pays — Glossaire: États-Unis. Commission géologique.

Annexes

ANNEXE 1

Composition des milieux de cultures

• **Composition de Bouillon nutritif (Nutrient Broth) :** (en raison de g/L d'eau distillée)

Nutrient Broth.....	8,0
Eau distillée stérile.....	1000
Tryptone .....	10
Extrait de levure .....	5,0
Chlorure de sodium.....	5,0
Extrait de viande .....	3,0
Peptone .....	5,0
PH: 7,2 - 6,8	

• **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
Mg So4.....	0, 2
KH2Po4.....	1, 7
NH4cl .....	0, 1
HK2PE4.....	4, 35
Ca cl2.....	0, 03
PH = 7,4	

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

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

20g de carbonate de sodium  $\text{NaCO}_3$  est ajoutés dans 100ml d'eau physiologique stérile

- **Réactif de folin ciocalteu :**

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

## Etude de l'adaptation des souches d'intérêt à l'effet de phénol

**Résumé :** Dans cette étude, le phénol est utilisé comme un polluant modèle lors de leur toxicité même à de faibles concentrations, il peut persister dans l'environnement à long terme en raison de son transport à longue distance. Certains microorganismes sont capables d'utiliser le phénol comme seule source d'énergie et de carbone pour leur croissance. L'objectif de cette étude est d'isoler quelques souches des bactéries capables de dégrader le phénol à partir d'un sol contaminé (zone de hasi messaoud) et d'améliorer le taux et la vitesse de la biodégradation par la pré-adaptation pour obtenir des bactéries bien adaptées. Par exemple, 1500 mg/l de phénol ont été dégradés aussi rapidement qu'en 22 h lorsque la cellule était pré-adaptée à 500 et 1000 et 1200 mg/l de phénol séquentiellement.

**Mots clés :** Sol, biodégradation, phénol, adaptation.

## Study of the adaptation of strains of interest of the effect of phenol

**Abstract :** In this study, phenol is used as a model pollutant for its toxicity even at low concentrations, it may persist in the environment in the long term due to its long-range transport. Some microorganisms are able to use phenol as the sole source of energy and carbon for their growth. The objective of this study is to isolate some strains of bacteria capable of degrading phenol from contaminated soil (hasi messaoud zone) and to improve the adaptation rate and the speed of biodegradation by pre-adaptation to obtain well-adapted bacteria. For example, 1500 mg/l of phenol were degraded as quickly as in 22 h when the cell was pre-adapted to 500 and 1000 and 1200 mg/l of phenol sequentially.

**Key words :** Soil, biodegradation, phenol, adaptation.

## دراسة تكيف السلالات ذات الأهمية تأثير الفينول

**ملخص:** في هذه الدراسة ، يستخدم الفينول كملوث نموذجي أثناء خطورته حتى عند التركيزات المنخفضة ، ويمكن أن يستمر في البيئة على المدى الطويل بسبب انتقاله بعيد المدى. بعض الكائنات الدقيقة قادرة على استخدام الفينول كمصدر وحيد للطاقة والكربون لنموها. الهدف من هذه الدراسة هو عزل بعض سلالات البكتيريا القادرة على تحطيم الفينول من التربة الملوثة ( منطقة حاسي مسعود ) وتحسين معدل التكيف وسرعة التحلل البيولوجي عن طريق التكيف المسبق للحصول على بكتيريا جيدة التكيف . على سبيل المثال ، تم تدهور 1500 ملغ/لتر من الفينول في فترة 22 ساعة عندما تم تكيف السلالة مسبقا ب 500 و 1000 و 1200 ملغ/لتر من الفينول بالتتابع.

**الكلمات الرئيسية:** التربة ، التحلل البيولوجي, الفينول, التكيف.