

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE



**Département du génie de l'environnement
Laboratoire de Sciences et Techniques de l'Environnement**

MEMOIRE DE MAGISTER

THEME

La biodégradation des hydrocarbures: activité de la microflore des eaux polluées

Etudié par : M^{elle} HAMDI Hamida

Soutenu devant le jury composé de

Président :	Mr R. KHERBACHI	Professeur (E.N.P)
Examineurs :	Mme S. ZEBOUDJ	Maître de conférence (E.N.P)
	Mme F. ZERROUK	Chargée de cours (I.N.A)
	Mr A. NAMANE	Docteur (E.N.P)
Rapporteur :	M^{elle} J. ARRAR	Chargée de cours (E.N.P)
Co-rapporteur :	Mme A. HELLAL	Professeur (E.N.P)

Année Universitaire 2006 – 2007

DEDICACES

- *En hommage à mon père.*
- *A ma très chère mère.*
- *A mes sœurs: Khira, Zohra, en particulier **Fatiha**.*
- *A mes frères : Boualm, Omar, Brahim, Lounesse et Djamel.*
- *A Fatma, Assia, Djamila, Nabila*
- *A mes nièces et neveux: Faiza, Farouk, Hichem, Assma, Yassmina, Mahdi, Malek, houda, Amine, Hannane, Nabil, Hadjar, Salim, Narimane, Ahleme, Manel et Madjide.*
- *A mes tantes : Zohra et Houria.*
- *A mes amies de l'école de l'INFORBA.*

REMERCIEMENTS

Je remercie *M^{elle} ARRAR* et *M^{me} HELLAL* de m'avoir guidée et aidée, à réaliser ce travail.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur *R. KHERBACHI*, pour l'honneur qu'il me fait en présidant le jury de soutenance.

Je remercie aussi Monsieur *A. NAMANE* d'avoir accepté de juger ce travail

J'exprime ma gratitude à *M^{me} ZEBOUJ*, chargée de cours à l'ENP pour avoir accepté d'être membre de ce jury.

Ma profonde gratitude et mes plus sincères remerciements vont aussi à *M^{me} F. ZERROUK* chargée de cours à l'INA tout d'abord pour son assistance précieuse et pour avoir consacré son temps à la lecture de ce mémoire et accepté de faire partie de ce jury.

Un grand merci à tous mes collègues qui m'ont aidé à réaliser ce travail ; je cite en particulier *BEKALEM Amel*, TASSISTE *Amina*, *CHEMLAL Radia*, *BENMACHHOUR Fatima*, *BOUTRIA Samira*.

Mes profondes amitiés et reconnaissances vont à toute l'équipe du laboratoire de Génie de l'environnement je cite *Ratiba et son mari Yacine*, *Rachida*, *Oumessad*, *Assira*, *Liela*, *Hassiba*, *Dalila*, *Nadia*.

Je n'oublie pas mes amies Dadou, Radia et son mari Radouan, Djaouida et sa sœur Faiza

Enfin je ne saurais terminer, sans oublier de remercier ma mère, mes sœurs et frères, et tous ceux qui m'ont encouragé et supporté tout au long de ce travail.

SOMMAIRE

LISTE DES TABEAUX ET DES FIGURES

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
I.1 Les hydrocarbures.....	3
I.1.1 Les hydrocarbures saturés.....	3
I.1.2 Les hydrocarbures insaturés.....	4
I.1.3 Les hydrocarbures aromatiques.....	4
I.2 Traitement de la pollution.....	4
I.3 Les procédés biologiques.....	5
I.3.1 La biorémédiation.....	5
I.3.1.1 L'atténuation naturelle.....	5
I.3.1.2 La biostimulation.....	5
I.3.1.3 La bioaugmentation.....	6
I.3.2 Avantages et inconvénients des procédés biologiques.....	6
I.4. Les principaux facteurs influençant la biodégradation.....	7
I.4.1 Le polluant à dégrader.....	7
I.4.1.1 Propriétés physico-chimiques.....	7
I.4.1.1.1 La structure chimique du polluant.....	7
I.4.1.1.2 La solubilité.....	8
I.4.1.2 La concentration du polluant.....	8
I.4.1.3 La présence du polluant avec d'autres produits.....	9
I.4.1.4 La biodisponibilité.....	9
I.4.1.5 L'âge de la pollution.....	10
I.4.2 Les paramètres environnementaux.....	10
I.4.2.1 L'effet de la température.....	10
I.4.2.2 L'effet de l'oxygène.....	10
I.4.2.3 L'effet du pH.....	11
I.4.2.4 Les éléments nutritifs.....	11
I.4.2.5 La constitution du sol.....	11
I.5 La biodégradation des hydrocarbures aromatiques.....	12
I.5.1 La cinétique bactérienne.....	12
I.5.1.1 La Courbe de croissance.....	13
I.5.1.2 Le taux de croissance pendant la phase exponentielle.....	15
I.5.2 Dégradation des hydrocarbures aromatiques.....	15
I.5.2.1 Micro-organismes responsable de la dégradation des hydrocarbures monoaromatiques.....	15
I.5.2.2 Voies bactériennes de dégradation des hydrocarbures monoaromatiques.....	17
I.5.2.3 Micro-organismes responsables de la dégradation des HAP.....	19
I.5.2.4 Voies bactérienne de dégradation des HAP.....	19

CHAPITRE II : METHODES DE MESURES ET INSTALLATION EXPERIMENTALE

II.1 Dénombrement des souches.....	22
II.2 Isolement et purification des souches	23
II.3 Conservation des souches.....	23
II.4 Sélection des souches dégradatrices du phénol.....	23
II.5 Identifications des souches.....	24
II.5.1 Coloration de Gram.....	24
II.5.2 Enzymes respiratoires.....	24
II.5.3 Tests culturaux.....	25
II.5.4 Identification par galerie biochimique API 20N E.....	25
II.5.5 Identification par galerie biochimique API 20 E.....	26
II.6 Traitement de l'eau polluée par le phénol.....	26
II.6.1 Mesure de la biomasse microbienne.....	26
II.6.2 Dosage du phénol.....	27
II.7 Caractérisation du sol.....	29
II.7.1 Analyse granulométrique.....	29
II.7.2 pH du sol.....	29
II.7.3 Carbone et matière organique.....	29
II.7.4 Azote total.....	30
II.7.5 Phosphore.....	30
II.7.6 Caractéristique biologique du sol.....	30
II.8 Dosage du phénanthrène	30
II.8.1 Extraction du phénanthrène dans la phase solide.....	30
II.8.2 Extraction du phénanthrène dans la phase liquide.....	31

CHAPITRE III : RESULTATS EXPERIMENTAUX ET DISCUSSION

III.1 Dénombrement des souches.....	33
III.2 L'isolement et la purification.....	34
III.3 La sélection des souches qui dégradent le phénol.....	35
III.4 Identification des souches qui dégrade le phénol.....	39
III.5 Traitement de l'eau pollué par le phénol.....	46
III.5.1 La dégradation du phénol par les sept souches	46
III.5.2 Etude des cinétiques de croissances bactériennes et de dégradation du phénol à différentes concentrations par la souche SB6.....	52
III.5.3 La dégradation du phénol à différentes concentrations par la souche SE8.....	55
III.6 L'adaptation de la souche SE8 sur une concentration plus grande de phénol.....	56
III.6 Traitement de sol pollué par un HAP.....	58
III.6.1 Etude du sol.....	58
III.6.1.1 Caractéristiques physico-chimiques du sol.....	59
III.6.1.2 Caractéristiques biologiques du sol.....	59
III.6.2 Traitement du sol pollué par le phénanthrène dans un bioréacteur triphasique agité.....	59

III.6.2.1 Adaptation de la souche SE8 sur le phénanthrène.....	60
III.6.2.2 Elimination du phénanthrène dans la phase liquide et la phase solide	61
CONCLUSION GENERALE	67
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

LISTE DES FIGURES

Figure I.1	Les six phases de la cinétique de croissance d'une Population bactérienne	13
Figure I.2	Voies métaboliques de la dégradation du benzène.....	18
Figure I.3	Voie métabolique de dégradation du naphthalène par <i>Pseudomonas sp</i> et <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	21
Figure I.4	Voie aérobie de dégradation bactérienne de l'anthracène par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
Figure III.1	la forme de quelques souches bactériennes.....	39
Figure III.2	Pourcentages du phénol résiduel et croissance bactérienne pour les bactéries Gram+	47
Figure III.3	Pourcentages du phénol résiduel et croissance bactérienne pour les bactéries Gram-.....	48
Figure III.4	Temps de dégradation totale du phénol à une concentration de 100mg.l ⁻¹ par les sept souches.....	49
Figure III.5	Pourcentage résiduel de dégradation du phénol et croissance bactérienne de la souche SB6 à différentes concentrations.....	53
Figure III.6	Influence de la concentration initiale du substrat (phénol) sur le taux de croissance de la souche SB6.....	55
Figure III.7	Pourcentage résiduel de dégradation du phénol et croissance bactérienne de la souche SE8 à différentes concentrations	56
Figure III.8	Influence de la concentration initiale du substrat (phénol) sur le taux de croissance de la souche SE8	57
Figure III.9	Rendement d'élimination du phénanthrène dans la phase solide à la fin du traitement.....	61
Figure III.10	Rendement d'élimination du phénanthrène dans la phase liquide à la fin du traitement.....	62
Figure III.11	L'évolution du rendement d'élimination du phénanthrène dans la phase solide.....	64
Figure III.12	L'évolution du rendement d'élimination du phénanthrène dans la phase Liquide.....	64
Figure III.13	La croissance bactérienne dans la phase solide (essai sol non bioaugmenté, et sol bioaugmenté).....	65
Figure III.14	La croissance bactérienne dans la phase liquide (essai sol non bioaugmenté, et sol bioaugmenté).....	65

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.2	Les diverses constituants du sol.....	11
Tableau I.3	Influence de la matière organique sur le temps de dégradation du phénanthrène et du pyrène.....	11
Tableau I.4	Responsables dans la dégradation des hydrocarbures momoaromatiques	16
Tableau I.5	Principales souches bactériennes aérobies responsables de la dégradation des HAP.....	20
Tableau III.1	Dénombrement des germes des deux échantillons.....	33
Tableau III.2	Observation macroscopique des différents types de colonies obtenus.....	34
Tableau III.3	Souches dégradantes et non dégradantes du phénol.....	36
Tableau III.4	La coloration de Gram ainsi que la forme des sept souches.....	39
Tableau III.5	Tests oxydase et tests catalase.....	41
Tableau III.6	Tests King A et King B pour les souches Gram -.....	42
Tableau III.7	Résumé des différents critères d'identification des sept souches.....	42
Tableau III.8	Résultats des tests API 20 NE pour les souches Gram-.....	43
Tableau III.9	Résultats des tests API 20E pour les souches Gram-.....	43
Tableau III.10	Pourcentage de réactions positives pour <i>Aeromonas salmonicida</i> et <i>P. putida</i> , ainsi que les tests positifs et négatifs de la souche SE6.	44
Tableau III.11	Pourcentages de réactions positives pour les deux souches <i>Burkholderia cepacia</i> (B.c) et <i>Chrysobacterium meningosepticum</i> (C.m) ainsi que les tests positifs et négatifs des souches SE7* et SE8.....	44
Tableau III.12	Concentrations initiales de la biomasse microbienne et durée de dégradation totale du phénol.....	50
Tableau III.13	Durée de dégradation du phénol par la souche SB6 à différentes concentrations	54
Tableau III.14	Les caractéristiques physico-chimiques du sol.....	59
Tableau III.15	Nombre de germes des deux précultures	61

Introduction générale

INTRODUCTION

Le déversement accidentel, le stockage, les rejets d'activités industrielles sont à l'origine du relargage de quantités très importantes de polluants organiques dans l'environnement notamment dans les sols et les eaux souterraines (**Dutheil**, 2003). Aujourd'hui un grand nombre de sites sont concernés par ce type de pollution et des techniques de traitement des sols et des nappes ont vu le jour afin de tenter de restaurer les sites ou dans un premier temps de limiter les risques associés à ces pollutions.

Les procédés biologiques font partie de ces méthodes de traitements. Ils ont l'avantage d'être:

Des procédés destructifs qui évitent les transferts de pollution, de se situer parmi les traitements les plus rentables, d'être applicables pour une large gamme de produits; particulièrement les hydrocarbures pétroliers.

Dans la plus part des cas on peut arriver au stade de la destruction totale du polluant (**Balba et al.** (1998), **In et al.** (2001) et **Ruiz-Ordaz et al.** (2001)).

Le principe de base des techniques biologiques est l'élimination des polluants organiques et /ou minéraux, présents dans des sols, les boues, les sédiments ou les effluents liquides sous l'action de micro-organismes (bactéries, levures, moisissures) (**Costes et al.**, 1997).

Selon le mode d'action des microorganismes et la nature des polluants on peut distinguer plusieurs types de procédés. La biorémediation est l'une de ces procédés biologiques. Elle est basée sur l'utilisation des micro-organismes dans la dégradation des polluants organiques (**Li et al.**, 2004 ; **Vidali**, 2001).

Certains microorganismes peuvent vivre dans des eaux ou des sols pollués. Ils peuvent contribuer à la diminution de la charge polluante par la biodégradation. Leur présence et leur capacité à dégrader les polluants sont dues à leurs adaptations aux conditions du milieu et à leur métabolisme. C'est la raison pour laquelle beaucoup d'auteurs dans le monde s'intéressent à l'isolement des souches à partir des eaux ou des sols pollués par les hydrocarbures. Une purification de ces souches est ensuite faite afin de tester leurs activités dans la dégradation des polluants organiques (**Annweiler et al.** (2000); **Potin et al.** (2004);

Yang et al. (2006)) dans le but de les utiliser dans les traitements (bioaugmentation) des sols ou des eaux polluées. C'est dans ce contexte que cette étude a été menée.

L'objectif de notre travail est d'isoler et de purifier des souches bactériennes présentes dans des eaux polluées par les hydrocarbures afin de les utiliser dans des essais de traitements de sols et des eaux pollués par différents polluants hydrocarbonés.

Le présent mémoire se subdivise en trois chapitres. Le premier est consacré à l'étude bibliographique où sont exposées les données relatives aux hydrocarbures suivies des techniques de traitement de la pollution. Après avoir défini les procédés biologiques, leurs avantages et leurs inconvénients, notre attention se portera sur tous les paramètres qui influent sur la biodégradation et quelques voies biologiques de dégradation de quelques composés hydrocarbonés.

Dans le second chapitre, le matériel et les méthodes utilisés dans cette étude sont présentés en intégrant la description des dispositifs expérimentaux et techniques analytiques.

Le troisième chapitre de ce mémoire est consacré à la présentation et la discussion des résultats.

Chapitre I :

Revue bibliographique

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE :

Depuis quelques années, on commence à évaluer les effets dévastateurs de l'industrialisation sur l'environnement. Parmi les grandes industries polluantes, l'industrie pétrolière pose de grands problèmes de pollution à tous les niveaux, de l'exploration au transport. Des quantités importantes de polluants organiques (hydrocarbures) sont relargués dans l'environnement notamment dans les sols et les eaux de surface et/ souterraines.

I.1 les hydrocarbures

Les hydrocarbures sont un groupe de produits extrêmement hétérogènes et variés (Lefebvre, 1965). Des milliers de substances de la famille des hydrocarbures ayant des propriétés chimiques et des effets écologiques et toxicologiques différents, sont utilisées dans le monde (Koning *et al*, 2001). Elles sont libérées dans l'environnement sous forme de carburants, combustibles, lubrifiants, solvants, etc.....

Les hydrocarbures peuvent être classés en trois familles principales : Les hydrocarbures saturés, Les hydrocarbures insaturés, les hydrocarbures aromatiques et polyaromatiques (Lefebvre, 1965).

I.1.1 Les hydrocarbures saturés :

Parmi ceux-ci, on distingue :

- **Les alcanes linéaires**, de formule générale C_nH_{2n+2} , ils constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier (Soltani, 2004).
- **Les alcanes ramifiés** se caractérisent par des branchements. Les plus abondants sont les *iso*-alcanes (groupement méthyle en position 2). Ces composés se trouvent dans le pétrole brut dans des proportions sensiblement égales à celles des *n*-alcanes (Soltani, 2004).
- **Les cycloalcanes** renferment des composés cycliques, saturés et le plus souvent sont substitués. Les plus fréquemment rencontrés dans le pétrole brut sont les cycles à 5 ou 6 atomes de carbone (Lefebvre, 1965). Cette famille peut représenter entre 30 et 50 % des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut (Soltani, 2004).

I. 1.2 Les hydrocarbures insaturés :

Dans cette catégorie on trouve (Lefebvre, 1965) :

- Les alcènes qui comportent dans leur molécule deux hydrogènes de moins que les hydrocarbures saturés correspondants et une double liaison. Leur formule générale est donc C_nH_{2n} .
- Les alcynes ou hydrocarbures acétylénique, ont pour formule générale C_nH_{2n-2} et sont caractérisés par la présence dans leur molécule d'une liaison triple.

I.1.3 Les hydrocarbures aromatiques :

Ce sont des hydrocarbures cycliques polyinsaturés. On distingue :

- les aromatiques simples (benzène, toluène, xylène, etc) qui possèdent un cycle insaturé de 6 atomes de carbone.
- les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (naphtalène, phénanthrène, pyrène...etc), qui sont constitués d'atomes de carbone et d'hydrogène formant au moins deux anneaux aromatiques (Gabet, 2004).

I.2 Traitement de la pollution :

Beaucoup de paramètres sont à prendre en compte avant de faire le choix d'une méthode particulière de dépollution : type de polluant et variabilité de leur comportement (volatilité, adsorbabilité, polarité...), diversité des conditions locales (nature du sol, de la nappe, accessibilité, disponibilité de surfaces utilisables à proximité, zone urbaine ou non), pollution récente ou ancienne, étendue ou non. En plus, les exigences économiques et administratives sont à prendre en compte. Tout ceci nécessite un diagnostic préalable (Gabet, 2004).

La dépollution peut être mise en oeuvre à travers les techniques de traitement qui sont classées en cinq familles principales souvent complémentaires : Méthodes physiques, géochimiques, chimiques/ électrochimiques, thermiques et biologiques (Desjardin, 2002 ; Varillon, 2002).

Parmi ces différentes techniques, les techniques biologiques suscitent actuellement un grand intérêt (EPA, 2006).

I.3 Procédés biologiques :

Le principe de base des techniques biologiques est l'élimination des polluants organiques et /ou minéraux, présents dans des sols, les boues, les sédiments ou les effluents liquides sous l'action de micro-organismes (bactéries, levures, moisissures) (**Costes et al.**, 1997).

Selon le mode d'action des microorganismes et la nature des polluants on peut distinguer plusieurs types de procédés. La biorémédiation est l'une de ces procédés biologiques.

I.3.1 La biorémédiation :

La biorémédiation est un procédé biologique de décontamination. Elle est basée sur l'utilisation des micro-organismes dans la dégradation des polluants organiques (**Li et al.**, 2004 ; **Vidali**, 2001). On distingue trois types de biorémédiation (**Abbondanzi et al.**, 2005) : L'atténuation naturelle, la biostimulation, la bioaugmentation.

Les substances à dégrader peuvent subir:

- une dégradation incomplète pour donner plusieurs composés simples et stables (biotransformation) (**Armon et al.**, 1998) ,
- une dégradation complète qui se réfère à la minéralisation des composés organiques en éléments simples, le dioxyde de carbone et l'eau (**Armon et al.**, 1998 ; **Costes et al.**, 1997).

I.3.1.1 L'atténuation naturelle :

De nombreux micro-organismes, sont naturellement présents dans notre environnement et ont une capacité importante d'adaptation aux conditions de leur milieu. La présence de ces micro-organismes (endogènes ou autochtones) dans les milieux contaminés peut contribuer naturellement à la dégradation des polluants existants. Ce type de dégradation est appelé l'atténuation naturelle (**Armon et al.**, 1998 ; **Costes et al.**, 1997). Le processus de dégradation dépend uniquement des conditions physiques, chimiques et biologiques du milieu (**Abbondanzi et al.**, 2005).

I.3.1.2 La biostimulation :

La biostimulation consiste à stimuler l'activité de la microflore indigène du sol, en fournissant un environnement pour la biodégradation des hydrocarbures en ajoutant certaines nutriments, ou en optimisant les conditions d'aération (**Coulon et al.**, 2003 ; **Desjardin**, 2002). La stimulation de la population indigène d'un site contaminé, depuis de

nombreuses années, produit des résultats significatifs de biodégradation.

I.3.1.3 La bioaugmentation :

La bioaugmentation consiste à utiliser une culture, pure ou mixte d'organismes endogènes ou exogènes que l'on apporte au milieu pollué en vue d'améliorer le taux de biorémédiation du sol ou de l'eau souterraine (nappe phréatique) (**Balba et al., 1998 ; Desjardin, 2002 ; Muller et al., 2001 ; Vidali, 2001 ; Yu et al., 2005**). Elle est très intéressante dans le cas de la biorémédiation des sites contaminés par des polluants difficilement biodégradables (**Armon et al., 1998**) présents à des fortes concentrations dans le site (**Potin et al., 2004**) et lorsque la biostimulation de la flore indigène ne parvient pas à augmenter les vitesses de biodégradation (**Yu et al., 2005**).

Les travaux de **Durate Dh Cunha et al. (2000)** ont montré que le traitement d'un sol pollué par le gazoil seulement par la microflore autochtone du sol présente un pourcentage de dégradation moyen de 50%. L'association des bactéries isolées à partir des sites contaminés par ce même polluant (gazoil) (une bioaugmentation) a présenté un pourcentage de dégradation de 88,7% pour le n-undecane (C_{11}), de 61,3% pour le n-dodécane (C_{12}) et de 66,7% pour le n-tridecane (C_{13}). Ce qui montre l'effet de la bioaugmentation.

I.3.2 Avantages et inconvénients des procédés biologiques :

Les procédés biologiques comme tous les autres procédés présentent des avantages et des inconvénients.

Balba et al. (1998), In et al. (2001) et Ruiz-Ordaz et al. (2001) citent que ces procédés ont l'avantage :

- ✓ d'être des procédés destructifs qui évitent donc les transferts de pollution,
- ✓ de se situer parmi les traitements les plus rentables,
- ✓ d'avoir un impact positif sur l'opinion publique,
- ✓ d'être applicables pour une large gamme de produits, particulièrement les hydrocarbures pétroliers,
- ✓ dans la plus part des cas on peut arriver au stade de la destruction totale du polluant.

Parmi les inconvénients on trouve que cette technique de dépollution n'est applicable :

- ✓ que pour les composés biodégradables, non inhibiteurs et non toxiques. En effet, certains composés ou sous-produits formés au cours de la dégradation peuvent présenter un risque de toxicité vis-à-vis des micro-organismes (**Gabet, 2004**).
- ✓ Que lorsque la durée de traitement n'est pas importante car les traitement biologique

nécessitent des durées de traitement élevées (généralement s'étend sur plusieurs mois voire, dans certains cas, sur plusieurs années) (**Balba et al.**, 1998 ; **Gabet**, 2004).

Selon **Vidali** (2001), la bioremediation peut être limitée :

- ✓ certains polluants comme les composés organiques chlorés et les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont résistants à l'attaque microbiennes, elles sont lentement ou pas dégradés.
- ✓ Pas de règle qui permet de prévoir si le polluant peut être dégradé ou non.

I.4 Les principaux facteurs influençant la biodégradation :

Le processus de biodégradation est un phénomène complexe et largement dépendant des conditions influant l'activité bactérienne, à savoir :

- ✓ Le polluant à dégrader (ses caractéristiques physico-chimiques et sa concentration) (**Gabet**, 2004) ;
- ✓ Les différentes conditions environnementales (**Gabet**, 2004 ; **Hinga**, 2003).

I.4.1 Le polluant à dégrader :

I.4.1.1 Propriétés physico-chimiques

I.4.1.1.1 La structure chimique du polluant :

La structure chimique est importante pour l'évaluation de la vitesse et du taux de dégradation des polluants. Même s'il est considéré que la plupart des produits pétroliers sont biodégradables, plus la structure moléculaire est complexe, plus le composé est difficile à dégrader.

- les alcanes sont les hydrocarbures les plus facilement utilisés par les micro-organismes (**Solano-Serena et al.**, 2001). Le taux de dégradation des alcanes est d'autant plus faible que le poids moléculaire est élevé (faible solubilité) (**Balba et al.**, 1998).
- Les chaînes ramifiées sont plus résistantes à la dégradation que les chaînes linéaires (**Balba et al.**, 1998 ; **Solano-Serena et al.**, 2001 ; **Soltani**, 2004).
- Les hydrocarbures aliphatiques insaturés sont attaqués plus facilement que les hydrocarbures saturés (**Zerrouk**, 2002).
- La dégradation des alcanes cycliques tend à être plus lente que les alcanes linéaires (**Balba et al.**, 1998 ; **Solano-Serena et al.**, 2001).
- Les hydrocarbures aromatiques ont une configuration particulière marquée par la

présence d'un ou plusieurs noyaux benzéniques qui leur confèrent une très grande stabilité. La vitesse de leurs dégradations dépend très fortement de leurs poids moléculaires, de la configuration et du nombre de cycles (**Balba et al.**, 1998)

I.4.1.1.2 La solubilité :

La solubilité du polluant est également un paramètre très important pour la biodégradation (**Armon**, 1998 ; **Bliefert et al.**, 2001). Les hydrocarbures les plus solubles se dégradent plus rapidement que les autres.

La biodégradation est limitée par la quantité de polluant dissout dans l'eau (**Johnsen et al.**, 2005). Selon **Soltani** (2004), Les hydrocarbures de faible poids moléculaire sont solubles dans l'eau et par conséquent très toxiques pour les microorganismes. Ils peuvent interagir avec la membrane cellulaire des microorganismes. Ces interactions conduisent à des changements structuraux et fonctionnels de la membrane, ce qui par conséquent, peut diminuer la croissance et l'activité cellulaire

Par contre les hydrocarbures de grand poids moléculaire donc faible solubilité posent un problème de non disponibilité au micro-organisme.

Une possibilité pour augmenter la solubilité des ces composés organiques ainsi que leurs surfaces de contact avec les micro-organismes est l'application de surfactants. L'utilisation de biosurfactants (**Anders et al.**, 2005 ; **Armon**, 1998 ; **Feitkenhauer et al.**, 2001 ; **Wick et al.**, 2001)), produits par les micro-organismes (champignons ou bactéries) (**Gabet**, 2004) ou des agents émulsifiants synthétiques (**Arodi**, 2005 ; **Armon**, 1998) est de plus en plus préconisée en particulier dans le cas des HAP.

Ces agents sont des molécules amphiphiles actives aux surfaces, ils s'accumulent aux interfaces et réduisent la tension de surface (**Roux**, 2003). Le principal rôle physiologique de ces agents est de permettre aux micro-organismes de se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension interfaciale entre l'eau et le substrat, rendant ce dernier plus facilement accessible (**Gabet**, 2004 ; **Roux**, 2003). En effet, ils permettent l'émulsification de la source de carbone (**Roux**, 2003).

I.4.1.2 La concentration du polluant :

La concentration du polluant et sa répartition sur le site sont également des facteurs importants à considérer.

La biodégradation est performante dans une gamme de teneurs donnée, et un produit réputé biodégradable ne l'est plus au dessous ou au delà d'une certaine concentration.

Le micro-organisme peut rester en périphérie de la masse contaminante sans y avoir accès, ou bien être inhibé, par la forte concentration. Dans le cas contraire, la concentration n'est plus adéquate au micro-organismes pour se développer (**Balba et al.**, 1998 ; **Lecomte**, 1998).

I.4.1.3 La présence du polluant avec d'autres produits :

De nombreuses molécules organiques sont aujourd'hui considérées comme biodégradables, par contre, leur présence en mélanges de produits provoque des phénomènes d'inhibition qui peuvent soit stopper le processus de biodégradation ou bien le retarder, par fois même l'empoisonnement des micro-organismes présents (**Lecomte**, 1998 ; **Reardon et al.**, 2000).

Reardon et al. (2000), ont suivi la cinétique de biodégradation du phénol, benzène et du toluène individuellement et en mélange, par *Pseudomonas putida* F1. Les expériences ont montré qu'en présence d'un mélange toluène/benzène, la bactérie consomme les deux simultanément mais la dégradation du toluène commence avant celle du benzène (le toluène retarde la dégradation du benzène). Dans le cas du mélange toluène/phénol, le toluène inhibe la dégradation du phénol et cette dernière ne commence qu'après que la consommation du toluène est presque finie.

Le même phénomène est observé dans le cas d'un mélange benzène/phénol, c'est à dire la dégradation du phénol ne commence qu'après la consommation, presque totale, du benzène. En présence des trois composés, les bactéries procèdent en premier, à la dégradation du toluène et avant l'achèvement de la dégradation totale du toluène commence celle du benzène puis en dernier la dégradation du phénol.

I.4.1.4 La biodisponibilité :

La biodégradabilité des hydrocarbures en milieu complexe, aussi bien pour les procédés aérobies qu'anaérobies, est liée à leur biodisponibilité vis-à-vis des microorganismes susceptibles de les dégrader.

La notion de biodisponibilité se situe à l'interface entre le milieu et l'organisme. Elle dépend à la fois du polluant, de son devenir dans l'environnement et de la physiologie de l'organisme exposé. La biodisponibilité désigne « la fraction de produit chimique présent dans le milieu environnemental qui est disponible pour être accumulée par les organismes. L'environnement peut inclure l'eau, les sédiments, les particules en suspension et la nourriture » (**Gourlay**, 2004).

Selon **Gabet** (2004), la biobioisponibilité du substrat pour le micro-organisme dans le sol est très fortement liée au taux de la matière organique (MO). Plus le taux en MO des sols est élevé et moins les HAP sont biodisponibles du fait des fortes interactions entre le polluant et le sol.

I.4.1.5 L'âge de la pollution:

L'âge de la pollution intervient à deux niveaux. On constate d'une part une altération du polluant au cours du temps. D'autre part, l'adsorption du polluant sur les particules du sol. Le temps d'adsorption peut aller de quelques semaines à quelques années, la prolongation du temps de contact entraîne une plus forte adsorption et ainsi une plus grande résistance à la désorption (**Dutheil**, 2003).

Selon **Lei et al.** (2005) ; **Gabet** (2004), les HAP ajoutés dans des sols déjà contaminés sont plus rapidement dégradés que les HAP dits, anciens, vraisemblablement intimement liés à la matrice du sol.

I.4.2 Les paramètres environnementaux :

I.4.2.1 La température :

La température est un paramètre pouvant influencer la biodégradation des hydrocarbures (**Hinga**, 2003) en modifiant leurs états physiques ainsi que leurs compositions chimiques. Elle régit l'activité physiologique des microorganismes et par conséquent la vitesse de dégradation des hydrocarbures, ainsi que la nature et la concentration des espèces microbiennes présentes (**Coulon et al.**, 2003 ; **Soltani**, 2004).

I.4.2.2 L'oxygène:

L'étape initiale du catabolisme des hydrocarbures aliphatiques, cycliques et aromatiques par les bactéries et les champignons inclut l'oxydation de ces substrats par l'intermédiaire d'hydroxylases et d'oxygénases, pour lesquelles l'oxygène est indispensable (**Reardon et al.**, 2000 ; **Soltani**, 2004 ; **Van Beilen et al.**, 2003). Les conditions aérobies sont, par suite, nécessaires pour cette voie d'oxydation microbienne, par contre la dégradation anaérobie des composés hydrocarbonés peut se produire mais a des vitesses négligeables et est considérée comme de moindre importance (**Soltani**, 2004).

I.4.2.3 Le pH :

Le développement bactérien est possible dans un intervalle de pH assez large entre 5 et 9. Cependant, des pH compris entre 7 et 7,8 optimisent le phénomène (**Gabet**, 2004).

I.4.2.4 Les éléments nutritifs :

La concentration et la nature des sels dissous peuvent être des éléments limitants de la croissance bactérienne et donc de la biodégradabilité d'un polluant (**Amellal et al.**, 2001) en particulier l'azote et le phosphore.

I.4.2.5 La constitution du sol :

La phase solide du sol associe des constituants de natures très diverses (tableau I.2)

Tableau I.2 : les diverses constituants du sol (**Morel**, 1989)

sol	La fraction minérale	Sable Limon Argil Calcaire
	La fraction organique	Vivante Non vivante

La matière organique peut fixer une quantité notable d'hydrocarbures et cela d'autant plus que le caractère hydrophobe du polluant est important (**Colin**, 2000 ; **Dutheil**, 2003).

Deux sols ont été étudiés par **Smith et al.** (1997), un contenant 0.4% de matière organique, et l'autre contenant 22.9% de matière organique. Les deux sols sont pollués par du phénanthrène et du pyrène, et inoculés par deux souches bactériennes PD₂ et DC₁ isolées à partir d'un site contaminé par les hydrocarbures.

Leurs résultats montrent une meilleure durée de dégradation dans le sol contenant moins de matière organique (tableau I.3)

Tableau I.3 : Influence de la matière organique sur le temps de dégradation du phénanthrène et du pyrène

	Sol1 (0,4% de matière organique)		Sol2 (22,9 % de matière organique)	
	PD ₂	DC ₁	PD ₂	DC ₁
Phénanthrène	2j	6,5j	9j	12j
Pyrène	/	20j	/	30j

L'adsorption du substrat (le polluant) par la matière organique du sol limite la biodisponibilité du substrat au micro-organisme ce qui affecte le taux de dégradation (**Chang et al.**, 2002 ; **Dictor et al.**, 2003 ; **Woo et al.**, 2004).

I.5 La biodégradation des hydrocarbures :

La biodégradation est l'un des premiers mécanismes conduisant à l'élimination des hydrocarbures de l'environnement (**Hinga**, 2003). La littérature concernant l'oxydation des hydrocarbures par les microorganismes indique que la croissance cellulaire dépend des processus de transport des hydrocarbures à la surface cellulaire et de passage à travers l'enveloppe cellulaire jusqu'au cytoplasme.

Trois modes d'élimination des hydrocarbures sont généralement considérés (**Soltani**, 2004):

1- L'interaction des cellules avec les hydrocarbures dissous dans la phase aqueuse par les facteurs de solubilisation extracellulaires.

2- L'interaction des cellules avec les hydrocarbures émulsifiés par les agents actifs de surface appelée biosurfactants.

3- Le contact direct des cellules avec les hydrocarbures.

I.5.1 la cinétique bactérienne :

Les micro-organismes se développent et se divisent pour donner naissance à d'autres bactéries qui héritent de la cellule-mère du même potentiel d'activité. La croissance microbienne n'est possible que dans le cas où les micro-organismes peuvent satisfaire leurs besoins nutritifs dans leur environnement.

Il existe un certain nombre de contraintes nutritionnelles pour permettre un optimum de croissance des microorganismes (**Gourdon**, 2002) :

- **Les éléments constitutifs** : pour leurs constituants cellulaires : eau, C, H, N, O, S, P, etc....

- **Les sources d'énergies** : lumière ou substances chimiques (organiques et/ou inorganiques)

- **Les nutriments spécifiques**, appelés facteurs de croissance car ce sont des substances indispensables pour les micro-organismes qui sont incapables de les synthétiser eux-mêmes.

On trouve les acides amines qui sont nécessaires à la synthèse protéiques, les purine et la pyrimidine nécessaire à la synthèse des acides nucléiques, et les vitamines sont nécessaire en très faibles quantité pour la croissance (**Prescott et al.**, 2004).

Ainsi, grâce aux éléments qu'on lui fournit et qu'elle dégrade, la bactérie synthétise ses propres constituants organiques. L'ensemble des échanges chimiques qui se produisent alors

au niveau cellulaire constitue le métabolisme. Les multiples réactions assurant la dégradation d'un substrat libèrent simultanément de l'énergie qui servira à la biosynthèse, à la croissance et à la reproduction (**Gourdon**, 2002).

I.5.1.1 Courbe de croissance

On peut d'une façon simple étudier le phénomène de croissance en suivant dans le temps l'évolution de la concentration cellulaire (X) (le nombre de cellules par unité de volume de culture) ou la concentration en biomasse microbienne (g de matière sèche cellulaire microbienne par unité de volume de culture) (**Scriban**, 1999).

La courbe de croissance comme illustrée sur la figure I.1 présente six phases, la phase 3 de croissance exponentielle apparaît alors linéaire, et la pente de cette droite correspond au taux de croissance maximum (**Delignette-Muller**, 1995).

Les cinétiques de croissance d'une population microbienne sont souvent représentées en coordonnées semi-logarithmiques.

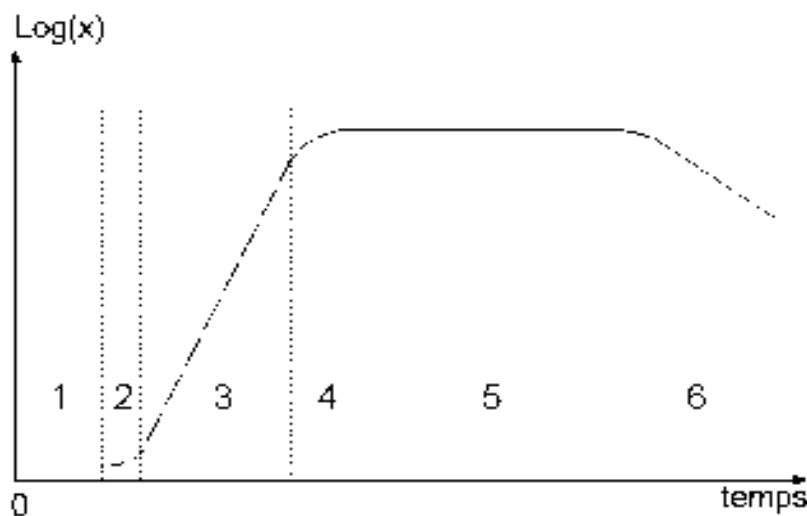


Figure I.1 : Les six phases de la cinétique de croissance d'une Population bactérienne (**Bréand**, 1998)

Les différentes phases sont (**Bréand**, 1998 ; **Larpenet et al.**, 1975 ; **Scriban**, 1999) :

➤ **1 : Phase de latence :**

Cette phase suit immédiatement l'ensemencement bactérien dans le milieu de culture. Il s'agit d'une période d'adaptation au cours de laquelle la cellule synthétise en particulier les enzymes qui lui sont nécessaires pour métaboliser le substrat présent (il n'y a pas de reproduction cellulaire).

➤ **2 : Phase d'accélération :**

C'est la phase où on assiste au démarrage de la croissance bactérienne : la reproduction cellulaire commence. La concentration cellulaire augmente lentement tout d'abord puis plus vite.

➤ **3 : La phase exponentielle :**

Cette phase est atteinte lorsque le taux de croissance atteint son maximum. Elle dure tant que ce taux est constant.

➤ **4 : Ralentissement de la croissance :**

La courbe présente un point d'inflexion qui correspond du point de vue biochimique à l'épuisement du milieu de culture suite à la disparition d'un ou de plusieurs composés nécessaires à la croissance bactérienne (C, N, P.....).

➤ **5 : Phase stationnaire :**

Au cours de cette phase, la croissance est maximale et stationnaire.

➤ **6 : Phase de décroissance :**

C'est la phase où il y'a mortalité des bactéries ce qui entraîne une diminution de leur nombre.

I.5.1.2 Le taux de croissance :

Chaque cellule microbienne donne après multiplication deux cellules identiques.

Après n générations, le nombre initial de cellules X_0 pour $t = 0$, devient au temps t , X tel que :

$$X = X_0 2^n$$

$$X = X_0 2^{\mu t}$$

$$\ln X = \ln X_0 + \mu \cdot t \cdot \ln 2$$

$$\mu = \frac{\ln X - \ln X_0}{t \cdot \ln 2}$$

X_0 : nombre de cellule à t_0

X : nombre de cellule à t

μ : le taux de croissance

Ceci est vérifié que pendant la phase de croissance logarithmique. La croissance cellulaire est indépendante de la concentration du substrat. Si celui-ci est largement en excès. Dans le cas contraire le taux de croissance dépendrait de la concentration en substrat qui joue le rôle de facteur limitant.

Le tracé de $\ln X$ en fonction du temps, d'après l'équation ci-dessous donne une droite de pente $\mu \cdot \ln 2$:

$$\ln X = (\mu \cdot \ln 2) t + \ln X_0$$

I.5.2 Dégradation des hydrocarbures aromatiques :

La quasi-totalité des voies métaboliques sont des voies métaboliques aérobies. La dégradation des hydrocarbures aromatiques par voie anaérobie est moins étudiée (**Chang et al.**, 2002 ; **Lei et al.**, 2005). Longtemps considérée comme irréalisable, les récents résultats montrent qu'il y a un potentiel réel des flores anaérobies à dégrader ces composés.

I.5.2.1 Micro-organismes responsables de la dégradation des hydrocarbures monoaromatiques :

La dégradation des hydrocarbures monoaromatiques est essentiellement le fait de bactéries Gram négatives, surtout les espèces de *Pseudomonas* et les genres voisins (tableau I.4).

Tableau I.4 : *Micro-organismes* responsables dans la dégradation des hydrocarbures momoaromatiques

Hydrocarbure	Micro-organisme	Référence
Phénol	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Pseudomonas putida F₁</i> ▪ <i>Pseudomonas pictorum</i> ▪ <i>Pseudomonas putida (ATCC 17484)</i> ▪ <i>Pseudomonas putida (MTCC 1194)</i> ▪ <i>Pseudomonas sp</i> ▪ <i>Pseudomonas putida DSM548 (ATCC 17514)</i> ▪ <i>Pseudomonas putida (ATCC 11172)</i> ▪ <i>Acinetobacter sp</i> ▪ <i>Burkholderia sp(JS150)</i> ▪ <i>Pseudomonas cepacia</i> ▪ <i>Pseudomonas vasicularis</i> ▪ <i>Staphylococcus sciuri</i> ▪ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ▪ <i>Pseudomonas fluorescens</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reardon et al., 2000 ▪ Sheeja et al., 2002 ▪ Gonzalez et al., 2001 ▪ Bandhyopadhyay et al., 2001 ▪ Bandhyopadhyay et al., 2001 ▪ Sà et al., 2001 ▪ Collins et al., 1997 ▪ Abd-el-haleem et al., 2003 ; Hao et al., 2002 ▪ Reardon et al., 2002 ▪ Pakula et al., 2000 ▪ Agnieszka et al., 2002 ▪ Agnieszka et al., 2002 ▪ Thi Thu et al., 2000 ▪ Pakula et al., 2002
Benzène	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Pseudomonas putida F₁</i> ▪ <i>Burkholderia sp(JS150)</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reardon et al., 2000 ▪ Reardon et al., 2002
Toluène	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Pseudomonas putida F₁</i> ▪ <i>Burkholderia sp (JS150)</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reardon et al., 2000 ▪ Reardon et al., 2002

Quelques cas de dégradation fongique ont été rapportés par **Prenafeta et al.** (2003). Le *cladophialophora* sp. T1, possède la capacité de croître sur un mélange complexe de monoaromatiques (BTEX*), et de les utiliser comme source de carbone et d'énergie.

Les levures sont aussi utilisées dans la dégradation des monoaromatiques. On peut citer, à titre d'exemple, les *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* dans la dégradation du xylène (**Labrecque**, 2003).

*: **Benzène, Toluène, Ethylbenzène, Xylène**

I.5.2.2 Voies bactériennes de dégradation des hydrocarbures monoaromatiques :

Les bactéries oxydent initialement les monoaromatiques par l'incorporation de deux atomes d'oxygènes moléculaires dans le substrat pour former des dihydrodiols de configuration *cis*. Cette réaction est catalysée par une enzyme, la dioxygénase. L'oxydation des *cis*-dihydrodiols conduit à la formation de catéchols. Généralement, l'oxydation se poursuit par une rupture *ortho* (rupture de la liaison entre les deux groupements hydroxyle) ou *méta* (rupture d'une liaison entre un carbone portant un groupement hydroxyle et le carbone immédiatement voisin ne portant pas de groupement hydroxyle) du cycle qui est assuré par une autre dioxygénase, comme le montre la Figure I.2 correspondante à la dégradation du benzène (Soltani, 2004).

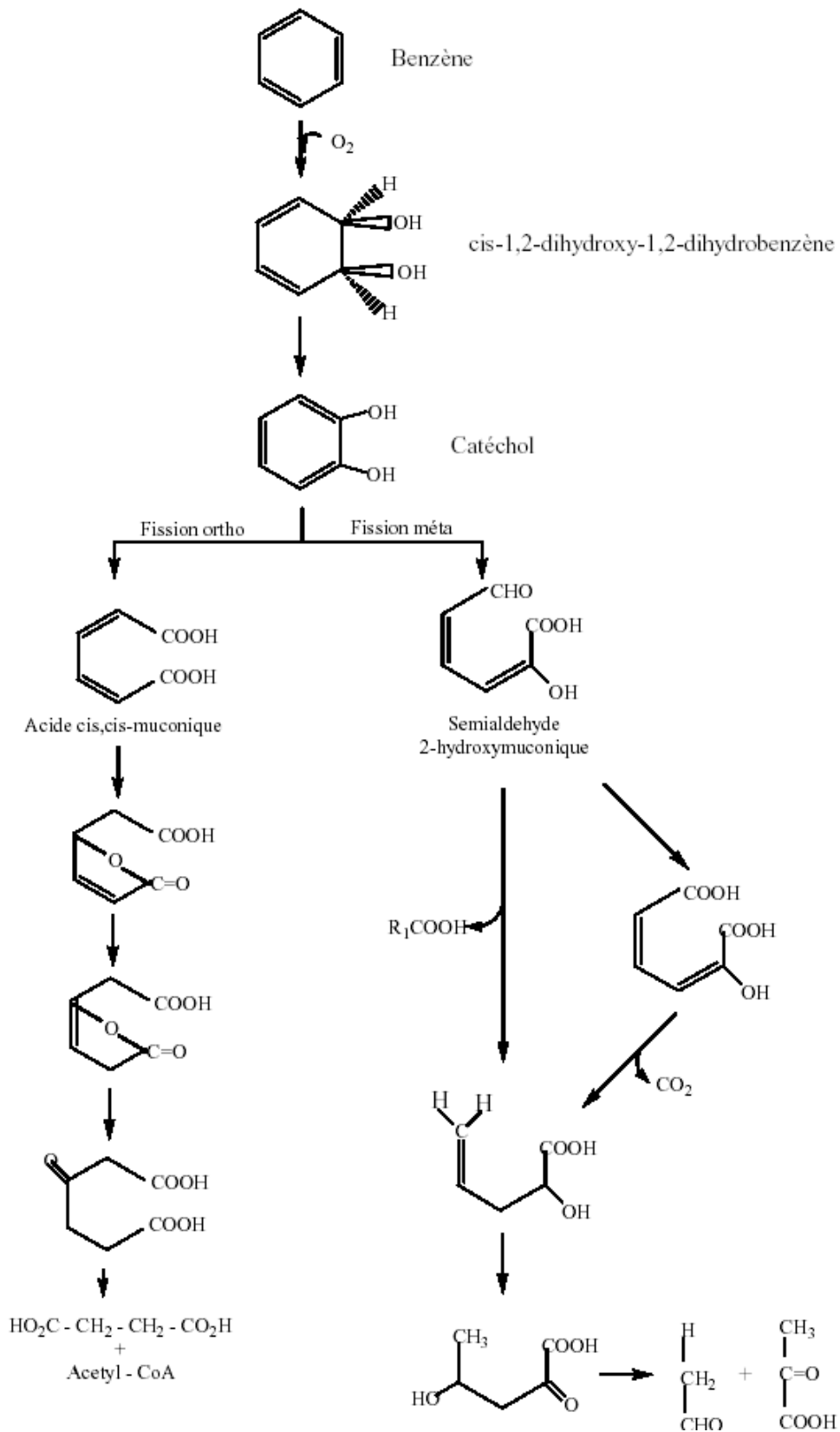


Figure I.2 : Voies métaboliques de la dégradation du benzène (Soltani, 2004)

I.5.2.3 Micro-organismes responsables de la dégradation des HAP :

Les HAP sont des composés relativement réfractaires à la dégradation biologique. Les trente dernières années, les recherches sur la dégradation des HAP ont permis l'isolement de nombreuses espèces de bactéries, de champignons et d'algues capables de dégrader les HAP de petit poids moléculaire (2 à 3 cycles benzéniques). Les plus gros HAP sont généralement récalcitrants à l'attaque microbienne, quelques champignons et algues sont capables de les transformer (Arodi, 2005).

A l'heure actuelle, quelques bactéries ont été isolées ayant la capacité à dégrader les HAP de quatre (04) cycles comme unique source de carbone et d'énergie (Arodi, 2005).

Le tableau I.5 illustre les principales souches bactériennes capables de dégrader les HAP.

Certains champignons (*Cunninghamella elegans*, *Penicillium* sp, *Penicillium janthinellum*, *Aspergillus* sp) produisent des cytochromes P450 monooxygénases qui leur permettent de transformer un certain nombre de molécules y compris les HAP (Pickard et al., 1999 ; Sack et al., 1997).

Ces monooxygénases transforment directement les HAP par incorporation d'une molécule d'oxygène en formant un trans-dihydrodiol-HAP.

Il existe d'autres familles de microorganismes capables de transformer ou dégrader les HAP. Certaines algues unicellulaires peuvent également métaboliser les plus petits HAP tel que le naphthalène, ... et des souches de levure (*Rhodotorula glutinis*) utilisant le phénanthrène comme seule source de carbone et d'énergie ont été isolées.

Le rôle de ces microorganismes dans le catabolisme des HAP au sein d'écosystèmes complexes reste encore mal connu (Arodi, 2005).

I.6.2.4 Voies bactériennes de dégradation des HAP :

Le naphthalène est l'un des HAP les plus simples et les plus facilement biodégradables. Ainsi, les voies métaboliques de dégradation par des souches de *Pseudomonas* sp ont été les premières voies étudiées et connues. La figure 5 montre la voie métabolique de dégradation du naphthalène par *Pseudomonas* sp et *Acinetobacter calcoaceticus*.

La première étape de la dégradation aérobie fait intervenir une dioxygénase qui oxyde l'un des cycles benzéniques pour former un cis dihydrodiol. Les dihydrodiols sont ensuite transformés en biphenols, lesquels sont attaqués par d'autres dioxygénases (Arodi, 2005 ; Gabet, 2004). De la même manière, tous les cycles sont alors dissociés et dégradés les uns après les autres pour conduire à des intermédiaires à simple cycle, comme l'acide benzoïque, l'acide salicylique, l'acide phthalique ou le catéchol (Figure I.3) (Arodi, 2005).

Tableau I.5 : Principales souches bactériennes aérobies responsables de la dégradation des HAP

Composés	Microorganisme	Références
Naphtalène	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Pseudomonas sp</i> ; <i>Mycobacterium sp</i> ; <i>Rhodococcus sp</i> ▪ <i>Bacillus thermoleovorans</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Arodi, 2005 ▪ Annweiler, 2000
Fluorène	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Pseudomonas sp</i> ; <i>Rhodococcus sp et</i> <i>Mycobacterium sp</i> ; <i>Staphylococcus</i> <i>auriculans</i> ▪ <i>Mycobacterium sp.</i> C2-3 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Arodi, 2005 ▪ Il-Gyu et al., 2001
Anthracène	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Rhodococcus sp</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Arodi, 2005
Phénanthrène	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Pseudomonas sp</i> ▪ <i>Pseudomonas paucimobilis et P.fluorescens</i> ▪ <i>Rhodococcus sp</i> ; <i>Acinitobactère. sp</i> ▪ <i>Aeromonas sp</i> ; <i>Alcalignes faecalis</i> ; <i>Arthrobactère polychromogenes</i> ; <i>Beijerinckia sp.</i> ; <i>Vibrio sp</i>; <i>Nocrdia sp.</i> <i>Flavobactérium sp.</i> ▪ <i>Mycobacterium sp.</i> C2-3 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Arodi, 2005 ; Yu et al., 2005 ▪ Arodi, 2005 ▪ Yu et al., 2005 ▪ Samanta et al, 2002 ▪ Il-Gyu et al., 2001
Fluoranthène	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Pseudomonas paucimobilis et Alcaligenes</i> <i>denitrificans</i> ▪ <i>Mycobacterium sp.</i> C2-3 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Arodi, 2005 ▪ Il-Gyu et al., 2001
Pyrène	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Mycobacterium spp</i> ▪ <i>Mycobacterium sp.</i> C2-3 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Arodi, 2005 ▪ Il-Gyu et al., 2001
Benzo[a]anthracène	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Beijerinckia sp</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Arodi, 2005
Chrysène	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Rhodococcus sp</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Arodi, 2005
Benzo[a]pyrène	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Beijerinckia sp</i> ▪ <i>Pseudomonas spp</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Arodi, 2005 ▪ Arodi, 2005

Pour les HAP avec trois cycles, comme l'acénaphthylène, le fluorène, l'anthracène et le phénanthrène, ils suivent le même modèle que le naphtalène (figure I.4).

Dans le cas des HAP à poids moléculaire élevé, peu de données existent sur les bactéries capables de les dégrader, mais plusieurs auteurs ont démontré que leurs voies métaboliques ressemblent à celles du naphtalène (**Arodi**, 2005).

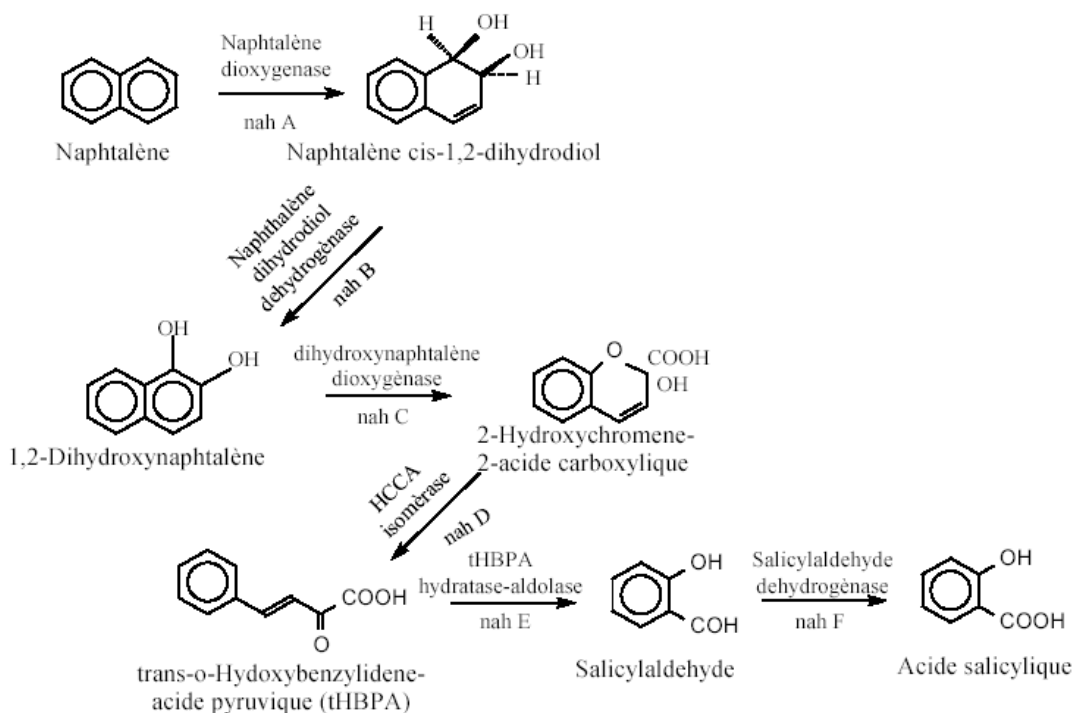


Figure I.3 : Voie métabolique de dégradation du naphtalène par *Pseudomonas sp* et *Acinetobacter calcoaceticus* (Arodi, 2005).

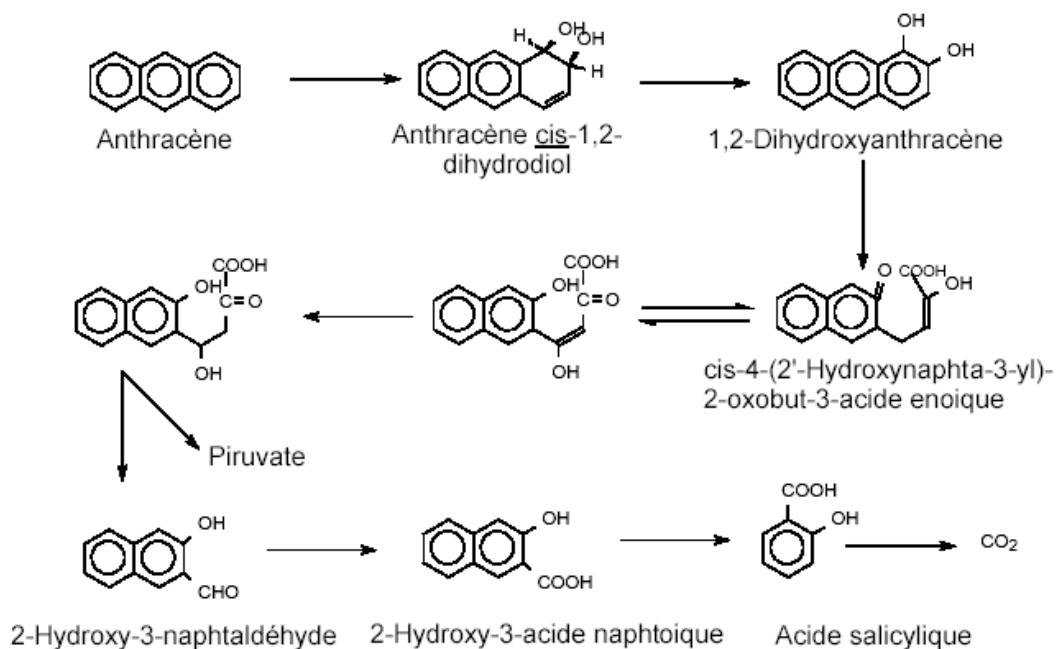


Figure I.4 : Voie aérobie de dégradation bactérienne de l'anthracène par *Pseudomonas aeruginosa* (Arodi, 2005).

Chapitre II :

Méthodes de mesures, Installation expérimentale

Chapitre II :

Méthodes de mesures, Installations expérimentales

Ce travail porte sur la sélection des souches bactériennes isolées, à partir des eaux polluées par les hydrocarbures suivie de l'étude de la cinétique de biodégradation de certains polluants organiques toxiques. Dans ce chapitre, nous décrivons les différentes méthodes utilisées ainsi que les installations expérimentales.

II.1 dénombrement de la population microbienne :

Le dénombrement est fait sur deux échantillons d'eau polluée :

E₁: un échantillon ramené de Hassi Messaoud (eau de borbier),

E₂ : un échantillon prélevé de Oued el Harrach.

Les échantillons ont été choisis pour leurs degrés de pollution par les produits pétroliers.

Le dénombrement de ces deux échantillons est effectué afin de connaître leur charge microbienne.

La technique de dénombrement commence par la préparation des dilutions :

- 1ml de chaque solution mère (eau de Oued El Harrach et eau de borbier) est mis dans 9ml d'eau physiologique (composition voir annexe I), la suspension est agitée pendant deux minutes afin d'obtenir un mélange homogène.

- A partir de cette suspension, préparer une série de 8 dilutions de 10^{-1} à 10^{-8} : prélever 1ml de la suspension mère et le transférer dans un deuxième tube contenant 9ml d'eau physiologique pour obtenir une dilution de 10^{-1} , procéder de la même manière afin d'obtenir une dilution de 10^{-2} ainsi de suite jusqu'à la dilution 10^{-8} .

Les ensemencements sur boîtes de Pétri sont effectués à partir de ces dilutions :

- 1ml de chaque dilution est mis dans une boîte de Pétri vide en utilisant une micropipette,

-10 à 15ml de gélose nutritive liquéfiée et maintenue à 45°C sont ensuite coulés dans les boîtes de Pétri contenant les dilutions. Mélanger uniformément le milieu avec l'inoculum par un lent mouvement circulaire horizontal.

Après une incubation de 24h à une température de 37°C, un comptage de colonies est fait : seules les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies sont considérées pour le comptage.

Lorsque le nombre de colonies est inférieur à 30, nous considérons que le nombre de germes est inférieur à 30 germes /ml. Pour chaque dilution le nombre moyen de colonies est compté

puis rapporté à la solution mère. Une moyenne des nombres de germes pour chaque dilution dénombrable est exprimée en Unités Formants Colonies UFC.ml⁻¹.

II.2 Isolement et purification des souches :

L'isolement consiste à prélever des colonies bien isolées sur boîtes de Pétri à partir des ensemencements des échantillons et des dilutions en surface sur gélose nutritive par la méthode des stries. Après incubation de 24h à 37°C toutes les colonies morphologiquement différentes sont prélevées et transférées chacune dans 10ml de bouillon nutritif (composition voir annexeI),

Le développement est traduit par la présence d'un trouble.

A partir de chaque tube de bouillon nutritif, un repiquage est effectué par un ensemencement par stries sur gélose nutritive en boîtes de Pétri suivi d'une incubation dans les mêmes conditions.

La purification consiste donc aux transferts successifs et alternés du milieu liquide au milieu solide et vice versa jusqu'à l'obtention de colonies morphologiquement identiques dans chaque boîte de Pétri.

II.3 Conservation des souches :

Les souches morphologiquement identiques sont conservées dans des tubes contenant de la gélose inclinée (composition voir annexeI) ainsi que dans des tubes en culots. Ils sont conservés à 4°C.

La pureté de ces souches est vérifiée périodiquement par étalement sur milieu solide.

II.4 Sélection des souches dégradatrices du phénol :

Le but final de cette partie est de trouver les différentes souches qui dégradent le phénol (les souches les plus actives).

La suspension bactérienne, préparée par préculture à partir des souches isolées et purifiées, est ensemencée (0,1ml) en surface sur milieu minéral gélosé (composition voir annexeI) qui contient 100 mg.l⁻¹ de phénol. Les boîtes sont ensuite incubées 7 jours à 37°C.

Un suivi de développement des colonies sur les boîtes Pétris est réalisé quotidiennement.

II.5 Identifications des souches :

L'identification peut se faire à partir des caractères suivants : caractères morphologiques, caractères culturels, caractères biochimiques et physiologiques, caractères immunologiques, lysotypie, pouvoirs pathogènes. Chaque critère permet de classer la souche dans une famille, espèce, groupe, souches.

Selon les moyens disponibles à notre niveau, nous avons opté pour la démarche préconisée par **Guiraud et al.** (1980) (voir Figure A.II.1 dans l'annexe II), l'identification des souches dégradatrices du phénol a porté sur : la coloration de Gram, la recherche des enzymes respiratoires et l'application des tests biochimiques miniaturisés (Galeries API). Les galeries API 20E (Entérobactéries) et API 20NE (Non Entérobactéries) ont été utilisés.

Deux tests supplémentaires (sur milieu KingA et KingB) étudient la pigmentation des cultures de *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens*.

II.5.1 Coloration de Gram :

La coloration de Gram permet de classer les bactéries en bactéries à Gram positif (colorées en violet par le violet de gentiane) et bactéries à Gram négatif (recolorées en rose par la fuschine). Cette distinction fondamentale, base de toute la taxonomie bactérienne, repose sur des différences de structures pariétales des bactéries.

Technique :

Quelques gouttes de solution aqueuse de violet de gentiane sont épanchées sur le frottis fixé. L'excès de violet est jeté après 1 mn d'action. Le frottis est alors recouvert de lugol cette liqueur prend une teinte mordorée, on la jette au bout de quelques secondes et on répète l'opération une ou deux fois jusqu'à ce que la pellicule mordorée n'apparaisse pas.

La lame est ensuite décolorée à l'alcool absolu goutte à goutte en l'inclinant au dessus de l'évier jusqu'à ce que l'alcool ajouté n'ait plus d'action décolorante.

Après lavage à l'eau, le frottis est recoloré à la Fuschine de Ziel pendant 1mn puis lavé à l'eau séché et examiné au microscope optique à l'immersion.

II.5.2 Enzymes respiratoires :

Deux enzymes respiratoires sont étudiées : **la catalase et la cytochrome oxydase**
La présence de la catalase chez les bactéries induit la formation d'un dégagement gazeux (O_2) lorsque celles-ci sont mises en présence d'eau oxygénée à 10 volumes. En effet, le rôle de catalase est de dégrader l'eau oxygénée, issue de la voie respiratoire oxydative directe, en oxygène et en eau.

La cytochrome oxydase agit sur un réactif incolore (solution aqueuse à 1% de l'oxalate de N-diméthyl-para phényle- diamine) en entraînant la formation d'une semi-quinone rouge qui évolue en composé noirâtre.

Technique :

-**Test oxydase** : le test est fait en utilisant les disques OX (oxalate de N-diméthyl-para phényle- diamine) qu'on place sur une lame et qu'on imbibe d'une goutte d'eau. Une parcelle de la culture est ensuite déposée à la surface. Une coloration rose signifie une réaction +

- **Test catalase** : Une goutte de H₂O₂ est placée sur une lame sur laquelle une parcelle de culture en milieu solide y est répartie. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles traduit la décomposition de H₂O₂.

II.5.3 Tests culturaux :

Les milieux King A et King B : favorisent la pigmentation des cultures de *Pseudomonas*. Ils sont particulièrement favorables pour exalter la pigmentation des *Pseudomonas*, en particulier du groupe fluorescent (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*).

- **King A** : milieu destiné à favoriser sélectivement la synthèse de la pyocyanine par *Pseudomonas aeruginosa* (bacille pyocyanique). La pyocyanine se manifeste en colorant le milieu de culture en bleu (ou en vert si les deux pigments de *Pseudomonas aeruginosa* sont synthétisés à la fois)
- **King B** : milieu destiné à favoriser la synthèse du pigment vert fluorescent (pyoverdine) par le bacille pyocyanique et divers autres *Pseudomonas*.

Technique :

- inoculer un tube de milieu King A et un tube de milieu King B en faisant une strie médiane à la surface de la gélose avec une anse de culture prise dans un bouillon ou sur une gélose,
- Incuber à 30 °C pendant 4 jours.

II.5.4 Identification par galerie biochimique API 20NE :

Principe :

API 20NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries (ex : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc).

La galerie API 20 NE comporte des microtubes contenant des substrats déshydratés.

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries se cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique.

II.5.5 Identification par galerie biochimique API 20 E :

Principe :

Le système API 20E (BioMérieux) est une version miniaturisée des tests biochimiques classiques destinés à l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif. Des microtubes contiennent des substrats déshydratés, lesquels sont mis en solution par l'addition d'une suspension de la bactérie à identifier. Une période d'incubation de 24 heures à $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ permet à la bactérie de réagir avec les substrats.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture (voir annexe II) et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique.

Les différentes testes ainsi que la technique et la lecture des résultats sont présentées dans annexe II.

II.6 Traitement de l'eau polluée par le phénol :

Le traitement de l'eau polluée par le phénol a été réalisé dans un erlenmeyer de capacité de 2 litres, placé dans un bain marie pour garder la température constante (37°C). L'agitation et l'aération sont 40 tr. min^{-1} et $1,4 \text{ l. min}^{-1}$ respectivement (voir figure II.2).

La croissance bactérienne et la dégradation du phénol ont été suivies respectivement à partir de la détermination de la masse cellulaire sèche et du dosage du phénol résiduel.

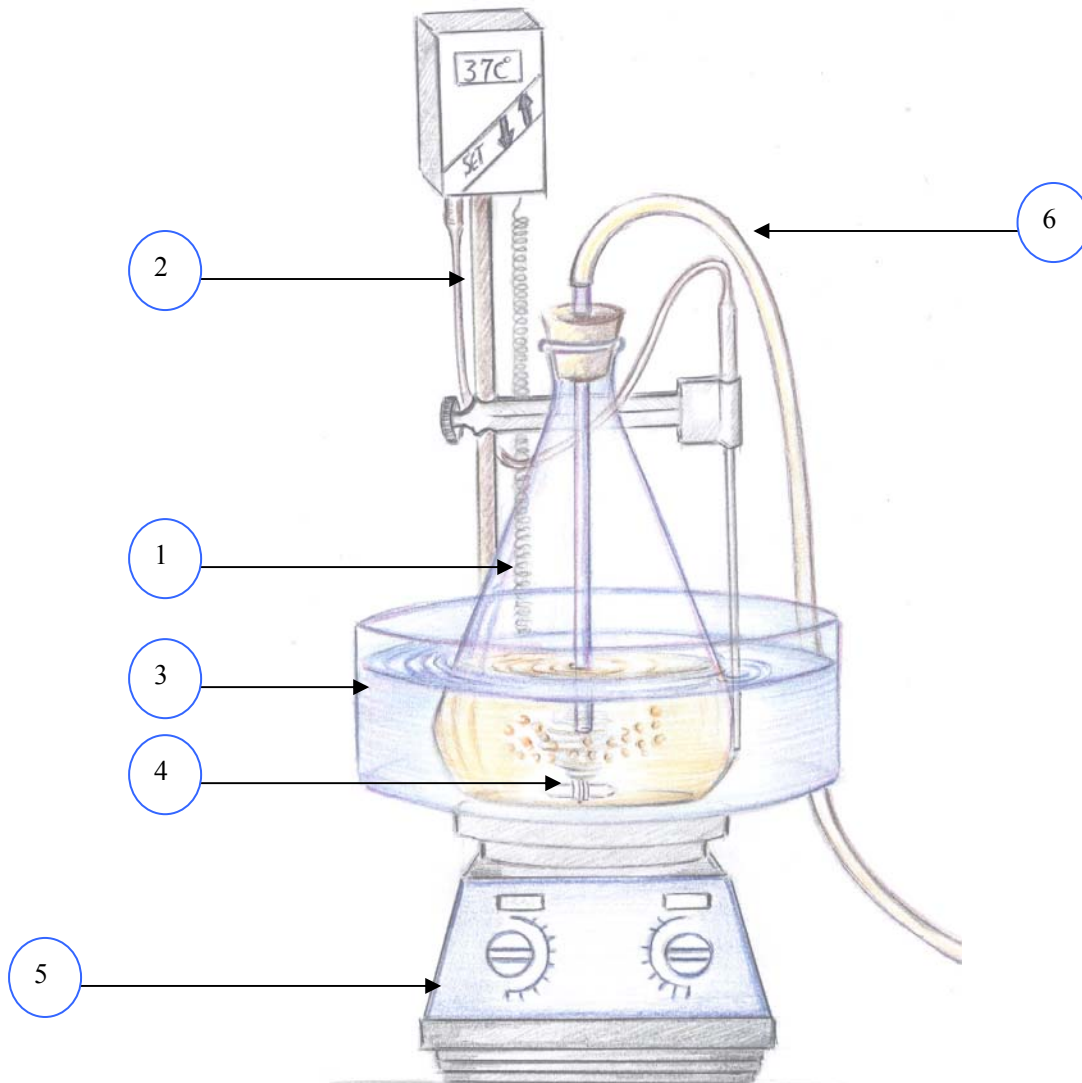
II.6.1 Mesure de la biomasse microbienne :

La détermination de la matière sèche cellulaire est la méthode la plus rigoureuse. Pour cela l'établissement des courbes d'étalonnages pour chaque bactérie est nécessaire (voir annexe III). Par le biais de ces courbes d'étalonnage, nous arrivons à déterminer les concentrations inconnues en matière sèche.

II.6.2 Dosage du phénol

Principe:

Le phénol a été quantifié par la méthode colorimétrique basée sur la condensation du 4-amino-antipyrine avec le phénol en présence d'un agent oxydant ferricyanure de potassium dans un milieu alcalin pour donner un complexe de couleur rouge, intensité de cette dernière dépend de la concentration du phénol **NF(T90-204)**. La courbe d'étalonnage ainsi que la méthode de dosage sont présentées en annexe III.



- 1 : Erlenmeyer
- 2 : Système de thermo-couple
- 3 : Bain marie
- 4 : Bareau magnétique
- 5 : Agitateur
- 6 : Système d'aération

Figure II 2 : Installation de traitement de l'eau polluée par le phénol

II.7 Caractérisation du sol :

Des analyses de caractérisation de l'échantillon du sol étudié ont porté sur la granulométrie, le pH, la matière organique, l'azote et le phosphore totaux, ainsi qu'un dénombrement des germes présents dans le sol.

II.7.1 Analyse granulométrique :

L'analyse granulométrique du sol est déterminée au laboratoire de pédologie de l'Institut National Agronomique (El Harrach) suivant une méthode internationale (**Guy**, 1978). L'analyse s'effectue sur une prise d'essai de sol fin (éléments $\leq 2\text{mm}$). La présente méthode a pour but de déterminer le pourcentage des différentes fractions de particules minérales. Le principe de la méthode est basé sur :

- 1- la mise en suspension de particules minérales, des prélèvements seront faits à l'aide de la pipette de Robinson, dans des flacons à sédimentation à des profondeurs et à des moments déterminés (argile et limon).
- 2- Le tamisage du sable fin et grossier.

II.7.2 pH du sol (pH eau) :

Le pH a été déterminé selon la norme (**ISO 10390**). On ajoute à l'échantillon du sol qui est équivalent à 5 ml, cinq fois ce volume en eau. Après une agitation pendant 5min et 2h de repos on effectue la lecture à l'aide d'un pH-mètre .

II.7.3 Carbone et matière organique :

La matière organique est déterminée à partir la méthode de **Anne (Guy, 1978)**. C'est l'oxydation du carbone organique de la prise d'essai, par du bichromate de potassium en milieu sulfurique. Le bichromate doit être en excès, la quantité réduite est en principe proportionnelle à la teneur en carbone organique. L'excès du bichromate de sodium est titré par une solution de sel de Mohr, en présence de diphénylamine. Connaissant le pourcentage de C, le taux de matière organique peut être approximativement obtenu par la formule.

$$M.O\% = \%C \times 1.72$$

II.7.4 Azote total :

La teneur en azote total est déterminée par la méthode Kjeldhal selon la norme (NF ISO 11261). Cette méthode a pour principe de minéraliser l'azote organique par l'acide sulfurique en présence d'un catalyseur de minéralisation, distillation de l'azote ammoniacal sous forme ammoniacale formé est fixé dans une solution d'acide borique puis titré par de l'acide sulfurique.

II.7.5 Phosphore soluble :

Le dosage du phosphore est déterminé selon la norme (ISO11263). Cette méthode repose sur l'extraction des formes de phosphore solubles par une solution d'hydrogénocarbonate de sodium. La teneur en phosphore de l'extrait limpide est mesurée par une méthode colorimétrique comportant la formation d'un complexe phosphate-molybdate, ce complexe étant réduit au moyen d'acide ascorbique pour former un complexe bleu.

II.7.6 Caractéristique biologique du sol :

Un échantillon de 1g de sol est mis dans un tube contenant 10ml d'eau distillée. Après une agitation au moyen d'un vortex, nous avons procédé au dénombrement en suivant la même méthode décrite dans le paragraphe II.2.1.

II.8 Traitement du sol pollué par le phénanthrène :

Le sol pollué par le phénanthrène est traité dans un réacteur à cuve mécaniquement agitée (voir figure II.2).

II.8.1 Dosage du phénanthrène :

Le suivi de la concentration du phénanthrène dans les deux phases (phases liquide et solide) après extraction, a été réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre (UV/VIS) de type (UV MINI 1240 Shimadzu) à une longueur d'onde égale à 245nm (Smith *et al.*, 1997).

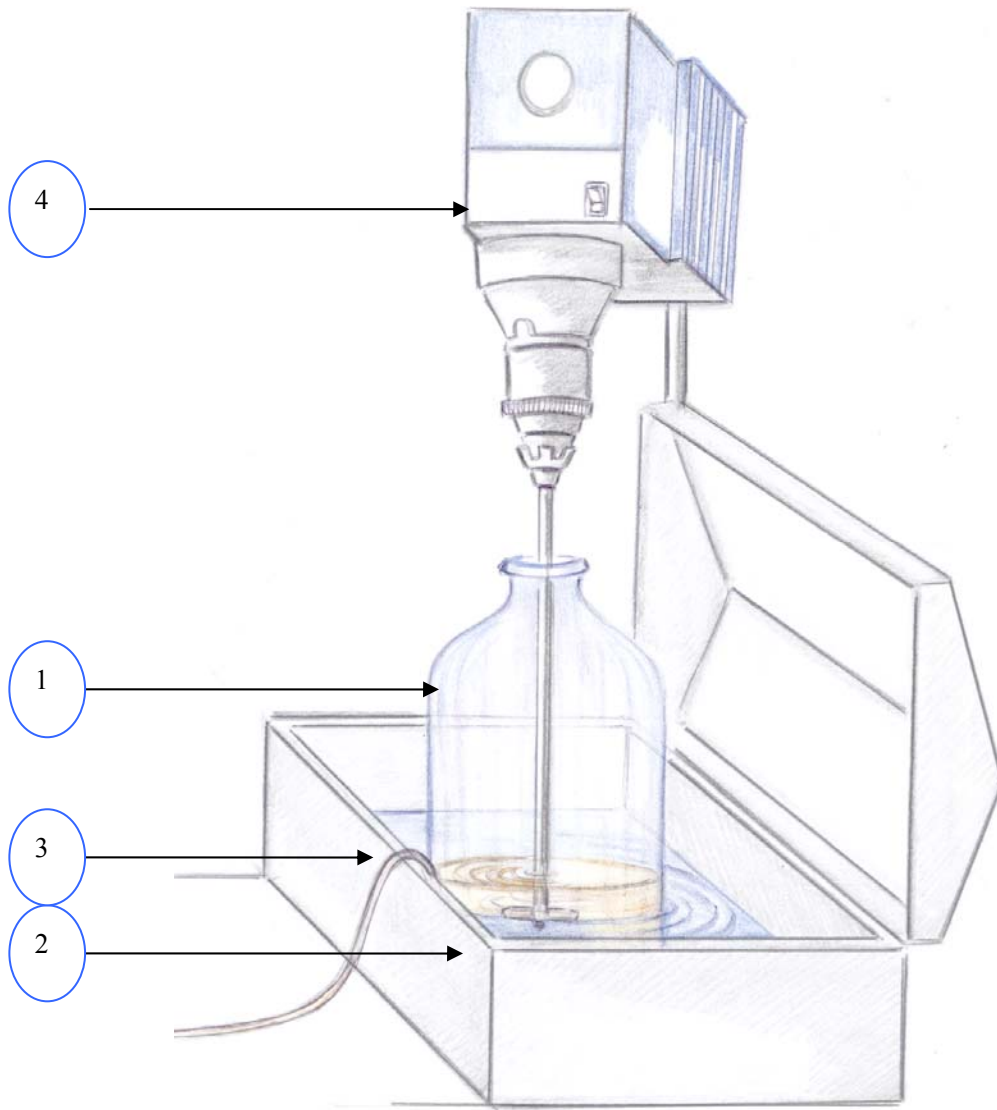
Par l'utilisation de la courbe d'étalonnage (voir annexe III), la concentration du phénanthrène est déterminée.

II.8.2 Extraction du phénanthrène dans la phase solide :

Un échantillon de 2 g de sol est mélangé et broyé avec une quantité de sulfate de sodium dans un rapport 4/5 (P/P). L'extraction du phénanthrène du sol est réalisée dans un extracteur soxhlet en utilisant le dichlorométhane comme solvant pendant une durée de 5h environ.

II.8.3 Extraction du phénanthrène dans la phase liquide :

A partir de l'échantillon fraîchement prélevé, on procède à une extraction par un solvant qui est dans notre cas, le dichlorométhane (**Abu-salah et al.**, 1996). La phase liquide est mise en contact avec le solvant dans une ampoule à décanter. Sous une agitation manuelle pendant 20 minutes, et après un repos de quelques minutes on sépare la phase organique de la phase aqueuse. Le solvant forme une phase organique immiscible piégeant le phénanthrène présent dans l'eau. L'extrait est filtré on utilisant le sulfate de sodium pour éliminer les traces d'eau.



- 1 : Réacteur de capacité de 5l
- 2 : Bain marie
- 3 : Système d'aération
- 4 : Agitateur

Figure II.2 : Dispositif du réacteur triphasique agité

Chapitre III :

Résultats expérimentaux

et discussion

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Certains microorganismes peuvent vivre dans des eaux ou des sols pollués. Ils peuvent contribuer à la diminution de la charge polluante par la biodégradation. Leur présence et leur capacité à dégrader les polluants sont dues à leurs adaptations aux conditions du milieu et à leurs métabolismes. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes intéressés aux eaux polluées par les hydrocarbures.

L'objectif de notre travail est d'isoler et de purifier des souches bactériennes présentes dans des eaux polluées par les hydrocarbures afin de les utiliser dans des essais de traitements de sols et des eaux pollués par différents polluants hydrocarbonés.

Dans notre étude deux polluants ont été choisis ; le phénol (un hydrocarbure aromatique à un seul cycle), et le phénanthrène (un hydrocarbure polycyclique à trois cycles).

Une première application a été réalisée sur le traitement d'eau polluée par le phénol après avoir sélectionné et identifié toutes les souches qui dégradent ce polluant de manière active.

Une seconde application de traitement a été réalisée sur un sol pollué par le phénanthrène.

III.1. Dénombrement des souches : Le dénombrement des germes fait sur les deux échantillons a donné les résultats suivants (Tableau III.1)

Tableau III.1 : Dénombrement des germes des deux échantillons

Echantillons	Nombre de germes (UFC .ml ⁻¹)
E ₁ eau de bourbier (Hassi Messaoud)	Moins de 30
E ₂ eau de Oued El Harrach.	9,7 .10 ⁴

Les résultats montrent que l'eau de bourbier est beaucoup moins chargée en germes que l'eau de Oued el Harrach. Ce qui laisse supposer que l'eau de bourbier est un milieu trop concentré en polluant donc non favorable au développement des germes. Par contre l'eau de Oued El Harrach est une eau moins chargée en polluants toxiques pour les microorganismes et donc un milieu plutôt favorable à leur développement.

III.2. Isolement et la purification :

L'isolement et la purification des souches à partir des échantillons E1 et E2 ont permis d'obtenir 90 souches (5 provenant de l'eau de borbier et 85 de l'échantillon de Oued El Harrach). L'étude macroscopique a été réalisée pour chaque souche. Elle a permis de mettre en évidence plusieurs types de colonies. Les résultats sont présentés dans le tableau III.2. Certaines de ces souches présentent les mêmes critères macroscopiques, mais ceci n'implique pas qu'elles sont identiques, pour cela une identification physiologique et biochimique est nécessaire.

Tableau III.2 : Observation macroscopique des différents types de colonies obtenus

Nombre de souches	observation macroscopique des souches
20 souches (SA1 SA2 SA3 SA4 SA5 SA6 SA8 SA9 SB1 SC9 SD1 SH4 SG3 SG5 SG6 SD3 SF3 SF4 SJ2)	Circulaire, beige, plate
18 souches (SB2 SB4 SJ4 SJ6 SF2 SF5 SF6 SF10 SG8 SG9 SH1 SH5 SH7 SH9 SI2 SI10 SJ1)	Circulaire, blanche, plate
5souches (SA7 SA10 SB3 SF8 SH6)	Circulaire, blanche, convexe
16 souches (SC4 SC8 SD4 SD5 SD6 SD7 SD8 SD10* SH3 SD9 SI7 SE1 SE2 SE3* SE4 SE5)	Circulaire, beige, convexe
2 souches (SI8 SI9)	Circulaire, beige, centré
2 souches (SI4 SI5)	Circulaire, blanche, centré
4 souches (SB5 SB6 SC3 SE6)	Filamenteuse, beige, centré
4 souches (SB7 SB8* SC1 SD2)	Filamenteuse, beige, convexe
2 souches (SB9 SC2)	Filamenteuse, beige, plate
2 souches (SF7 SG1)	Filamenteuse, blanche, plate
3 souches (SB10* SJ5 SH2)	Irrégulier, beige, convexe
une seule souche (SG2)	Filamenteuse, blanche, centré
7 souches (SE8 SG4 SC6 SE7* SC5 SC10 SI3)	Irrégulier, beige, plate
2 souches (SH8 SI1)	Irrégulier, blanche, plate
2 souches (SJ3 SJ7)	Irrégulier, beige, centré
Une seule souche (SI6)	Irrégulier, blanche, convexe
Une seule souche (SC7)	Ondulé, beige, plate

* Souches isolées de l'échantillon E1 (eau de borbier)

III.3 Sélection des souches dégradant le phénol :

A partir des souches isolées et purifiées, nous avons sélectionné les souches qui dégradent activement le phénol (propriétés physico-chimiques sont illustrées en annexe IV). Pour cela nous avons étudié d'abord la capacité de ces souches pures à croître sur un milieu minéral gélosé avec le phénol comme seule source de carbone et d'énergie (100 mg.l⁻¹), pendant une durée d'incubation de 7 jours (**Dictor et al.**, 2003). Le développement des colonies sur boîtes de Pétri a été suivi quotidiennement. Le tableau III.3 montre les résultats de différentes souches qui dégradent le phénol.

D'après ces résultats nous pouvons constater que :

- ✓ 44 souches sont capables de dégrader le phénol avec des périodes de latence différentes.
- ✓ Parmi ces 44 souches isolées, 7 souches (SB5, SB6, SC7, SD7, SE6, SE7, SE8) commencent à se développer à partir du 2^{ème} jour d'incubation, par contre les autres souches commencent à partir du 3^{ème} jour.
- ✓ La période d'apparition des colonies constitue une phase de latence nécessaire à l'adaptation de ces souches à la nouvelle source de carbone. Plus la croissance de la souche est rapide, plus son adaptation au polluant est meilleure. Pour cela nous avons choisi les 7 souches (dont la période de latence est de 24 heures) pour poursuivre cette étude.

Tableau III.3 : Souches dégradantes et non dégradantes du phénol

souches	1er j	2ème j	3ème j	4ème j	5ème j	6ème j	7ème j
SA1	-	-	-	-	-	-	-
SA2	-	-	-	-	-	-	-
SA3	-	-	-	-	-	-	-
SA4	-	-	-	-	-	-	-
SA5	-	-	-	-	-	-	-
SA6	-	-	-	-	-	-	-
SA7	-	-	-	-	-	-	-
SA8	-	-	-	-	-	-	-
SA9	-	-	-	-	-	-	-
SA10	-	-	-	-	-	-	-
SB1	-	-	-	-	-	-	-
SB2	-	-	-	-	-	-	-
SB3	-	-	-	-	-	-	-
SB4	-	-	-	-	-	-	-
SB5	-	+	+	+	+	+	+
SB6	-	+	+	+	+	+	+
SB7	-	-	+	+	+	+	+
SB8*	-	-	+	+	+	+	+
SB9	-	-	+	+	+	+	+
SB10*	-	-	+	+	+	+	+
SC1	-	-	+	+	+	+	+
SC2	-	-	+	+	+	+	+
SC3	-	-	+	+	+	+	+
SC4	-	-	+	+	+	+	+

* Souches isolées de l'échantillon E1 (eau de borbier)

Tableau III.3 (suite): Souches dégradantes et non dégradantes du phénol

souches	1er j	2ème j	3ème j	4ème j	5ème j	6ème j	7ème j
SC5	-	-	-	-	-	-	-
SC6	-	-	+	+	+	+	+
SC7	-	+	+	+	+	+	+
SC8	-	-	+	+	+	+	+
SC9	-	-	-	-	-	-	-
SC10	-	-	+	+	+	+	+
SD1	-	-	+	+	+	+	+
SD2	-	-	-	-	-	-	-
SD3	-	-	+	+	+	+	+
SD4	-	-	-	-	-	-	-
SD5	-	-	-	-	-	-	-
SD6	-	-	-	-	-	-	-
SD7	-	+	+	+	+	+	+
SD8	-	-	-	-	-	-	-
SD9	-	-	-	-	-	-	-
SD10*	-	-	-	-	-	-	-
SE1	-	-	-	-	-	-	-
SE2	-	-	-	-	-	-	-
SE3*	-	-	-	-	-	-	-
SE4	-	-	-	-	-	-	-
SE5	-	-	-	-	-	-	-
SE6	-	+	+	+	+	+	+
SE7*	-	+	+	+	+	+	+
SE8	-	+	+	+	+	+	+
SF2	-	-	-	-	-	-	-
SF3	-	-	-	-	-	-	-
SF4	-	-	+	+	+	+	+
SF5	-	-	-	-	-	-	-
SF6	-	-	+	+	+	+	+
SF7	-	-	+	+	+	+	+
SF8	-	-	-	-	-	-	-
SF10	-	-	-	-	-	-	-

* Souches isolées de l'échantillon E1 (eau de borbier)

Tableau III.3 (suite): Souches dégradantes et non dégradantes du phénol

souches	1er j	2ème j	3ème j	4ème j	5ème j	6ème j	7ème j
SG1	-	-	+	+	+	+	+
SG2	-	-	-	-	-	-	-
SG3	-	-	-	-	-	-	-
SG4	-	-	+	+	+	+	+
SG5	-	-	-	-	-	-	-
SG6	-	-	-	-	-	-	-
SG8	-	-	-	-	-	-	-
SG9	-	-	+	+	+	+	+
SH1	-	-	+	+	+	+	+
SH2	-	-	+	+	+	+	+
SH3	-	-	+	+	+	+	+
SH4	-	-	-	-	-	-	-
SH5	-	-	-	-	-	-	-
SH6	-	-	-	-	-	-	-
SH7	-	-	+	+	+	+	+
SH8	-	-	+	+	+	+	+
SH9	-	-	+	+	+	+	+
SI1	-	-	+	+	+	+	+
SI2	-	-	+	+	+	+	+
SI3	-	-	+	+	+	+	+
SI4	-	-	+	+	+	+	+
SI5	-	-	+	+	+	+	+
SI6	-	-	+	+	+	+	+
SI7	-	-	+	+	+	+	+
SI8	-	-	-	-	-	-	-
SI9	-	-	+	+	+	+	+
SI10	-	-	-	-	-	-	-
SJ1	-	-	-	-	-	-	-
SJ2	-	-	-	-	-	-	-
SJ3	-	-	+	+	+	+	+
SJ4	-	-	+	+	+	+	+
SJ5	-	-	+	+	+	+	+
SJ6	-	-	-	-	-	-	-
SJ7	-	-	+	+	+	+	+

III.4. Identification des souches dégradant le phénol :

L'identification ne concerne que les 7 souches qui dégradent le phénol à partir du deuxième jour (SE6, SE8, SE7*, SB6, SB5, SD7, SC8). Elle a porté sur la coloration de Gram, la recherche des enzymes respiratoires et les tests cultureux, puis une identification en utilisant les Galeries API. Les résultats sont présentés ci-après.

III.4.1 Morphologie et Gram :

Les résultats de la coloration de Gram des sept souches ainsi que leurs formes sont présentés dans le tableau III.4.

Tableau III.4 : La coloration de Gram ainsi que la forme des sept souches

Souches	Le Gram	Forme des souches
SC7	+	bacille
SE7*	-	bacille
SB5	+	bacille
SE6	-	bacille en chaînette
SE8	-	bacille
SD7	+	coques
SB6	+	bacille

A partir des résultats obtenus, on constate que :

- selon la coloration de Gram, les bactéries sont classées en 2 groupes :
 - Bactéries Gram +: SB5, SB6, SD7, SC7
 - Bactéries Gram – : SE6, SE7*, SE8
- Toutes les souches sont des bacilles plus ou moins longs, à l'exception de la souche SD7 qui se présente sous forme de coques

La figure III.1 illustre la forme de quelques souches bactériennes après la coloration de Gram (les autres souches seront présentées dans l'annexe VI) observées au microscope photonique.

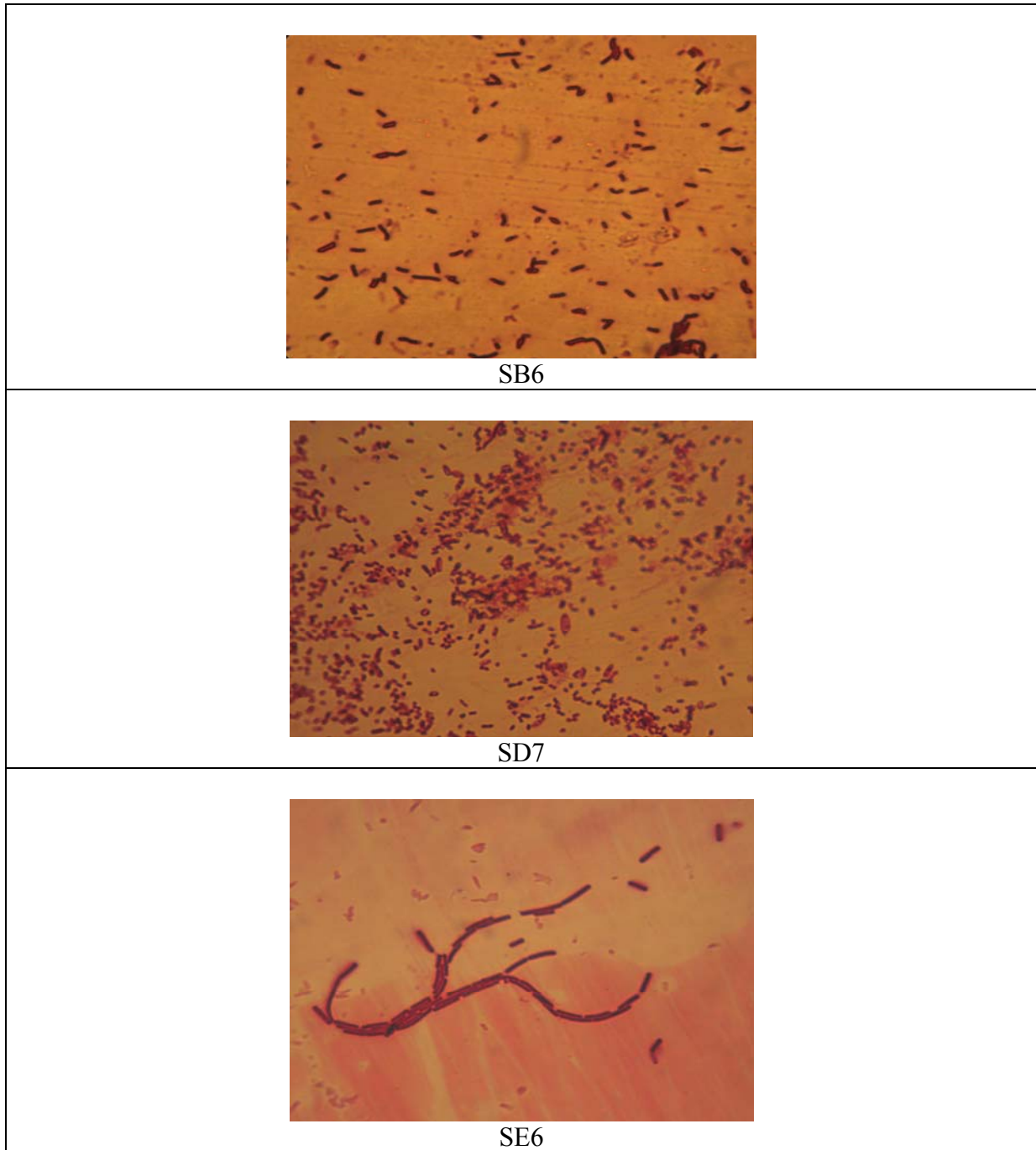


Figure III.1 : la forme de quelques souches bactériennes

III.4.2 Tests oxydase et catalase :

Selon les étapes données par **Guiraud et Galzy** (1980), la recherche de l'oxydase (pour les Gram -) et la catalase (pour les Gram +) permettent l'orientation vers les genres bactériens possibles.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau III.5

Tableau III.5 : Tests oxydase et tests catalase

Souche	Test oxydase (Gram-)	Test catalase (Gram+)
SB5		+
SB6		+
SC7		+
SD7		+
SE6	+	
SE7*	+	
SE8	+	

D'après ces résultats on remarque que :

- Pour les bactéries forme bacille, Gram – (SE6, SE7*, SE8), il s'agit du groupe des bactéries Gram – saprophytes (à identifier grâce aux galeries API20E et 20NE)
- pour les bactéries forme bacille, Gram + (SB5, SB6, SC7) : il s'agit du groupe des *Bacillus* ou *Actinobacter*.
- Pour la souche forme coque, Gram+ (SD7) nous sommes dans le groupe des microcoques.

III.4.3 Test culturaux (King A et le King B) :

Les résultats obtenus par les deux milieux sélectifs (**King A et King B**) sont illustrés dans le tableau III.6.

Tableau III.6 : Tests King A et King B pour les souches Gram -

souches	King A	King B
SE6	-	d*
SE7*	-	-
SE8	-	-

* d : développement (sans pigmentation)

Selon les résultats obtenus, nous remarquons qu'il n'y a pas de développement des souches ; SE7* et SE8 dans les deux milieux : en revanche, la souche SE6 s'est développée dans le milieu King B sans relargage de pigments. Elle ne faisant pas partie des deux genres *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Conclusion :

Le tableau III.7 résume les différents critères obtenus dans cette partie d'identification pour les sept souches.

Tableau III.7 : Résumé des différents critères d'identification des sept souches

	Aspect de la colonie			Aspect de la cellule		Tests			
	forme	couleur	élévation	Forme	Gram	Catalase	Oxydase	King A	King B
SB5	filamenteuse	beige	centré	bacille	+	+	/	/	/
SB6	filamenteuse	beige	centré	bacille	+	+	/	/	/
SC7	ondulé	beige	plate	bacille	+	+	/	/	/
SD7	circulaire	beige	convexe	coque	+	+	/	/	/
SE6	filamenteuse	beige	centré	Bacille en chaînette	-	/	+	-	d*
SE7*	Irrégulier	beige	plate	bacille	-	/	+	-	-
SE8	Irrégulier	beige	plate	bacille	-	/	+	-	-

III.4.4 Identification par galeries API 20 NE :

Pour plus d'informations sur ces souches, les galeries API 20 NE, tests complémentaires, sont utilisées particulièrement pour les bacilles à Gram négatif non entérobactéries. Pour les souches à Gram + nécessite l'utilisation d'autre galeries qui ne sont pas disponibles à notre niveau.

Les résultats des tests d'identification par galeries API 20 NE pour les souches (Gram -) figurent dans le tableau III.8.

Tableau III.8: Résultats des tests API 20 NE pour les souches Gram-

tests		NO ₃	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	ONPG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	OX
SE7*	24h	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
	48h				-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	
SE8	24h	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+
	48h				-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	
SE6	24h	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
	48h				-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	

D'après ces tests on remarque que :

- ✓ les souches SE7* et SE8 ont donné des résultats similaires, ce qui laisse supposer qu'il s'agirait de la même espèce.
- ✓ La souche SE6 diffère des deux par le test ONPG,
- ✓ Le guide analytique des Galeries API 20 NE n'a pas permis l'identification précise de ces souches. D'où la nécessité de compléter par la réalisation d'autres tests.

III.4.5 L'identification par galerie API 20 E

API 20 E sont des tests complémentaires, utilisés particulièrement pour les entérobactéries et quelques bactéries à Gram - .

Les différents résultats des souches à Gram – sont présentés dans le tableau III.9

Tableau III.9 : Résultats des tests API 20E pour les souches Gram-

tests		ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
SE7*	24h	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
SE8	24h	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
SE6	24h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

D'après le guide analytique fournit avec les galeries API 20 E on a trouvé que :

✓ La souche SE6 se rapproche des deux espèces :

1- *Aeromonas salmonicida* (A.s),

2- *Pseudomonas putida* (P.p).

Vu les différents pourcentages de réactions positives pour les deux souches (tableau III.10), la souche SE6 se rapproche beaucoup plus de la souche *Aeromonas salmonicida* que de la souche *Pseudomonas putida*.

Tableau III.10 : Pourcentage de réactions positives pour *Aeromonas salmonicida* et *P. putida*, ainsi que les tests positifs et négatifs de la souche SE6.

tests	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
SE6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
A.s	1	60	1	0	0	0	0	1	1	75	50	54	0	0	0	0	0	1	0	100
P.p	0	75	0	0	92	0	0	0	0	27	25	0	0	0	0	0	25	1	20	99

✓ Les souches SE7* et SE8 (qui ont donné le même résultat par galerie API20E) se rapprochent des deux espèces :

1- *Burkholderia cepacia* (B.c),

2- *Chrysobacterium meningosepticum* (C.m).

Le tableau III.11 donne les pourcentages de réactions positives pour les trois souches physiologiquement les plus proches (*Burkholderia cepacia*, *Chrysobacterium meningosepticum*) ; ainsi que les résultats des tests positifs et négatifs des souches SE7* et SE8.

Tableau III.11 : Pourcentages de réactions positives pour les deux souches *Burkholderia cepacia* (B.c) et *Chrysobacterium meningosepticum* (C.m) ainsi que les tests positifs et négatifs des souches SE7* et SE8.

tests	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
SE7*	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
SE8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
B.c	50	0	25	16	78	0	0	0	0	43	60	1	0	0	0	13	0	7	20	90
C.m	77	0	0	0	20	0	1	0	85	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99

Vu les différents pourcentages de réactions positives pour les deux souches (tableau III.11), les souches SE7* et SE8 se rapprochent beaucoup plus de la souche *Chrysobacterium meningosepticum* que de la souche *Burkholderia cepacia*.

L'utilisation du logiciel API d'identification des taxons pour les trois souches SE6, SE7*, SE8 nous a donné des résultats similaires aux premières interprétations avec des probabilités intéressantes, à savoir :

SE6 : *Aeromonas salmonicida*

SE7*, SE8: *Chrysobacterium meningosepticum*

Conclusion :

D'après les tests faits pour l'identification des sept souches, on peut dire qu'on a abouti à trois souches Gram+ (SB5, SB6, SC7) de forme bacille appartenant au genre *Bacillus* ou *Actinobacter*, et une souche Gram+ de forme coque (SD7) appartenant aux Microcoques. Des tests par galeries API spécifiques pourraient confirmer l'identification de ces espèces.

Pour les trois souches Gram-; SE7* et SE8 appartiendraient à l'espèce *Chrysobacterium meningosepticum* et la souche SE6 se rapproche d' *Aeromonas salmonicida*.

Il est bien établi qu'une identification microbienne n'est absolue que si elle est complétée par l'étude des caractères immunologiques et génétiques.

III.5 traitement de l'eau polluée par le phénol

III.5.1 Dégradation du phénol par les sept souches sélectionnées :

L'étude de la dégradation du phénol par les sept souches sélectionnées est réalisée dans des erlenmeyers de 2 litres, contenant 1 litre de milieu de culture auquel on a ajouté 100mg.l⁻¹ du phénol à l'aide d'un filtre seringue et 10ml de l'inoculum bactérien (préculture de 24h). Les cultures sont maintenues sous agitation de 40 trs.min⁻¹, un chauffage de 37°C et une aération de 1,4 l.mn⁻¹.

Nous avons suivi la dégradation du phénol, en effectuant régulièrement des prélèvements qui sont d'abord centrifugés puis dosés. À partir de la courbe d'étalonnage (voir annexe III), la concentration du phénol a été déterminée.

Nous avons également suivi l'évolution de la biomasse des différentes souches isolées par analyse spectrophotométrique. Les résultats sont exprimés en matière sèche par rapport aux courbes d'étalonnage réalisées pour l'ensemble des souches (annexe III).

Les figures III.2 et III.3 montrent les pourcentages résiduels du phénol ainsi que la croissance bactérienne pour les sept souches.

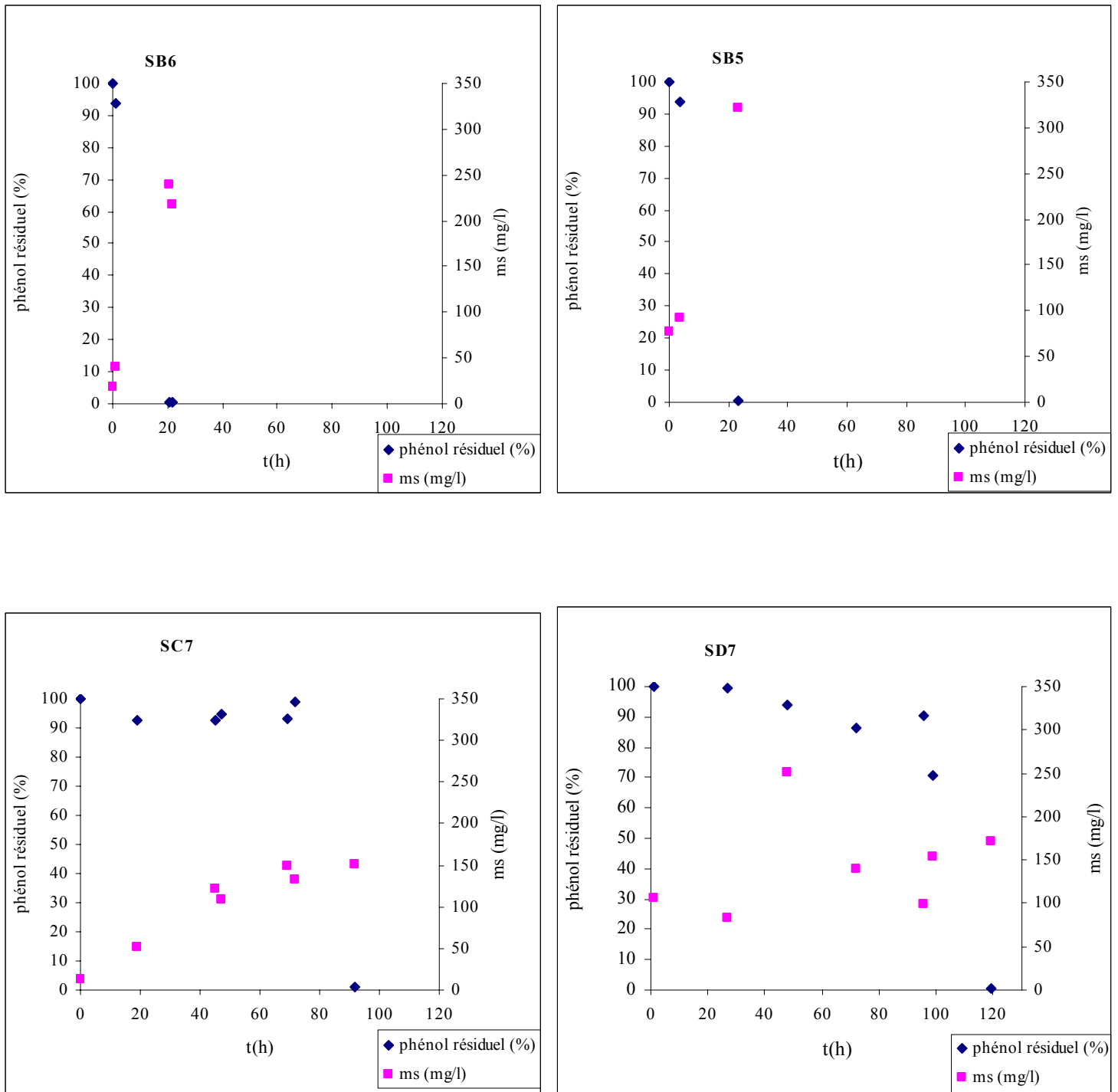


Figure III.2: Pourcentages du phénol résiduel et croissance bactérienne pour les bactéries Gram+

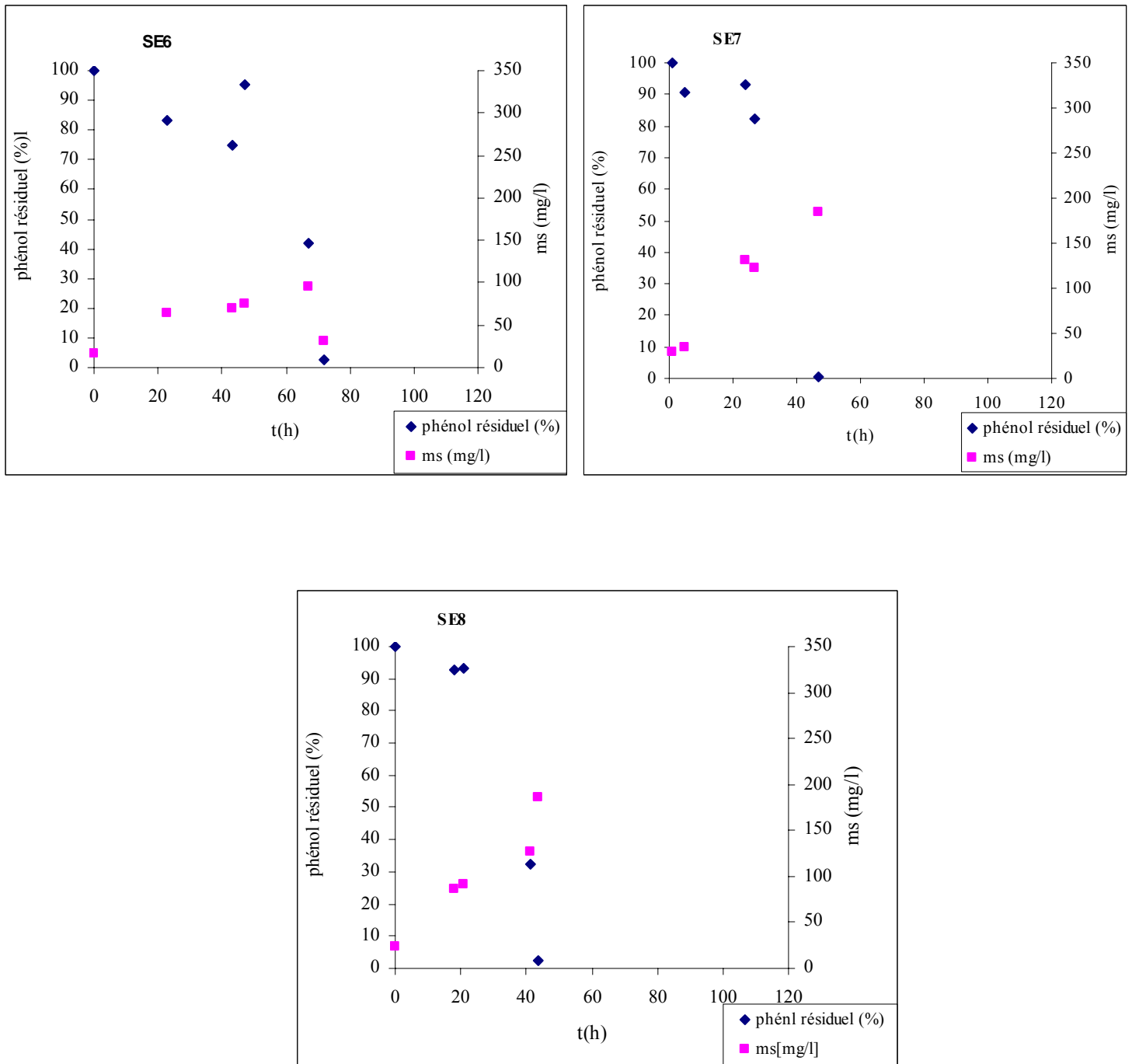


Figure III.3: Pourcentages du phénol résiduel et croissance bactérienne pour les bactéries Gram-

❖ Les différentes courbes des figures III.2 et III.3 montrent pour l'ensemble des souches étudiées, une allure décroissante du pourcentage résiduel du phénol tout au long de la durée d'essai ce qui reflète la consommation du substrat. Il est à constater que la durée de dégradation du phénol diffère d'une souche à l'autre (figure III.4).

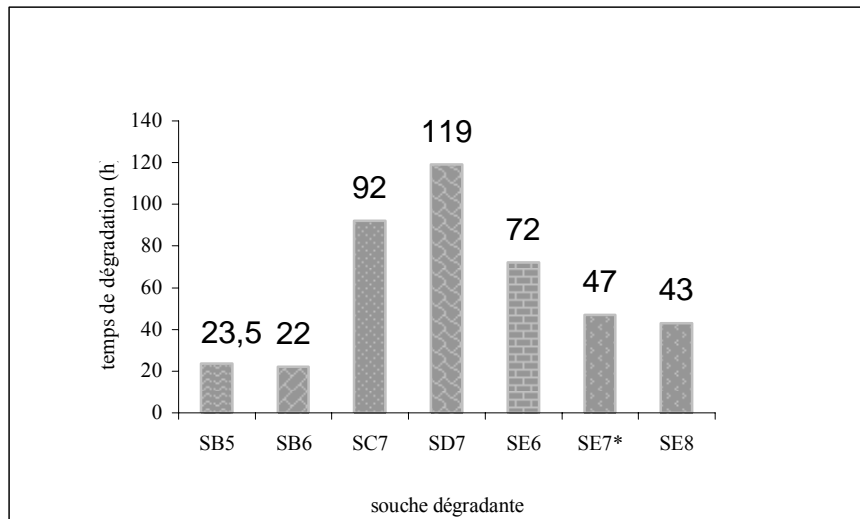


Figure III.4 : Temps de dégradation totale du phénol à une concentration de 100mg.l^{-1} par les sept souches

D'après nos résultats, bien que toutes les souches soient capables de dégrader le phénol, leurs efficacités sont différentes. Plusieurs auteurs ont testé des souches dans la dégradation du phénol parmi eux on trouve **Yang et al.** (2006) qui ont testé deux souches : *Pseudomonas resinovorans* souche P-1 et *Brevibacillus sp.* souche P-6 pour la dégradation du phénol à 100mg.l^{-1} . Les résultats auxquels ils sont parvenus montrent que les deux souches sont capables de dégrader le phénol avec une durée de 11h pour la souche *Pseudomonas resinovorans* souche P-1 et de 75h pour la souche *Brevibacillus sp.* souche P-6.

Selon ces mêmes auteurs, d'autres travaux ont été réalisés, notamment :

El sayed et al. (2003) qui ont isolé une souche *Ochrobacterium sp* qui peut dégrader le phénol (100mg/l) en une durée de 30h.

Margesin et al. (2004) ont comparé l'efficacité de la dégradation du phénol par deux souches isolées, *Arthrobacter sp.* AG31 et *Pseudomonas putida* DSM6414. Ils ont constaté que ces deux dernières dégradent une concentration de 200mg.l^{-1} et 400mg.l^{-1} de phénol entre des durées de 48h et 72h.

Gallego et al. (2003) ont eux aussi étudiés la dégradation du phénol par une culture mixte d'*Alcaligenes* (AG23) et une souche pure d'*Acinetobacter*. Les résultats trouvés montrent que

la souche *Acinetobacter* dégrade 99,5% du phénol (50mg.l^{-1}) au bout de 11h par contre *Alcaligenes* (AG23) nécessite une durée de 20h.

Ce qu'on peut conclure de ces tests que les espèces microbiennes ne se développent pas toutes dans les mêmes conditions, il y a une grande diversité métabolique. Chaque espèce, voir chaque souche microbienne, a ses propres tolérances pour chaque paramètre environnemental spécifique en fonction de ses capacités physiologiques et génétiques (Gourdon, 2002)

❖ Les résultats montrent aussi une différence dans l'efficacité et la durée de dégradation du phénol par les sept souches, cette différence peut être due à l'espèce bactérienne et/ou à sa concentration initiale en biomasse microbienne (l'inoculum bactérien). Le tableau III.12 montre les concentrations initiales de la biomasse microbienne pour les différentes expériences ainsi que les durées de dégradation du phénol.

Tableau III.12 : Concentrations initiales de la biomasse microbienne et durée de dégradation totale du phénol

Souches		Concentration initiale en matière sèche (mg.l^{-1})	La durée de dégradation totale du phénol (h)
Gram-	SE6	16,19	72
	SE7*	29,47	47
	SE8	23,81	43
Gram+	SB5	77,5	23,5
	SB6	18,33	22
	SC7	12,85	92
	SD7	105,55	119

Bactéries Gram- :

- **SE7* et SE8** : l'expérience qui utilise la souche SE8 comme inoculum bactérien présente la plus faible durée de dégradation du phénol (43,5h) malgré que la concentration initiale de la biomasse microbienne soit inférieure à celle de l'expérience utilisant la souche SE7*. La souche SE8 est donc plus efficace que la souche SE7*.
- **SE6** : la souche SE6 présente la plus petite concentration initiale en biomasse microbienne et la plus grande durée de dégradation.

Bactéries Gram+ :

- **SB5 et SB6** : l'expérience qui utilise la souche SB6 présente la plus faible durée de dégradation (22h) ; la durée est presque identique pour la souche SB5 (23,5h). La taille de l'inoculum ne semble par conséquent pas avoir une influence significative sur le temps de dégradation étant donné que SB6 semble plus active même avec un inoculum moins important.
- **SC7** : la souche SC7 présente la plus faible concentration initiale en biomasse microbienne et la plus grande durée de dégradation par rapport aux bactéries bacilles Gram+.
- **SD7** : Malgré la taille de l'inoculum élevée, la souche SD7 montre la plus longue durée de dégradation (119h) en comparaison avec l'ensemble des souches.

❖ Concernant la croissance bactérienne, on remarque :

- qu'il y a : une augmentation tout au long de la durée de dégradation due à la consommation du substrat organique (phénol) (voir figures III.2 et III.3). Toutefois, les cinétiques de croissance diffèrent d'une souche à une autre.
- On exclue la souche SD7, la croissance bactérienne des autres souches ne présentent pas de phase de latence ce même résultat est trouvé par plusieurs auteurs parmi eux on trouve :

Ojumu et al. (2005) ont étudié la dégradation de 100mg.l^{-1} du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens*, la croissance bactérienne ne présente pas de phase de latence ce résultat est expliqué par ces auteurs par le fait que 100mg.l^{-1} est une faible concentration.

Selon ces mêmes auteurs, d'autres travaux ont été réalisés notamment :

Thomas et al. (2002), ont rapporté que il y a une augmentation de la durée de la phase de latence dans un intervalle de concentration entre 100mg.l^{-1} et 1000mg.l^{-1} . Ils ont montré que à une concentration de 100mg.l^{-1} pas de phase de latence. Ce même résultat est observé par les auteurs **Collins et Daugulis** (1997).

Conclusion :

- La durée de dégradation du phénol dépend très fortement de l'espèce bactérienne.
- La souche SB6 (Gram+) et la souche SE8 (Gram-) sont les souches les plus actives et donc les plus intéressantes.

III.5.2 Etude des cinétiques de croissance et de dégradation du phénol à différentes concentrations par la souche SB6 :

Afin d'étudier la cinétique de dégradation du phénol à différentes concentrations ainsi que la cinétique bactérienne, nous avons choisi la souche SB6 (bactéries Gram+) qui a enregistré la plus courte durée de dégradation (une durée totale de dégradation à 100 mg.l⁻¹ du phénol de 22h).

Les résultats de la dégradation du phénol à différentes concentrations par la souche SB6 ainsi que la croissance bactérienne sont illustrés dans la figure III.5

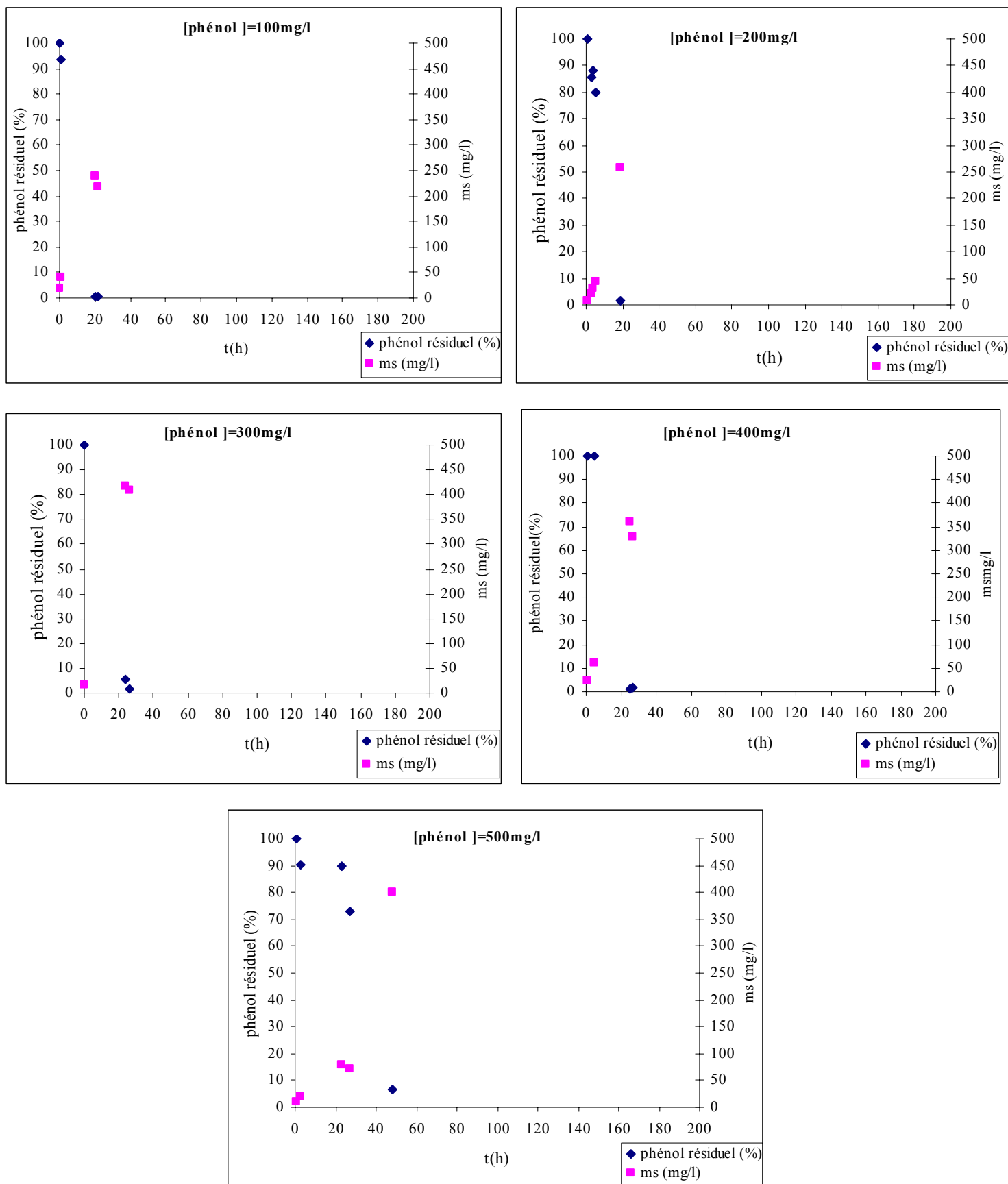


Figure III.5 : Pourcentage résiduel de dégradation du phénol et croissance bactérienne de la souche SB6 à différentes concentrations

D'après le tableau III.13 on remarque que la dégradation totale du phénol à des concentrations de 100, 200, 300 et 400mg.l⁻¹ par la souche SB6 présente presque les mêmes durées d'élimination. La meilleure durée de dégradation est de 19h à une concentration de 200mg.l⁻¹. À partir de cette concentration la durée augmente légèrement entre 300mg.l⁻¹ (26h) et 400mg.l⁻¹ (27h) et augmente jusqu'à 48h pour une concentration de 500mg.l⁻¹.

Tableau III.13 : durée de dégradation du phénol par la souche SB6 à différentes concentrations

Souches		Concentration initiale en phénol (mg.l ⁻¹)	La durée de dégradation totale du phénol (h)
Gram+	SB6	100	22
		200	19
		300	26
		400	27
		500	48

Effet inhibiteur du phénol sur la croissance bactérienne de la souche SB6 :

L'étude de l'effet inhibiteur du phénol sur la croissance bactérienne de SB6 a été déterminé en considérant le taux de croissance maximal (μ_{max}) estimé à partir des courbes de croissance précédentes (tableaux en annexe VII).

Les résultats montrent (figure III.6) qu'à des concentrations allant de 100 mg.l⁻¹ à 200 mg.l⁻¹ le taux de croissance augmente jusqu'à atteindre une valeur de 0,21 h⁻¹ puis diminue, ce qui indique une inhibition de la croissance à partir de 200 mg.l⁻¹. due à la sensibilité de la bactérie à des concentrations relativement élevées en phénol. Cette souche semble plus sensible que *Pseudomonas aeruginosa* étudiée par Ali (2005) dans les mêmes conditions et qui a montré une inhibition à partir de 500 mg.l⁻¹.

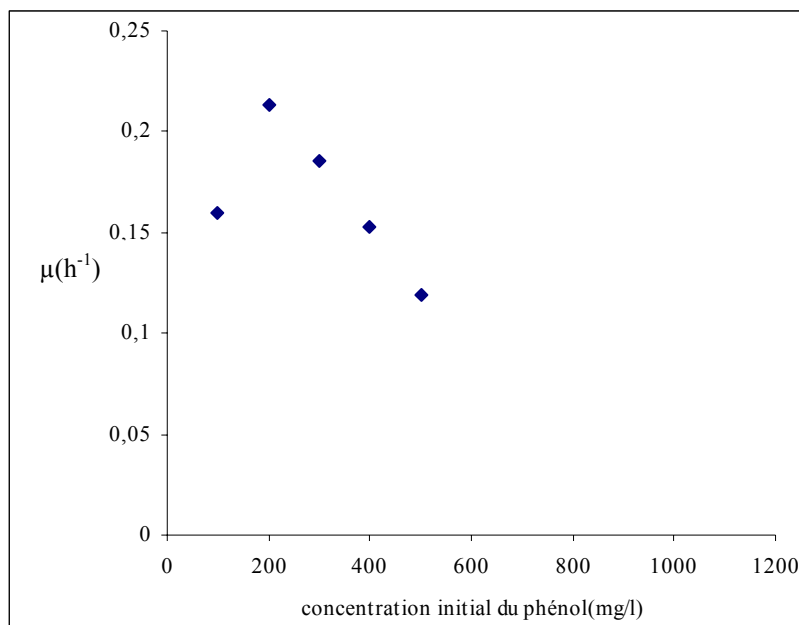


Figure III.6 : Influence de la concentration initiale du substrat (phénol) sur le taux de croissance de la souche SB6

Conclusion :

Il est important de souligner que la souche SB6 demeure la plus intéressante mais à des faibles concentrations. Selon **Desjardin** (2002), une souche dite résistante à un polluant considéré est capable de croître normalement en présence de ce polluant. Mais au-delà d'une concentration limite, la croissance est inhibée ou perturbée. On dira alors que la bactérie ne résiste pas à ce polluant au-delà de cette concentration. Pour cela on a opté à tester une autre souche plus résistante et en même temps donne une durée de dégradation faible.

III.5.3 la dégradation du phénol à différentes concentrations par la souche SE8 :

D'après les résultats précédents, la souche SB6 (Gram+) dégrade le phénol en 22h (100mg.l^{-1}) mais elle n'est pas résistante aux fortes concentrations.

Nous avons alors considéré une bactérie Gram-(la souche SE8 la plus active parmi les Gram-) dans l'étude de l'effet de la concentration en phénol.

La figure III.7 montre les résultats de la dégradation du phénol à différentes concentrations par la souche SE8 ainsi que la croissance bactérienne.

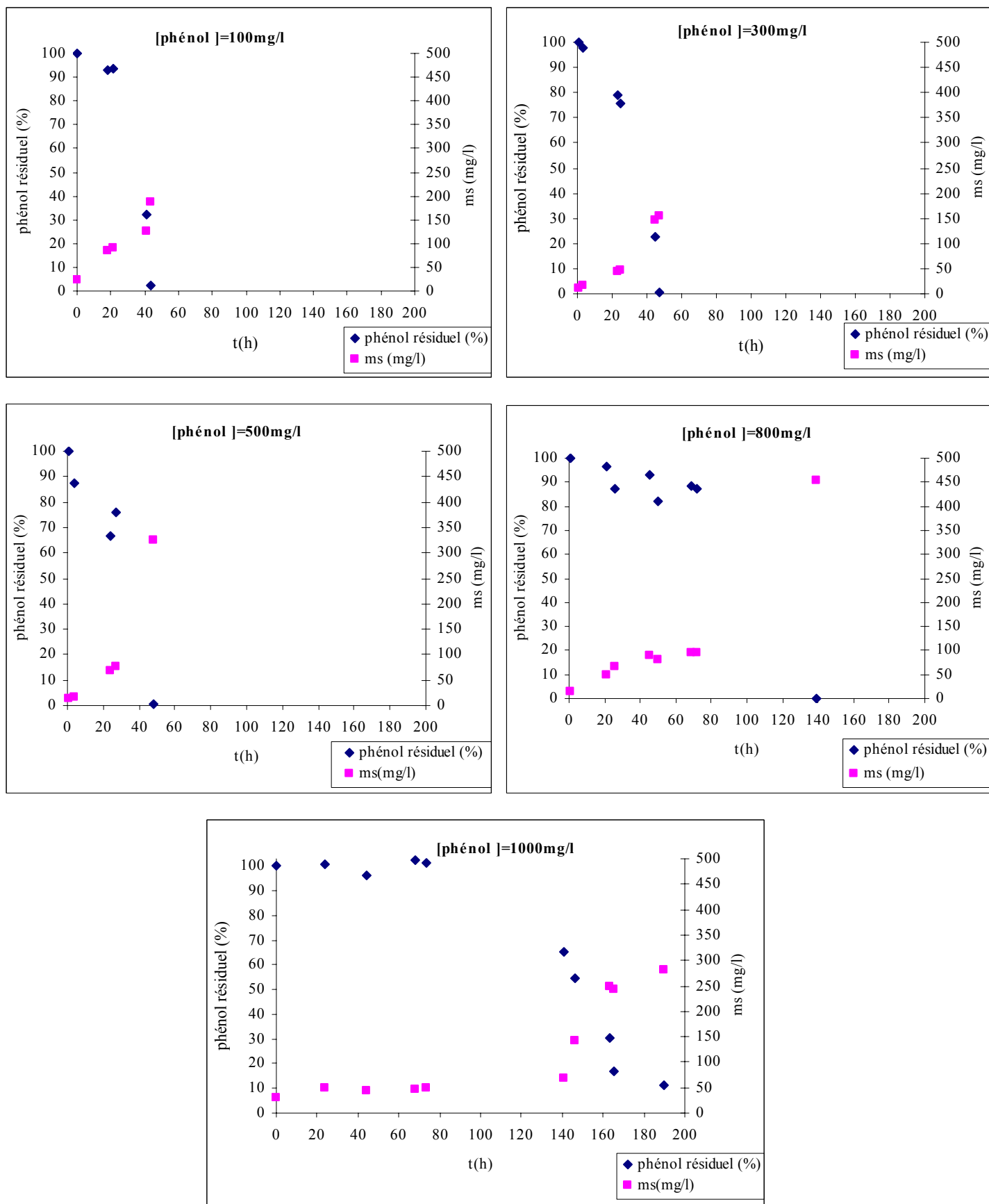


Figure III.7: Pourcentage résiduel de dégradation du phénol et croissance bactérienne de la souche SE8 à différentes concentrations

D'après les résultats obtenus on remarque que les durées de dégradation du phénol par la souche SE8 pour les concentrations de 100mg.l⁻¹, 300mg.l⁻¹ et 500mg.l⁻¹ sont presque les mêmes (presque deux jours). La durée de dégradation totale du phénol augmente avec la concentration en polluant pour atteindre 139h pour une concentration de 800mg.l⁻¹ et de 190h pour 1000mg.l⁻¹.

Effet inhibiteur du phénol sur la croissance bactérienne de la souche SE8 :

L'étude de l'effet inhibiteur du phénol sur la croissance bactérienne de la souches SE8 a été déterminé en considérant le taux de croissance maximal (μ_{max}) estimé à partir des courbes de croissance précédentes (tableaux en annexe VII).

Les résultats montrent (figure III.8) qu'à des concentrations allant de 100 mg.l⁻¹ à 500 mg.l⁻¹ le taux de croissance augmente jusqu'à une valeur de 0,1 h⁻¹ puis diminue, ce qui indique une inhibition de la croissance à partir de 500 mg.l⁻¹.

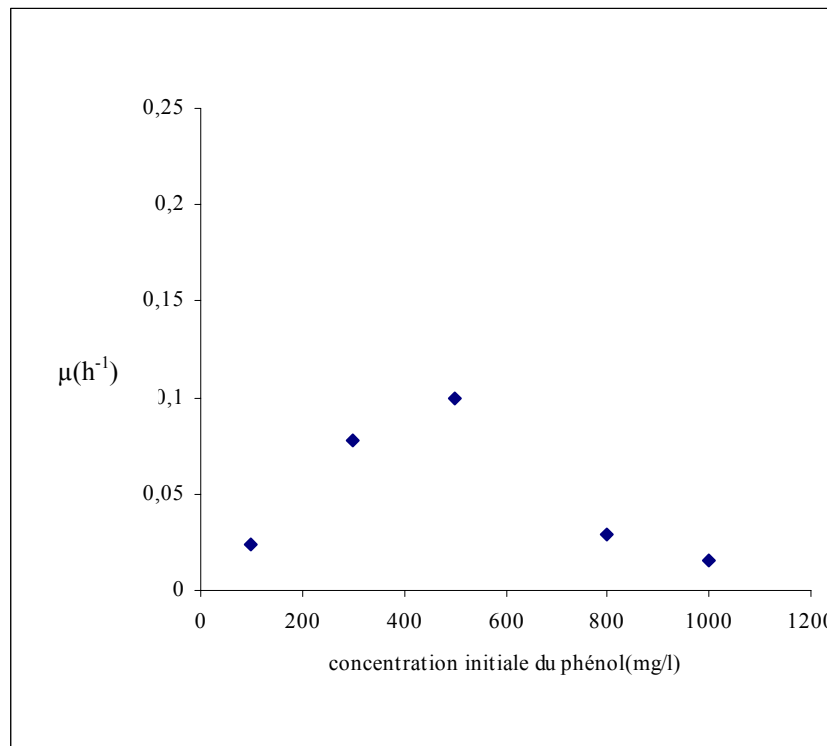


Figure III.8 : Influence de la concentration initiale du substrat (phénol) sur le taux de croissance de la souche SE8

Conclusion :

- ✓ En comparaison avec la souche SB6, on remarque que la souche SE8 résiste jusqu'à une concentration du phénol de 500 mg/l alors que cette concentration affecte fortement la croissance de la souche SB6.
- ✓ Les bactéries Gram+ semblent plus efficaces comme agents de dégradation du phénol

que les bactéries Gram-. En revanche, elles montrent une plus importante sensibilité aux fortes concentrations. La souche SB6 (Gram+) demeure plus intéressante que la souche SE8 (Gram-) par rapport à la cinétique de dégradation du phénol. L'effet inhibiteur des fortes concentrations en phénol se fait plus sentir sur la croissance que sur le métabolisme d'assimilation du substrat. De plus, les résultats ne montrent aucune corrélation directe entre l'efficacité de la dégradation du phénol et la productivité de biomasse.

III.6 Traitement de sol pollué par du phénanthrène :

Les résultats précédents ont montré que, la souche SE8 est la souche la plus résistante aux concentrations élevées du phénol (polluant aromatique composé d'un seul cycle benzénique). Pour cela, l'objectif de cette partie était de tester l'efficacité de cette souche sur la dégradation d'un autre polluant aromatique ; le phénanthrène ; qui se compose de trois cycles benzéniques.

La souche SE8 constitue l'inoculum bactérien utilisé dans le traitement d'un sol pollué par le phénanthrène à raison de 4g/kg du sol sec.

Les expériences sont menées dans un bioréacteur triphasique agité, le sol y est introduit à raison de 20%.

Les essais ont porté sur le traitement :

- Du sol non stérile ; seule la microflore autochtone stimulée par l'addition de nutriments intervient;
- Sur le sol non stérile en présence de la microflore du sol associé à la souche SE8 rajoutée sous forme d'inoculum bactérien;
- Du sol stérilisé au préalable sans l'addition d'inoculum.

Au préalable, il était important de déterminer les caractéristiques physico-chimiques (pH, matière organique, phosphore, azote total) et biologique du sol avant pollution.

III.6.1 Etude du sol :

Le sol étudié provient de la plage de Réghaia où il a été prélevé au voisinage d'une bouche d'égout.

Avant de caractériser le sol nous avons préparé ce dernier suivant la norme **NF ISO 11464**.

III.6.1.1 Caractéristiques physico-chimiques du sol :

Le tableau III.14 présente les pourcentages des différentes fractions ainsi que le pH, le carbone organique, le phosphore et l'azote total du sol avant pollution.

Tableau III.14 : Les caractéristiques physico-chimiques du sol

Sol	granulométrie					pH	CO (%)	P (%)	N (%)
	L.F	L.G	S.F	S.G	argile				
étudié	2,01	1,5	46,19	49,25	0,05	8,5	0,09	0,017	2,52

CO: Carbone Organique (%)

P: Phosphore (%)

N : Azote total (%)

SG et SF : sables grossiers ($200 < d < 2000 \mu\text{m}$) et fins ($50 < d < 200 \mu\text{m}$)

LG et LF : limons grossiers ($20 < d < 50 \mu\text{m}$) et fins ($2 < d < 20 \mu\text{m}$)

Argile : $d < 2 \mu\text{m}$

L'analyse granulométrique (tableau III.14) montre que la fraction prépondérante est celle des sables; 46,19% de sable fin et 49,25% du sable grossier ; avec une fraction très faible en argile (0.05%), en limon fin (2,01%) et en limon grossier (1,5%). Selon le triangle textuel U.S.D.A, ce sol a une texture sableuse (Voir annexe VIII pour le triangle).

Ce sol présente une faible valeur en matière organique ainsi qu'en phosphore et en azote total.

III.6.1.2 Caractéristiques biologiques du sol :

Le dénombrement des souches autochtones du sol avant pollution confirme la présence de microorganismes. Le nombre de germes est de $2,8 \cdot 10^6 \text{ UFC.kg}^{-1}$ de sol.

III.6.2 Traitement du sol pollué par le phénanthrène dans un bioréacteur triphasique agité :

La pollution du sol par le phénanthrène à raison de 4g./kg de sol sec a été effectuée après solubilisation de ce dernier par le dichlorométhane en se référant aux travaux de **Woo et al.** (2004). Selon **Yu et al.** Le phénanthrène est resté en contact avec les particules du sol une nuit afin de favoriser l'adaptation des bactéries autochtones du sol au polluant.

Le traitement du sol pollué par le phénanthrène, est fait dans un bioréacteur agité, en utilisant un pourcentage de sol de 20% (selon **EPA** (2006), un pourcentage habituel du sol dans un bioréacteur est entre 10 et 30%). En référant aux travaux de **Woo et al.**, (2004), Les éléments nutritifs sont rajoutés au sol en utilisant le milieu minéral cité dans l'annexe I.

Les expériences ont été effectuées durant les mois de mai juin et juillet où la température était élevée, avec une légère différence des températures enregistrées chaque jour. La température au niveau du bioréacteur a été maintenue entre 35 et 37°C. L'agitation mécanique était de 600 tr.min⁻¹, et l'aération de 1,4 l.mn⁻¹.

Des prélèvements ont été effectués sur une période de 10 jours tant dans la phase solide que dans la phase liquide. Le suivi de l'efficacité du traitement a été réalisé en mesurant les teneurs en phénanthrène et en biomasse.

III.6.2.1 Adaptation de la souche SE8 sur le phénanthrène :

Pour l'essai du sol bioaugmenté on a procédé d'abord à une adaptation de la souche SE8 au phénanthrène.

Pour réaliser l'adaptation de la souche choisie (la souche SE8) sur le phénanthrène, nous avons effectué deux précultures successives. Elles sont effectuées dans des erlenmeyers de 1000 ml contenant 250 ml de milieu de culture, avec agitation magnétique et une incubation à une température de 37°C.

Selon **Labrecque** (2003), le temps d'adaptation dépend du produit à dégrader, de la composition du milieu et de la souche utilisée.

La première préculture est réalisée en utilisant comme polluant organique le phénol comme seule source de carbone vu qu'il est facilement dégradé par la souche SE8, la concentration du phénol étant de 500mg.l⁻¹. Cette concentration correspond à un taux maximum de croissance.

La première préculture sert d'inoculum, elle est rajoutée à raison de 5 % pour la seconde où le phénanthrène est utilisé comme seule source de carbone à une concentration de 50 mg.l⁻¹.

Des dénombrements ont été effectués pour les deux précultures jusqu'à l'obtention d'un nombre de germes supérieur à 10⁴ UFC.ml⁻¹. En effet, **Woo et al.** (2004) ont travaillé avec un inoculum de concentration finale de 4,2 10⁴ UFC.ml⁻¹.

Une fois ce seuil atteint, il est procédé à une centrifugation de la préculture. Le culot est récupéré et lavé à deux reprises avec de l'eau distillée stérile, chaque lavage étant suivi d'une centrifugation. Le culot ainsi lavé est remis en suspension dans 10ml d'eau distillée et constitue l'inoculum qui va être utilisé dans l'expérience du sol bioaugmenté.

Les résultats de dénombrement des deux précultures après trois jours d'adaptation sont présentés dans le tableau III.15

Tableau III.15 : Nombre de germes des deux précultures

	Nombre de germes (UFC.ml ⁻¹)
1 ^{ère} préculture (phénol)	1,19 10 ⁸
2 ^{ème} préculture (phénanthrène)	2,1 10 ⁴

Le nombre de germes est beaucoup plus important en présence de phénol comme seule source de carbone par rapport au phénanthrène. Ce qui indique que cette souche préfère le phénol en raison de sa structure chimique (un seul cycle benzénique).

III.6.2.2 Elimination du phénanthrène dans la phase liquide et la phase solide :

Les mesures des teneurs en phénanthrène ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre (UV/VIS) à une longueur d'onde égale à 245 nm comme le préconise **Smith et al.** (1997).

Touraud et al. (1998), considère que cette méthode permet une estimation quantitative et qualitative du phénanthrène présente dans un échantillon donné, mais recommande une analyse par HPLC pour des résultats plus significatifs.

Les résultats des rendements d'élimination du phénanthrène après 10 jours de traitement sont rapportés sur les figures III.9 pour la phase solide et III.10 pour la phase liquide.

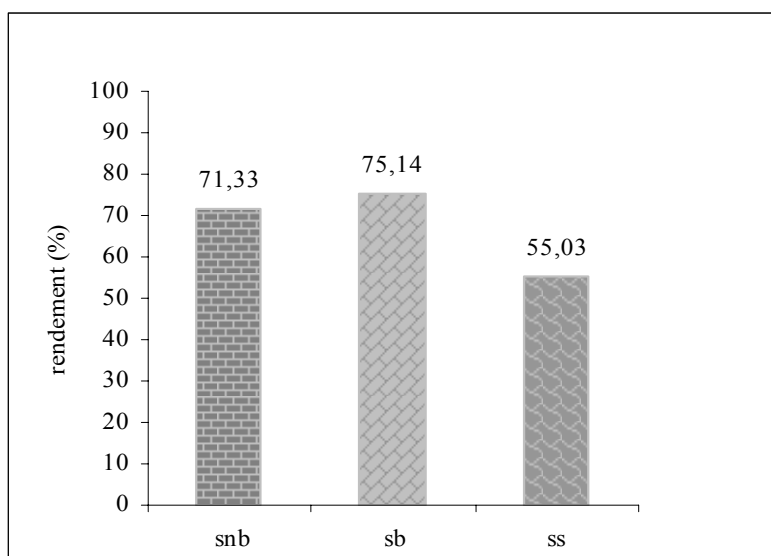


Figure III.9 : Rendement d'élimination du phénanthrène dans la phase solide à la fin du traitement

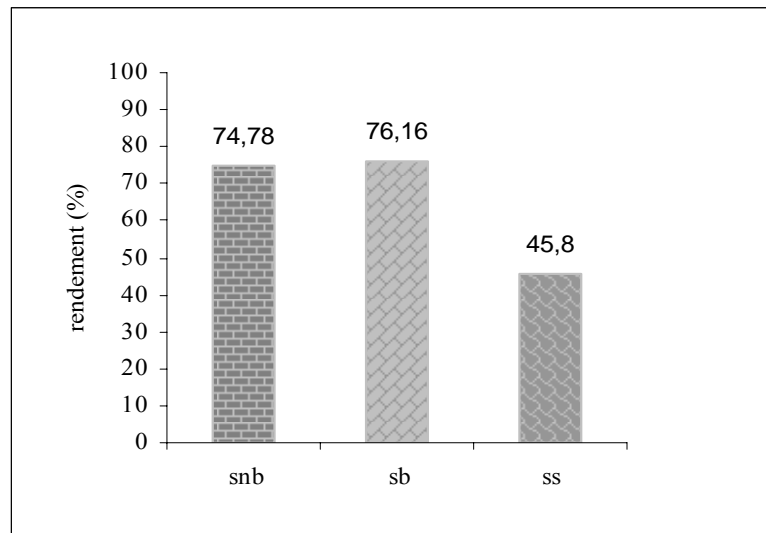


Figure III.10 : Rendement d'élimination du phénanthrène dans la phase liquide à la fin du traitement

- L'essai sur le sol stérile montre que les processus abiotiques d'élimination du phénanthrène sont très importants, de l'ordre de 55% pour la phase solide, et de 46% pour la phase liquide. La teneur en matière organique et en argile sont faible (tableau III.12) par conséquent, l'adsorption du phénanthrène sur les particules du sol est négligeable. Ceci laisse à supposer que seule la volatilisation est responsable de cette perte. **Kim et al.** (2001), considèrent que la volatilisation peut être un processus très important d'élimination du phénanthrène dans un bioréacteur, elle est d'autant plus importante lorsque l'activité biologique est faible en particulier dans la phase de latence ce qui est bien montré dans les figures III.11 et III.12 où nous constatons que ce soit dans la phase liquide ou la phase solide, la moitié de la concentration en phénanthrène est éliminée après trois jours de traitement. Dans les jours qui suivent, cette valeur reste inchangée.

Selon toujours **Kim et al.** (2001), la quantité du phénanthrène éliminée par volatilisation peut être très importante dans un réacteur muni d'un système d'aération et/ou d'un système d'agitation. Ce qui explique nos résultats.

- en comparant entre l'essai sol non bioaugmenté et l'essai stérile on remarque que seulement 16% du phénanthrène dans la phase solide et 29% dans la phase liquide sont éliminés par la microflore totale présente dans le milieu. Ces faibles taux d'élimination sont dus au fait que la microflore totale n'est pas adaptée au polluant. En effet une nuit est insuffisante pour une bonne adaptation au phénanthrène.

Selon **Blanchet et al.** (2005), le temps de contact de la microflore du sol avec le polluant est très important pour un bon rendement d'élimination ; pour dégrader un HAP de 3 à 4 cycles il faut au minimum un temps d'adaptation de deux jours.

- concernant l'essai bioaugmenté par rapport à l'essai non bioaugmenté on ne remarque presque pas de différence que ce soit dans la phase solide ou dans la phase liquide. En effet l'élimination du phénanthrène n'a augmenté que de 4% seulement dans la phase solide et de 2% dans la phase liquide. Ce qui explique que le taux de dégradation du phénanthrène n'est pas affecté par la présence de l'inoculum bactérien ajouté (souche SE8).

Selon Certains auteurs dont **Potin et al.** (2004) ; **Yu et al.** (2005), la bioaugmentation dans certains cas peut ne pas donner de bons résultats. Cela peut être due au fait :

- que la bactérie est encore dans la phase d'adaptation ; ce qui est bien montré d'après les résultats de dénombrement de la deuxième préculture; on est passé de 6.10^6 U.F.C/ml⁻¹ au premier jour à $2,1 \cdot 10^4$ U.F.C/ml⁻¹ après trois jours d'incubation. Pour de meilleurs résultats, il aurait fallu augmenter le temps d'incubation, ou alors augmenter le nombre d'adaptation de la bactérie au phénanthrène.
- La mort de la bactérie par effet toxique du polluant; une concentration de 4g.kg^{-1} du sol sec peut être toxique ou inhibitrice pour la souche SE8.

- Les figures III.11 et III.12 montre L'évolution du rendement d'élimination du phénanthrène dans la phase solide et la phase liquide respectivement. Les courbes mis en évidence une cinétique d'ordre un pour la phase liquide et d'ordre deux pour la phase solide .

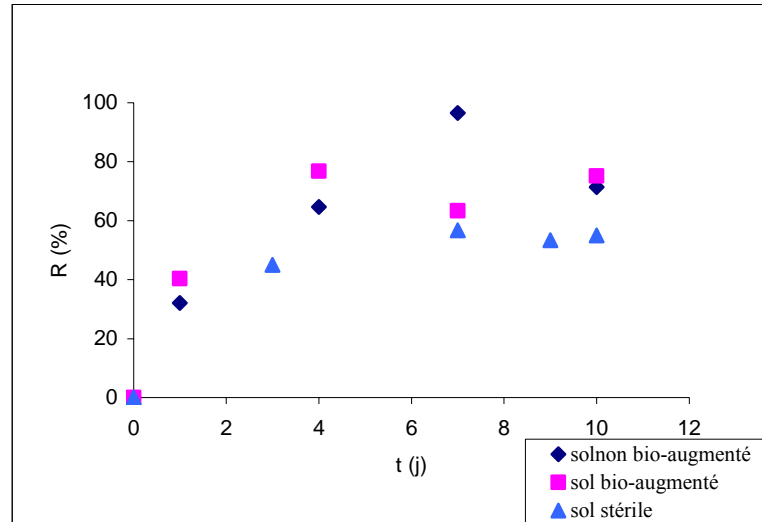


Figure III.11 : L'évolution du rendement d'élimination du phénanthrène dans la phase solide

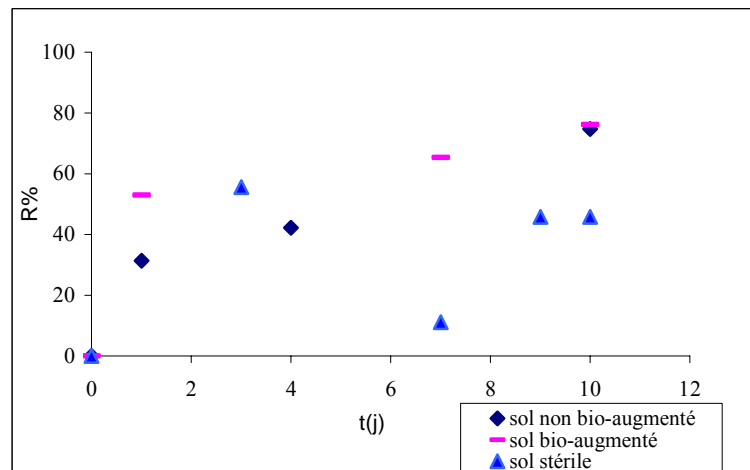


Figure III.12 : L'évolution du rendement d'élimination du phénanthrène dans la phase liquide

➤ Les figures III.13 et III.14 montrent, que ce soit dans la phase liquide ou dans la phase solide, la croissance bactérienne dans l'essai bioaugmenté est légèrement supérieure à celle de l'essai non bioaugmenté.

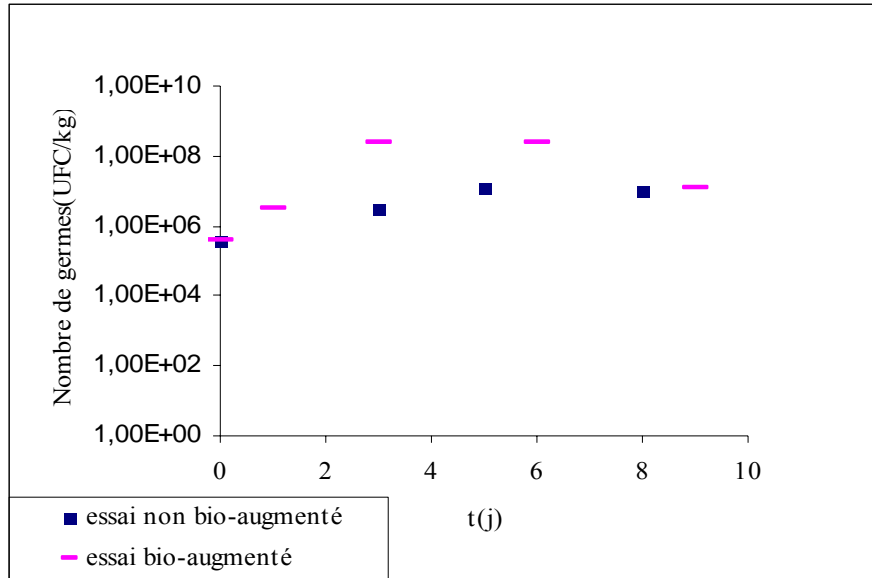


Figure III.13 : la croissance bactérienne dans la phase solide (essai sol non bio-augmenté, et sol bio-augmenté)

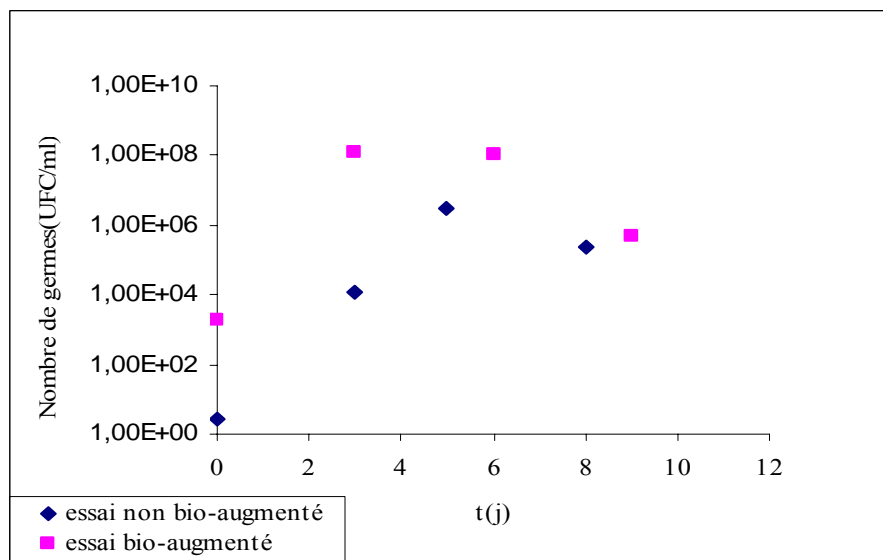


Figure III.14 : la croissance bactérienne dans la phase liquide (essai sol non bio-augmenté, et sol bio-augmenté)

D'après la figure III.14 qui montre la croissance bactérienne dans la phase liquide, on remarque que dans le premier jour il y a une différence dans le nombre de bactéries entre l'essai bioaugmenté et l'essai non bioaugmenté. Cette différence est due à l'ajout de l'inoculum bactérien.

Pour les deux jours suivant, on remarque une légère augmentation du nombre de bactéries dans l'essai bioaugmenté par rapport à l'essai non bioaugmenté ce qui correspond à la faible quantité du phénanthrène dégradée.

Dans la phase solide (figure III.13), on remarque une légère différence dans le nombre de bactéries dans l'essai bioaugmenté par rapport a l'essai non bioaugmenté.

Conclusion générale :

Conclusion générale

Notre étude consistait à isoler et à purifier des souches bactériennes à partir d'eaux polluées par les hydrocarbures, puis à étudier leurs activités de dégradation sur différents polluants organiques. Les bactéries les plus actives sélectionnées étaient utilisées dans des essais de bioaugmentation (traitement d'eau et de sol).

La première partie de notre travail a montré que :

- ✓ les eaux chargées en hydrocarbures ne sont pas favorables au développement des germes, à cause de la toxicité des polluants vis-à-vis des microorganismes.
- ✓ Une centaine de souches ont été isolées, purifiées et conservées ; 85 souches proviennent de Oued El Harrach et 5 souches de l'eau de bourbier.
- ✓ Cette étude a permis de sélectionner les souches les plus actives qui dégradent le phénol. Les résultats ont montré que parmi les 90 souches, 44 souches seulement sont capables de dégrader le phénol. Selon la durée d'apparition sur boîte Pétri, seulement 7 souches ont été récupérées après 2 jours d'incubation.
- ✓ Ces 7 souches ont été identifiées, les résultats obtenus montre la présence de quatre souches à Gram + dont trois bacilles appartenant au genre *Bacillus* ou *Actinobacter* et une souche en forme de coque appartenant au genre microcoque ; et trois autres souches à Gram- ; SE*7 et SE8 appartenant à l'espèce *Chrysobacterium meningosepticum* et la souche SE6 de *Aeromonas salmonicida*.

Par ailleurs, les résultats obtenus dans la deuxième partie de notre travail qui consistait en l'étude en culture pure de la dégradation du phénol par les sept souches les plus actives a montré que toutes les souches sont capables de dégrader le phénol avec des durées différentes. L'efficacité de ces souches dans la dégradation du phénol dépend très fortement de l'espèce bactérienne. Les meilleures activités étaient obtenues avec la souche SB6 parmi les Gram+ et la souche SE8 parmi les Gram-.

Afin de déterminer les concentrations que peuvent supporter les deux souches (SB6 et SE8) sans qu'il y ait inhibition, l'étude de la dégradation du phénol à différentes concentrations a montré que la souche SE8 (bacille, Gram-) est plus résistante que la souche SB6 (bacille, Gram+), la concentration maximale étant de 500 mg.l⁻¹ pour la souche SE8 et de 200 mg.l⁻¹ pour la souche SB6.

Aux faibles concentrations en phénol, la souche SB6 présente une meilleure activité de dégradation. En revanche, la souche SE8 montre une meilleure résistance aux concentrations élevées en polluant.

Afin de voir l'efficacité de la souche SE8 sur la dégradation d'un autre polluant aromatique qui se compose de trois cycles benzéniques (le phénanthrène), la troisième partie consistait en l'ajout d'un inoculum de la souche SE8 à un sol pollué (essai de bioaugmentation). Les résultats ont montré que la bioaugmentation dans notre cas n'a eu qu'une faible influence sur le processus biologique. En effet l'élimination du phénanthrène n'a augmenté que de 4% seulement dans la phase solide et de 2% dans la phase liquide. Ce qui explique que le taux de dégradation du phénanthrène n'est pas affecté par la présence de l'inoculum bactérien ajouté (souche SE8).

Pour des études ultérieures sur la dégradation du phénol ou d'autres polluants, on recommande de procéder à l'adaptation de la bactérie au polluant en plusieurs étapes et d'utiliser des cultures mixtes pour la dégradation des différents polluants.

Références bibliographiques :

Références

- Abd-El-Haleem D. , Beshay U., Abdelhamid A. O., Moawad H., Zaki S.; **Effects of mixed nitrogen sources on biodegradation of phenol by immobilized Acinetobacter sp. Strain W-17**; African Journal of Microbiology, vol.2, N° 1,(2003), pp 8-12.
- Abbondanzi F., campisi T., Focanti M., Gurra R., Iacondini A.; **Assessing degradation capability of aerobic indigenous-s microflora in PAH- contaminated brackish sediment**; Marine Environmental Research , 59, (2005),pp 419-434.
- Abu-salah K., Shelef G., Levanon D., Armon R., Dosoretz C.G.; **Microbial degradation of aromatic toxic compounds adsorbed on powdered activated carbon**; Journal of Biotechnology 51, (1996), pp 265-272.
- Afnor norme T90-204 ; **Essai des eaux : effluents aqueuse des raffineries de pétrole- dosage du phénol** ; Paris, (1986), pp 464-467.
- Ali O.; **Etude de l'influence des paramètres opératoires sur la dégradation du phénol par pseudomonas aeruginosa en fermenteur**; Mémoire de magister, ENP, 2005.
- Agnieszka M., Sylwia L.; **A comparison of biodegradation of phenol and homologous compounds by Pseudomonas vesicularis and staphylococcus sciuri Strains**; Acta Microbiologica Polonia, vol.51, N°4, (2002), pp 367-378.
- Amellal N., Portal J.M., Berthelin J.; **Effect of oil structure on the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons within aggregates of a contaminated soil**; Applied Geochemistry, 16, (2001), pp 1911-1916.
- Anders R.J, Lukas Y.w, Hauke H.; **Principals of microbial PAH degradation in sol**; Environmental Pollution, 133, (2005), pp 71-84,.
- Annweiler E., Richnow H. H., Antranikian G., Hebenbrock S., Grams C., Franke S., Franke W., Michaelis W.; **Nphthalene degradation and incorporation of Naphtalene-derived Carbon into biomasse by the thermophile Bcillus thermoleovrans**; Applied and Environmental Microbiology, vol.66, N° 2, (2000)pp 518-523.
- Armon R., Arbel T., **Indigenous soil microflora versus introduced micro-organisme in subsurface bioremediation**, springer, Germany, 1998.

-Arodi B-M. ; **Elimination des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques présents dans les Boues d'épuration par couplage ozonation-degestion anaérobie** ; Thèse de doctorat, université Montpellier II, 2005.

-Balba M.T., Al-Awadhi N., Al-Daher R.; **Bioremediation of oil contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation**; Journal of Microbiological Methods, 32, (1998), pp 155-164.

-Bandhyopadhyay K., Das D., Bhattacharyya P., Maiti B.R.; **Reaction engineering studies on biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* MTCC1194 immobilized on calcium alginate**; Biochemical Engineering Journal, 8, (2001), pp 179-186.

- Blanchet D., Benoit Y., Haeseler F.; **Trace analyses of hydrocarbons to understand the fate of these contaminants in aquifers**; Oil and Gas Science and Technology, vol.60, N°6, (2005), pp 913-922.

-Bliefert.C, Perraud R.; **Chimie de l'environnement (air, eau, sol, déchets)**; de boeck, 1^{ère} édition, Paris, 2004.

-Bréand.S ; **Etude biométrique de la réponse d'une population bactérienne à une variation défavorable de température ou de pH** ; Thèse de doctorat, université de Claude Bernard, Lyon, 1998.

-Chang B.V, Shinng L.C., Yuan S.Y.; **Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil**; Chemosphere, 48, (2002), pp 717-727.

- Colin.F ; **Pollution localisée des sols et sous sols par les hydrocarbures et par les solvants chlorés** ; TEC et DOC, 2000.

- Collins.L, Daugulis.A; **Biodegradation of Phenol at High Initial Concentrations in Two-Phase Partitioning Batch and Fed-Batch Bioreactors**; Biotechnology and Bioengineering, vol.55, N°1, (1997).

-Coulon F., Delille D.; **Effects of biostimulation on growth of indigenous bacteria in sub-Antarctic soil contaminated with oil hydrocarbons**; Oil and Gas Science and Technology, rev IFP, vol.58, N°4, (2003), pp 469-479.

-Costes J.-M et Druelle.V ; **Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement la réhabilitation des anciens sites industriels** ; rev IFP, vol.52, N° 4, pp 425-440, 1997.

-Delignette-Muller.M ; **Méthodes de prédiction des aptitudes de croissance des populations de micro-organismes**; Thèse de doctorat, Université de Claude Bernard, Lyon, 1995.

- Desjardin V.; **Réduction de chrome (VI) par la souche *Streptomyces thermocarboxydus* NH50 isolée à partir d'un sol pollué**; Thèse de doctorat, Lyon, France, 2002.

-Dictor M.C., Berne N., Mthieu O., Moussay A. and Saada A.; **Influence of ageing of polluted soils on bioavailability of phenanthrene**; Oil and Gas Science and Technology, vol.58, N°4, (2003), pp 481-488.

-Durate Dh Cunha C., Gomes Ferreira Leite S.; **Gasoline biodegradation in different soil microcosms**, Brazilian Journal of Microbiology; 31, (2000), pp 45-49,.

-Dutheil C.; **Dépollution des sols par extraction sous pression réduite: étude de quelques paramètres** ; Thèse de doctorat, Institut national des sciences appliquées, Lyon, 2003.

-Environmental Protection Agency (EPA), **In situ and ex situ biodegradation technologies for remediation of contaminated sites**, 2006.

-Feitkenhaur H., Hebenbrock S., Deppe U., Markl H., Antranikian G.; **Degradation of xenobiotics at elevated temperature**; Springer, Germany, 2001.

- Gabet S.; **Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique**; Thèse de doctorat, université de limoges, 2004

-Gonzalez G., Herrera G., Garcia M.t., Pena M.; **Biodegradation of phenolic industrial wastewater in a fluidised bed bioreactor with immobilized cells of *Pseudomonas putida***; Bioresource Technology, 80, (2001), pp 137-142.

-Gourdon R. ; **Aide à la définition des déchets dits biodégradable, fermentescibles, méthanisables** ; compostables (rapport final), INSA, LYON, 2002.

-Gourlay C.; **La biodisponibilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les écosystèmes aquatiques: influence de la matière organique naturelle et anthropique**; Thèse de doctorat, Ecole Nationale des Génie Rural des eaux et des forêts, Paris, 2004.

-Guiraud J., Galzy P. ; **L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires**; Edition de L'USINE, Paris, 1980.

-Guy Aubert ; **Méthodes d'analyse des sols** ; Centre Régional de Documentation Pédagogique de Marseille (CRDP MARSEILLE), 1978.

- Hao O.J., Kim M.H., Seagren E.A, Kim H.; **Kinetics of phenol and chlorophenol utilization by *Acinetobacter* species**; Chemosphere, 46, (2002), pp 797-807.

- Hinga K.R.; **Degradation rates of low molecular weight PAH correlate with sediment TOC in marine subtidal sediments**; Marine Pollution Bulletin, 64, (2003), pp 466-474.

- Il-Gyu L., Suk-Kyun H., You-Seak G., Tae-Young A.; **Phylogenetic Analysis of *Mycobacterium* sp. C2-3 Degrading Polycyclic Aromatic Hydrocarbons**; Journal of Microbiology, Vol.39, N°4, (2001), pp 326-330.
- INERIS; **Phénol**, fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, 2001
- Johansen A.R, Wick L.Y, Harms H; **Principales of microbial PAH-degradation in soil**; Environmental Pollution, 133, (2005), pp 71-84.
- Kim I.S., Park J.S., Kim k.w.; **Enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons using non ionic surfactants in soil slurry**; Applied Geochemistry, 16, (2001), pp 1419-1428.
- Koning M., Cohrs I., Stegmann R.; **Development and application of oxygen-controlled high pressure aeration system for treatment of TPH-contaminated soils in high biopiles**; Springer, Germany, 2001.
- Labrecque M-H. ; **Etude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène**; mémoire de maître en sciences, faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, université de Laval, 2003.
- Larpen J-P., Larpen-Gouraud M. ; **Mémento technique de microbiologie** ; Tec et Doc, Paris, 1975.
- Leclerc H. ; **Microbiologie générale** ; Doin, Paris 1986.
- Lecomte P; **Les sites pollués: traitement des sols et des eaux souterraines** ; 2^{ème} édition, Tec et Doc, 1998.
- Lefebvre G., **Chimie des hydrocarbures**, Technip, 1965.
- Lei L., Khododoust A.P., Suidan M.T., Tabak H.H. ; **Biodegradation of sediment-bound PAHs in field- contaminated sediment**; Water Research, vol.39, (2005), pp 349-361.
- Li L., Cunningham C.J., Pas V., Philp J.C., Barry D.A., Anderson P.; **Field trial of a new aeration system for enhancing biodegradation in a biopile**; Waste Management, 24, (2004), pp 127-137.
- Milieux et réactifs de laboratoire pasteur**, institut pasteur ; Edition avril, 1981.
- Morel R. ; **Les sols cultivés** ; Tec et Doc – lavoisier, 1989.
- Muller.R, Maho.B; **Bioaugmentation: advantage and problems using micro-organisms with special abilities in soil decontamination**; Springer, Germany, 2001.
- NF ISO 10390, **Qualité du sol: détermination du pH**, 1994.

- NF ISO 11261, **Qualité du sol: dosage de l'azote total, méthode de Kjeldale**, 1995.
- NF ISO 11263, **Qualité du sol: dosage du phosphore- dosage spectrométrique du phosphore soluble dans une solution d'hydrogencarbonate de sodium**, 1994.
- NF ISO 11464, **Qualité du sol : prétraitement des échantillons pour analyse physico-chimique**, 1994.
- Ojumu T.V., Bello O.O., Sonibare J.A., Solomon B. O.; **Evaluation of microbial systems for bioremediation of petroleum refinery effluents in Nigeria**; African Journal of Biotechnology, vol.4, N° 1, (2005), pp 31-35.
- Pakula A., Bieszkiewicz E., Boszczyk-Maleszak H., Mycielski R.; **Biodegradation of phenol by bacterial strains from petroleum refining wastewater purification plant**; Acta Microbiologica Polonia vol.48, N°4, (1999), pp 373-380.
- Pickard M.A., Roman R., Tinoco R., Vazquez-Duhalt R. ; **Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by White rot fungi and Oxidation by coriolopsis gallica UAMM 8260 laccase**; Applied and Environmental Microbiology, vol.65, N°9, (1999), pp 3805-3809.
- Potin O., Veignie E., Rafin C. ; **Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil**; FEMS Microbiology Ecology, 51,(2004), pp 71-78.
- Prenafeta-Boldu F.X., Ballerstedt H., Gerritse J., Grotenhuis J. T. G.; **Bioremediation of BTEX hydrocarbons: effect of soil inoculation with the toluene-growing fungus caldophialophora sp. Strain T1**; Earth and Environmental Science, vol.15, N°1, (2004), pp59-65.
- Prescott Lansing M., Harley John P., Klein Donald A.; **Microbiologie**, 2ème edition, de boeck, 2004
- Reardon K.F., Mosteller D.C., Rogers J.D.B.; **Biodegradation kinetics of benzene, toluene, and phenol as single and mixed substrates for pseudomonas putida F1**; Biotechnology and Bioengineering, vol.69, N°4, (2000).
- Reardon K.F., Mosteller D.C., Rogers J.D.B., Du Teau N.M., Kee-Hong K., **Biodegradation kinetics of Aromatic Hydrocarbon Mixtures by pure and mixed Bacterial Cultures**, Environmental Health Perspectives, vol.110, (2002).
- Roux E. ; **Les oléosine – de nouveaux émulsifiants d'origine végétale -comparaison des globules lipidiques extraites de végétaux (*A.thaliana*) et levures (*y.lipolytica*)**; Thèse de doctorat, l'Institut National Agronomique Paris-Grignon, 2003.
- Ruiz-Ordaz N., Ruiz-Lagunez J-C., Castanon-Gonzalez J-H., Hernandez-Manzano E., Cristiani-Urbina E., Galindez-Mayer J. ; **Phenol biodegradation using a repeated batch culture of**

Candida tropicalis in a Mulstage bubble column ; Revista Latinoamericana de Microbiologia 43,(2001), pp19-25.

-Sà C.S.A., Boaventura R.A.R.; **Biodegradation of phenol by Pseudomonas putida DSM 548 in a trickling reactor**; Biochemical Engineering Journal 9, (2001), pp 211-219.

-Sack U., Heinze T.M., Deck J., Rniglia C.C, Cazan M.C., Fritche w.; **Novel metabolites in phenanthrene and pyrene transformation by aspergillus niger**; Applied and Environmental Microbiology, vol.63, N°7, (1997), pp 2906-2909.

-Scriban R.; **Biotechnologie**; 5^{ème} édition, Tec et Doc, PARIS, 1999.

-Sheeja R.Y., Murugesan T.; **Mass transfer studies on the biodegradation of phenols in-up packed bed reactors**; Journal of Harazardous Materials, vol.89, (2002), pp 287-30.

-Smith M.J, Lethbridge. G, Burns R.G.; **Bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil**; FEMS Microbiology Letters, 152, (1997), pp 141-147.

-Solano-Serena F., Marchal R., Vandecasteele J.P. ; **Biodégradabilité de l'essence dans l'environnement : de l'évaluation global au cas des hydrocarbures récalcitrants** ; Oil and Gas Science and Technologie, vol.56, N°5, (2001), pp 479-498.

-Soltani M.; **Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone**; Thèse de doctorat, l'université Paris, 2004.

-Samanta S.K., Singh O.V., Jain R. K.; **Polycyclic aromatic hydrocarbons : environmental pollution and bioremediation** ; TRENDS in biotechnology, vol.20, N°6, (2002).

- Thi Thu S. T., Blaszczyk M., Przytocka-Jusiak M.; **Growth and phenol activity of Pseudomonas aeruginosa strain 101/1 in batch cultures**; Acta Microbiologica Polonia, vol.48, N°3, (2000), pp 297-306.

- Touraud E., Crone M., Thomas O.; **Rapid diagnosis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soils with the use of ultraviolet detection**; Field Analytical Cchemistry and Technologie, vol. 2, N°4, (1998), pp 221-229.

-Van Beilen J.B , Li Z., Duetz W.A., Smith T.H.M., Witholt B.; **Diversity of Alcane Hydroxylase Systems in the Environment**; Oil and Gas Science and Technology, vol.58, N°4, (2003), pp 427-440.

-Varillon.E, **Estimation des sols industriels pollués** ; Mémoire d'ingénieur E.S.G.T, Vienne, 2002.

-Vidali M.; Bioremediation. **An Overview**; Pure and Applied Chemistry, vol.73, N°7, (2001), pp 1163-1172.

-Wick L.K., Springael D., Harms H.; **Bacterial strategies to improve the bioavailability of hydrophobic organic pollutants**; Springer, Germany, 2001.

-Woo S.H., Lef M.W., Park J.M.; **Biodegradation of phénanthrène in soil slurry systems with different mass transfer regimes and soil contents**; Journal of biotechnology, 110, (2004), pp 235-250.

-Yang C. F., Lee C. M.; **Enrichment, isolation, and characterization of phenol degrading *Pseudomonas resinovorans* strain P-1 and *Brevibacillus sp.* strain P-6**; International Biodeterioration & Biodegradation, 2006.

-Yu S.H., Ke L., Wong Y.S., Tam N.F.Y.; **Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediment**; Environment International, 31, (2005), pp 149-154.

-Zerrouk F. ; **Biodégradation des hydrocarbures dans un sol agricole, effet sur la biomasse microbienne** ; Thèse de magister, INA, 2002.

ANNEXES

Annexe I

Milieux de cultures, réactifs et Matériels utilisés

I.1 Milieux de cultures :

- **Le bouillon nutritif (h-leclerc, 1986)** utilisé pour l'enrichissement, contient par litre :

Extrait de viande de bœuf.....	05g
Peptone tryptique.....	10g
Chlorure de sodium.....	05g
Eau distillée	01l
- **Le milieu salin minimum gélosé** :(Sheeja *et al*, 2002) est utilisé pour la sélection et la culture des souches dégradantes le phénol. le phénol est ajouté au milieu à raison de 100 mg.l⁻¹. le milieu contient par litre :

KH ₂ PO ₄	1,50g
K ₂ HPO ₄	0,50g
NH ₄ NO ₃	3,00g
MgSO ₄	0,50g
NaCl.....	0,50g
FeSO ₄	0,02g
CaCl ₂	0,02g
Agar.....	15,00g
- **L'eau physiologique** : utilisé pour la préparation des dilutions. contient par litre :

Chlorure de sodium.....	9g
-------------------------	----
- **Milieu PCA** : contient par litre :

Agar standard	25g
L'eau distillé.....	1l

Remarque :

- Tous Les milieux sont stérilisés à l'autoclave avant utilisation (121°C, 20 minutes).
- le phénol n'est pas stérilisé à l'autoclave, il est ajouté dans le milieu minimum après autoclavage par filtration stérilisante sur un filtre de 0,45µm.

I.2 Réactifs : Les produits utilisés pour le dosage du phénol sont :

- Solution 4-amino-antipyrine (ALDRICH) à 20g/l (flacon en verre teinté, bouchon, rôdé) la solution peut être conservée pendant plusieurs mois à l'abri de l'air et de l'humidité.
- Solution ferricyanure de potassium (MERCK) à 20g/l.
- Solution tampon: pH 9.5 de composition:
34g de NH_4Cl (MERCK) ;
200g tartrate double de Na et K (ANALAR TRADE MARK) ;
15ml d'ammoniac concentré ;
Compléter à 1l et ajuster le PH à 9,5 au PH-mètre avec NH_3 concentré (MERCK).

I.3 Matériels utilisés :

- Agitateur (FISHERBRAND 10511)
- PH mètre (HANNE INSTRUMENTS 211)
- Spectrophotomètre Uv-visible (JENWAY)
- Autoclave (WEBECO-GMPH BAD SCHWARTAU)
- Filtre stérilisant (0.45 μm) (MILLEX-HA)
- Etuve (MEMMERT UE-400)
- Centrifugeuse (MIKRO 22R HETTIH)
- Microscope (ZEISS 100-800)

Annexe II

Galerie API 20 E :

Techniques :

La suspension bactérienne est réalisée à partir d'une colonie (bien isolé sur milieu gélosé) et une eau saline (API NaCl 0.85% ou API suspension Medium).

Les principaux tests sont :

ONPG : Détermination de la présence de l'enzyme β -galactosidase

ADH : Transformation de l'arginine (acide aminé) par l'arginine dihydrolase

LDC : Transformation de la lysine (acide aminé) par la lysine décarboxylase

ODC : Transformation de l'ornithine (acide aminé) par l'ornithine décarboxylase

CIT : Utilisation du citrate comme seule source de carbone

H2S : Production du sulfure d'hydrogène (H₂S) à partir du thiosulfate (S₂O₃)

URE : Libération d'ammoniac à partir de l'urée grâce à l'uréase

TDA : Formation de l'acide indolepyruvique à partir du tryptophane (acide aminé) grâce à la tryptophane désaminase

IND : Formation d'indole à partir du tryptophane (acide aminé)

GEL : Liquéfaction de la gélatine (protéine)

GLU (glucose), MAN (mannitol), INO (inositol), SOR (sorbitol), RHA (rhamnose), SAC (saccharose), MEL (mélbiose), AMY (amygdaline), ARA (L+arabinose) : formation d'acide suite à l'utilisation de ces hydrates de carbones.

OX : Test oxydase

La galerie API 20E est inoculée avec une suspension bactérienne. Par l'utilisation d'une pipette pasteur :

- remplir les « tubes et cupules » des tests CIT, GEL.
- Pour les autres tests, remplir seulement les tubes.
- Créer une anaérobiose en remplissant les cupules des tests, ADH (arginine dihydrolase), LDC (lysine décarboxylase), ODC (ornithine décarboxylase), H₂S (sulfure d'hydrogène), URE (uréase) par l'huile de paraffine

Lecteur de la galerie :

Après incubation la lecture de la galerie doit se faire en se referant au tableau de lecture (tableau A.II.1).

Lire les réactions de la façon suivante :

- Faire la lecture des microtubes à L'exception de TDA (tryptophane désaminase) et IND (indole). Noter la couleur et la réaction (+ ou -) de chaque microtube.

- Pour les tests TDA, IND :

- TDA (tryptophane désaminase) - Ajouter une goutte de réactif TDA. Lire la réaction immédiatement.

- IND (indole) : Ajouter une goutte du réactif de James. Lire la réaction immédiatement.

Tableau A.II.1 : les résultats d'incubation de 18 à 24 pour galerie API 20E

Tubes	Réaction	
	Positive	Négative
ONPG	Jaune	Incolore
ADH	Rouge ou orange	Jaune
LDC	Rouge ou orange	Jaune
ODC	Rouge ou orange	Jaune
CIT	Bleu-vert/bleu	Vert pale ou jaune
H₂S	Dépôt noir	Aucun dépôt noir
URE	Rouge ou orange	Jaune
TDA	Marron rougeâtre	Jaune
IND	Rose	Incolore/ vert pale/ Jaune
GEL	Diffusion du pigment	Aucune diffusion du pigment
GLU MAN INO SOR RHA SAC MEL AMY ARA	Jaune	Bleu ou bleu vert

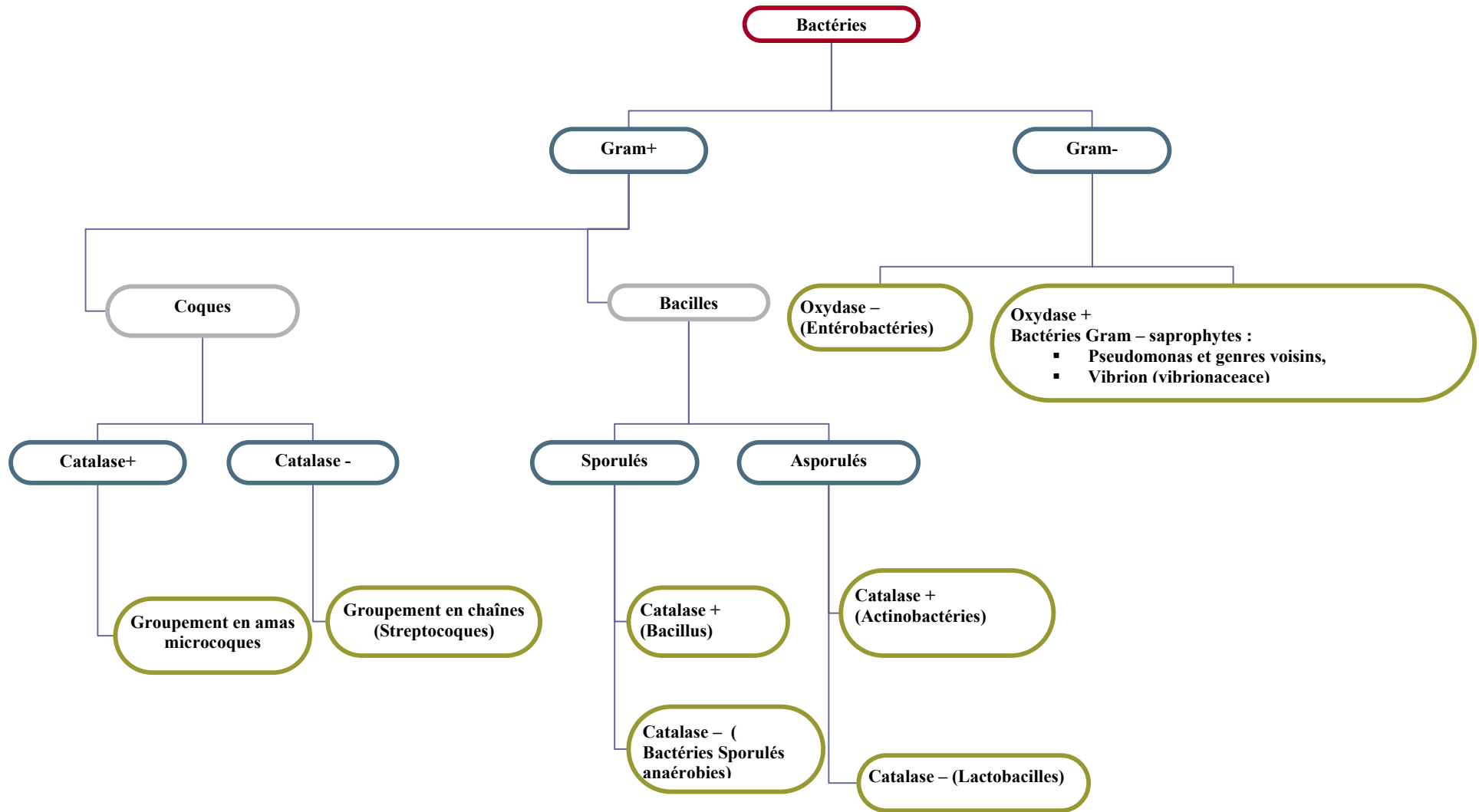


Figure A.II.1 : organigramme de la démarche suivie dans la préidentification

Annexe III

III.1 courbe d'étalonnage de la biomasse microbienne :

Technique :

- 200ml du milieu de culture bactérien est centrifugé puis lavé stérilement avec de l'eau distillée 3 fois,
- le culot est remis en suspension dans 60ml d'eau distillée,
- la DO est lue au spectrophotomètre à 600nm,
- 50 ml de cette suspension est séchée à 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant,

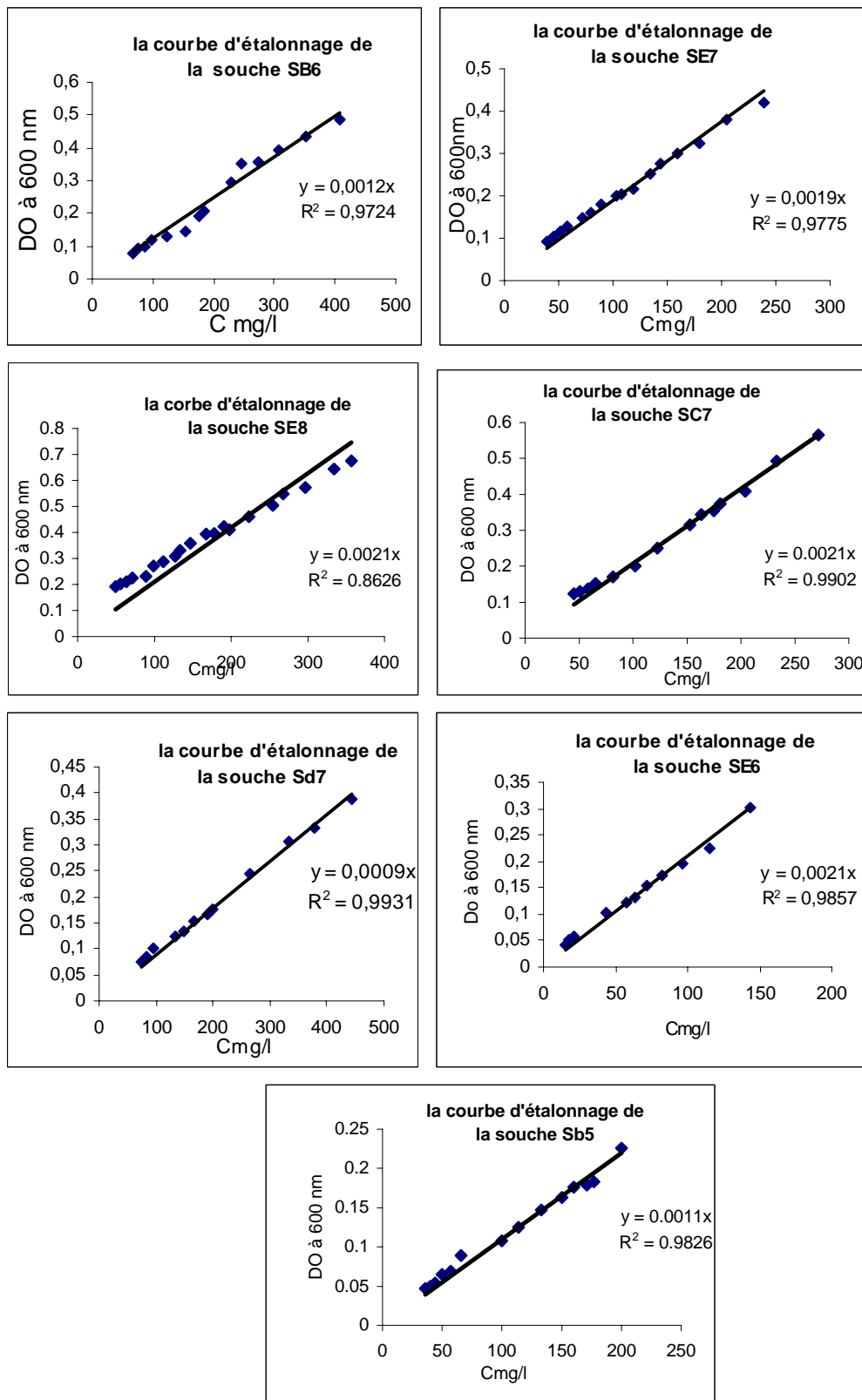
$$C_0 = (m - m_0)/50\text{ml}$$

Avec :

m : masse de la suspension après séchage

m₀ : masse de la suspension avant séchage

- le reste (10ml) est utilisé pour la préparation des dilutions. Pour chaque dilution, la prise de DO est effectuée à 600nm,
- les matières sèches correspondantes à chaque dilution sont établies à partir de C₀ en le divisant par le facteur de dilution
- la courbe des DO en fonction des concentrations est établie, elle est spécifique pour chaque bactérie. Il s'agit de droites dont les coefficients de corrélation sont situés entre 86% et 99% (figureA.III.1)



FigureA.III.1 : Les courbes d'étalonnages de la biomasse microbienne de chaque bactérie

III.2 courbe d'étalonnage du phénol :

Technique

- Préparer une solution de 1g/l de phénol.
- Préparer des dilutions, de manière à obtenir des solutions étalon contenant respectivement 0 - 0,5 - 1 - 1,5 - 5 mg.l⁻¹.
- Prélever 100ml de la solution de 4- amino-antipyrine ; mélanger le tout immédiatement.
- Ajouter 2ml de la solution de ferricyanure de potassium ; mélanger de nouveau.
- laisser reposer pendant 5 min pour permettre le développement de la coloration (à température ambiante).

La figure A.III.2 montre la courbe qui exprime la relation entre la DO à 510nm et la concentration en phénol (mg.l⁻¹).

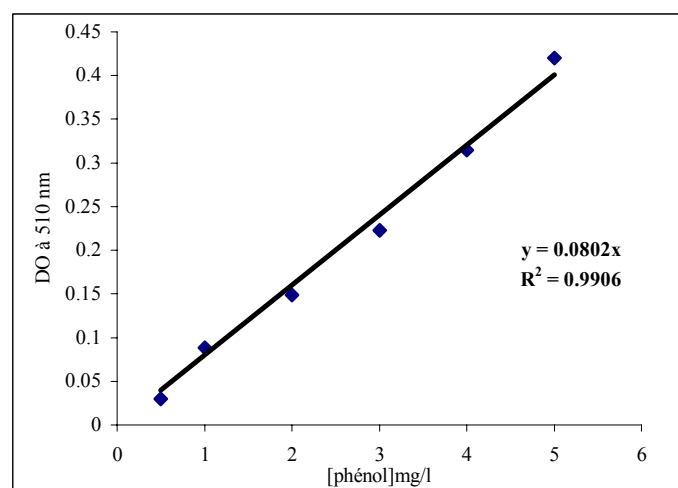


Figure A.III.2 : la courbe d'étalonnage du phénol

III.3 Méthode de Dosage du phénol:

- prélever un échantillon de 10ml à l'aide d'une pipette stérile, dans la zone stérile
- centrifuger l'échantillon (vitesse de 5770 tour .min⁻¹, durée 30minutes).
- filtrer l'échantillon à partir du surnageant, en utilisant une fiole jaugée de 100ml toute en tenant compte de la limite de détection du phénol de la méthode (5mg.l⁻¹).

- mettre les 100ml de la solution à doser dans un bêcher de 125ml, ajouter 5ml de la solution tampon afin d'ajuster le pH à 9,5.
- Ajouter 1ml de la solution 4 amino- antipyrine.
- Ajouter 2ml de la solution de ferricyanure de potassium.
- Nous laissons la coloration se développer à température ambiante pendant 5 min.

L'absorbance de la solution à 510nm est déterminée au spectrophotomètre, et par le biais de la courbe d'étalonnage la concentration en phénol est déterminée

III.4 La courbe d'étalonnage du phénanthrène : consiste à :

- Préparer une solution de 10mg/l de phénanthrène
- Préparer des dilutions, de manière à obtenir des solutions étalons contenant respectivement 0, 1, 1,5, 2, 2,5 et 3 mg/l.

La figureIII.3 montre la courbe qui exprime la relation entre la DO à 245nm et la concentration en phénanthrène (mg.l^{-1}).

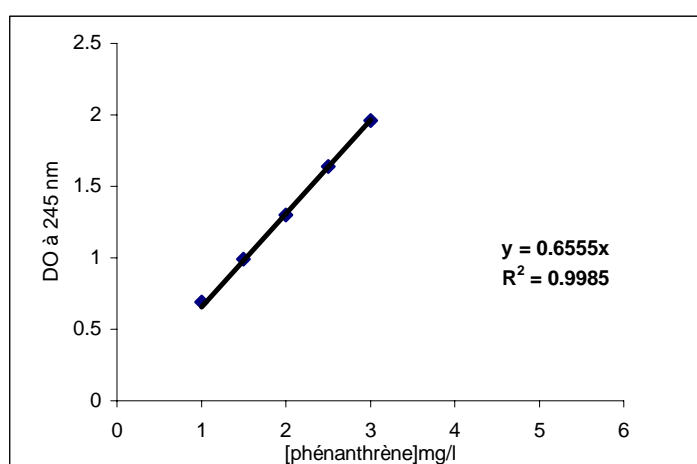
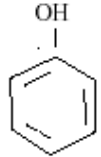
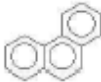


Figure A.III.3 : la courbe d'étalonnage du phénanthrène

Annexe IV

Tableau A.IV.1 : les propriétés physico-chimiques des deux polluants choisis dans notre étude (phénol et phénanthrène)

Composé	Formule semi développée	Formule brute	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Solubilité dans l'eau S _w (mg.L ⁻¹) (à 20 °C)	Coefficient de partage octanol/eau log K _{ow}	Point d'ébullition (°C) à pression normal	Pression de vapeur (Pa) (à 20 °C)
Phénol (INERIS, 2001)		C ₆ H ₆ O	94,11	83500	1,47	181,8	28,7
Phénanthrène (Gabet, 2004)		C ₁₄ H ₁₀	178,2	1,10	4,57	> à 300°C	0,113

Annexe V

Tableau A.V.1: Etude macroscopique des différentes colonies

S/C	FORME									COULEUR	ELEVATION		
	Ci	I	O	A	F	M	R	T	Co		P	CON	CEN
SA1	+									be	+		
SA2	+									=	+		
SA3	+									=	+		
SA4	+									=	+		
SA5	+									=	+		
SA6	+									=	+		
SA7	+									bl		+	
SA8	+									be	+		
SA9	+									=	+		
SA10	+									bl		+	
SB1	+									be	+		
SB2	+									bl	+		
SB3	+									=		+	
SB4	+									=	+		
SB5					+					be			+
SB6					+					=			+
SB7					+					=		+	
SB8*					+					=		+	
SB9					+					=	+		
SB10*		+								=		+	

Tableau A.V.I (suite) : Etude macroscopique des différentes colonies

S/C	FORME									COULEUR	ELEVATION		
	Ci	I	O	A	F	M	R	T	Co		P	CON	CEN
SC1					+					be		+	
SC2					+					=	+		
SC3					+					=			+
SC4	+									=		+	
SC5		+								=	+		
SC6		+								=	+		
SC7			+							=	+		
SC8	+									=		+	
SC9	+									be	+		
SC10		+								bl	+		

Tableau A.V.I (suite) : Etude macroscopique des différentes colonies

S/C	FORME								COULEUR	ELEVATION		
	Ci	I	O	A	F	M	R	T		Co	P	CON
SD1	+								=	+		
SD2					+				=		+	
SD3	+								=		+	
SD4	+								be		+	
SD5	+								=		+	
SD6	+								=		+	
SD7	+								=		+	
SD8	+								=		+	
SD9	+								=		+	
SD10*	+								=		+	
SE1	+								=		+	
SE2	+								=		+	
SE3*	+								=		+	
SE4	+								=		+	
SE5	+								=		+	
SE6					+				=			+
SE7*		+							=	+		
SE8		+							=	+		
SF2	+								bl	+		
SF3	+								be	+		
SF4	+								be	+		
SF5	+								bl	+		
SF6	+								=	+		
SF7					+				=	+		
SF8	+								=		+	
SF9	+								=	+		
SF10	+								=	+		

Tableau A.V.I (suite) : Etude macroscopique des différentes colonies

S/C	FORME								COULEUR	ELEVATION		
	Ci	I	O	A	F	M	R	T		Co	P	CON
SG1					+				bl	+		
SG2					+				=			+
SG3	+								=	+		
SG4		+							be	+		
SG5	+								=	+		
SG6	+								be	+		
SG8	+								bl	+		
SG9	+								=	+		
SH1	+								bl	+		
SH2		+							be		+	
SH3	+								=		+	
SH4	+								be	+		
SH5	+								bl	+		
SH6	+								=		+	
SH7	+								=	+		
SH8		+							=	+		
SH9	+								=	+		
SI1		+							=	+		
SI2	+								=	+		

Tableau A.V.I (suite) : Etude macroscopique des différentes colonies

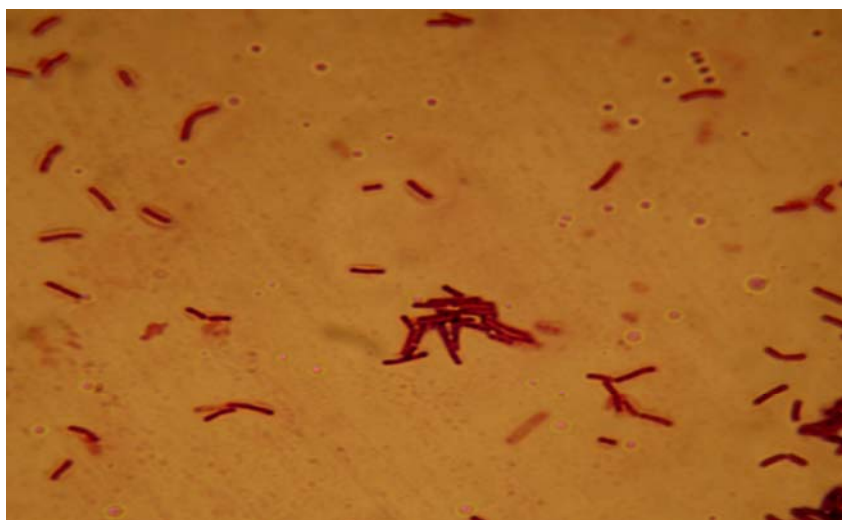
S/C	FORME								COLEUR	ELEVATION		
	Ci	I	O	A	F	M	R	T		Co	P	CON
SI3		+							be	+		
SI4	+								bl			+
SI5	+								=			+
SI6		+							bl		+	
SI7	+								be		+	
SI8	+								=			+
SI9	+								=			+
SI10	+								bl	+		
SJ1	+								=	+		
SJ2	+								=	+		
SJ3		+							=			+
SJ4	+								bl	+		
SJ5		+							=		+	
SJ6	+								=	+		
SJ7		+							be			+

* : Souche isolée de l'échantillon E1 (eau de boubier)

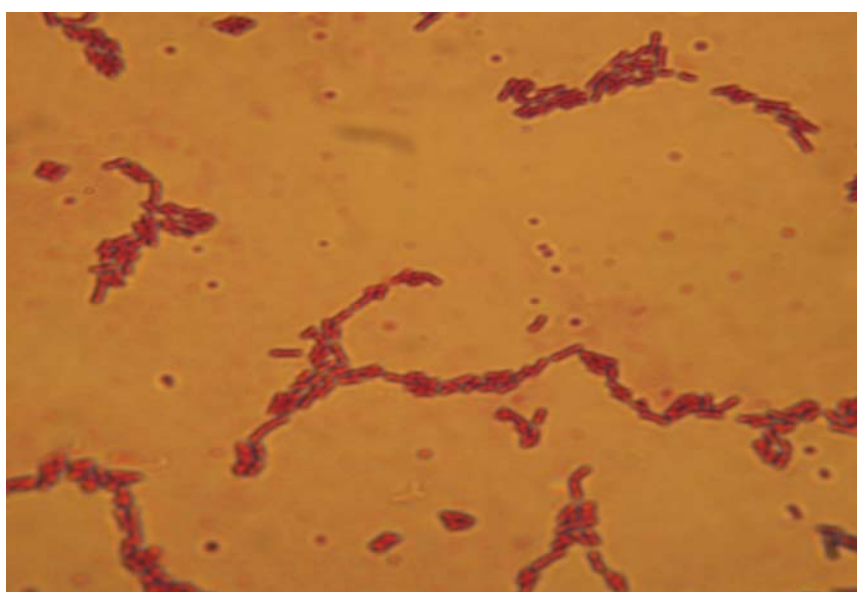
Tableau A.V.2 : La légende des éléments de description donnés par Larpent (1970).

Forme	C : circulaire I : irrégulier O : ondulé A : amiboïde F : filamenteuse M : myéloïde R : rhizoïde t : toruloïde
Couleur de la colonie	Co (be : beige ; bl : blanche)
Elévation	P : plate CON: convexe CEN: centré

Annexe VI



SB5



SC7

Figure A.VI.1: la forme des souches (SB5, SC7, SE7, SE8) bactériennes observée sous microscope photonique

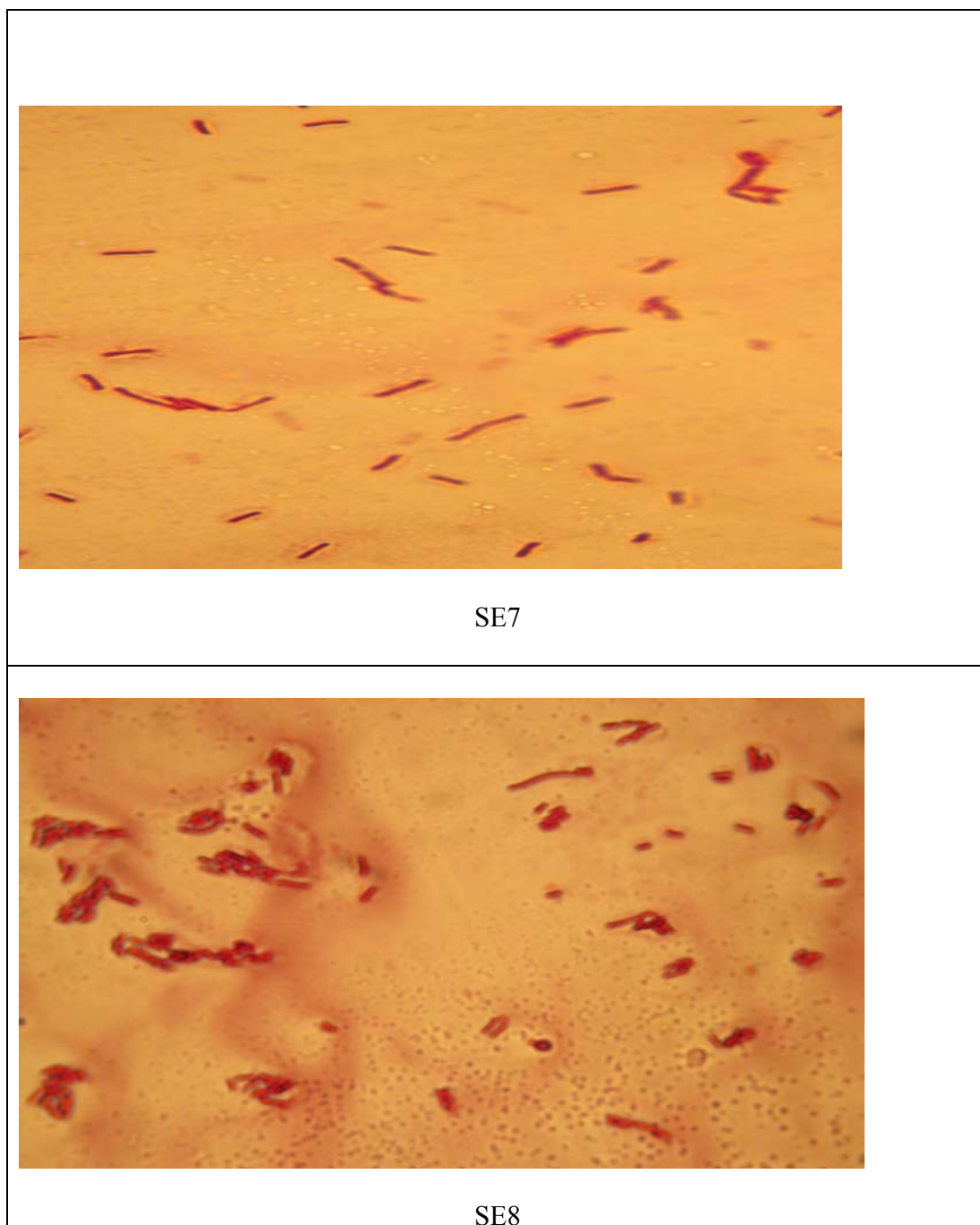


Figure A.VI.1: la forme des souches (SB5, SC7, SE7, SE8) bactériennes observée sous microscope photonique

Annexe VII

Tableau A.VII.1 : Les paramètres de croissances pour la souche Sb6

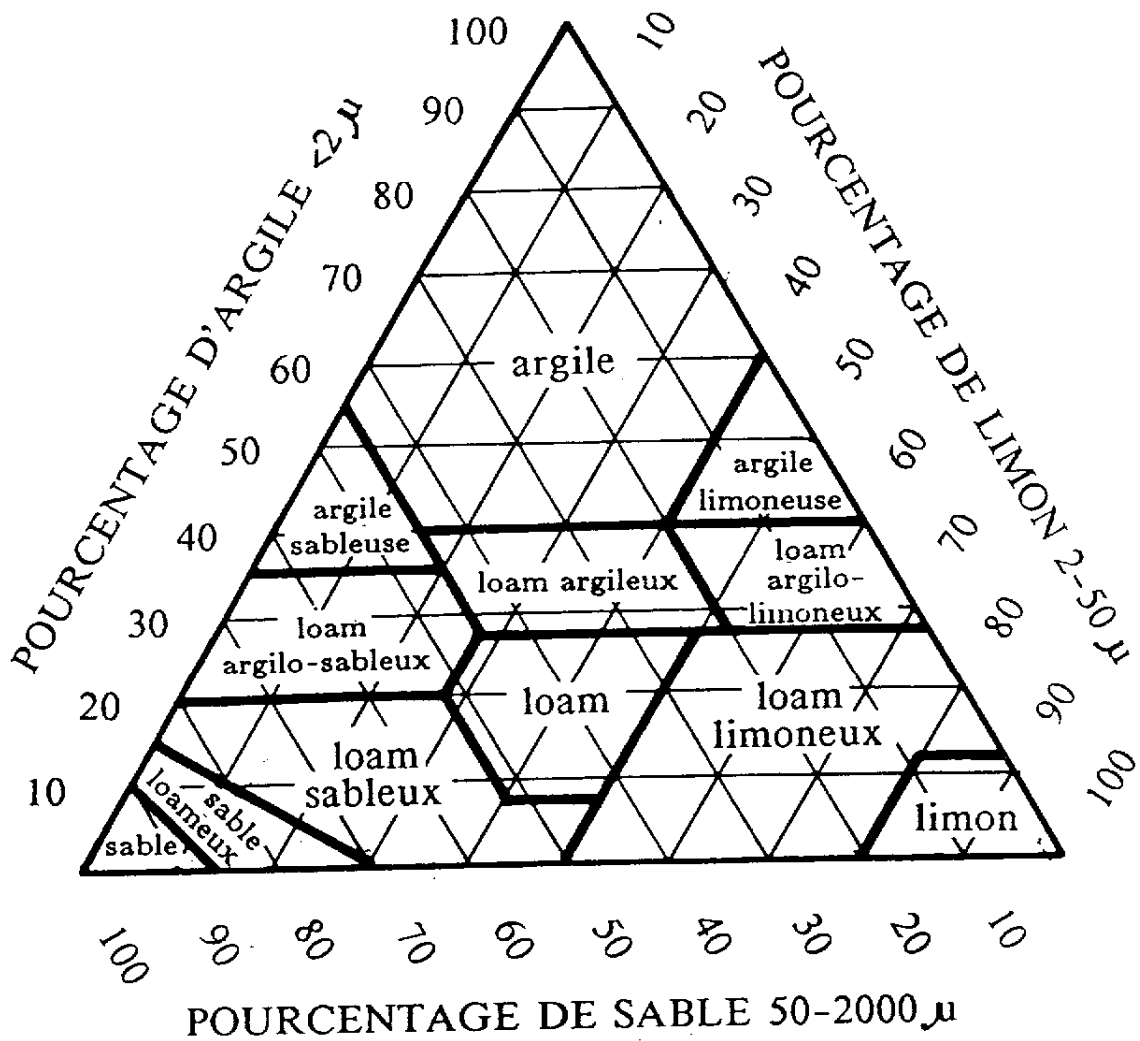
[phénol] mg/l	Equation de la phase exponentielle de la courbe de croissance	μ_{\max} (h⁻¹)
100	y=0,1103x+3,2352	0,1598
200	y=0,1472x+2,7891	0,2133
300	y=0,1278x+2,8242	0,1852
400	y=0,1054x+3,3007	0,1527
500	y=0,0825x+2,491	0,1195

Tableau A.VII.2 : Les paramètres de croissances pour la souche SE8

[phénol] mg/l	Equation de la phase exponentielle de la courbe de croissance	μ_{\max} (1/h)
100	y=0,0165x+4,1553	0,0239
300	y=0,0536x+2.5467	0,0777
500	y=0,0691x+2,4971	0,1
800	y=0,0207x+3,2779	0,029
1000	y=0,0113x+3,3331	0,016

Annexe VIII

Triangle Textural (U.S.D.A)



الملخص:

محتوى هذا البحث يتمثل في عزل و تنقية السلالات البكتيرية الموجودة في المياه الملوثة بالهيدروكربونات لأجل استعمالها في معالجة المياه أو التربة .
90 سلالة بكتيرية قمنا بعزلها و تنقيتها ، من بينها 44 سلالة بكتيرية استطاعت تحليل الفينول ، و منهم 7 أكثر نشاطا .
بينت دراسة الزراعة البكتيرية النقية لتحليل الفينول في محيط مائي باستعمال السبع بكتيريا، قدرتها على تحليل الفينول في فترات زمنية مختلفة .
البكتيريتين ذات الغرام الموجب (SB6) و الغرام السالب (SE8) أظهرتا الفعالية القسوة في تحليل الفينول في الماء فكانت مدة التحلل 22 سا و 43 سا على التوالي . البكتيريا ذات الغرام السالب (SE8) أظهرت المقاومة الكبرى تجاه الفينول.
معالجة التربة الملوثة بالفينوننتخان (Phénanthrène) المزودة بالبكتيريا ذات الغرام السالب (SE8) بينت لنا أن الزيادة البيولوجية لها أثر ضعيف على التحلل .

مفاتيح الكلمات : التحلل البيولوجي ، الفينول ، التربة ، المياه ، التزويد البيولوجي ، البكتيريا

Résumé :

Le présent travail a porté sur la purification des souches bactériennes isolées des eaux polluées par les hydrocarbures en vue de leur adaptation pour les traitements des eaux et des sols.

90 souches ont été isolées et purifiées. Seuls 44 souches présentent la capacité de dégrader le phénol, dont sept se sont révélées comment étant les plus actives.

L'étude en culture pure de la dégradation du phénol en milieu aqueux par les sept souches a montré leur capacité à dégrader ce polluant avec des durées différentes.

Deux souches Gram+ (SB6) et Gram- (SE8) se sont montrées les plus performantes, pour la dégradation du phénol dans l'eau, avec une durée de dégradation de 22 heures et de 43 heures respectivement. La souche (SE8) présente la plus grande résistance au phénol.

Le traitement du sol pollué par le phénanthrène inoculé par la souche SE8 a indiqué que la bioaugmentation présente un faible effet sur la dégradation.

Mots clés :

Biodegradation, phénol, sol, eau, bioaugmentation, souches bactériennes.

Abstract:

This study consists on the purification of strains isolated from hydrocarbon- contaminated water, in order to treat water and soil.

90 strains were isolated and purified. 44 strains from these last are able to degrade phenol, among them (these 44 strains), seven appeared the most active.

The study in pure culture of the degradation of phenol in aqueous medium by the seven strains showed their capacity to degrade this pollutant with different durations.

Two strains Gram+ (SB6) and Gram- (SE8) were shown most powerful, for the degradation of phenol in water, with the duration of 22h and 43h respectively. The strain SE8 presents the greatest resistance to phenol.

The treatment of soil polluted with phenanthrene and inoculated with the strain SE8 indicated that the bioaugmentation presents a weak effect on degradation.

Keywords: Biodegradation, phenol, soil, water, bioaugmentation, strains