

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou**  
**Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques**  
**Département de Biochimie-Microbiologie**



## **Mémoire de fin d'études**

**Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologies**  
**Spécialité : Biotechnologie Microbienne**

### **Thème**

**Isolement et sélection des micro-organismes ayant des aptitudes à dégrader des composés polluants aromatiques.**

**Réalisé par: Mme HENNA Lamia**

**Mme KEMMAT Djouhra**

**Soutenu le 12/07/2023 devant le jury composé de:**

<b>Président:</b>	<b>Mr BOUACEM K.</b>	<b>MCA-UMMTO</b>
<b>Promotrice:</b>	<b>Mme DERMECHE S.</b>	<b>MCB-UMMTO</b>
<b>Examinatrice:</b>	<b>Mme BOUGUENOUN I.</b>	<b>MCB-UMMTO</b>

**Année universitaire 2022/2023**

# Remerciement

Nous tenons à remercier tout d'abord le Dieu le tout puissant de nous avoir donné courage, force et la patience afin d'accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance à notre promotrice **Mme. DERMECHE Samia**, Docteur Enseignante Chercheuse à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, nous la remercions de nous avoir encadrées, orientées, aidées et conseillées.

Nous adressons notre sincère remerciement à notre encadreur de stage, **Mr. BADJOU Mahdi**, chef de département TCF au Centre de Recherche et de Développement (CRD) Sonatrach. Ainsi qu'à toute l'équipe du laboratoire environnement et corrosion bactérienne.

Nous tenons à remercier les membres de jury : **Dr. BOUACEM** et **Dr. BOUGUENOUN**, qui nous ont honoré par leur présence afin d'examiner notre travail.

Nous remercions toute personne qui a contribué afin de finaliser ce travail.

## *Dédicaces*

J'ai le grand plaisir de Dédier ce modeste travail à ma très chère mère, qui n'a jamais cessé de  
prier pour moi

À mon très cher père pour ses encouragements son soutien et son sacrifice pour que rien ne  
n'entrave le déroulement de mes études

À mon frère Arezki, source d'espoir et de motivation à qui je souhaite toute la réussite

À mes très chers amis tout particulièrement Liza, Safia, Mounir, Katia, Takfarinas, kamelia...

À mon binôme djouhra, pour son énergie positive, sa compréhension, et sa gentillesse

À toute ma famille

À vous chers lecteurs

*LAMIA*

## *Dédicaces*

Dieu merci de m'avoir donné le courage et la patience et m'a ouvert les portes pour réaliser ce travail.

**Je dédie ce modeste travail :**

**À**

La mémoire de mon cher père,

Puisse dieu le tout puissant l'accueille dans son vaste Paradis.

Mon cher père qui m'avait donné des conseils et m'a toujours encouragé à poursuivre mes études.

Ma mère, pour tous ses sacrifices, et ses prières tout au long de mes études.

Mes chers frères, AHMED, LOUNES, MOHAND, HOUCINE, SAID, qui m'ont toujours motivé depuis toujours.

Mes belles sœurs « WASSILA et MELISSA ».

Tous mes amis chacun avec son nom.

Mon binôme, la plus adorable et très compréhensive LAMIA, d'avoir partagé tous ces moments inoubliables lors de la réalisation de ce projet.

À toute ma famille.

À vous...

**DJOUHRA**

## Table des matières

**Remerciement**

**Dédicace**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Liste des abréviations**

**Introduction ..... 1**

### Synthèse bibliographique

#### **I. Pollution des sols par les hydrocarbures**

1. Le Sol .....	3
1.1. Définition .....	3
1.2. Activités microbiennes dans le sol .....	3
2. Les hydrocarbures .....	3
2.1. Utilisation des hydrocarbures .....	4
2.2. Classes des hydrocarbures .....	4
2.2.1. Hydrocarbures aliphatiques .....	4
2.2.2. Hydrocarbures aromatiques .....	4
2.2.2.1. Hydrocarbures aromatiques monocycliques .....	4
2.2.2.2. Hydrocarbures aromatiques polycycliques .....	5
2.3. Le phénol .....	5
2.4. Danger et toxicité du phénol .....	6
2.5. Devenir des hydrocarbures aromatiques monocycliques dans le sol .....	6
2.6. Toxicité des hydrocarbures aromatiques monocycliques .....	7
2.7. Impact sur l'environnement .....	7
3. Les margines .....	8
3.1. Composition des margines .....	8
3.2. Pouvoir polluant des margines .....	9

## **II. Biodégradation des hydrocarbures aromatiques**

1. La biodégradation.....	11
2. Principe de la biodégradation des hydrocarbures.....	11
3. Mécanismes de la biodégradation des hydrocarbures .....	11
3.1. Biodégradation aérobie .....	12
3.2. Biodégradation anaérobie.....	12
4. Microorganismes dégradants les hydrocarbures .....	12
5. Facteurs influençant la biodégradation des hydrocarbures .....	13
5.1. Facteurs liée aux hydrocarbures aromatiques .....	13
5.1.1. Concentration en hydrocarbures.....	13
5.1.2. Propriétés physicochimiques des hydrocarbures.....	13
5.2. Facteurs liée aux micro-organismes .....	13
5.2.1. Souches bactériennes impliquées .....	13
5.2.2. Concentration en microorganismes .....	13
5.3. Facteurs liée aux conditions de développements .....	14
5.3.1. La température.....	14
5.3.2. L'oxygène.....	14
5.3.3. Le potentiel en hydrogène .....	14
5.3.4. Les éléments nutritifs .....	14

## **Partie expérimentale**

### **I. Matériel et Méthodes**

1. Présentation .....	16
2. Matériel.....	16
2.1. Matériel biologique .....	16
2.2. Matériel non biologique .....	16
3.Méthodes .....	17
3.1. Isolement et sélection de souches tolérants le polluant aromatique : le phénol.....	17
3.1.1-Echantillonnage.....	17
3.1.2. Technique d'isolement par enrichissement sélectif .....	18
3.1.3. Purification des souches isolées .....	21
3.2. Identification des souches .....	21

3.2.1. Aspect macroscopique.....	21
3.2.2. Aspect microscopique .....	21
3.3. Test de biodégradation d'un polluant aromatique : le phénol.....	22
3.4. Biotraitement d'un effluent industriel : les margines .....	23
3.4.1. Quelques paramètres des margines utilisées .....	23
3.4.1.1. Demande chimique en oxygène .....	23
3.4.1.2. Potentiel hydrogène.....	24
3.4.1.3. Conductivité .....	24
3.4.1.4. Matière sèche.....	24
3.5. Sélection de souches tolérants les margines.....	25

## **II. Résultats et discussions**

1. Isolement de microorganismes capables de dégrader le phénol et les margines.....	26
1. 1. Aspect macroscopique.....	28
1.2. Aspect microscopique .....	32
2. Résultat des essais de biodégradation du phénol.....	38
3. Caractérisations des margines utilisées .....	44
3. 1. Potentiel Hydrogène .....	45
3.2. Conductivité .....	45
3.3. Demande chimique en oxygène .....	46
3.4. Matière sèche.....	47
3.5. Taux d'humidité.....	47
4. Test de croissance des isolats sur gélose supplémentée de margines brutes.....	47
Conclusion.....	49

## **Références bibliographiques**

### **Résumé**

### **Abstract**

## Liste des figures

<b>Figure 01:</b> Structure de quelques hydrocarbures aromatiques polycycliques abondants dans l'environnement.....	05
<b>Figure 02:</b> Structure du noyau phénol.....	06
<b>Figure 03:</b> Localisation géographique des régions de récolte des échantillons de sol sur la carte de la wilaya de Tizi-Ouzou.....	18
<b>Figure 04:</b> Diagramme récapitulatif des échantillons et cultures utilisés lors de travail expérimental.....	20
<b>Figure 05:</b> Etape d'introduction des lames dans l'appareil PREVI Color Gram.....	22
<b>Figure 06:</b> Répartition des isolats selon leur nature et leur milieu d'isolement.....	26
<b>Figure 07:</b> Schéma récapitulatif de la répartition des souches isolées de chaque échantillon.....	27
<b>Figure 08:</b> Répartition des souches microbiennes après coloration de Gram.....	32
<b>Figure 09:</b> Cinétique de biodégradation du phénol par les souches bactériennes isolées à partir de l'échantillon pollué par les hydrocarbures.....	42
<b>Figure 10:</b> Cinétique de biodégradation du phénol par les souches fongiques isolées à partir de l'échantillon pollué par les hydrocarbures.....	43
<b>Figure 11:</b> Cinétique de biodégradation du phénol par les souches bactériennes isolées à partir de l'échantillon pollué par les margines.....	43
<b>Figure 12:</b> Cinétique de biodégradation du phénol par les souches fongiques isolées à partir de l'échantillon pollué par les margines.....	44
<b>Figure 13:</b> Développement des souches SH18, SM19, SM20, SM21, SM22, SM23, SM24 et SM25 sur gélose nutritive additionnée de margines.....	48

## Liste des tableaux

<b>Tableau I:</b> Composition des margines .....	9
<b>Tableau II:</b> Quelques microorganismes responsables de la biodégradation des hydrocarbures .....	12
<b>Tableau III:</b> Quelques exemples de travaux récemment réalisés sur la biodégradation du phénol .....	15
<b>Tableau IV:</b> Différentes caractéristiques macroscopiques des souches incubées à 37° après 24h .....	28
<b>Tableau V:</b> Aspect macroscopique des souches incubées à 28°C après 48h .....	31
<b>Tableau VI:</b> Résultats de l'observation microscopique des dix-sept souches isolées à l'état frais et après fixation et coloration de Gram .....	33
<b>Tableau VII:</b> Résultats de l'observation microscopique des huit souches isolées à l'état frais et après fixation et coloration de Gram .....	37
<b>Tableau VIII:</b> Densités optiques enregistrées pour l'ensemble des souches après culture en présence du phénol comme seule source de carbone .....	41
<b>Tableau IX:</b> Quelques paramètres caractérisant les margines brutes et diluées .....	44

## Liste des abréviations

<b>HC:</b>	Hydrocarbure
<b>HAP:</b>	Hydrocarbure aromatique polycyclique.
<b>HAM:</b>	Hydrocarbure aromatique monocyclique.
<b>DCO:</b>	Demande chimique en oxygène.
<b>DO:</b>	Densité Optique
<b>GN:</b>	Gélose Nutritive
<b>MB:</b>	Marges brutes
<b>Md:</b>	Marges diluées
<b>ECBU:</b>	Examen cyto bactériologique des urines
<b>S:</b>	Souche
<b>EH:</b>	Echantillon 1 pollué par les hydrocarbures
<b>EM:</b>	Echantillon 2 pollué par des marges
<b>EH-P:</b>	Echantillon 1+Phénol+Milieu MM
<b>EH-M:</b>	Echantillon1+Marges+Milieu MM
<b>EM-P:</b>	Echantillon2+Phénol+Milieu MM
<b>EM-M:</b>	Echantillon2+Marges+Milieu MM
<b>SH:</b>	Souches isolées à partir du sol pollué par les hydrocarbures
<b>SM:</b>	Souches isolées à partir du sol pollué par des marges

# **Introduction**

Les hydrocarbures aromatiques sont des composés organiques essentiels qui jouent un rôle vital dans notre société moderne. Ils constituent les principales sources d'énergie et de matières premières pour de nombreuses industries, ainsi que des combustibles indispensables dans notre vie quotidienne. Cependant, leur utilisation massive est l'élimination inadéquate des produits pétroliers ont engendré d'importants problèmes environnementaux. Par ailleurs, plusieurs types de produits et d'effluents industriels sont composés de polluants aromatiques notamment ceux des industries chimiques et oléicoles : les margines. Ces effluents peuvent avoir un impact négatif lorsqu'ils sont rejetés dans la nature sans aucun traitement préalable.

L'un des défis majeurs posés par l'exploitation et l'utilisation des hydrocarbures réside dans leur impact sur les écosystèmes. Les résidus d'hydrocarbures, provenant de fuites, d'émissions accidentelles ou de déchets industriels, peuvent contaminer les sols, les eaux souterraines, les rivières, les océans et même l'air. Cette pollution présente des risques considérables pour la biodiversité, la santé humaine et les activités économiques. Heureusement, la nature elle-même possède une capacité étonnante à dégrader les hydrocarbures grâce à des micro-organismes spécifiques, tels que les bactéries, les champignons, les levures et les moisissures. La biodégradation, processus naturel de dégradation des composés organiques par les organismes vivants, est une solution prometteuse pour atténuer les impacts environnementaux causés par les hydrocarbures et plus particulièrement les composés aromatiques. L'objectif de cette étude est d'isoler à partir de deux types de sols pollués, l'un étant contaminé par les hydrocarbures et l'autre par les margines, et de sélectionner des microorganismes fongiques et des bactéries ayant la capacité de dégrader des polluants aromatiques.

La première partie du présent manuscrit, les différents aspects de la biodégradation des hydrocarbures ont été abordés, en mettant l'accent sur les mécanismes impliqués, les facteurs qui influent sur l'efficacité de la dégradation et les applications potentielles de cette technologie. Les défis et les opportunités liés à l'utilisation des micro-organismes dans la biorestauration des sites contaminés par des hydrocarbures ont été également explorés. Dans ce contexte cette partie est organisée en deux chapitres :

- le premier décrit des données relatives sur la pollution des sols par les hydrocarbures ;
- le deuxième est consacré à la biodégradation des sols pollués par les hydrocarbures aromatiques.

La deuxième partie porte sur le travail expérimental, des microorganismes ayant la capacité de dégrader des polluants aromatiques ont été isolés. Cette section est scindée en deux parties :

1. La première regroupe les méthodes et matériel utilisés.
2. La seconde rassemble les résultats et leur discussion

Enfin, pour clôturer le manuscrit se termine par une conclusion générale.

# **Synthèse bibliographique**

### **I. Pollution des sols par les hydrocarbures**

#### **1. Le Sol**

##### **1.1. Définition**

Le sol est une ressource naturelle vitale et complexe, formée par un mélange de minéraux, de matière organique, d'eau, d'air et d'organismes vivants. Il constitue la couche supérieure de la croûte terrestre où les processus biologiques, physiques et chimiques interagissent en permanence (Barles *et al.*, 1999). Le sol joue un rôle crucial dans le maintien de la biodiversité, la production alimentaire, la régulation des cycles biogéochimiques (Walter *et al.*, 2015).

De plus, le sol abrite une vaste communauté de microorganismes qui jouent un rôle fondamental dans de nombreux processus, y compris la biodégradation des hydrocarbures (Brady et Weil., 2008)

##### **1.2. Activité microbienne dans le sol**

L'activité microbienne dans le sol joue un rôle essentiel dans divers processus écologiques et agronomiques. Les microorganismes, tels que les bactéries, les champignons et les actinomycètes, interagissent avec les composants du sol, tels que la matière organique, les minéraux et les racines des plantes. Ils influencent ainsi la décomposition de la matière organique, la transformation des nutriments, la fixation de l'azote et la suppression des pathogènes. Ces interactions microbiennes sont intimement liées à la fertilité du sol et à la productivité des écosystèmes terrestres (Anderson *et al.*, 2019).

#### **2. Les hydrocarbures**

Les hydrocarbures sont des composés ubiquistes, constitués uniquement d'atomes de carbone (C) et de l'hydrogène (H). Ils contiennent tous des chaînes carbonées auxquelles sont attachés des atomes H. La plupart des hydrocarbures sont inflammables (Kuppusamyet *al.*, 2020).

Ils peuvent être classés en deux catégories principales : les hydrocarbures saturés (alcane) qui ne contiennent que des liaisons simples entre les atomes de carbone, et les hydrocarbures insaturés (alcènes, alcynes et composés aromatiques) qui contiennent au moins une double ou triple liaison entre les atomes de carbone. Les hydrocarbures peuvent exister

sous forme de gaz, de liquide ou de solide, en fonction du nombre d'atomes de carbone et des conditions de température et de pression (Kuppusamy et al., 2020).

### **2.1. Utilisations des hydrocarbures**

### **2.2. Classes des hydrocarbures**

Les hydrocarbures revêtent une importance capitale dans divers domaines d'application. Ils sont principalement utilisés comme carburants et combustibles, jouant un rôle essentiel dans la production d'huiles lubrifiantes. De plus, son constituant la matière première incontournable pour les synthèses pétrochimiques. Une particularité fondamentale des hydrocarbures est leur utilisation en tant que source de carbone pour la culture des microorganismes, se distinguant ainsi des sucres par leur absence d'oxygène (Adrian, 1974 ; Lefebvre, 1986).

#### **2.2.1. Hydrocarbures aliphatiques**

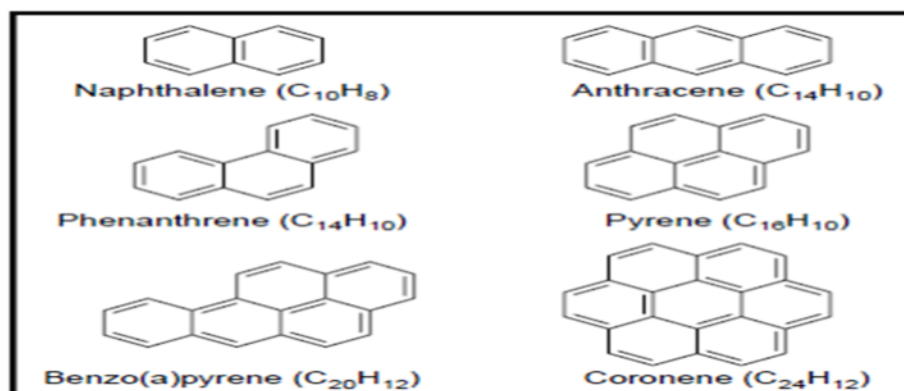
Les hydrocarbures aliphatiques sont des composés organiques constitués exclusivement d'atomes de carbone et d'hydrogène, reliés entre eux par des liaisons simples, sans aucun de cycles. Ces composés jouent un rôle essentiel dans de nombreux secteurs industriels et commerciaux en tant que carburants, solvants, lubrifiants et précurseurs pour la synthèse de produits chimiques (Vollhardt et Schore, 2018).

#### **2.2.2. Hydrocarbures aromatiques**

Les composés aromatiques sont des molécules d'hydrocarbures cycliques, classés selon le nombre de cycle aromatique que possède chaque molécule parmi lesquels on distingue :

##### **2.2.2.1 -Hydrocarbures aromatiques monocycliques**

Les hydrocarbures aromatiques monocycliques tel que les xylènes, le toluène et benzène sont des composés volatils. Il s'agit principalement de produits chimiques de synthèse issus d'activités industrielles et le manque de leur contrôle. La plupart de ces HAM sont d'origine agricole (Essentiellement dérivé du méthane), ou des industries pétrochimiques...



**Figure 01:** Structure de quelques hydrocarbures aromatiques polycycliques abondants dans l'environnement(Sudip et *al.*, 2002).

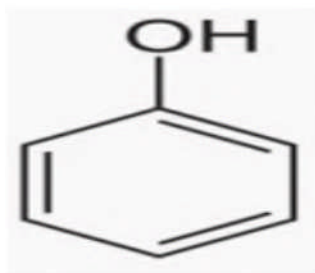
### 2.2.2.2 -Hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques comportent deux ou plusieurs cycles aromatiques condensés, on distingue des petits HAP qui sont constitué de moins de six cycles aromatiques et des grands HAP avec plus de six cycles aromatiques. Ils ont une faible solubilité dans l'eau (Farhadian et *al.*, 2008 ; Haritash et Kaushik, 2009 ; Costa et *al.*, 2012).

### 2.3. Le phénol

Le phénol, également connu sous le nom d'acide phénique ou d'hydroxybenzène, est un composé organique aromatique représenté dans la figure 2 contenant un groupe hydroxyle (-OH) attaché à un noyau de benzène (Katzenellenbogen, 2021).

Il est couramment utilisé comme matière première dans la synthèse de produits chimiques tels que les plastiques phénoliques, les résines époxy, les détergents, les explosifs (Matuschek et Spiteller, 2022).



**Figure02:** Structure du noyau phénol (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

#### 2.4. Danger et toxicité du phénol

Les phénols sont considérés comme des polluants majeurs ayant un impact néfaste sur l'environnement. Leur présence dans les eaux usées découle de nombreuses activités, tant domestiques qu'industrielles (Daffri, 2008).

L'émission non traitée et non contrôlée de phénol dans le milieu naturel peut engendrer des altérations des écosystèmes aquatiques et causer des préjudices aux ressources précieuses. La faune et la flore sont les principales victimes de ces rejets. Le phénol, en tant que substance largement répandue, représente une menace significative pour la vie aquatique. Sa présence dans l'eau est hautement toxique, polluant les sols et engendrant de multiples conséquences causant sur l'environnement et la santé (Terki Hassaine, 2013).

Le phénol se prête facilement à l'absorption par différentes voies, notamment par ingestion, inhalation ou contact cutané. Une fois absorbé, le phénol est rapidement éliminé de l'organisme, principalement par le biais de l'urine, sous forme de dérivé sulfoconjugué. Le processus de conjugaison se déroule au niveau hépatique et dans le tractus gastro-intestinal (Bouazza, 2012).

#### 2.5. Devenir des hydrocarbures aromatiques monocycliques dans le sol

Selon une étude menée par Smith et *al.*, (2018) les HAM dans les sols peuvent subir plusieurs processus de transformation. La biodégradation, par exemple, est un mécanisme important par lequel les micro-organismes du sol dégradent les HAM en utilisant ces composés comme source de carbone et d'énergie. La biodégradation peut être favorisée par des facteurs tels que la disponibilité en nutriments, le pH du sol et la présence d'autres contaminants. Les HAM peuvent également être sujets à la volatilisation, où ils se vaporisent dans l'air à partir des

sols contaminés. Ce processus dépend de la volonté spécifique de chaque HAM et des conditions environnementales, telles que la température et l'humidité.

### **2.6. Toxicité des hydrocarbures aromatiques monocycliques**

Selon des études comme celle menée par Snyder *et al.*, (2016), l'exposition au benzène est liée à un risque accru de développer des cancers du sang, en particulier la leucémie myéloïde aiguë. Le benzène hydrocarbure aromatique monocyclique est reconnu pour son efficacité et son potentiel cancérigène. Selon une étude menée par Faroon *et al.*, (2012), l'exposition au toluène peut causer des problèmes au système nerveux central, tels que des problèmes d'équilibre, des maux de tête et des problèmes de mémoire. Le toluène est un autre solvant monocyclique aromatique hydrocarbure couramment utilisé comme solvant industriel. Selon une étude menée par Sabzevariet *al.*, (2019), l'exposition au xylène chimique peut avoir des effets toxiques sur le système nerveux, altérant les fonctions cognitives et endommageant les neurones. Le xylène est un hydrocarbure monocyclique aromatique utilisé comme solvant et additif.

### **2.7. Impact sur l'environnement**

Ces composés organiques volatils peuvent contaminer les sols, les eaux souterraines et les écosystèmes aquatiques, entraînant des effets efficaces sur la faune et la flore environnante. Une étude menée par

Saeedi *et al.*, (2019) a montré que les hydrocarbures aromatiques monocycliques peuvent altérer la croissance et la reproduction des plantes, affectant ainsi l'équilibre écologique des écosystèmes terrestres.

De plus, la présence de ces hydrocarbures dans les eaux de surface peut également causer des problèmes environnementaux. Une recherche réalisée par Jabeen *et al.*, (2018) a révélé que le benzène, le toluène et le xylène pouvaient être toxiques pour les organismes aquatiques tels que les poissons, en provoquant des effets efficaces sur leur reproduction, leur développement et leur survie. Ces effets peuvent avoir des conséquences à long terme sur la biodiversité et l'intégrité des écosystèmes aquatiques.

Il est également important de noter que les hydrocarbures aromatiques monocycliques peuvent être libérés dans l'atmosphère par diverses sources, telles que les émissions des véhicules et les processus industriels. Une étude menée par Li *et coll.*, (2020) a montré que ces

composés contribuent à la formation d'ozone troposphérique et de particules fines, qui sont des polluants atmosphériques préoccupants. Ces polluants peuvent avoir un impact sur la qualité de l'air, la santé humaine et les écosystèmes terrestres.

### 3. Les margines

Les margines sont des liquides de couleur brune rougeâtre à noir, rejetés lors de la trituration des olives. Elles sont constamment répandues dans la nature, généralement sur les sols ou stockées dans des bassins (Rais et *al.*, 2017).

#### 3.1. Composition des margines

##### 1. Matière minérale

Les margines sont riches en sels minéraux tel que le Phosphore, le Sodium, le Calcium et le chlore. La concentration de ces minéraux varie de 4 à 42 g/l pour les margines obtenues par pression et de 0,4 à 12,5 g/l pour celles obtenues par centrifugation (Salvemini, 1985).

##### 2. Matière organique

Les margines sont constituées de deux fractions organiques distinctes. La première fraction, insoluble, est principalement composée de pulpes d'olives, représentant la matière en suspension et colloïdale. Quant à la seconde fraction, elle est soluble dans la phase aqueuse et renferme une variété de composés tels que les sucres, les composés azotés, les vitamines, les acides organiques, les lipides et les composés phénoliques (Fki et *al.*, 2005).

##### 3. Les polyphénols

Les polyphénols désignent des composés bioactifs présents dans le règne végétal. Leur structure est hautement variée, mais ils partagent tous la caractéristique commune d'avoir au moins un noyau aromatique (appelé groupement phénol) doté de plusieurs groupements hydroxyles (-OH) (Crozier et *al.*, 2004).

**Tableau I:** Composition des margines (Sansoucy,1984).

<b>Composant</b>	<b>Teneur en %</b>
<b>Eau</b>	83---88
<b>Matières organiques</b>	10---15
<b>Matières minérales</b>	1.5---2
<b>Matières azotées totales</b>	1,25---2,4
<b>Matières grasses</b>	0,08---1
<b>Poly phénols</b>	1---1,5

### 3.2. Pouvoir polluant des margines

Les margines ont un pouvoir polluant important en raison de leur forte teneur en matières organiques, en polyphénols, en acides gras et en autres composés. Ces substances peuvent être toxiques pour les microorganismes du sol et les plantes, et peuvent également contribuer à l'eutrophisation des eaux souterraines et des rivières (Fernández-Bolaños et *al.*, 2006).

Les margines peuvent également être riches en métaux lourds, notamment le plomb, le cadmium et le chrome, qui peuvent s'accumuler dans les sols et les eaux et être toxiques pour les organismes vivants. Les marges peuvent également contenir des contaminants microbiens tels que des bactéries et des virus qui peuvent être dangereux pour la santé humaine (ChenariBouket et *al.*, 2020).

Les margines peuvent également contribuer à la pollution atmosphérique en raison de leur teneur élevée en particules fines et en composés organiques volatils. Ces substances peuvent être libérées dans l'air pendant le processus de stockage et de traitement des marges, ainsi que pendant leur épandage sur les sols agricoles (Ranalli et *al.*, 2006)

Les margines peuvent également contribuer à la contamination des sols par des microplastiques, qui sont des particules de plastique de moins de 5 mm de diamètre. Les microplastiques peuvent être présents dans les marges en raison de leur utilisation dans le

processus d'irrigation des oliviers, ainsi que de leur accumulation dans les déchets plastiques associés à la production d'huile d'olive (Fridman *et al.*, 2017).

## II. Biodégradation des hydrocarbures aromatique

### 1. La biodégradation

La biodégradation est l'un des principaux mécanismes d'élimination des hydrocarbures de l'environnement (Hinga, 2003). Il s'agit d'un mécanisme qui convertit les contaminants en une variété de sous-produits moins toxiques grâce à l'action de microorganismes. Ce phénomène peut se produire non seulement dans n'importe quel milieu (sol, eau), mais également dans diverses phases de polluants (liquide, solide, gaz) (Lecomte, 1995).

### 2. Principe de la biodégradation des hydrocarbures

La biodégradation se forme à la suite de la décomposition de molécules organiques par des micro-organismes (bactéries, champignons, etc.) et utilisent le carbone oxydé comme source d'énergie pour leur croissance (Djerbaoui, 2010).

#### . Les processus de biodégradation

- **Biodégradation primaire:** Évaluer la disparition d'une substance dans des conditions définies en mesurant les quantités résiduelles ou la perte de propriétés.
- **Biodégradation ultime:** Elle représente l'étape à laquelle la molécule est complètement transférée en CO<sub>2</sub> ou CH<sub>4</sub>, soit par la formation de biomasse, soit par des éléments minéraux.
- **Biodégradation acceptable:** C'est la biodégradation des composés organiques jusqu'à ce que la toxicité soit réduite (Bouderhem, 2011).

### 3. Mécanismes de la biodégradation des hydrocarbures

La biodégradation des hydrocarbures est un processus naturel où des micro-organismes, tels que des bactéries et des champignons, décomposent les composés hydrocarbonés en utilisant ces substances comme source d'énergie et de carbone (Jose, 1999). Cette dégradation s'effectue en présence ou en absence d'oxygène (dégradation aérobie ou anaérobie)

### 3.1. Biodégradation aérobie

La biodégradation aérobie s'effectue en présence d'oxygène dans un milieu aérobie, les microorganismes tels que certaines bactéries et champignons, utilisent les hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie pour leur croissance, les composés carbonés sont minéralisés pour former du dioxyde de carbone, des composés inorganiques, de l'eau et des protéines cellulaires (Record, 2007).

### 3.2. Biodégradation anaérobie

La biodégradation anaérobie s'effectue en absence d'oxygène, l'activité métabolique des microorganismes adaptés produit des substances organiques simples qui ne sont pas complètement oxydées, telles que des acides organiques et d'autres composés tels que le méthane et l'hydrogène gazeux (Record, 2007).

## 4. Les microorganismes dégradants les hydrocarbures

Les microorganismes ont besoin de nutriments et de sources de carbone pour fournir l'énergie dont ils ont besoin pour leur croissance et leur survie (Geoffrey et al., 2008). La capacité des microorganismes à se développer sur les hydrocarbures ne se limite pas aux bactéries, et certains sites contaminés contiennent également de nombreux champignons et levures qui peuvent dégrader les hydrocarbures (Vandecasteele, 2005). Le tableau II présente une compilation de quelques microorganismes impliqués dans la biodégradation des hydrocarbures.

**Tableau II:** Quelques microorganismes responsables de la biodégradation des hydrocarbures (Pelmont, 2005).

Bactéries	Champignons	Levures
<i>Actinomycètes.</i> <i>Arthrobacter.</i> <i>Bacillus.</i> <i>Crynebacterium.</i> <i>Mycobacterium.</i> <i>Nocardia.</i> <i>Pseudomonas.</i> <i>Rhodococcus.</i>	<i>Pinicillium.</i> <i>Cunninghamella.</i> <i>Exophiala.</i> <i>Aspegillus, trichoderma,</i> <i>fusarium</i>	<i>Rhodotorula.</i> <i>Saccharomycess, Candida.</i> <i>Kluyveromyces.</i> <i>Torulopsis.</i> <i>Cryptococcus</i>

### **5. Facteurs influençant la biodégradation des hydrocarbures**

La biodégradation des hydrocarbures est un processus complexe qui dépend de nombreux facteurs.

#### **5.1. Facteurs liée aux hydrocarbures aromatiques**

##### **5.1.1. Concentration en hydrocarbures**

Des concentrations élevées d'hydrocarbures peuvent inhiber la biodégradation en limitant les nutriments et l'oxygène. En raison des effets toxiques de certains hydrocarbures, la plupart des micro-organismes sont tués à de très faibles concentrations de solvants organiques (0,1%), alors que *Pseudomonas*, *Actinobacteria* et *Nocardia* sont capables d'assimiler les solvants organiques à des concentrations de 0,3% (Belaloui et *al.*,2020).

##### **5.1.2. Propriétés physicochimiques des hydrocarbures**

Les **propriétés physicochimiques des hydrocarbures** comprennent la taille et la structure moléculaires, le potentiel d'ionisation, l'affinité électronique et le coefficient de partage. La solubilité dans l'eau joue un rôle important et variable dans les processus de transformation et de dégradation. Les hydrocarbures de faible masse moléculaire sont plus susceptibles de se transformer et de se dégrader que les HA de masse moléculaire élevée plus hydrophobes (Jonsson et *al.*, 2007).

#### **5.2. Facteurs liés aux microorganismes**

##### **5.2.1. La souche bactérienne**

Les réactions chimiques (oxydation, oxydation de l'hydrogène) de biodégradation des hydrocarbures catalysées par les enzymes bactériennes varient également entre les souches bactériennes. Certaines souches ont une meilleure dégradation que d'autres (Boudjema et *al.*, 2009).

##### **5.2.2. Concentration en microorganismes**

La biodégradation des hydrocarbures est influencée par de nombreux facteurs. Le premier de ces facteurs est la faible concentration de microorganismes capables de métaboliser les hydrocarbures. En effet, plus la concentration de microorganismes est élevée, plus le taux de biodégradation est rapide (Van Hamme et *al.*, 2003).

### 5.3. Facteurs liés aux conditions de développements

#### 5.3.1. Température

L'activité biologique des micro-organismes est sensible aux changements de température (François, 2002). Elle agit sur la multiplication microbienne et le métabolisme, sur la vitesse de la biodégradation ainsi sur l'état physiologique et la composition chimique du polluant. Une température plus basse réduit la croissance microbienne, un métabolisme microbien plus faible réduit la biodégradation et une température plus élevée accélère la décomposition des hydrocarbures aromatiques polycycliques de faible poids moléculaire. Généralement, la température optimale de biodégradation est d'environ 27°C. Cette température peut varier en fonction des hydrocarbures impliqués et de la population microbienne indigène du milieu (Goyer et *al.*, 1995).

#### 5.3.2. Oxygène

La première étape du catabolisme des hydrocarbures par les microorganismes implique l'oxydation des substrats par les hydroxylases et les oxygénases (Van Beilen et *al.*, 2003). La dégradation des hydrocarbures est plus rapide en présence d'oxygène, c'est un facteur limitant de la biodégradation (Goyer et *al.*, 1995). La biodégradation anaérobie est plus lente que la biodégradation aérobie (Huang et *al.*, 1995). Pour que la dégradation biologique des polluants se déroule de manière optimale, les polluants doivent être oxygéné en quantité suffisante (François, 2001).

#### 5.3.3. Potentiel d'hydrogène

La plupart des bactéries préfère un pH neutre pour se développer, un pH extrême influence négativement sur la capacité microbienne à dégrader les hydrocarbures (Goyer et *al.*, 1995).

#### 5.3.4. Eléments nutritifs

Les nutriments sont essentiels à l'activité et au développement microbiens. Ce sont des objets simples assimilables par les organismes vivants sans modification du système digestif et facilitant la croissance des populations bactériennes. Les plus importants sont l'azote et le phosphore (Barooah et Borthakor, 1999).

**Tableau III:** Quelques exemples de travaux qui ont été récemment réalisés sur la biodégradation du phénol.

<b>Souche</b>	<b>Concentration utilisée</b>	<b>%de dégradation</b>	<b>Référence</b>
<i>Pseudomonas veronii</i> <i>Leifsonia naganoensis</i> <i>Rhodococcus qingsengii</i>	200mg/L	33%	Yang et al (2023)
<i>Aquabacterium sp</i>	1200mg/L	50%	Zhang et al (2022)
<i>Cryptococcus albidus</i> <i>Candida guilliermondii</i> <i>Candida tropicalis</i>	2000mg/L	36%	Bautista et al (2022)
<i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i> <i>Sphe3</i>	1500mg/L	55%	Asimakoula et al (2023)

# **Matériel et Méthodes**

### 1. Présentation

Ce travail a été réalisé au sein des laboratoires suivants :

- Laboratoire « Environnement » au Centre de Recherche et de Développement (CRD) de Sonatarch sis à Boumerdès.
- Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies du département de Biochimie-Microbiologie Faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques de l'université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou.

L'objectif de cette étude était d'isoler et sélectionner des microorganismes ayant des aptitudes à dégrader des composés aromatiques.

### 2. Matériel

#### 2.1. Matériel biologique, polluant et sol

##### 1. Echantillons de sol

Les deux échantillons utilisés sont pollués par les hydrocarbures, l'un est prélevé de la station-service pompe à essence bouzeguene, et l'autre est un sol pollué par les margines, prélevé à partir d'huilerie du village Tabourt, commune Ifigha Daïra Azazga.

##### 2. Polluants

Les polluants utilisés sont les suivants :

- Les margines utilisées sont prélevées par Mme DERMECHE.S, le 15 /01/2023.
- La solution du phénol (Annexe 2).

#### 2.2. Matériel non biologique

Le matériel non biologique est répertorié dans l'annexe 01.

### 3. Méthodes

#### 3.1. Isolement et sélection de souches tolérant le phénol

##### 3.1.1. Echantillonnage

Deux échantillons ont été collectés dans la région de Tizi-Ouzou (Figure 4) à partir de sols contaminés par les margines et les hydrocarbures, et ce, dans le but d'isoler des microorganismes qui pourraient être impliqués dans la dégradation des composés aromatiques, en particulier les composés phénoliques. Pour chaque site contaminé, une dizaine d'échantillons de sol ont été prélevés à l'aide d'instruments stériles et recueillis dans des flacons (ECBU) en plastique stériles. Les prélèvements ont été effectués à différentes profondeurs, allant de 5 à 10 cm, à des points choisis au hasard dans chaque site contaminé. Par la suite, les échantillons ont été mélangés afin d'obtenir un seul échantillon homogène représentatif pour chaque site.

Le premier échantillon noté EH (échantillon pollués par les hydrocarbures) est un échantillon de sol pollué par des hydrocarbures, il a été prélevé depuis une pompe à essence de la région de BOUZEGUENE wilaya de TIZI-OUZOU. Bouzeguene, est une commune de la wilaya de Tizi Ouzou, dans la région de Grande Kabylie en Algérie. Elle se situe à 27 km à l'est d'Azazga et à 38 km au nord d'Akbou.

Composition de l'essence : L'essence est un mélange complexe d'hydrocarbures légers, généralement obtenu à partir du raffinage du pétrole brut.

Les principaux composants de l'essence et leurs pourcentages approximatifs :  
Hydrocarbures saturés : Les hydrocarbures saturés à chaîne carbonée courte, tels que l'heptane ( $C_7H_{16}$ ), l'octane ( $C_8H_{18}$ ), le nonane ( $C_9H_{20}$ ) et le décane ( $C_{10}H_{22}$ ), constituant généralement la majeure partie de l'essence, représentant environ 40 à 60% de sa composition.

Le deuxième échantillon noté EM (échantillon pollués par les margines) est un échantillon de sol pollué par des margines, prélevé depuis une huilerie de la région d'AZAZGA (IFIGHA) wilaya de TIZI-OUZOU.

Azazga est une commune de la wilaya de Tizi Ouzou en Algérie. Elle est située à 30 km au sud du littoral méditerranéen, à 30 km à l'est de Tizi Ouzou et à 90 km à l'ouest de Béjaïa.

Les margarines sont principalement composées d'huiles végétales raffinées telles que l'huile d'olive ou d'autres huiles similaires, et eau.

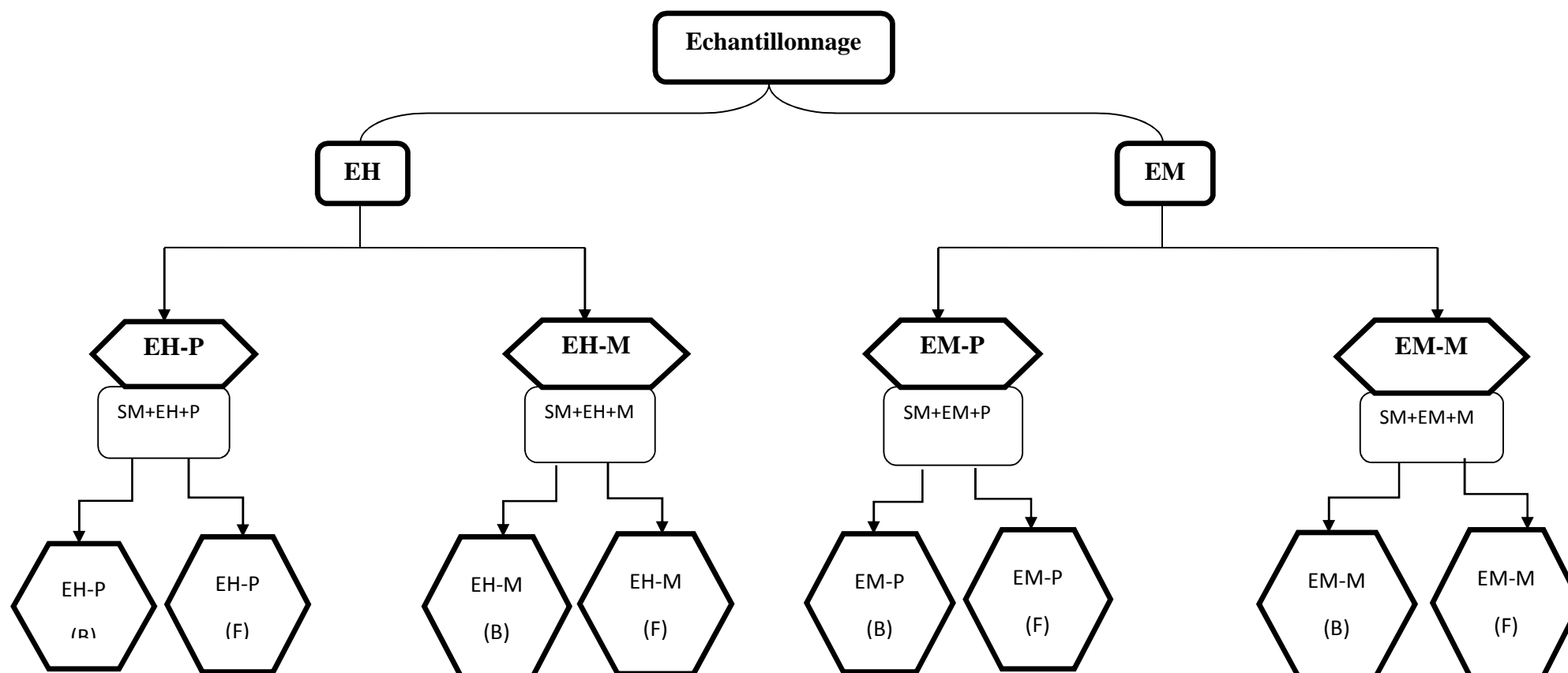


**Figure03:** Localisation géographique des régions de récolte des échantillons de sol sur la carte de la wilaya de Tizi-Ouzou.

### 3.1.2. Technique d'isolement par enrichissement sélectif

Plusieurs études antérieures ont mentionné la méthode utilisée pour isoler des microorganismes capables de dégrader le phénol et ses dérivés (Santos et Linardi, 2001 ; Shourian et *al.*, 2009). Environ 20 g de sol sont dilués dans 180 ml d'eau physiologique pour chaque échantillon, puis les mélanges ont été maintenues en agitation pendant une heure. Ensuite, 10 ml de chaque solution mère sont ajoutés à 90 ml du milieu (MM) décrit dans les travaux de Santos et Linardi (2004) et 10ml de polluant pour avoir la culture EH-P(B) (composée de la solution mère de l'échantillon pollué par des hydrocarbures, du milieu MM et du phénol qui a été incubée à 37°C pour isoler les bactéries du premier échantillon) et EH-P(F) (incubée à 28°C, dans le but d'isoler les microorganismes fongiques). EM-P(B) et EM-P(F) (sont de la même composition que les deux premières cultures sauf que dans ce cas on a ajouté la solution mère de l'échantillon pollué par des margines), jusqu'à avoir quatre cultures (deux pour chaque échantillon). Dans la première étape de la culture, un antibiotique (chloramphénicol) a été ajouté à une concentration de 200 mg/l au milieu contenant 100 mg/l de polluant pour la culture de chaque échantillon., dans le but de sélectionner des microorganismes fongiques, en particulier des levures, capables de dégrader ce polluant.

Le diagramme récapitulatif présenté dans la figure 6 illustre les échantillons et les cultures utilisées lors du travail expérimental.



**Figure 04:** Diagramme récapitulatif des échantillons et cultures utilisés lors de travaille expérimental.

Après 24h d'incubation à 28°C pour les cultures EH-P (F), EH-M (F), EM-P (F), EM-M (F), et 37°C pour EH-P (B), EH-M (B), EM-P (B), EM-M (B) des dilutions décimales ont été réalisées pour chaque culture, et ensuite, la dilution  $10^{-3}$  a étéensemencée.

Les levures et les bactéries, sont alors isolées à partir de chaque culture sur milieu sabouraud dextrose au chloramphénicol (SDCA) et gélose nutritive. Une goutte de chaque suspension estensemencée par étalement. Les boîtes sont notées au hasard par les lettres EH-P (F), EH-M (F), EM-P (F), EM-M (F) et EH-P (B), EH-M (B), EM-P (B), EM-M (B) et les colonies sont attribuées avec d'autres lettres et ainsi sont obtenues les codes des isolats, La même lettre « S » additionnée d'un chiffre est attribuée au départ pour les colonies qui se ressemblent dans leur aspect macroscopique car les colonies peuvent avoir plus de détails dans leur aspect macroscopique après une incubation de plus de 72h après isolement.

### **3.1.3. Purification des souches isolées**

Les isolats récupérés lors de cette première sélection, sont purifiés par des repiquages successifs par la méthode d'épuisement. Ceci afin de les tester par la suite en cultures pures. Les isolats purs sont conservés à une température de 4°C sur du milieu Sabouraud chloramphénicol et de la gélose nutritive, inclinés dans des tubes à essai, avec un pH de 6. Afin d'entretenir les isolats, des repiquages s'effectuent régulièrement.

## **3.2. Identification des souches**

### **3.2.1. Aspect macroscopique**

L'examen de l'apparence macroscopique des colonies, permet de réaliser une première caractérisation, offrant une orientation potentielle lors de l'identification selon Singleton (1999). Les critères de cette identification sont : la forme des colonies, l'élévation, l'opacité, la surface, l'odeur...

### **3.2.2. Aspect microscopique**

#### **1. Observation à l'état frais**

Ce test permet de déterminer la forme, l'arrangement et la mobilité des bactéries par le biais d'une observation d'une colonie bactérienne disposée entre une lame et une lamelle avec une goutte d'eau physiologique. L'exploration visuelle de cette préparation se réalise au moyen d'un microscope photonique, permettant ainsi une analyse des caractéristiques morphologiques, de l'organisation structurale et des mouvements propres à ces microorganismes.

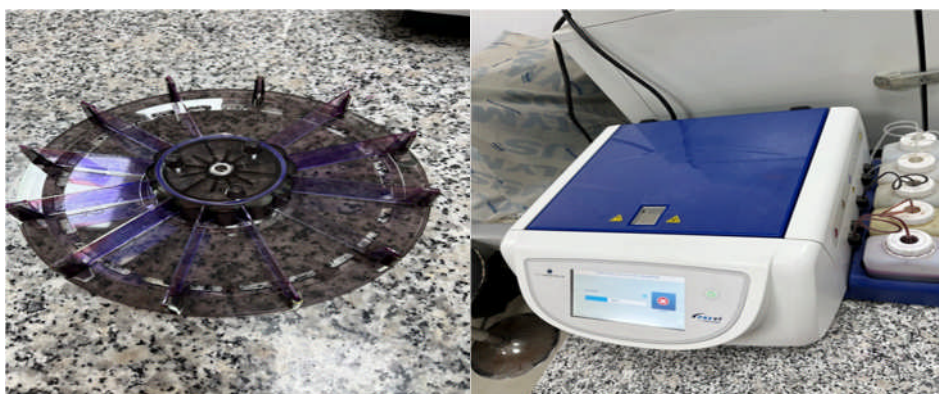
### 2. Coloration de Gram

Cette double coloration permet d'obtenir des informations sur la forme, l'arrangement, la pureté et la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées. Elle est réalisée de manière systématique sur les différentes colonies purifiées afin de déterminer si elles sont Gram+

ou Gram-. Elle implique le traitement d'un frottis bactérien fixé à la chaleur avec une solution de violet de Gentiane, une solution iodo-iodurée (lugol), un solvant organique (éthanol) et de la Fuchsine. Les cellules réagissent de deux manières distinctes, formant ainsi ces deux groupes Gram négatif et Gram positif (Marchal et al.,1987).

#### Mode opératoire :

Cette coloration se déroule en plusieurs étapes. Tout d'abord, les colonies sont fixées sur les lames, assurant ainsi leur stabilité. Ensuite, les lames sont introduites dans l'appareil PREVI Color Gram, où la coloration a été faite, conformément à la figure 5. Une fois la coloration terminée, les lames colorées sont récupérées, prêtes à être observées sous un microscope pour des analyses ultérieures.



**Figure05:** Etape d'introduction des lames dans l'appareil PREVI Color Gram.

### 3.3. Test de biodégradation d'un polluant aromatique « phénol »

Chaque souche pure est soumise à un test individuel sur le milieu MM pour évaluer sa capacité à dégrader un polluant aromatique monocyclique (phénol) à une concentration de 200 mg/L. Les cultures sont réalisées dans des erlenmeyers de 100 mL préalablement stérilisés et vides, contenant 38 mL du milieu MM et 200uL de la solution du phénol préalablement préparé en utilisant 5g de ce dernier dans 100mL d'eau physiologique. Après l'inoculation, les

erlenmeyers sont fermés avec du coton stérilisé. La densité optique (DO) initiale de chaque inoculum a été mesurée à 620 nm. Les cultures ont été alors incubées à 28°C (pour les levures et champignons) ou à 37°C (pour les bactéries). Les valeurs de DO des cultures sont analysées après 24, 48 et 72 heures.

L'objectif de ce test consiste à sélectionner les microorganismes capables de se développer en utilisant un polluant aromatique « le phénol » comme unique source de carbone et d'énergie. Donc pour les souches qui ont démontré une augmentation de la DO, une deuxième série de tests a été réalisée. Dans ces tests, la quantité de phénol a été doublée jusqu'à atteindre 400 µL, puis elles ont été mesurées après 48h.

### **3.4. Biotraitement d'un effluent industriel « les margines »**

Les isolats sélectionnés, seront soumis à des tests pour évaluer leur capacité à éliminer les phénols présents dans un substrat naturel à forte teneur en phénols mono et poly-aromatiques « les margines ».

#### **3.4.1. Quelques paramètres des margines utilisées**

##### **3.4.1.1. La Demande Chimique en Oxygène**

La Demande Chimique en Oxygène (DCO), est un paramètre largement employé dans l'évaluation de la teneur en matière organique d'un échantillon d'eau ou d'effluent. Elle permet d'estimer la quantité d'oxygène requise pour oxyder chimiquement cette matière organique. La DCO est exprimée en mg/L ou en g/L, offrant ainsi une mesure quantitative de la charge organique présente dans l'échantillon.

##### **Mode opératoire**

Tout d'abord, les échantillons (marges brutes : MB et marges diluées: Md10<sup>-1</sup>, Md10<sup>-2</sup>, Md10<sup>-3</sup>) sont préparés et homogénéisés par agitation. Ensuite, une quantité de 0,5 mL de chaque échantillon est ajoutée aux tubes de réactifs (LCK014) et mélangée par mouvement d'inversion pour assurer une homogénéisation de la solution, ce qui entraîne une augmentation de la température. Les quatre tubes sont ensuite chauffés pendant 2 heures. Après la période de chauffage, les tubes sont retirés de l'appareil et refroidis à l'abri de la lumière. Enfin, la demande chimique en oxygène (DCO) est mesurée pour chaque échantillon.

### 3.4.1.2. Potentiel hydrogène

La mesure du pH est une méthode couramment utilisée pour évaluer l'acidité ou l'alcalinité d'un effluent. Le pH est une échelle de mesure qui va de 0 à 14, où 7 est considéré comme neutre. Une valeur inférieure à 7 indique un milieu acide, tandis qu'une valeur supérieure à 7 indique un milieu alcalin.

### 3.4.1.3. Conductivité

La conductivité électrique correspond à l'évaluation de la capacité d'un matériau à assurer la circulation du courant électrique. Son fondement repose sur la capacité de certains matériaux à permettre le déplacement des charges électriques, notamment des ions, à travers leur structure. La conductivité dépend ainsi de la concentration et de la mobilité de ces charges électriques au sein du matériau considéré. Le principe de mesure de la conductivité repose sur l'application d'une tension électrique à travers un échantillon et la mesure du courant qui circule à travers celui-ci. Lorsque la tension est appliquée, les charges électriques se déplacent dans l'échantillon, générant ainsi un courant électrique.

#### Mode opératoire

La conductivité électrique des margines brut et des margines diluées, a été mesurée à l'aide d'un conductimètre (Figure 9). Après avoir fait la préparation des échantillons, avant de procéder à la mesure, le conductimètre est calibré en utilisant des solutions étalons de conductivité connues, et pour la mesure de la conductivité, l'échantillon est placé dans une cellule de conductivité du conductimètre, et le courant électrique est appliqué à travers l'échantillon, La conductivité est généralement exprimée en siemens par mètre (S/m) ou en microsiemens par centimètre ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ).

### 3.4.1.4. Matière sèche

Cette méthode consiste à mesurer la masse de l'échantillon avant et après son séchage pour déterminer la quantité de matière sèche, elle a été réalisée en suivant ces étapes :

#### Mode opératoire

La méthode utilisée pour mesurer la quantité de matière sèche des échantillons de margines implique plusieurs étapes. Tout d'abord, trois échantillons de margines ont été préparés en plaçant une quantité de 10 mL de ces dernières dans trois récipients appropriés, afin d'obtenir

une moyenne représentative. Ensuite, les échantillons ont été soumis à un séchage dans une étuve à une température de 105 °C pendant 2 heures. Ce séchage permet d'éliminer toute l'humidité présente dans les échantillons. Une fois le séchage terminé, les échantillons ont été retirés de l'étuve et laissés refroidir à température ambiante dans un environnement sec. Après refroidissement, les échantillons ont été pesés à nouveau. Les trois valeurs obtenues ont été utilisées pour calculer la moyenne.

### **3.5. Sélection des souches tolérants les margines**

Le présent essai a été exécuté en ensemençant individuellement chaque souche sur des margines incorporées dans le milieu de culture GN. Les souches S1 à Sh18 ont été incubées à une température de 37°C, tandis que les souches Sh18 à Sm25 ont été incubées à une température de 28°C, durant une période de 24 heures. L'objectif de cette démarche visait à sélectionner les souches manifestant une capacité à pousser sur les margines, en tirant parti des composés aromatiques, tels que les polyphénols, qui se trouvent dans ces dernières, comme unique source de carbone.

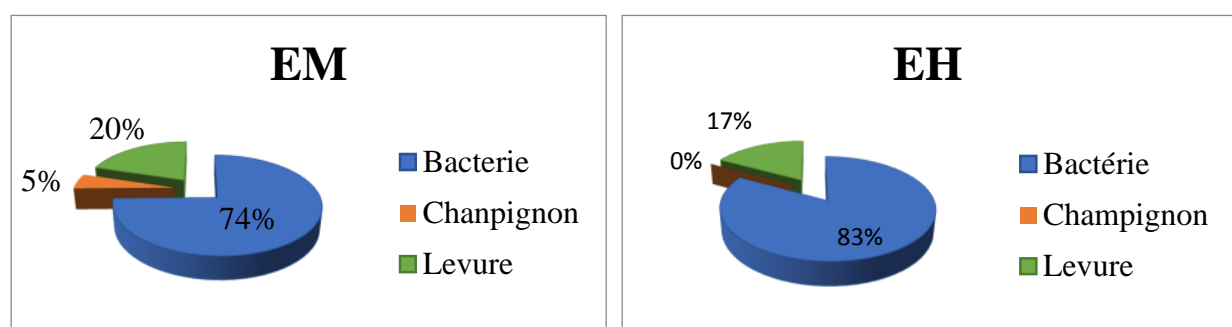
# **Résultats et discussions**

### III. Résultats et discussions

#### 1. Isolement des microorganismes capables de dégrader le phénol et les margines

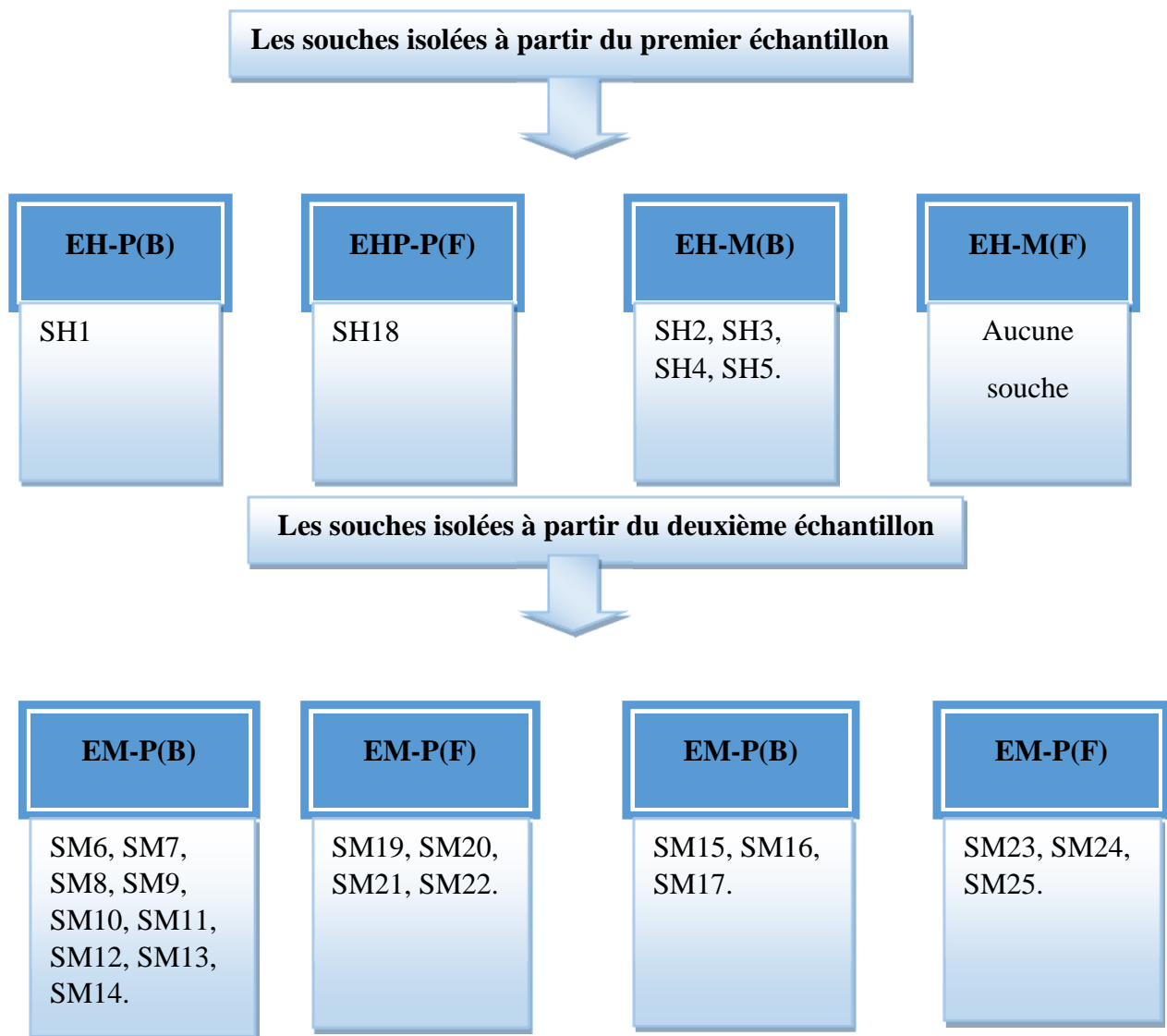
Dans cette section, les résultats de l'isolement des souches de microorganismes dégradants d'hydrocarbures ont été présentées, en mettant l'accent sur leur capacité à dégrader le phénol en tant que sources de carbone et d'énergie. Pour isoler ces souches dégradantes, une étape d'enrichissement, puis d'isolement et de purification ont été effectuées.

En premier lieu, les milieux liquides contenant le polluant ont étéensemencés et incubés à deux températures différentes, soit 28°C et 37°C. Les colonies distinctes ont ensuite été isolées sur milieu solide (GN). Après une manipulation méticuleuse, vingt-cinq souches microbiennes différentes qui ont démontré une capacité avérée à dégrader ou bien à tolérer la présence des polluants utilisés notamment le phénol ou composés phénoliques des margines, ont été sélectionnées. Conformément aux conclusions de Tarayre (2012), il est établi que le carbone contenu dans les hydrocarbures assume la fonction de substrat pour la prolifération des micro-organismes. Cela indique une diversité microbienne présente dans ces environnements contaminés. Ces souches, répondant aux appellations de SH1, SH2, SH3 à SM25, ont ainsi été reconnues comme des entités microbiennes prometteuses dans cette d'étude. En utilisant du chloramphénicol dans les cultures, huit souches fongiques à une température d'incubation de 28°C ont été isolées, tandis que dix-sept souches ont été isolées à une température d'incubation de 37°C.



**Figure06:** Répartition des isolats selon leur nature et leur milieu d'isolement.

**EH:** Sol pollué par des hydrocarbures ; **EM:** Sol pollué par des margines. La répartition des isolats en fonction des échantillons de sol est représentée dans la figure 07.



**Figure 07:** Schéma récapitulatif de la répartition des souches isolées de chaque échantillon.

**EH-P(B):** Culture (solution mère du sol pollué par les hydrocarbures + milieu MM + phénol) préparée pour l'isolement de bactéries, **EH-P(F):** Culture (solution mère du sol pollué par les hydrocarbures + milieu MM + phénol) préparée pour l'isolement des microorganismes fongiques, **EH-M:** Culture (solution mère du sol pollué par les hydrocarbures + milieu MM + margines) préparée pour l'isolement de bactéries, **EH-M(F):** Culture (solution mère du sol

pollué par les hydrocarbures + milieu MM + margines) préparée pour l'isolement des microorganismes fongiques, **EM-P(B)**:Culture (solution mère du sol pollué par les margines + milieu MM +phénol) préparée pour l'isolement de bactéries, **EM-P(F)**:Culture (solution mère du sol pollué par les margines + milieu MM +phénol) préparée pour l'isolement des microorganismes fongiques, **EM-M(B)**:Culture (solution mère du sol pollué par les margines + milieu MM +margines) préparée pour l'isolement de bactéries, **EM-M(F)** :Culture (solution mère du sol pollué par les margines + milieu MM +margines) préparée pour l'isolement des microorganismes fongiques.

### 1. Aspect macroscopique

L'observation macroscopique a été réalisée en examinant les colonies à l'œil nu., en prenant en compte des caractéristiques telles que la taille, la texture, la couleur, la forme et l'élévation (Tableau IV). Ces observations macroscopiques (photos dans l'annexe 3) permettent de décrire les caractéristiques apparentes des colonies de microorganismes et peuvent fournir des indices initiaux sur leur identité.

**Tableau IV:** Différentes caractéristiques macroscopiques des souches incubées à 37° après 24h.

<b>E</b>	<b>E+P</b>	<b>S</b>	<b>Aspect macroscopique</b>
<b>EP</b>	<b>EH-P</b>	<b>SH1</b>	Colonie de taille moyenne, jaunâtre, opaque, circulaire, Surélevée, lisse et brillante, visqueuse, avec odeur.
		<b>SH2</b>	Colonie jaune de taille moyenne, translucide, circulaire, bossue, visqueuses, avec odeur.
		<b>SH3</b>	Colonie de taille moyenne, de couleur jaune claire, translucide, bossue, irrégulière, visqueuse, avec odeur.

	<b>EH-M</b>	<b>SH4</b>	Petite Colonie de couleur jaune, translucide, circulaire, surélevée, lisse et brillante, visqueuse, avec odeur.
		<b>SH5</b>	Petite Colonie de couleur blanche, translucide, circulaire, régulière, surélevée, lisse et brillante, visqueuse, avec odeur.
<b>EM</b>	<b>EM-P</b>	<b>SM6</b>	Colonie de taille moyenne, verdâtre, translucide, irrégulière, rugueuse, visqueuse, avec odeur.
		<b>SM7</b>	Petite Colonie jaune, translucide, bossue, lisse et brillante, visqueuses, avec odeur.
		<b>SM8</b>	Petite Colonie jaune, translucide, bossue, lisse et brillante, visqueuses, avec odeur.
		<b>SM9</b>	Petite Colonie blanche, opaque, circulaire, surélevée, visqueuse, avec odeur.
		<b>SM10</b>	Grosse Colonie beige, translucide, irrégulière, rugueuse, visqueuse, avec odeur.
		<b>SM11</b>	Petite Colonie blanche, opaque, circulaire, convexe, visqueuse, avec odeur.
		<b>SM12</b>	Grosse Colonie jaune foncé, opaque, circulaire, bossue, visqueuse, avec odeur.
		<b>SM13</b>	Grosse Colonie de couleur beige, translucide, dentelée, irrégulière, non visqueuse avec odeur.

		<b>SM14</b>	Petite Colonie de couleur jaune claire, translucide, circulaire, plate, visqueuse, avec odeur.
	<b>EM-M</b>	<b>SM15</b>	Petite Colonie jaunâtre, translucide, circulaire, surélevée, convexe, visqueuse, avec odeur.
		<b>SM16</b>	Grosse Colonie blanche, opaque, irrégulière, ondulée, crémeuse, sans odeur.
		<b>SM17</b>	Petite colonie jaunâtre, translucide, circulaire, élevée, bossue, visqueuse, avec odeur.

Il est intéressant de noter que dans le cas des dix-sept souches isolées à 37°C, la majorité des colonies présentent une petite taille, mais il y en a également de taille moyenne et grande. En ce qui concerne la texture, la majorité des colonies sont visqueuses et dégagent une odeur. Pour la couleur, la majorité des colonies sont de couleur jaune clair ou foncé et sont translucides. Certaines colonies présentent une couleur blanche. De plus, les colonies sont généralement surélevées, ce qui signifie qu'elles se développent en hauteur par rapport à la surface du milieu de culture. Il y a également une variation d'aspect, car des colonies lisses, rugueuses, en dentelle ou bossues ont été observées. En ce qui concerne la forme, les colonies peuvent être soit circulaires, soit irrégulières, soit filamenteuses. Tandis que les souches isolées à 28°C (Tableau V) sont presque toutes sèches et surélevées, avec des tailles différentes, il y a des petites, des grosses et des moyennes colonies. En ce qui concerne la couleur, on observe que la majorité des colonies sont de couleur verte et noire, opaques, et quelques-unes sont blanches. De plus, certaines colonies présentent une apparence filamenteuse ou irrégulière. Ces observations macroscopiques peuvent fournir que des indications préliminaires sur les caractéristiques des microorganismes isolés.

**Tableau V:** Aspect macroscopique des souches incubées à 28°C après 48h.

Echantillon	E+Polluant	Souche	Aspect macroscopique
<b>EH</b>	<b>EH+P</b>	<b>SH18</b>	Grosse colonie, blanche, translucide, filamenteuse, surélevée, sèche.
	<b>EH+M</b>	Aucune souche isolée.	
<b>EM</b>	<b>EM+P</b>	<b>SM19</b>	Colonie de taille moyenne, de couleur vert noirâtre, opaque, de forme rhizoïde, surélevée, sèche.
		<b>SM20</b>	Petite colonie, de couleur vert, opaque, rhizoïde, surélevée, sèche.
		<b>SM21</b>	Grosse colonie, de couleur noirâtre, opaque, irrégulière, surélevée, sèche.
		<b>SM22</b>	Colonie de taille moyenne, transparente, surélevée, recourbée, visqueuse.
	<b>EM+M</b>	<b>SM23</b>	Petite colonie, blanchâtre, translucide, circulaire, convexe, visqueuse.
		<b>SM24</b>	Colonie de taille moyenne, de couleur vert noirâtre, translucide, rhizoïde, surélevée, sèche.
		<b>SM25</b>	Grosse colonie, de couleur blanche, translucide, filamenteuse, plate, sèche.

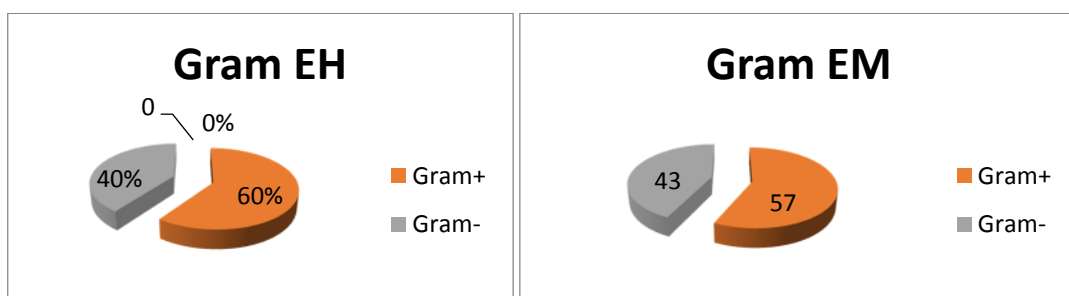
**S:**Souche ; **H:** Hydrocarbure ; **M:** Margine ; **E:** Echantillon

## 1.2. Aspect microscopique

### 1. Les microorganismes isolés à 37°C

Les résultats de l'observation microscopique des dix-sept souches bactériennes isolées après fixation ainsi qu'à l'état frais sont représentés dans le tableau VI. Parmi ces souches isolées, 43% sont des bacilles, 31% sont des Cocci et les 25% restantes présentent une forme de coccobacilles. Pour la mobilité, seulement 30% qui sont mobiles les 70% qui restent sont immobiles.

Contrairement à la nature dans laquelle les Gram- sont plus abondantes que les Gram+ grâce à leur rigidité (Debette et *al.*, 1975), dans cette étude, les Gram+ sont abondantes avec un pourcentage de 56% et les Gram - ne représentent que 44%(Figure 08).

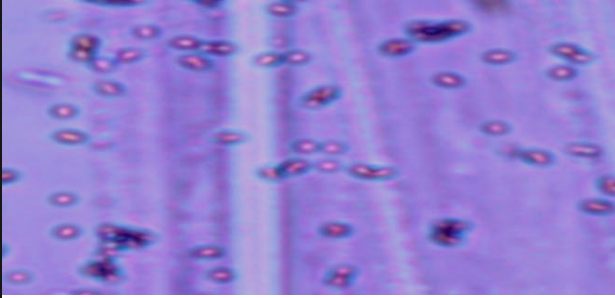

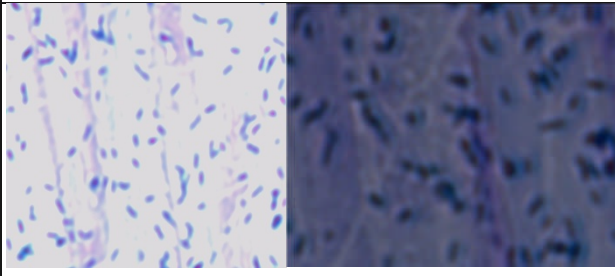
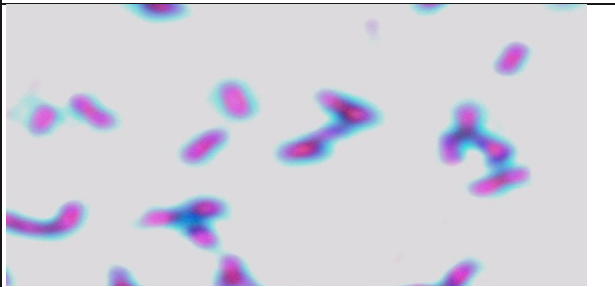


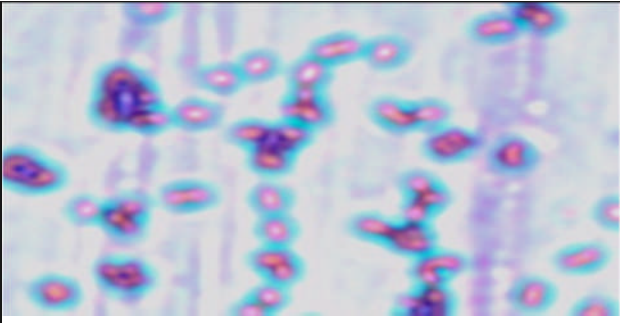

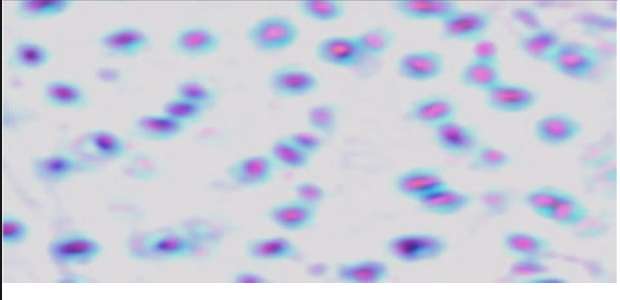
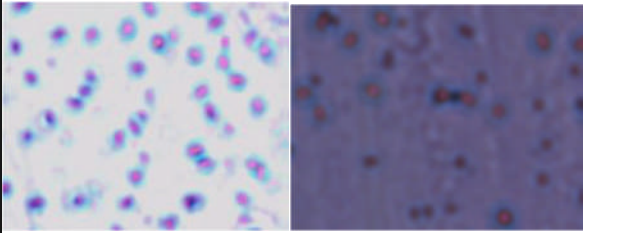
**Figure08:** Répartition des souches microbiennes après coloration de Gram.


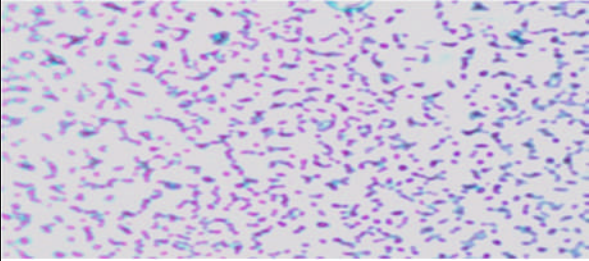
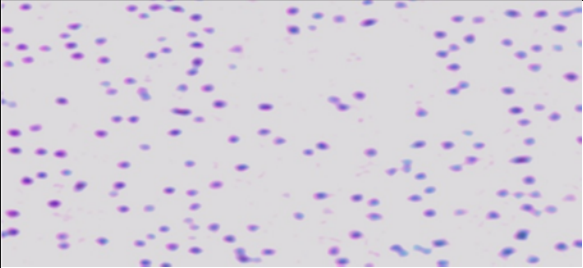

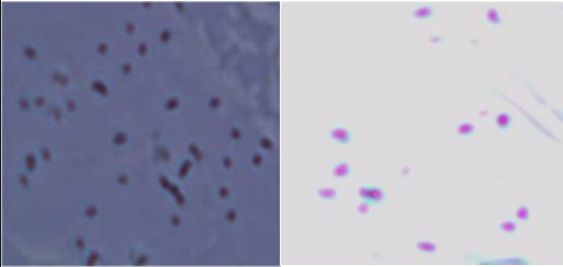
**EH:** Sol pollué par des hydrocarbures ;**EM:** Sol pollué par des margines.

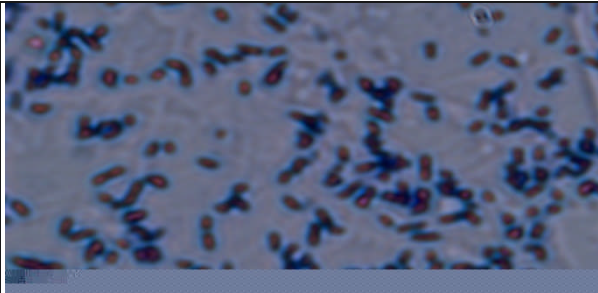
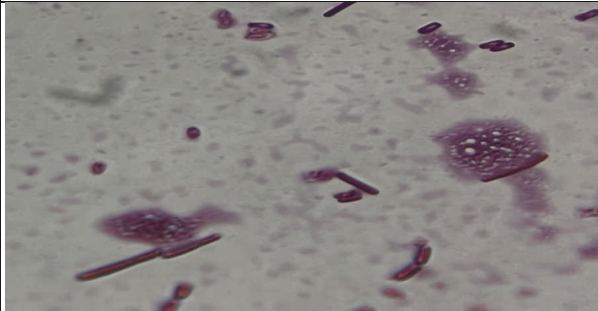
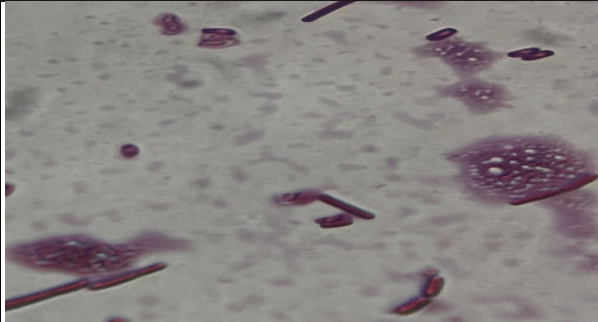
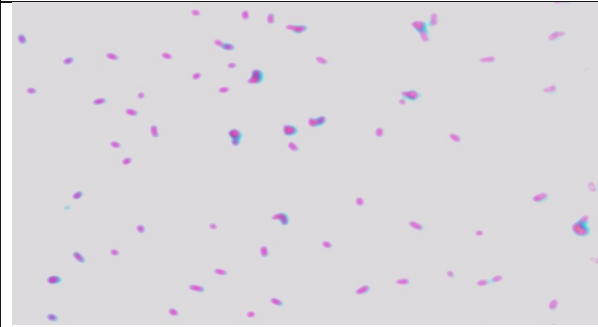
Le tableau ci-dessous présente les résultats de l'observation microscopique des dix-sept souches isolées à l'état frais et après fixation et coloration de Gram.

**Tableau VI:** Résultats de l'observation microscopique des dix-sept souches isolées à l'état frais et après fixation et coloration de Gram au grossissement x10.

Souche	Type de Gram	Forme	Mobilité	Observation microscopique de la souche
SH1	Gram-	Coccobacille	Immuable	
SH2	Gram+	Cocci	Immuable	
SH3	Gram+	Bacille	Immuable	
SH4	Gram+	Bacille	Mobile	

<p><b>SH5</b></p>	<p>Gram-</p>	<p>Coccobacille</p>	<p>Mobile</p>	
<p><b>SM6</b></p>	<p>Gram-</p>	<p>Bacille</p>	<p>Immobile</p>	
<p><b>SM7</b></p>	<p>Gram+</p>	<p>Coccobacille</p>	<p>Immobile</p>	
<p><b>SM8</b></p>	<p>Gram-</p>	<p>Cocci</p>	<p>Immobile</p>	

<b>SM9</b>	Gram+	Bacille	Immoble	
<b>SM10</b>	Gram+	Coccobacille	Mobile	
<b>SM11</b>	Gram-	Bacille	Immoble	
<b>SM12</b>	Gram+	Cocci	Immoble	
<b>SM13</b>	Gram+	Cocci	Immoble	

SM14	Gram-	Bacille	Mobile	
SM15	Gram+	Cocci (Présence de spores)	Immuable	
SM16	Gram+	Bacille (sporulé)	Mobile	
SM17	Gram+	Bacille	Immuable	

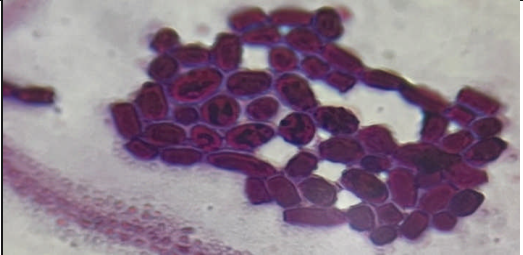
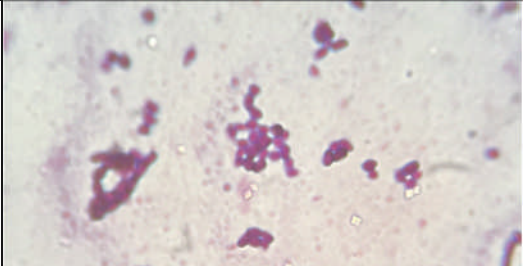
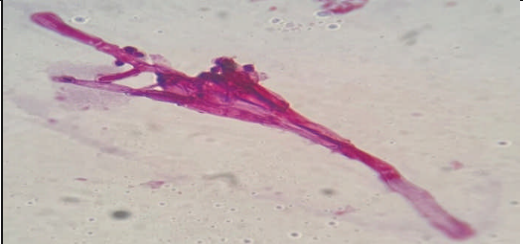
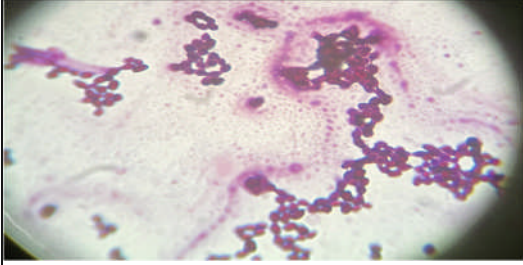
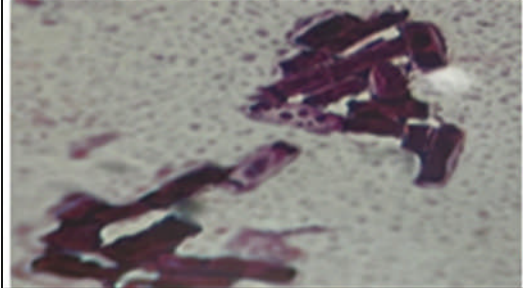
**S**: souche ; **H** : Hydrocarbures ; **M** : Margine

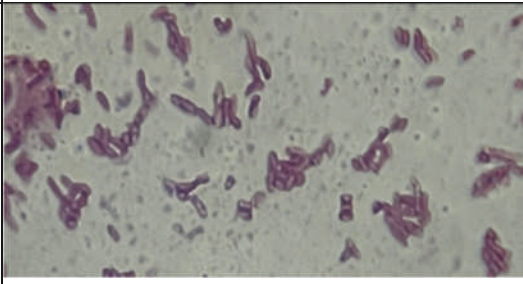

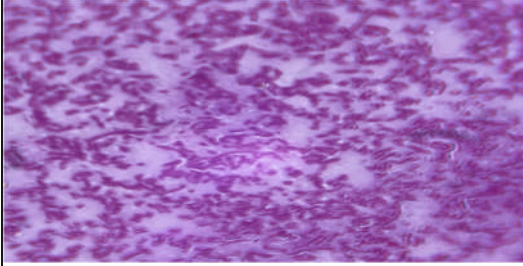
## 2. Les microorganismes isolés à 28°C

Les résultats de l'observation microscopique des huit souches isolées et purifiées sur milieu GN (auquel du chloramphénicol a été ajouté) après une incubation à 28°C, sont consignés dans le tableau VII. Cinq sont des levures, caractérisées par une forme

généralement ovale ou arrondie, tandis qu'un seul champignon se présente sous forme d'hyphe avec des spores, et deux bactéries adoptent une morphologie de bacilles ou de coccobacilles. Les isolats SH18 et SM22 nécessitent une étude plus approfondie.

**Tableau VII:** Résultats de l'observation microscopique des huit souches isolées à l'état frais et après fixation et coloration de Gram.

Souche	Gram	Forme	Mobilité	Image de la souche
SH18	/	-Ovale -Arrondie -Bacille	Mobile	
SM19	/	Ovale (Présence de bourgeons)	Mobile	
SM20	/	Hyphes (présence des spores)	immobile	
SM21	/	Ovale (Présence de bourgeons)	Mobile	
SM22	/	Bacille volumineux (forme rectangulaire)	Immobilés	

SM23	Gram-	Bacille (sporulé)	immobile	
SM24	/	Ovale (Présence de bourgeons)	immobile	
SM25	Gram -	Coccobacilles (petits)	immobile	

**S** : souche ; **H** : Hydrocarbure ; **M** : Margine

À la suite de cette observation, il a été constaté que parmi les vingt-cinq isolats, on recensait précisément dix-neuf bactéries, cinq levures et un champignon.

## 2. Résultat des essais de biodégradation du phénol

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau VIII. Les DO enregistrées pour la souche S1, isolées à partir du sol pollué par des hydrocarbures, et des souches SH6, SM7, SM9, SM10, SM14, SM21, SM22, SM24 et SM25 isolées à partir du sol pollué par des margines, n'ont présentées aucun changement significatif de la DO après 24h-48h. Ces résultats sont en accord avec l'observation de Guermouche et *al.* (2013) qui a démontré que les micro-organismes sont limités dans leur capacité à métaboliser uniquement une gamme restreinte de substrats. Toutefois, il convient de noter que ces souches ont tout de même présenté une croissance après ensemencement sur gélose nutritive. Cette observation démontre leur viabilité

et tolérance à la présence du phénol, bien qu'elles ne puissent l'utiliser comme seule source de carbone ou qu'elles sont en phase d'adaptation. Cependant, les souches SH2, SH3, SH4, SH5 et SH18 isolées à partir du sol pollué par les hydrocarbures et les cultures des souches SM8, SM11, SM12, SM13, SM15, SM16, SM17, SM19, SM20 et SM23 isolées à partir du sol pollué par les margines, ont montré une augmentation visible de la DO. Celles-ci ont également manifesté une croissance après ensemencement sur gélose, cette procédure est aussi effectuée pour la vérification de la pureté de la culture.

Les cultures des souches SM16, SM15, SM23, SM2 et SM3 ont montré une croissance plus rapide et prononcée en présence du phénol (250mg/L). La souche SM16 passe d'une DO initiale de 0,309 à 0,611 après 72h, ensuite une DO d'environ 0,706 est enregistrée après 48h de l'ajout de 500mg/L du phénol. Comparativement à la DO qui avait doublée à 250mg/L de phénol après 24h (0,3 à 0,6), celle notée après ajout de 500mg/L s'est avérée plus faible. Ceci serait du probablement à une inhibition exercée par la concentration plus élevée en phénol. Comme rapporté par plusieurs auteurs, l'immobilisation des cellules pourrait constituer une solution prometteuse permettant aux souches de contrecarrer l'effet toxique et inhibiteur du phénol à de fortes concentrations. Cela a été confirmé par l'étude de Asimakoula *et al.* (2023) qui a montré que les cellules de *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans*, immobilisées, maintiennent leur capacité de dégradation du phénol même après 30 jours de stockage et peuvent être réutilisées pendant au moins cinq cycles en conservant plus de 75 % de leur capacité initiale de catabolisation du phénol.

Il est important de souligner que les résultats indiquent clairement que ces souches ont la capacité d'utiliser le phénol comme seule source de carbone et d'énergie, leur permettant ainsi de prospérer dans cet environnement. L'utilisation d'hydrocarbures par des micro-organismes a été préalablement constatée par ZoBell (1946), qui a pu identifier qu'une multitude de microorganismes possèdent la capacité d'utiliser les hydrocarbures en tant que source exclusive de carbone et d'énergie. Pour les cultures où une augmentation de la DO a été observée, une quantité supplémentaire de phénol a été ajoutée, portant la concentration totale à 500mg/L. Dans ces cultures, la DO a continué à augmenter de manière significative.

L'analyse des résultats suggère que les cultures des souches microbiennes SH2, SH3, SH4, SH5, SH18, SM8, SM11, SM12, SM13, SM15, SM16, SM17, SM19, SM20 et SM23 présentaient des augmentations de la densité (DO) sur une concentration initiale de 250mg/L

de phénol, démontrant leur capacité à utiliser le phénol comme seule source de carbone et d'énergie. De plus, l'ajout ultérieur de phénol a amélioré leur capacité de dégradation, entraînant une augmentation progressive et continue de la DO au fil du temps. Ces observations suggèrent que ces souches sont adaptées à la dégradation du phénol. Ces résultats mettent en évidence l'importance de sélectionner ces souches prometteuses pour des études plus approfondies sur leur potentiel de biodégradation des hydrocarbures.

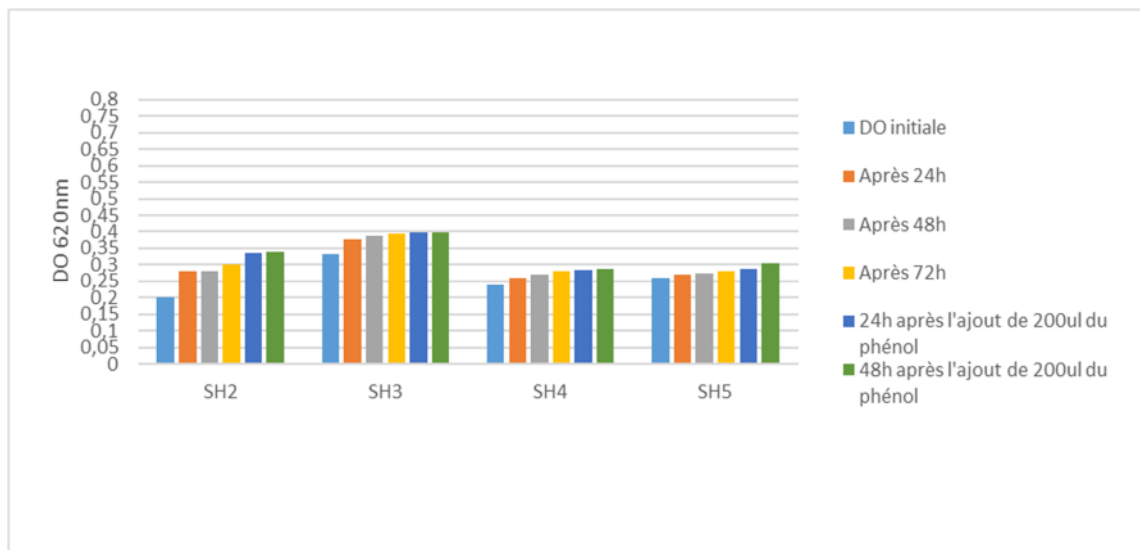
**Tableau VIII:** Valeurs des densités optiques notées pour l'ensemble des cultures des souches isolées en présence du phénol comme seule source de carbone.

Type de microorganisme	Souche	DO initiale	DO après 24h	Viabilité	DO après 48h	DO après 72h	Après l'ajout de 200uL de phénol	
							Après 24h	Après 48h
<b>Bactéries</b>	<b>S1</b>	0,259	0,257	+	0,257	0,258	0,258	0,259
	<b>S2</b>	0,200	0,280	+	0,301	0,311	0,337	0,339
	<b>S3</b>	0,332	0,376	+	0,389	0,395	0,399	0,399
	<b>S4</b>	0,240	0,259	+	0,270	0,280	0,284	0,289
	<b>S5</b>	0,260	0,269	+	0,273	0,280	0,289	0,304
	<b>S6</b>	0,229	0,230	+	0,225	0,227	0,229	0,232
	<b>S7</b>	0,062	0,062	+	0,062	0,062	0,063	0,063
	<b>S8</b>	0,121	0,136	+	0,173	0,193	0,200	0,219
	<b>S9</b>	0,063	0,063	+	0,062	0,063	0,064	0,063
	<b>S10</b>	0,074	0,073	+	0,074	0,074	0,076	0,074
	<b>S11</b>	0,109	0,173	+	0,191	0,227	0,240	0,258
	<b>S12</b>	0,163	0,179	+	0,184	0,190	0,199	0,213
	<b>S13</b>	0,066	0,213	+	0,264	0,281	0,297	0,301
	<b>S14</b>	0,216	0,216	+	0,216	0,216	0,217	0,216
	<b>S15</b>	0,278	0,337	+	0,350	0,372	0,382	0,396
	<b>S16</b>	0,309	0,490	+	0,548	0,611	0,699	0,706
	<b>S17</b>	0,061	0,102	+	0,106	0,116	0,135	0,152
<b>S23</b>	0,222	0,367	+	0,391	0,399	0,424	0,448	
<b>S25</b>	0,018	0,016	+	0,015	0,016	0,020	0,017	
	<b>S18</b>	0,018	0,101	+	0,133	0,154	0,180	0,199

<b>Levures</b>	<b>S19</b>	0,037	0,048	+	0,090	0,101	0,118	0,121
	<b>S21</b>	0,055	0,047	+	0,045	0,047	0,050	0,049
	<b>S22</b>	0,130	0,127	+	0,127	0,125	0,130	0,129
	<b>S24</b>	0,075	0,075	+	0,078	0,076	0,078	0,076
<b>CH</b>	<b>S20</b>	0,060	0,073	+	0,089	0,100	0,112	0,129
<b>T</b>	<b>Témoin</b>	0,000	0,002	-	0,000	0,001	0,000	0,000

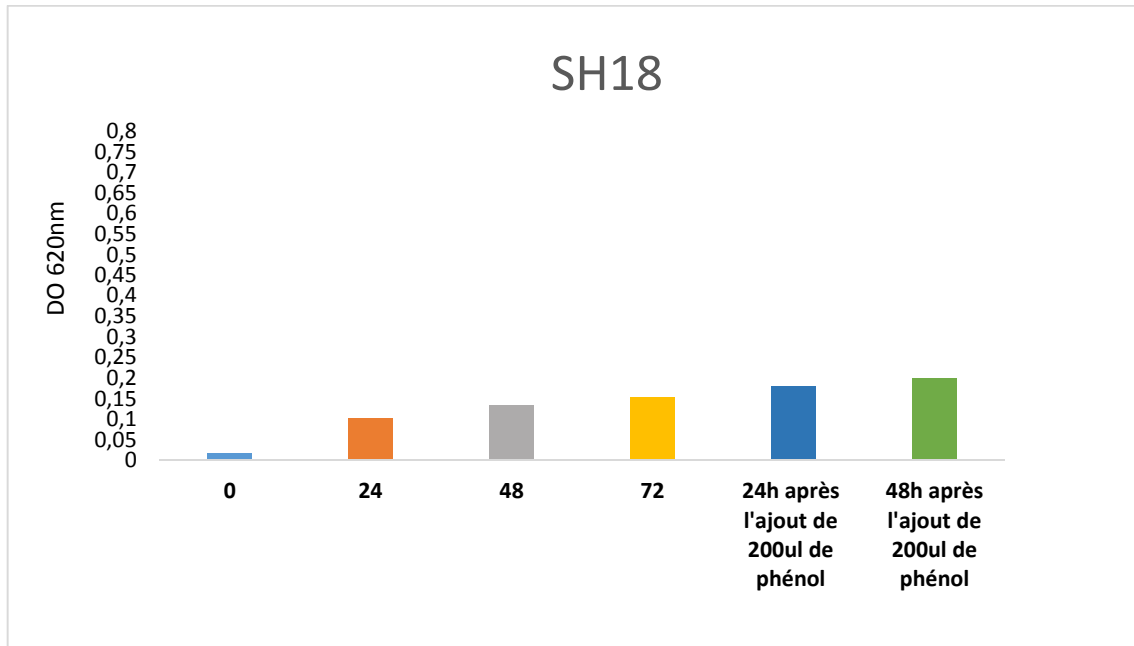
**DO** : Densité optique ; **CH** : Champignon ; **T** : Témoin ; (+) : Croissance ; (-) : Absence de croissance ; **S** : Souche ; **H** : Hydrocarbure ; **M** : Margine

Des histogrammes ont été réalisés pour les cultures qui présentent une augmentation significative de DO.



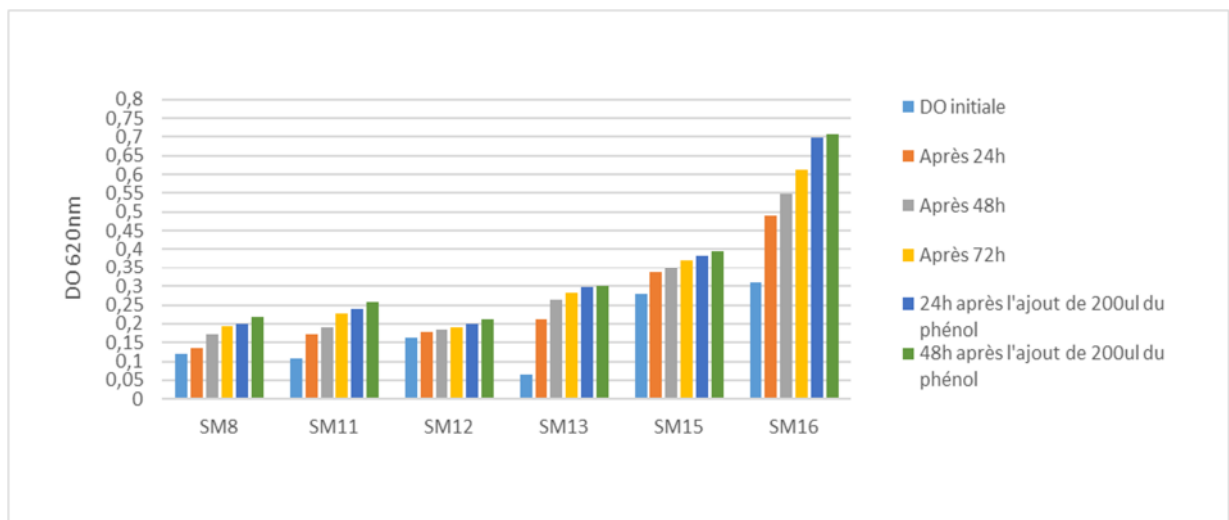
**Figure09:** Cinétique de biodégradation du phénol par les souches bactériennes isolées à partir de l'échantillon pollué par les hydrocarbures.

**SH:** souche isolée à partir du sol pollué par les hydrocarbures.



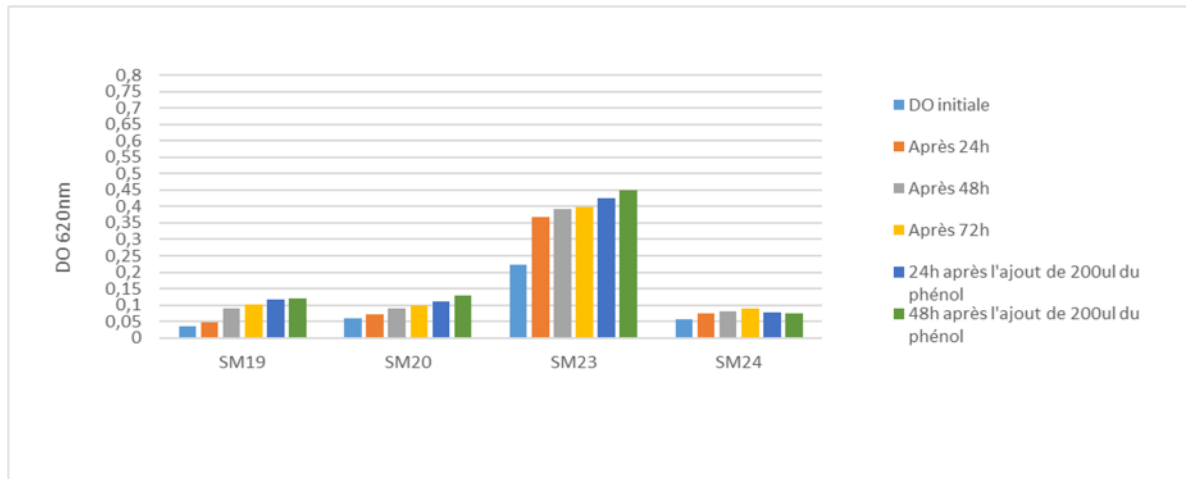
**Figure10:** Cinétique de biodégradation du phénol par les souches fongiques isolées à partir de l'échantillon pollué par les hydrocarbures.

**SH:** souche isolée à partir du sol pollué par les hydrocarbures.



**Figure11:** Cinétique de biodégradation du phénol par les souches bactériennes isolées à partir de l'échantillon pollué par les margines.

**SM:** Souche isolée à partir du sol pollué par les margines.



**Figure 12:** Cinétique de biodégradation du phénol par les souches fongiques isolées à partir de l'échantillon pollué par les margines.

**SM:** souche isolée à partir du sol pollué par les margines.

### 3. Caractérisations des margines

Cette caractérisation a permis d'évaluer les différents paramètres clés pour étudier les margines notamment le pH, la demande chimique en oxygène, le poids sec et la conductivité des margines. Elle a également fourni des informations précieuses sur la composition chimique, la charge polluante potentielle et les propriétés physiques de ces dernières.

**Tableau IX:** Quelques paramètres caractérisant les margines brutes et diluées.

Paramètre	Unité	Margines brutes	Margines diluées		
			10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>
Demande chimique en oxygène	g/L	26,108	4,033	0,352	0,023
Conductivité à 20°C	mS/cm	2,00 mS/cm	391000	282000	186100
	us/cm		us/cm	us/cm	us/cm
Potentiel hydrogène	/	4,98	5,45	6,94	7,35
Matière sèche	g/mL	0,032 ± 0,001	/	/	/
Taux d'humidité	%	96	/	/	/

### 3.1. Potentiel hydrogène

Pour les margines brutes, la valeur de pH est acide, elle est de 4,6. Cela indique une acidité relativement élevée des margines non diluées, ce qui peut être attribué à la présence d'acides gras libres et d'autres composés acides (acides phénoliques) issus du procédé de l'extraction de l'huile d'olive. Plusieurs chercheurs ont confirmé l'acidité des margines comme Niaounakis et al. (2004), Garcia et al. (2000) et Jaouani et al. (2006). Après la première dilution, le pH des margines atteint 5,45. Cette augmentation du pH peut être due à la dilution des acides présents dans les margines brutes. Cependant, la valeur reste acide, bien que moins élevée qu'à l'état brut. Après la deuxième dilution, le pH des margines augmente davantage pour atteindre 6,94. Cette augmentation suggère une diminution de l'acidité, ce qui peut être attribué à une dilution supplémentaire des acides présents. Enfin, après la troisième dilution, le pH atteint 7,35, ce qui est proche de la neutralité. Cette valeur indique que les margines ont été diluées suffisamment pour réduire l'acidité et se rapprocher d'un pH neutre.

Le pH proche de la neutralité favorise la croissance des bactéries et des champignons et facilite la biodégradation des hydrocarbures (Leahy et Cotwell, 1990). Ces variations de pH reflètent la présence d'acides gras libres dans les margines brutes et soulignent l'importance de leur gestion adéquate pour prévenir tout impact environnemental néfaste notamment sur le sol.

### 3.2. Conductivité

Les résultats obtenus pour les mesures de conductivité des margines révèlent des variations significatives. Pour les margines brutes, la conductivité est de 2,00 mS/cm. Cette valeur relativement élevée suggère la présence d'une concentration élevée d'ions dissous, tels que des sels et des minéraux, dans les margines non diluées. Après la première dilution, la conductivité des margines chute à 391  $\mu$ S/cm. Cette diminution de la conductivité indique une dilution des sels et des minéraux présents dans les margines brutes. Lors de la deuxième dilution, la conductivité diminue davantage pour atteindre 282  $\mu$ S/cm. Cette réduction supplémentaire suggère une dilution plus importante des ions dissous, ce qui est cohérent avec une diminution de la concentration des margines. Après la troisième dilution, la conductivité descend à 186,1  $\mu$ S/cm. Cette valeur indique une diminution significative de la concentration en ions dissous dans les margines, ce qui peut être attribué à la dilution croissante des margines.

L'interprétation de ces résultats révèle que les margines brutes présentent une conductivité relativement élevée en raison de la présence de sels et de minéraux comme l'étude de Adhoum

et *al.* (2004) et Achak et *al.* (2003) qui ont trouvé, respectivement, une valeur de 11,4 mS.cm<sup>-1</sup> et de 9,46 mS.cm<sup>-1</sup>. Cependant, à mesure que les margines sont diluées, la conductivité diminue progressivement, ce qui est en corrélation avec une diminution de la concentration des ions dissous. Ces variations de conductivité peuvent avoir des implications sur l'utilisation des margines comme amendement agricole, en particulier en ce qui concerne leur impact sur la salinité des sols lorsqu'elles sont appliquées.

### 3.3. Demande Chimique en Oxygène

Les résultats obtenus pour la demande chimique en oxygène (DCO) des margines montrent des variations significatives. Pour les margines brutes, la DCO est de 26,108 g/L. Cette valeur est faible par rapport aux résultats obtenus par Panizza et *al.* (2006) qui ont trouvé une valeur de 50 à 200 g d'O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> lors de leur mesure de la DCO des margines brutes. Ces valeurs indiquent une charge polluante importante des margines, témoignant de la présence de substances organiques oxydables dans ces résidus. Suite à la première dilution, la DCO des margines diminue considérablement pour atteindre 4,033 g/L. Cette réduction significative de la DCO suggère une diminution de la concentration des substances organiques oxydables due à la dilution des margines brutes. Lors de la deuxième dilution, la DCO continue de diminuer pour atteindre 0,352 g/L, indiquant une réduction supplémentaire de la charge polluante des margines. Après la troisième dilution, la DCO chute encore plus pour atteindre 0,023 g/L. Cette valeur proche de zéro indique une diminution significative de la concentration des substances organiques oxydables dans les margines, ce qui indique une dilution importante et une réduction considérable de la charge polluante.

L'interprétation de ces résultats démontre que les margines brutes présentent une DCO élevée, indiquant une forte charge polluante due à la présence de substances organiques oxydables. Cependant, à mesure que les margines sont diluées, la DCO diminue progressivement, ce qui suggère une réduction de la pollution organique dans les margines diluées ce qui est en concordance avec les études menées par Singh et Fulekar (2007) ainsi que Zahed et *al.* (2010) qui ont démontré une corrélation entre la diminution de la demande chimique en oxygène (DCO) et de la demande biologique en oxygène sur 5 jours (DBO<sub>5</sub>) avec la diminution de la concentration des hydrocarbures. Ces variations de la DCO sont cruciales pour évaluer l'impact environnemental des margines et pour développer des stratégies de traitement appropriées afin

de minimiser leur impact sur les écosystèmes terrestre et aquatique lors de leur élimination ou de leur utilisation.

### 3.4. Matière sèche

Les résultats obtenus pour la matière sèche des margines sont de 32 000 mg/l (ou 32 g/l). Hanafi et al ont obtenu une valeur de 213 mg/l, les résultats sont considérablement plus élevés. De plus, les résultats de Garcia et al. (1999) indiquent une valeur de 15 g/l.

Ces résultats suggèrent qu'il y a une variation importante dans la teneur en matière sèche des margines entre les différentes études. La matière sèche représente la proportion de matière restante après l'évaporation de l'eau dans les margines. Elle peut inclure des minéraux, des matières organiques et d'autres composés. La différence entre les résultats peut être due à plusieurs facteurs tels que les méthodes d'analyse utilisées, les conditions de collecte et de stockage des échantillons, ainsi que les variations naturelles dans les propriétés chimiques des margines en fonction de leur source et de leur traitement.

### 3.5. Taux d'humidité

Le taux d'humidité des margines est de 96%. La composition des margines a été déjà étudiée par Ranalli depuis 1991 et Lopez et al. (1996), ces auteurs ont trouvé des valeurs d'humidité comprise entre 82,4 % et 94,15 %. Ceci est due à l'abondante proportion d'eau faisant partie de la composition des olives, mais aussi aux quantités d'eau ajoutée lors du processus d'extraction de l'huile d'olive (Procida et al., 2006).

## 4. Test de croissance des isolats sur gélose supplémentée de margines brutes

Il a été observé que les souches SH1 à SM17, incubées à une température de 37°C, n'ont pas été capables de se développer sur la gélose nutritive additionnée de margines. Par conséquent, ces souches n'ont pas pu toléré ou utilisé les composés aromatiques présents dans les margines notamment les acides phénoliques et les tannins connus pour leur potentiel antimicrobien. En effet, les levures et les champignons présentent une meilleure aptitude à se développer dans ce milieu par rapport aux bactéries, comme l'a souligné Aissam (2003). Adebusoye et al. (2006) et Al-Wasify & Hamed (2014) ont rapporté qu'un seul organisme ne peut pas contenir toutes les enzymes nécessaires à la biodégradation des hydrocarbures. Il est donc possible qu'un microorganisme possède des enzymes ou des mécanismes spécifiques lui permettant d'utiliser efficacement le phénol comme substrat pour leur croissance mais ne peut

utiliser des composés plus complexes. Par contre, les souches SH18 à SM25 (dont la majorité sont des levures) ont démontré une capacité de croissance et de développement sur la gélose nutritive additionnée de margines (Figure 13), ce qui suggère leur capacité à tolérer et à métaboliser les composés aromatiques des margines. Ces résultats concordent avec les travaux de recherche menés par Aissam et *al.* (2022), qui ont isolé quarante souches de levures parmi lesquelles seulement huit souches ont pu croître sur un milieu à base de margine à 100%. Ces dernières étaient des souches de levures : *Saccharomyces capensis*, *Geotrichum candidum*, *zygosaccharomyces fermentât*, *hansenula kluyveri* et *candida boidinii*.



**Figure13:** Développement des souches SH18, SM19, SM20, SM21, SM22, SM23, SM24 et SM25 sur gélose nutritive additionnée de margines.

# Conclusion et perspectives

## Conclusion

L'objectif assigné à ce travail consiste à isoler des micro-organismes présents dans les sols contaminés par des composés aromatiques et ayant une capacité potentielle à dégrader des composés aromatiques comme source unique de carbone. Les résultats obtenus montrent la présence d'une population diversifiée de bactéries, de levures et de champignons dans les sols contaminés par les hydrocarbures et phénols aromatiques, démontrant ainsi leur capacité suffisante à dégrader efficacement les composés aromatiques, notamment le phénol.

L'étude du développement des vingt-cinq souches microbiennes isolées et purifiées en présence du phénol a permis de sélectionner les quinze souches les plus performantes, qui ont démontré une croissance rapide même face à une augmentation de la concentration du phénol dans le milieu.

Des tests pour évaluer la capacité de ces isolats à se développer après exposition au phénol ont été également effectués démontrant ainsi leur viabilité même en ayant pas pu croître en présence du phénol. Par ailleurs, toutes les levures ainsi que le champignon isolé ont réussi à se développer sur la gélose nutritive additionnée de margines, tandis que seulement deux souches bactériennes ont également montré cette capacité. En revanche, les 19 autres souches bactériennes n'ont pas été en mesure de se développer sur les géloses nutritives additionnée de margines, ce qui indique leur incapacité à consommer ou à tolérer les composés aromatiques présents dans ces dernières. En effet, les margines utilisées sont caractérisées d'une DCO élevée (26,1g/L) témoignant d'une charge polluante importante, mettant en évidence la présence de substances polluantes inhibitrice de la croissance microbienne.

Les micro-organismes isolés pourraient être exploités comme des outils précieux pour la bioremédiation des effluent liquides ou de sols contaminés, offrant une approche naturelle et durable pour restaurer les écosystèmes touchés. En perspectives, des travaux supplémentaires sont nécessaires pour l'identification de des isolats et l'optimisations des conditions de dégradation, ainsi que l'identification de mécanismes spécifiques de dégradation des différents composés aromatiques et d'évaluer l'applicabilité de cette technologie à grande échelle. Il est également souhaitable de développer des stratégies de bioremédiation efficaces et durables contribuant ainsi à la préservation de l'environnement, de la biodiversité et de la santé humaine.

# **Références bibliographiques**

**A**

**Aissam, H., Errachidi, F., Merzouki, M., & Benlemlih, M. (2002).** Identification of yeasts isolated from margins and study of their catalase activity. *Cahiers De L'Association Scientifique Européenne Pour L'Eau Et La Santé*, 7 (1), 23-30.

**Anderson, TH, Domsch, KH, & Ekelund, F. (2019).** Microbial activity and biomass in soil: effect of soil structure and soil organic matter content. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(3), 445-451.

**AkdemirEvrendilek, G. (2002).** Properties of some fruit and seed oils and potential use as a fuel. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 79(6), 677-680.

**Adebusoye S. A., Ilori M. O., Amund O. O., Teniola O. D. and Olatope S. (2006).** Microbial degradation of petroleum hydrocarbons in a polluted tropical stream. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(8), 1149-1159.

**Adhoum, N., & Monser, L. (2004).** Decolorization and removal of phenolic compounds from oil mill wastewater by electrocoagulation. *Génie chimique et transformation: Intensification des procédés*, 43 (10), 1281-1287.

**Achak, M., Mandi, L., & Ouazzani, N. (2009).** Removal of organic pollutants and nutrients from olive mill wastewater by a sand filter. *Journal of environmental management*, 90(8), 2771-2779.

**Asimakoula S, Marinakos O, Tsagogiannis E, Koukkou AI. (2023).** Phenol Degradation by *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3. *Microorganisms*, 11(2), 524.

**B**

**Bautista-Guerrero A, Lara-Diaz RA, Pihen V, Bandala ER, Sanchez-Sala JL. (2022).** Isolation and test of novel yeast strains with lignin usage capability and phenolic compound resistance. *Microbiologyopen*. 11(5), 1326.

**Boudjema, K., Fazouane-Naimi, F., Hellal, A., & Mechakra, A. (2009).** Optimization and model of lactic acid production by *Streptococcus thermophilus* on whey. *Science & Technology*, 29: 11-19.

**Brady, N. C., Weil, R. R., & Weil, R. R. (2008).** The nature and properties of soils, 13: 662-710.

**Barles, S., Breysse, D., Guillerme, A. & Laeyval, C., 1999.** Le Sol Urbain. Collection VILLES, Economica, Paris. 278p.

**Bouazza, L., Bodas, R., Boufennara, S., Bousseboua, H., & López, S. (2012).** Nutritive evaluation of foliage from fodder trees and shrubs characteristic of Algerian arid and semi-arid areas. *Journal of animal and feed sciences*, 21(3), 521-536.

**Bouderhem, A. (2011).** Use of autochthonous telluric bacterial strains in the biodetection and bioremediation of hydrocarbon-polluted soils. Mémoire de magister en biologie, option microbiologie appliquée université KasdiMerbah-Ouargla p 11.

**Belaloui, Z. (2020).** Biodegradation of monocyclic and aromatic hydrocarbons by environmental microorganisms. <http://dspace.univ-medea.dz:8080/handle/123456789/3099>

**Barooah M., Borthakur H.P. 1999.** Biodegradation of hydrocarbon in soil of upper Assam. *Journal of the Indian Society of Soil Science*, Vo1.47, N°1, PP 62-67.

## C

**ChenariBouket, A., Nasser, S., Mahvi, AH, Nabizadeh, R., Alimohammadi, M., Nazmara, S., & Azimi, A. (2020).** Removal of microbial contaminants and heavy metals from oil mill wastewater using a novel electrocoagulation/flotation reactor. *Journal of Environmental Management*, 256, 109981.

**Costa, A.S., et al., 2012.** Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass. *Bioresource Technology*, 105: p. 31-39.

**Crozier A. Jaganath I.B. and Clifford M.N. (2004).** Dietray phenotics, chemistry, bioavailability and effets on health. *National Product Reports*, 26(8), 1001-43.

**D**

**Debette, J., Losfeld, J., & Blondeau, R. (1975).** Numerical taxonomy of non-fermenting Gram-negative soil bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 21 (9), 1322-1334.

**Djerbaoui, AN (2010).** Use of indigenous bacterial strains for biosurfactant production and bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils in Hassi Messaoud.

**Daffri, A., Noumeur, S., Guenoune, S., & Bousseboua, H. (2008).** Cinetics of biodegradation of m-cresol by microbiote of constantines wastewater. *Sciences & Technologie. A, exact sciences*, 85-89.

**F**

**Farhadian, M., et al. (2008).** In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: a review. *Bioresource Technology*, 99(13): p. 5296-5308.

**François, A., Mathis, H., Godefroy, D., Piveteau, P., Fayolle, F., & Monot, F. (2002).** Biodegradation of methyl tert-butyl ether and other fuel oxygenates by a new strain, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2754-2762.

**Faraon, A., Santori, C., Huang, Z., Acosta, V. M., & Beausoleil, R. G. (2012).** Coupling of nitrogen-vacancy centers to photonic crystal cavities in monocrystalline diamond. *Physical review letters*, 109(3), 033604.

**Fernández-Bolaños, J., Felizón, B., Heredia, A., & Rodríguez, R. (2006).** Olive oil waste: a review of its generation, characterization and management. *Sustainable Development and Biodiversity*, 3(1), 1-15.

**Fridman, J., Savin, I., Ginzburg, B., & Černý, J. (2017).** Microplastics in five wastewater treatment plants in the Czech Republic. *Environmental Sciences and Pollution Research*, 24(24), 20360-20368.

**Fki, I., Allouche, N., & Sayadi, S. (2005).** The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3, 4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants. *Food Chemistry*, 93(2), 197-204.

**G**

**Galanakis, C.M., & Kotsiou, K. (2017).** Recovery of bioactive compounds from olive mill waste. Academic Press. Olive Mill Waste, 1(1): 205-229.

**Garcia Garcia P.R., Jiménez Peña J.L., Bonilla Venceslada A., Martin Martin M.A., Martin Santos E., Ramos Gomez, 2000.**« Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*», Proc. Biochem, 35, 751-758.

**Guermouche M.A., Bensalah F. and Gray N. (2013).** Application of molecular methods as a biomarker in bioremediation studies, International Journal of Biotechnology Applications. 5(1): 147-154.

**Goyer S., Jaouich A., Morency M. and Couillard D. (1995).** Site remediation technologies for contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons. Vecteur environnement. 28,1, pp. 43-51.

**Geoffrey, M., Perchet ,H . 2008.** Study of bioremediation of sediments contaminated by persistent organic nitrate compounds. Thèse de doctorat, l'institut national polytechnique de Toulouse, p .28 -31-32.

**H**

**Hinga, KR. 2003.** Degradation rates of low molecular weight PAH correlate with sediment TOC in marine subtidal sediments. Marine Pollution Bulletin 46 (4): 466-74.

**Huang, Y., Okey, A. B., & Harper, P. A. (1995).** Aromatic hydrocarbon receptor in cultured fetal cells from C57BL/6J and DBA/2J mice: similarity in molecular mass to receptors in adult livers. Canadian journal of physiology and pharmacology, 73(1), 18-26.

**Haritash, A. K., & Kaushik, C. (2009).** Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. Journal of Hazardous Materials, 169(1–3), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>.

**J**

**Jonsson, S., Persson, Y., Frankki, S., van Bavel, B., Lundstedt, S., Haglund, P., & Tysklind, M. (2007).** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in contaminated soils by Fenton's reagent: a multivariate evaluation of the importance of soil characteristics and PAH properties. *Journal of hazardous materials*, 149(1), 86-96.

**Jaouani A., Tabka MG., Penninckx MJ (2006).** Lignin modifying enzymes of *Coriolopsis polyzona* and their role in olive oil mill wastewaters decolourisation, *Chemosphere*. 62, 1421-1430.

**Jose, F. 1999.** Biodegradability test on hydrocarbon-contaminated soils, 3rd edition. Dunad. Paris.

**Jabeen, H., Iqbal, MZ, Khan, QM et Mahmood, Q. (2018).** Toxicity of benzene, toluene and xylene to fish: a review. *Environmental Sciences and Pollution Research*,25(5), 3984-3998.

**K**

**Kuppusamy, S., Maddela, N. R., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Kuppusamy, S., Maddela, N. R., & Venkateswarlu, K. (2020).** An overview of total petroleum hydrocarbons. *Total Petroleum Hydrocarbons: Environmental Fate, Toxicity, and Remediation*, 1-27.

**Katzenellenbogen, JA (2021).** Phenols. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH.

**L**

**Lotfabad, T. B., Shourian, M., Roostaazad, R., Najafabadi, A. R., Adelzadeh, M. R., &Noghabi, K. A. (2009).** An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 69(2), 183-193.

**Lopez M. J., Ramos-Cormenzana A., 1996.** Xanthan production from olive mill wastewaters. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 38, 263-270.

**Lal, R. (2009).** Soil carbon sequestration impacts global climate change and food security. *Sciences*, 304(5677), 1623-1627.

**Lecomte, P .1995.** Polluted sites, soil and groundwater treatment. Edition Lavoisier, TEC & DOC, p. 198.

**Leahy J.G and Colwell, R.R; 1990.** Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiological Reviews 54, 305-315.

**Lotfabad, T. B., Shourian, M., Roostaazad, R., Najafabadi, A. R., Adelzadeh, M. R., &Noghabi, K. A. (2009).** An efficient biosurfactant-producing *bacterium Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 69(2), 183-193.

**Li, M., Zhang, Q., Kipen, H., Wang, G., Ohman-Strickland, P., Zhang, L., & Olaguer, EJ (2020).** Association of China's standard air quality index with cardiorespiratory mortality: a nationwide time series analysis. PLoS medicine, 17(12), e1003464.

## M

**Martin Santos M.A., E. Ramos Gomez. (1999).** Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. 2, 751-758.

**Marchal, N. (1987).** Culture media for the isolation and biochemical identification of bacteria. Ed. Dion, Paris.

**Marshall, C. (2017).** Introduction to petroleum chemicals: based on lectures given at Manchester College of Science and Technology. Elsevier.

**Matuschek, G., & Spiteller, M. (2022).** Phenol: a multifaceted natural compound. Revues chimiques, 122(5), 3445-3471.

## N

**Niaounakis M, Halvadakis, 2004.** The effect of olive-mill technology. In G.Dardanos (Ed.). Olive-mill waste management, 57–71.

**P**

**Procida G, Cecon L. (2006).** Gas chromatographic determination of free fatty acids in olive mill waste waters. *Analytica Chimica Acta*, 561: 103–106.

**Panizza M, Cerisola G. (2006).** Olive mill wastewater treatment by anodic oxidation with parallel plate electrodes. *Water research* 4: 1179 – 1184.

**Pelmont , J. (2005).** Biodegradation and metabolisms. *Bacteria for environmental technology*. EDP science 17, avenue du Hoggar Parc d'activité de Courtaboeuf , Bp 11291944 Les Ulis cedex A, France.

**R**

**Record., 2007.** State of knowledge on the fate of organic pollutants in soils during natural biodegradation and after biotreatments: Identification of "metabolite" compounds and kinetics, n°05-05 13/1

**Ranalli, A., Lucera, L., & Contento, S. (2006).** Atmospheric pollution by waste from oil mills. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1696-1700.

**Rais, Z., Haji, M. E., Benabbou, M., Majbar, Z., Lahlou, K., Taleb, M., Zaytouni, Y., Rheribi, R., Bouka, H., & Nawdali, M. (2017).** Margines: processing, valorization in tomato seed germination and in the composting chain. *Journal of Water Science*. <https://doi.org/10.7202/1040064ar>

**S**

**Singleton, VL (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants using the Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152-178.

**Saeedi, M., Li, LY, Salmanzadeh, M. et Van den Brink, PJ (2019).** Effects of monocyclic aromatic hydrocarbons on plants and soil organisms: a review. *Environmental Pollution*, 249, 542-555.

**Sabzevari O., Yunesian M., Kobarfard F., et al. (2019).** Neurotoxic effects of chronic p-xylene exposure: a systematic review and meta-analysis. *Neurotoxicology*, 75:10-20.

**Salvemini F. (1985).** Composizione chimica e valutazione biologica di un Mangime ottenuto essicando tercemente le acque di vegetazione delle olive. Riv. Delle Sostanze Grasse, 112: 559-564p.

**Santos, V. L., & Linardi, V. R. (2004).** Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents identification and degradation potential. Process Biochemistry, 39(8), 1001-1006.

**Sarni-Manchado, P. & Cheynier, V. (2006).** Polyphenols in the food industry. Ed Tec et Doc Lavoisier, 02-11.

**Sudip K. Samanta, Om V. Singh et Rakesh K. Jain. (2002).** Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. TRENDS in Biotechnology. 20(6), 243-248.

**SANSOUCY R. (1984).** Use of olive by-products in animal feed in the Mediterranean basin, FAO, Rome.

**Snyder R., Hedli CC, Pan P. (2016).** Induction and repair of DNA damage by the benzene metabolite hydroquinone in normal human cells. Mutagenesis, 31(1), 45-53.

**Smith, A., Johnson, R. et Brown, A. (2018).** Fate and transport of monocyclic aromatic hydrocarbons in soil: a review. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 53(3), 216-225.

## T

**Terki Hassaine. F, (2013).** Influence of cobalt substitution by iron on the structural, electrical and magnetic properties of the pyrochlore compound of formula Bi<sub>1.56</sub> Sb<sub>1.48</sub> Co<sub>0.96</sub> O<sub>7</sub>. Magister's thesis, Mohamed Boudiaf University, Oran.

**V**

**Van Beilen, Jan B, Zhi Li, Wouter A Duetz, Theo HM Smits, & Bernard Witholt. (2003).** Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil & gas science and technology* 58 (4): 427-40.

**Van Hamme J.D., Sing A. et Ward O.P. (2003).** Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol.Mol.Bio.Rev.*67: 503-549.

**Vandecasteele, JP (2005).** Petroleum microbiology. Concepts. Environmental consequences. Industrial applications; P 186.

**Vollhardt, P., & Schore, N. (2018).** Organic chemistry: Structure and mechanisms. De Boeck supérieur.

**W**

**Walter, C., Bispo, A., Chenu, C., Langlais, A., & Schwartz, C. (2015).** Les services écosystémiques des sols : du concept à sa valorisation. *HAL Open Science*, 15, 53–68.

**Y**

**Yang Y, Zhang Y, Liu C, Su Z, Zhao R, Zhou J. (2023).** Low-temperature phenol-degrading microbial agent: construction and mechanism. *Arch Microbiol.* 205(5):193.

**Z**

**Zhang R, Wang X, Ali A, Su J, Wang Z, Li J, Liu Y. (2022).** Single-step removal of calcium, fluoride, and phenol from contaminated water by *Aquabacterium sp. CZ3* via facultative anaerobic microbially induced calcium precipitation: Kinetics, mechanism, and characterization. *Bioresour Technol.* 361:127707.

**Zahed M. A., Hamidi A., M. Hasnain Isa et L. Mohajeri. (2010).** Effect of initial oil concentration and dispersant on crude oil biodegradation in contaminated seawater. *Bull Environ Contam Toxicol.* 84:438–442.

**Zobell S. (1946)** Microbial degradation of petroleum hydrocarbons an environmental perspective. 108-119.

# **Annexes**

**Annexe 01: Matériel non biologique.****Verreries, produits et réactifs et autre matériel**

<b>Verreries</b>		<b>Autre matériel</b>		<b>Produits</b>	
1.	Béchers	11.	Anse de platine	1.	$K_2HPO_4$ (3,4g/l)
2.	Erlenmeyers 500ml	12.	Bec bunsen	2.	$KH_2PO_4$ ... (4,3g/l)
3.	Flacons	13.	Papier aluminium	3.	$MgCl_2 \cdot H_2O$ (0,3g/l)
4.	Fiole	14.	Papier filtre	4.	$(NH_4)_2SO_4$ ... (1)
5.	Entonnoir	15.	Papier film	1.	Extrait de levure (mg/l)
6.	Eprouvette	16.	Papier génique	(0,05)	
7.	Biote de pétrie	17.	Coton stérile	2.	$MnCl_4 \cdot 4H_2O$ ... 1mg/l
8.	Lames et Lamelles	18.	Barreau magnétique	3.	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,6mg/l)
9.	Pipette pasteur	19.	Micropipette	4.	$CaCl_2 \cdot H_2O$ (2,6mg/l)
10.	Tube à essai	20.	Embouts	5.	$Na_2MoO_4 \cdot H_2O$ (6mg/l)
		21.	Gants jetables	6.	pH ... (6,8)
		22.	Bavettes médicales jetable	7.	NaOH 4N
		23.	Marqueur		Chloramphénicol → Antibiotique Phénol → Composé aromatique Margines → polluant

**Appareillage**

<b>Appareils</b>	<b>Références</b>
Autoclave	SYSTEC
Bain-marie	OLS200 GRANT
Balance	METTLER TOLEDO max =120g d= 0,0001g
Agitateur	STUAN SB 162-3
Incubateur	Memmert
Congélateur et Réfrigérateur	GREEN ION DOOR COOLING LG CHILLER 0°/+10°C TECNODOM
pH mètre	METTLER TOLEDO I/L 00110239
La hotte	EUROCLONE S.p.A. I/L 00110183

**Annexe 02: Milieux de cultures****Composition des milieux de cultures :****1. Gélose nutritive**

Extrait de levure.....	2,5g
Extrait de viande.....	1,0g
Peptone.....	5,0g
Chlorure de sodium.....	5,0g
Agar.....	15,0g
Eau distillée.....	quantité suffisante pour 1000ml
pH.....	7,0

**2. Bouillon nutritif**

Peptone.....	5,0g
Extrait de viande de bœuf.....	3,00g
Eau distillée.....	quantité suffisante pour 1000ml
pH.....	7,20g

**3. Eau physiologique**

Eau distillée.....	quantité suffisante pour 1000ml
NaCl.....	9g

**4. Milieu MM :**

$K_2HPO_4$ .....	3,4g
$KH_2PO_4$ .....	4,3g
$MgCl_2 \cdot H_2O$ .....	0,3g
$(NH_4)_2SO_4$ .....	1g
5 ml de solution d'éléments minérales en trace (mg /l)	
$MnCl_4 \cdot H_2O$ .....	1mg

FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O..... 0,6 mg  
CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O..... 2,6 mg  
Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O.....6 mg  
pH ..... 6,8

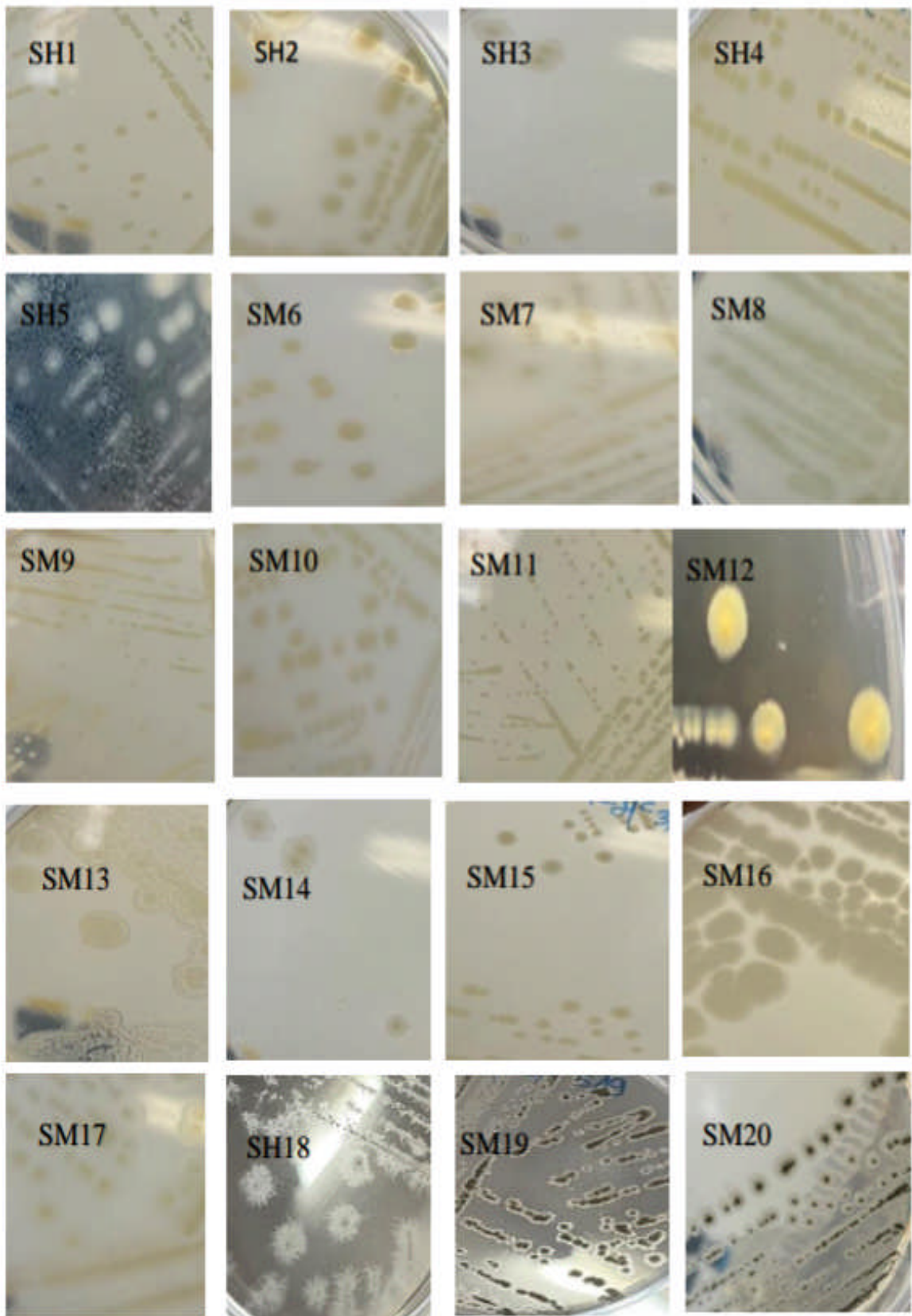
**5. Solution phénol :**

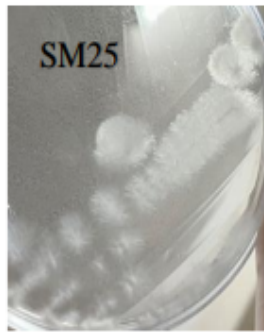
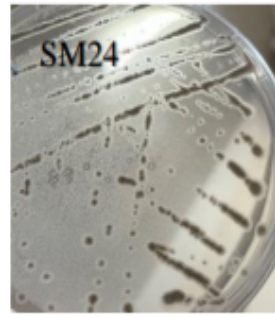
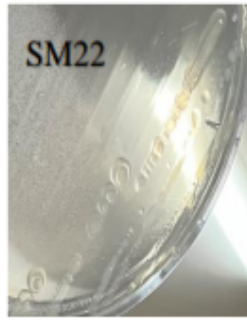
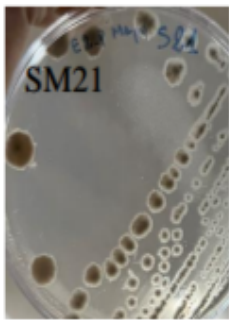
Phénol en cristaux.....5g  
L'eau distillé.....quantité suffisante pour100ml

**6. Milieu GN additionné de margine :**

Eaux distillé.....500ml  
Margines filtrées.....500ml  
Bouillon nutritive.....8g  
Agar-Agar.....18g

## Annexe 3 : Aspect macroscopique des isolats





## Résumé

Le déversement de polluants aromatiques dans la nature sans aucun traitement préalable entraîne des problèmes environnementaux majeurs, notamment la pollution du sol, de l'eau et de l'air. La biodégradation, processus naturel par lequel les micro-organismes dégradent les hydrocarbures, offre une solution prometteuse pour atténuer ces effets. Dans cette optique, un total de vingt-cinq souches variant en taille, couleur et apparence ont été isolées par enrichissement sélectif en utilisant du phénol ou des margines. En se basant sur leur caractérisation macroscopique et microscopique, dix-neuf bactéries, cinq levures et un champignon ont pu être identifiés. Les résultats obtenus ont révélé que quinze parmi les vingt-cinq souches isolées ont démontrés une efficacité notable dans l'utilisation du phénol en tant qu'unique source de carbone. Parmi ces souches bactériennes, SM16, SM15, SM23, SH2 et SH3 ont présenté une croissance particulièrement remarquable. Par ailleurs, seulement huit souches sont capables de croître sur gélose nutritive supplémentée de margines brutes, il s'agit de cinq levures, deux bactéries et un champignon. A travers cette investigation, des micro-organismes sont isolés et sélectionnés pour leur aptitude à dégrader ou à tolérer des composés aromatiques, notamment le phénol ou les margines. Cette étude ouvre de nouvelles perspectives quant à l'utilisation des souches isolées dans la dépollution après optimisation du bioprocédé de dégradation.

**Mots clés:** Sol, hydrocarbures, composés aromatique ,biodégradation, microorganismes, margines, phénol.

## **Abstract**

The untreated discharge of aromatic pollutants into the environment leads to major environmental problems, including soil, water and air pollution. Biodegradation, the natural process by which micro-organisms degrade hydrocarbons, offers a promising solution to mitigate these effects. With this in mind, a total of twenty-five strains varying in size, color and appearance were isolated by selective enrichment using phenol or margines. Based on their macroscopic and microscopic characterization, nineteen bacteria, five yeasts and one fungus were identified. The results revealed that fifteen of the twenty-five strains isolated demonstrated significant efficiency in utilizing phenol as the sole carbon source. Among these bacterial strains, SM16, SM15, SM23, SH2 and SH3 showed particularly remarkable growth. On the other hand, only eight strains were able to grow on nutrient agar supplemented with raw margines: five yeasts, two bacteria and one fungus. Through this investigation, micro-organisms were isolated and selected for their ability to degrade or tolerate aromatic compounds, notably phenol or margines. This study opens up new prospects for the use of the isolated strains in depollution after optimization of the degradation bioprocess.

**Keywords:** Soil, hydrocarbons, aromatic compounds ,biodegradation, microorganisms, margines, phenol.