

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة امحمد بوقرة- بومرداس  
UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA DE BOUMERDES

Faculté Des Sciences  
Département de Biologie

**Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du  
Diplôme de Master**

*Filière Sciences Biologiques*  
*Spécialité Biotechnologie Microbienne*

**Biodégradation du Phénol par des Archées  
Halophiles et Production de Biomolécules**

Présenté par : *Melle BAZIZ Meriem*  
*Melle BOUGRIOUA Manel*  
*Melle MECHERI Saara*

**Devant le jury:**

Mme KHEMILI-TALBI S.	Maitre de conférences/A (U.M.B.B)	Présidente
Mme GANA-KEBBOUCHE S..	Professeur (U.M.B.B)	Examinatrice
Mme AKMOUSSI-TOUMI S.	Maitre de conférences/B (U.M.B.B)	Promotrice

*Année Universitaire 2019 – 2020*

# Remerciements

*Nous rendons grâce à Dieu de nous avoir donné le courage, la santé physique et mentale pour compléter cette maîtrise et l'infinité de belles choses qu'il nous ait accordé et pour avoir illuminé notre chemin et soutenu notre pas. Ce travail est l'aboutissement d'un long chemin au cours duquel nous avons bénéficié de l'encouragement et du soutien de plusieurs personnes.*

*Nous tenons tout d'abord à adresser nos plus vifs et sincères remerciements à notre directrice de mémoire, **AKMOUSSI-Toumi Siham**, pour son expérience, son temps, ses conseils constructifs, sa confiance tout au long de ces années qui nous a fait vivre cette unique expérience très enrichissante. Qu'elle trouve ici l'expression de notre entière gratitude et le témoignage de notre grande estime.*

*Nous exprimons notre gratitude aux membres de jury pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nous témoignons nos vifs remerciements à Madame **KHEMILI-TALBI S.**, Maître de conférences/A à L'U.M.B.B qui a bien voulu présider le jury de ce Mémoire de Master, Madame **GANA-KEBBOUCHE S.**, Professeur à L'U.M.B.B qui nous ont honoré d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Un projet de Mémoire ne se réalise jamais seul, c'est pourquoi nous souhaiterions ici remercier toutes les personnes qui ont participé à des années d'aventure scientifique et humaine. Nous souhaiterions tout d'abord exprimer nos remerciements à tous les enseignants de notre cursus universitaire pour leur aide et leurs orientations.*

*On assure de notre profond reconnaissance Mr **KHOUDJA** le Directeur de Centre de Recherche et Développement CRD – SONATRAC et Mme **BENCHOUK Amina**, du Laboratoire de Microbiologie, pour avoir accepté de nous accueillir malgré leurs nombreuses sollicitations, on les remercie vivement pour cette collaboration fructueuse qui malheureusement n'a pas connus de lumière à cause de la situation sanitaire du pays.*

*Nos remerciements vont également à notre cher, enseignant **BENNOUI F.**, à L'UMB pour son orientation, sa disponibilité, sa rigueur scientifique et surtout ses conseils précieux qui ont alimenté notre réflexion.*

*Un remerciement assez spécial à l'ingénieur **MALKI Med L.**, quoi qu'on fasse, quoi qu'on dise, on ne saura point vous remercier comme il se doit. Votre présence malgré la distance a toujours été notre source de force pour affronter les obstacles.*

*Enfin, nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à nos familles et tous nos amis. Merci pour votre compréhension.*

# *Dédicace*

*Merci au bon dieu le tout puissant de nous avoir aidés à réaliser ce modeste travail.*

*A la mémoire de « mes parents », mes premiers maîtres qui m'ont donné la vie en me donnant de leur savoir, qui m'ont appris à honorer la science et à l'élever au-dessus de tout obstacle. Vous avez été les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais...*

*Ma chère maman **MALIKA**, qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau. Ni sacrifices, ni privations ne l'ont empêché, d'accomplir son devoir de mère soucieuse de l'avenir de ses enfants.*

*Mon cher papa **HOUCINE**, qui a su se montrer patient, compréhensif et encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.*

*A la mémoire de mes frères **Abderezak, Aghilas**, aucunes dédicaces ne sauraient exprimer tout l'amour que j'ai pour vous. Je suis très reconnaissant et je ne vous remercierai jamais assez pour votre aide et gentillesse qui n'a cessé d'être présent à mes côtés.*

*A mes sœurs **Meriem, Hayet, Amira, Nadira** lumière de mes jours vous êtes tout pour moi ! L'inépuisable source d'affection, le soutien quotidien indéfectible, vous m'avez redonné le courage de me relever et d'aller de l'avant. Toute ma gratitude.*

*A mes adorables amis ; **Manel, Meriem, Insaf, Hadjer, Souhila, Lamia, Ahlem, Rania et Salim.***

*Ames deuxième famille **BOUGRIOUA et BAZIZ** grands et petits, sans oublier: Tata **Farida** et Tata **Fatma** ancles **Aissa** , ancles **Belkacem** que dieu le tout puissant, bénisse son âme..*

*A **Abdelhalim . F** qui n'a jamais cessé de me soutenir et de m'encourager: Jamais de simples mots ne me permettront de t'exprimer mes remerciements.*

*A toute ma famille.*

*Ainsi qu'à tous ceux qui me sont chers. Qui était toujours à mes côtés et*

*Que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que vous n'avez tous cessé de formuler dans vos prières.*

**Saara**

# Dédicace

*Je dédie ce modeste travail et ma profonde gratitude à tous ceux qui ont sacrifié pour m'offrir les conditions propices à ma réussite :*

***A mon très cher père Bougrioua Belkacem** Toute l'encre du monde ne pourrait suffire pour exprimer mes sentiments envers un être très cher. Vous avez toujours été mon école de patience, de confiance et surtout d'espoir et d'amour. Vous êtes et vous resterez pour moi ma référence, la lumière qui illumine mon chemin. Ce travail est le résultat de l'esprit de sacrifice dont vous avez fait preuve, de l'encouragement et le soutien que vous ne cessez de manifester, j'espère que vous y trouverez les fruits de votre semence et le témoignage de ma grande fierté de vous avoir comme père. J'implore Dieu, tout puissant, de te reposer en paix et que Allah t'accueille et nous réunisse dans son éternel paradis.*

***A ma très chère mère Farida** Aucune dédicace très chère maman, ne pourrait exprimer la profondeur des sentiments que j'éprouve pour vous, vos sacrifices innombrables et votre dévouement firent pour moi un encouragement. Vous avez guetté mes pas, et m'avez couvé de tendresse, ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Puisse Dieu, tout puissant vous combler de santé, de bonheur et vous procurer une longue vie.*

***A ma unique Sœur Meriem** Aucune dédicace ne peut exprimer mon amour et ma gratitude de t'avoir comme sœur. Je ne pourrais jamais imaginer la vie sans toi, tu comptes énormément pour moi, tu es la sœur qui assure son rôle comme il faut, je n'oublierais jamais ton encouragement et ton soutien le long de mes études, je t'aime beaucoup.*

***A mon beau frère Adel** pour l'encouragement permanent, et le soutien moral.*

***A mon neveu Adem** Avoir un neveu est le plus beau cadeau qu'une sœur puisse vous faire. Tu as apporté beaucoup de bonheur à notre famille. Je t'aime*

***A Mes chères Trinômes Saara et Meriem** avec lesquels j'ai passé des années inoubliables, et qui m'ont aidée lors de la rédaction de ce mémoire. Qui ont toujours été là pour moi. Pliablestien inconditionnel et leurs encouragements ont été d'une grande aide.*

***A TOUTE MA FAMILLE** Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour votre soutien et encouragements. Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que vous m'offrez quotidiennement et votre bonté exceptionnelle. Que Dieu le Tout Puissant vous garde et vous procure santé et bonheur.*

***A la famille Bazziz et Mecheri** Je vous dédie ce travail et je vous remercie pour l'estime et l'affection que vous m'avez accordée durant la préparation de mémoire et surtout mes chères tantes **Malika et Fatma** et mes chères ancies **Aissa et Hocine**.*

***A mes amies Insaf, Manel, Sara, Fatiha, Hadjer, Ahlem, Lamia, Souhila, Rania**, vous êtes pour moi des sœurs et des amies sur qui je peux compter. Je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

**Manel**

# Dédicace

*Je tiens tout d'abord à remercier le bon Dieu de m'avoir aidé à réaliser ce travail.*

*Je dédie ce travail:*

*A Mes très chers parents, mes premiers maîtres qui m'ont donné la vie en me donnant de leur savoir, qui m'ont appris à honorer la science et à l'élever au-dessus de tout obstacle.*

*Vous avez été les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais, que Dieu les protèges.*

*A ma merveilleuse mère "Fatma" qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que je puisse finir mes études. Ni sacrifices, ni privations ne l'empêché d'accomplir son devoir de mère.*

*A mon cher père Aissa qui a su se montrer patient, compréhensif et encouragement, qui a été un grand réconfort pour moi.*

*A Mohammed lamine qui était toujours à mes côtés et qui n'a jamais cessé de me soutenir et de m'encourager: Jamais de simples mots ne me permettront de t'exprimer mes remerciements mon très cher mari.*

*A Ma grande mère Khadoudja et ma belle-mère Fatouma Merci pour leur présence, leur aide, leur compréhension et leur amour.*

*Ainsi qu'à tous ceux qui me sont chers.*

*A mes chères sœurs Aicha, Djamila et Chaima pour leur aide morale et matériel et que j'aime plus que les mielleuses sœurs du monde.*

*A mes chers frères Youcef, Hicham qui ont montré une totale disponibilité à chaque sollicitation, que le dieu les gardent.*

*A mes proches amies, Fatiha, Hadjar, Ahlem, Lamia, Souhila, Rania, Nariman, Aicha, Abir et Khadidja pour l'aide et la disponibilité à chaque moment. Et l'amie d'enfance Rahima qui partagent ma petite vie de tous les jours et qui m'ont soutenue moralement pendant toute cette période de préparation. Et surtout mes chers amies et trinôme "Bougrioua Manel" et "Mecheri Saara" qui ont m'accompagné lors de ce recherche. et sans oublier leur famille, mes chères tantes Malika et Farida et mon ancles Houcine et a la mémoire de mon ancles Belkacem. que dieu le tout puissant, bénisse son âme.*

*A Mme Bougrioua Meriem, qui n'a cessé d'être présent.*

*A tous mes enseignants de tout mon cursus.*

*A tous mes amis(es) et tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.*

**Meriem**

# Sommaire

## Liste des abréviations

## Liste des figures

## Liste des tableaux

Introduction	1
--------------	---

## *Chapitre I : Synthèse bibliographique*

I.1 Les écosystèmes aquatiques salins contaminés par les hydrocarbures	3
I.1.1 Les environnements salins et hypersalins	3
I.1.2 Marées noires	4
I.1.3 Origine des hydrocarbures dans les écosystèmes aquatiques salins	5
I.1.4 Contamination des milieux aquatiques salin par les hydrocarbures, en particulier phénol.	5
<i>I.1.4.1 Propriété physico-chimiques phénol</i>	6
<i>I.1.4.2 Techniques de dépollution des environnements pollués par le phénol</i>	7
I.1.5 Biodégradation du phénol	8
<i>I.1.5.1 Les dioxygénases</i>	8
I.1.6 Microorganismes aptes à la biodégradation les hydrocarbures	9
<i>I. 1.6.1 Microorganismes halophiles</i>	9
<i>I.1.6.2 Applications actuelles et potentielles des halophiles.</i>	11
<i>I.1.6.3Biodégradation du phénol par des microorganismes halophiles</i>	13

## *Chapitre II : Matériels et Méthodes*

<b>II.1 Matériels</b>	15
II.1.1 Matériels non biologiques	15
II.1.2 Matériels biologiques	15
II.1.3 Milieux de culture	15
<b>II.2 Méthodes</b>	16
II.2.1 Revivification des souches bactériennes	16
II.2.2 Vérification de la pureté de la souche	16

II.2.3 Essai de biodégradation du phénol par les souches halophiles extrêmes	18
II.2.3.1 Préculture	18
II.2.3.2 Culture en batch	18
II.2.3.3 Suivi de la fermentation	18

### ***Chapitre III : Résultats et discussion***

III.1 Essai de biodégradation du phénol par les souches halophiles extrêmes	24
III.1.1 Adaptation des souches halophiles extrêmes au phénol	24
III.1.2 Croissance cellulaire sur des composés hydrocarbonés comme seule source de carbone et d'énergie.	24
III.1.3 Évaluation de la biodégradation du phénol par les souches halophiles extrêmes.	25
III.1.4 Effets de la température et du pH et de salinité sur la stabilité des biosurfactants bruts	28
<b>Conclusion et perspectives</b>	31
<b>Références bibliographiques</b>	32
<b>Résumé</b>	

## **Liste des abréviations**

**DO** : Densité Optique.

**E24** : Index d'émulsification.

**HAM** : Les hydrocarbures aromatiques monocycliques.

**POM** : polyoxométallates.

**C.R.D** : laboratoire de centre de recherche et de Développement de Sonatrach.

**BMBEAP** : Biodiversité Microbienne et Biotechnologies des Ecosystèmes Aquatiques salins et Pétroliers.

**Rpm** : Round Per Minute.

**BSA** : l'albumine de sérum de bœuf.

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Exemples d'environnements hypersalines athalassohalines: la Mer Morte.	3
<b>Figure 1:</b> Photographie de Sebkhia EzzemoulAïnM'lila (Algérie).	4
<b>Figure 3:</b> Remorquage d'une plateforme gravitaire d'exploitation d'hydrocarbures en mer du Nord.	5
<b>Figure 4:</b> Mode de clivage du phénol par voie ortho ou méta	9
<b>Figure 6:</b> Les deux modes de clivage du noyau aromatique intermédiaire par les catéchols dioxygénases: o-fission : pour fission en ortho; m-fission : pour fission en méta.	19
<b>Figure 7:</b> Test d'émulsification.	23
<b>Figure 8:</b> Effet de la température (a), (b) sur la stabilité du biosurfactant.	28
<b>Figure 9:</b> Effet de PH (a), (b) sur la stabilité du biosurfactant.	29
<b>Figure 10:</b> Effet de la salinité sur la stabilité du biosurfactant.	30

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Propriétés physico-chimiques des phénols	7
<b>Tableau 2:</b> Applications industrielles actuelles et potentielles des micro-organismes halophiles	12
<b>Tableau 3:</b> La composition des milieux SH et SH modifié	16
<b>Tableau 4:</b> Tension superficielle (ST) et indice d'émulsification (E24) au kérosène pour la souche <i>Natrialbasp.C21</i> après 15 et 22 jours d'incubation, à 200 rpm, 40°C, pH 7,0 et NaCl 25%	27
<b>Tableau 5:</b> Indice émulsifiant (E24) du surnageant produit par la souche <i>Natrialbasp.C21</i> après 22 jours d'incubation, à 200 rpm, 40°C, pH 7,0 et 25% de NaCl sans cellules avec différents hydrocarbures utilisés comme substrats pour le test E24	27

**Introduction**

**Générale**

## **Introduction**

Le phénol est l'un des principaux polluants organiques présents dans les eaux usées industrielles. Il est rejeté par de nombreux procédés industriels tels que la transformation du textile, la gazéification du charbon, le raffinage du pétrole, la fabrication du cuir, la synthèse de résine, le rouissage de la noix de coco, la production de parfums et la fabrication pharmaceutique (**Gianfreda et al., 2006; Kiliç, 2009; Schie et Young, 2000; Arya et al., 2011; Ravikumar et al., 2011**).

Les déversements de produits chimiques peuvent également augmenter la possibilité de rejet de phénol dans l'environnement océanique. Par exemple, un total de 400 tonnes de phénol s'est déversé sur un quai et dans l'eau de mer du port de Göteborg, en Suède, en 1973 (**HELCOM, 2002**). Lorsqu'il est introduit dans l'environnement aquatique, le phénol peut constituer un danger écologique sérieux en raison de sa toxicité même à de faibles concentrations. Les processus physico-chimiques courants de traitement des eaux usées phénoliques sont l'ozonation, le réactif de Fenton, les UV et le peroxyde d'hydrogène, mais ces méthodes sont coûteuses, nocif pour l'environnement et inapproprié pour de grands volumes d'eaux usées (**ElAhwany et Mabrouk, 2013; Lobo et al., 2013**).

Parmi les diverses méthodes disponibles pour éliminer le phénol, la biodégradation est la plus prometteuse en raison de sa viabilité économique, de son respect de l'environnement et de sa faisabilité pratique (**Bonfá et al., 2013; Jiang et al., 2015, 2016**): cependant, ce processus est difficile dans des conditions salines ou hypersalines. Dans de nombreuses eaux usées industrielles, des sels inorganiques solubles coexistent avec des composés phénoliques. On estime que 5% des eaux usées industrielles sont salines ou hypersalines (**Le Borgne et al., 2008**).

Le phénol peut être dégradé par de nombreuses espèces de bactéries qui poussent dans des environnements d'eau douce, telles que *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Achromobacter*, etc. (**Li et al., 2010; Shahriari Moghadam et al., 2016; Felshia et al., 2017; Aneela et al., 2018**): cependant, lorsqu'ils sont exposés à une pression osmotique élevée résultant de l'augmentation de la salinité, ils ne survivront généralement pas et perdront leur activité métabolique (**Castillo-Carvajal et al., 2014**). D'où la nécessité de faire appel aux microorganismes halophiles en raison de leur utilisation potentielle dans l'assainissement

des environnements à haute salinité impactée par les hydrocarbures (Dalvi et al., 2014 ; Li et al., 2019).

Notre travail représente un aperçu des études réalisées sur l'évaluation de la biodégradation du phénol par des souches halophiles extrême.

Ce travail de synthèse est subdivisé en trois parties :

- ✓ La première est dédiée à une synthèse bibliographique dans lequel on présentera les généralités sur les environnements hypersalins, leurs compositions en hydrocarbures en particulier le phénol, les différentes techniques de décontamination ainsi que les microorganismes halophiles aptes à la dégradation du phénol y sont également présentées.
- ✓ La seconde partie est consacrée à la présentation des matériels et méthodes utilisées par différents auteurs sur l'étude de la biodégradation du phénol par des souches halophiles extrêmes et production de biomolécules.
- ✓ Les résultats des différents articles traités sont résumés et discutés dans la troisième partie, suivis par une conclusion générale accompagnée de perspective.

**Synthèse**

**Bibliographique**

## ***Chapitre I : Synthèse bibliographique***

### **I.1 Les écosystèmes aquatiques salins contaminés par les hydrocarbures**

A la suite d'un déversement des hydrocarbures dans les milieux aquatiques, le devenir de ces derniers dépend de plusieurs facteurs tels que leurs natures, leurs compositions et le type de milieu. Parmi ces milieux aquatiques, il y a les environnements salins, hypersalins, et les marées noires.

#### **I.1.1 Les environnements salins et hypersalins**

Une variété d'écosystèmes salins et hypersalins est présente sur terre. La concentration en sel dans ces milieux peut varier de 3,5% (m/v) de sels dissous totaux, comme dans l'eau de mer, à des concentrations proches de la saturation (35%). Les environnements hypersalins sont ceux qui contiennent des concentrations de sel supérieures à l'eau de mer (**Le Borgne et al., 2008**).

Les milieux aquatiques salins et hypersalins peuvent être classés en deux catégories athalassohalin ou en thalassohalin selon leur origine : Les **thalassohalins** qui sont des environnements tenant leur origine de l'évaporation des eaux de mer et par conséquent leur composition ionique est la même ; l'autre groupe correspond aux environnements **athalassohalin** principalement formées à partir des dépôts de sel dus aux évaporations dans les eaux intérieures ; ils ne sont pas d'origine marine dont la composition ionique diffère complètement de celle de l'eau de mer (**Le Borgne et al., 2008**).



**Figure 1:**Exemples d'environnements hypersalines athalassohalines: la Mer Morte (**Google Earth**).

Les deux plus grands lacs hyper-salés étudiés sont : le Grand Lac salé à l'Ouest des Etats Unis et la Mer Morte au Moyen Orient (**Figure 1**). Outre ces deux principaux lacs, on peut citer : des chotts et sebkhas qui sont des vases salées périodiquement inondables surtout pendant la saison des pluies et recouvertes par des croûtes salines pendant la saison sèche (**Figure 2**) (**Kharroub, 2007**).



**Figure 2:** Photographie de Sebkhia Ezzemoul Aïn M'lila (Algérie) (**Kharroub, 2007**).

### **I.1.2 Marées noires**

La production industrielle d'**hydrocarbure** autant que leur utilisation inappropriée, leur élimination incorrecte et les pertes accidentelles liées à leur extraction ou à leur transport entraîne la pollution de nombreux environnements, depuis le 19<sup>e</sup> siècle. Les marées noires figurent parmi les exemples les plus flagrants de pollution liée aux hydrocarbures. Celle survenue dans le golfe du Mexique en 2010 en raison de l'explosion de la plate-forme pétrolière Deepwater Horizon a été décrite comme le pire désastre environnemental aux États-Unis. Plus de 800 millions de litres de pétrole brut ont été déversés dans le golfe du Mexique, causant des dégâts irréversibles sur la faune et la flore et menaçant plus d'une cinquantaine d'espèces marines, sans compter les oiseaux et animaux englués dans le pétrole sur les plages. À la suite de cette marée noire, les scientifiques et les pêcheurs ont remarqué des mutations et des difformités chez de nombreuses espèces marines (crevettes sans yeux, ou encore crabes à carapace molle et plus petits que la normale) (**Xue et al., 2015**).

### **I.1.3 Origine des hydrocarbures dans les écosystèmes aquatiques salins**

Les hydrocarbures aromatiques monocycliques (HAM) tel le phénol et les hydrocarbures aliphatiques tel l'hexane sont très répandus dans les milieux marins. Chaque année, des millions de tonnes de ces hydrocarbures contaminent les environnements aquatiques principalement à partir de sources anthropiques, mais aussi à partir de sources naturelles (Feknous, 2017).

Les hydrocarbures pétroliers qui arrivent dans l'environnement marin peuvent avoir quatre origines majeures : les sources géochimiques, l'extraction de pétrole, le transport et la consommation. La part des sources géochimiques dues à des fuites naturelles qui apparaissent au fond des océans s'élève à 47 %. Les 53 % restant se répartissent ainsi : 38 % proviennent des rejets suite à la consommation (exemple: rejets d'industries basées à terre et des grandes agglomérations urbaines), 12 % sont dus au transport et 3 % à la production pétrolière offshore (Figure 3) (Soltani, 2004). Parmi ces hydrocarbures, nous pouvons citer le phénol.



**Figure 3:** Remorquage d'une plateforme gravitaire d'exploitation d'hydrocarbures en mer du Nord (BONTON *et al.*, 2015).

### **I.1.4 Contamination des milieux aquatiques salin par les hydrocarbures, en particulier le phénol**

La pollution par les hydrocarbures pose un problème majeur pour les écosystèmes aquatiques, notamment au niveau de la frange côtière, exposée à ces polluants insolubles d'une manière chronique ou accidentelle (**Ballerini et al., 1996**). Il a été estimé que 5 % des effluents industriels mondiaux étaient des effluents salins (**Le Bogne et al, 2008**). En effet, de nombreux secteurs industriels sont susceptibles de générer des eaux usées très salées : il s'agit notamment des industries agro-alimentaires, du pétrole et du cuir. Le rejet de ces eaux usées contenant en même temps une forte salinité et une teneur élevée en matière organique (tels les hydrocarbures) sans traitement préalable nuit à la vie aquatique, à la potabilité de l'eau et à l'agriculture.

Parmi ces hydrocarbures, le phénol qui est plus prédominant et le plus nocif, et sont les principaux polluants des eaux usées industrielles car ils sont couramment utilisés dans de nombreuses industries telles que le raffinage du pétrole, la conversion du coke, les usines de fabrication de produits pharmaceutiques et de résine (**Le Bogne et al, 2008**). Le phénol est un composé organique aromatique composé de noyau benzénique relié avec un groupement hydroxyle (-OH). Bien qu'il ait une fonction alcool, le phénol a des propriétés uniques et n'est pas classé comme un alcool. Sa structure est relativement simple, le groupement hydroxyle est lié à un atome de carbone du cycle benzénique (**Ineris ,2005**).

#### ***1.1.4.1 Propriété physico-chimiques phénol***

Le phénol est l'unité structurelle de base pour une variété de composés organiques de synthèse. En effet Dans les conditions normales de température et de pression, le phénol est un solide qui se présente sous la forme d'une masse cristalline ou d'aiguilles incolores. Il est modérément volatile à la température ambiante, hygroscopique et très inflammable et. En présence d'impuretés, d'eau ou de lumière, il se teint en rose ou rouge, très soluble dans de nombreux solvants organiques usuels tels que l'acétone, l'éthanol, les hydrocarbures aromatiques et l'oxyde de diéthyle et faiblement acide et très sensible à l'oxydation et aux réactions de substitution électrophile sous sa forme ionisée. En plus, peut réagir vivement avec les oxydants puissants. Le phénol liquide attaque certains métaux (aluminium, plomb,

zinc, etc.), ainsi que certains plastiques, notamment le polyéthylène. Ses propriétés physicochimiques sont représentées dans le **tableau 1 (Harzallah, 2018)**.

**Tableau 1:** Propriétés physico-chimiques des phénols (Harzallah, 2018).

Propriété	Phénol	<i>p</i> -crésol	3,4-DMP
<b>Formule chimique</b>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> OH	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> OH
<b>Masse molaire</b>	94,14 g.mol <sup>-1</sup>	108,14 g.mol <sup>-1</sup>	122,167 g.mol <sup>-1</sup>
<b>Solubilité dans l'eau (25°C)</b>	87 g.l <sup>-1</sup>	19 g.l <sup>-1</sup>	4,76 g.l <sup>-1</sup>
<b>Point de fusion</b>	43°C	34,8°C	62,5°C
<b>Point d'ébullition</b>	181,8°C	201,8°C	225°C
<b>Température d'auto-inflammation</b>	715°C	599°C	599°C
<b>Point d'éclair en coupelle fermée</b>	87°C	86°C	61 à 95°C
<b>pKa</b>	9,95	10,26	10,36

#### *I.1.4.2 Techniques de dépollution des environnements pollués par le phénol*

Certains phénols sont difficilement ou lentement biodégradables, ce qui en fait des polluants préoccupants. Diverses techniques ont été expérimentées pour leur destruction en tant que polluants (Martin et al., 2010):

- ✓ Les procédés photocatalytiques, le photocatalyseur
- ✓ Procédés chimiques
- ✓ Extraction par la chaleur
- ✓ Extraction par un solvant
- ✓ Les traitements par isolement
- ✓ Les traitements par oxydation
- ✓ Les ultrasons de haute fréquence.
- ✓ La dégradation oxydante par sonoélectrochimie de solutions aqueuses de phénols.
- ✓ Photocatalyse homogène par les polyoxométallates (POM)

La dégradation biologique. Cette technique est le moyen alternatif de détoxification qui peut remplacer les méthodes traditionnelles. Elle utilise le pouvoir épurateur des microorganismes de l'environnement, et présente l'avantage d'être peu invasive et moins onéreuse.

### I.1.5 Biodégradation du phénol

La dégradation microbienne constitue un processus biotique majeur d'élimination du phénol présent dans les milieux salin et hyper salin. En effet, certaines bactéries sont capables d'utiliser les hydrocarbures (aromatiques ou halogénés) comme unique source de carbone et d'énergie pour la synthèse cellulaire. Ces dernières convertissent une substance métabolisable en un composé plus simple, et moins toxique que le composé d'origine (biotransformation). Il en résulte la formation du dioxyde de carbone (minéralisation) (**Churchill et al., 1999; Demanèche et al., 2004**). Selon que la bioremédiation se fait en présence ou en absence d'oxygène, nous pouvons distinguer le traitement aérobie ou anaérobie.

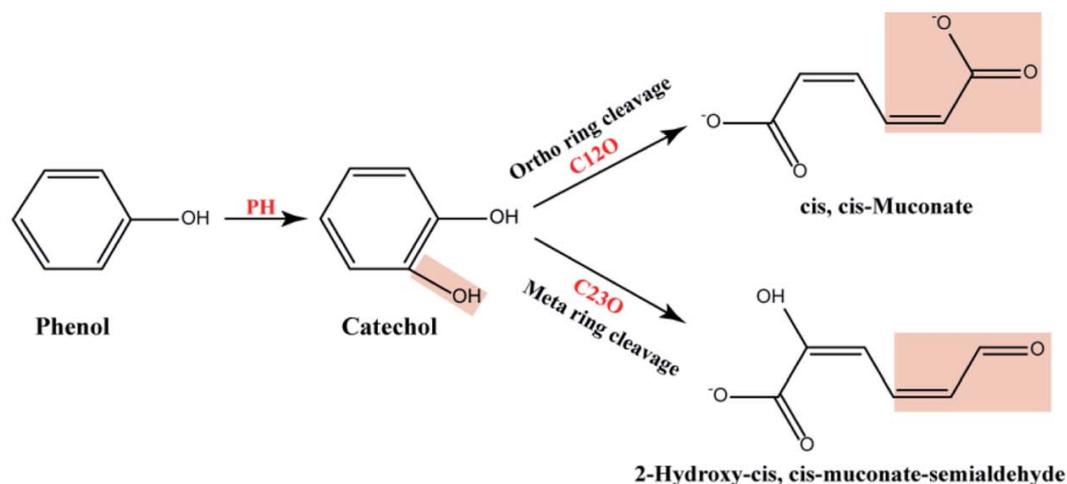
La bioremédiation des hydrocarbures aromatiques (comme le phénol et les composés phénoliques) dans les conditions aérobies est réalisée par les microorganismes (procaryotes ou eucaryotes) possédant des systèmes enzymatiques différents, tels que les dioxygénases et les monooxygénases (**Kuony, 2005**).

#### I.1.5.1 Les dioxygénases

Chez les bactéries, la bioremédiation des hydrocarbures aromatiques est réalisée par deux étapes qui consistent en une réaction d'incorporation des deux atomes d'oxygène sur le noyau aromatique. Ceci permet, en premier lieu, la dihydroxylation, et en deuxième lieu, l'ouverture finale du noyau aromatique. Ces deux opérations sont catalysées par des enzymes de type dioxygénase. Selon le type de la réaction qu'elles catalysent, il existe deux types de dioxygénases (**Bertiniet al., 1996; Butler et Mason, 1997**) qui constituent deux familles d'enzymes différentes sur le plan de la séquence en acides aminés (**Harayama et al., 1992**) :

- L'intradioldioxygénase lorsque la fission se fait en *ortho* (coupure intradiol) par exemple les catéchol 1,2-dioxygénases; ces enzymes contiennent un ion ferrique  $Fe^{+3}$  (**Pascalyet al., 2001**).
- L'extradioldioxygénase pour une fission en *méta* (coupure extradiol) par exemple les catéchol 2,3-dioxygénases; ces enzymes contiennent un ion ferreux  $Fe^{+2}$  (**Vetting et Ohlendorf, 2000**).

Dans le cas de la plupart des bactéries le substrat aromatique est converti en catéchol. Celui-ci peut alors être clivé selon deux voies : la voie *méta* où le catéchol est clivé en acide semi-aldéhyde 2-hydroxymuconique et/ou la voie *ortho* où le catéchol est clivé en acide cis, cis-muconique (**figure 4**).



**Figure 4:** Mode de clivage du phénol par voie ortho ou méta (Mahiuddin et al., 2012).

### I.1.6 Microorganismes aptes à la biodégradation des hydrocarbures

Les environnements hypersalins, comme tous les autres écosystèmes, peuvent être affectés par la pollution. En outre, environ 5% des effluents industriels sont estimés être salins et hypersalins. La bioremédiation de ces milieux contaminés par des microorganismes non extrémophiles conventionnels n'est pas valable en raison de leur incapacité à transformer efficacement les polluants organiques à des salinités élevées. Étant donné que les microorganismes halophiles sont métaboliquement plus adaptés à des concentrations élevées de sel, ils sont considérés comme des candidats appropriés et efficaces pour la biorestauration d'environnements hypersalins contaminés et d'effluents salins. En fait, les bactéries halotolérantes et halophiles dégradent un large éventail de composés contaminants (Le Borgne et al., 2008).

#### I.1.6.1 Microorganismes halophiles

Les microorganismes qui se développent dans des environnements à forte teneur en sel sont appelés halophiles. Ces microorganismes sont largement répandus dans de nombreux grands environnements comme les marais salants, les lagunes, les sebkhas et les lacs salés telles que le Grand Lac Salé et la mer Morte (Sei et Fathepure, 2009; Al-Mailem et al., 2010; Rhodes et al., 2011; Luque et al., 2012; Erdogmus et al., 2013). En fait, leur salinité dépasse 3,5% du sel total et peut atteindre jusqu'à saturation en sel (35% de sel), conditions qui sont insupportables par les autres micro-organismes conventionnels. De plus, ils se retrouvent dans les trois domaines de la vie : l'*Eucarya*, *Archaea* et *Bacteria*, avec une représentation plus

phylogénétique dans le domaine des *Bacteria*. Les groupes bactériens contenant au moins un membre halophile sont les Cyanobactéries, les Protéobactéries, les Firmicutes, les Actinobactéries, les Spirochètes et les Bacteroidetes. L'*Archaea* ne contient qu'une seule famille exclusivement halophile, les Halobacteriaceae, représentant le genre extrêmement halophile le plus connu : *Halobacterium* (Daoud et Ben Ali, 2020). Les habitats hypersalins peuvent inclure d'autres conditions défavorables, notamment des concentrations élevées de cations divalents, un pH bas, des températures élevées et des niveaux élevés d'exposition aux UV. Présentant les taux de croissance spécifiques les plus élevés dans des milieux saturés en sel (2,5 - 5,2 M NaCl) (Peeples, 2014).

Les micro-organismes halophiles n'ont pas tous besoin de la même gamme de concentrations de sel pour une croissance optimale. Certains poussent mieux dans seulement 0,2 à 0,5 M de sels comme la plupart des bactéries marines ; d'autres nécessitent au moins 2,5 M de sels pour une croissance optimale et le maintien de la stabilité structurelle, comme les espèces d'*Halobacterium*. La classification la plus adaptée place les microorganismes halophiles en 5 groupes, en fonction des plages de concentrations de sel pour une meilleure croissance, qui sont: les halophiles légers (0,2-0,5 M), les halophiles modérés (0,5-2,5 M), les halophiles extrêmes limites (1,5-4 M NaCl), les halophiles extrêmes (2,5-5,2 M) et les halotolérants qui ne sont pas halophiles mais peuvent tolérer des sels jusqu'à 2,5 M et même plus. Dans le dernier cas, ils sont appelés extrêmement halotolérants, comme *Staphylococcus aureus* (Daoud et Ben Ali, 2020).

Pour cela, les halophiles possèdent deux stratégies pour supporter ces conditions difficiles: soit la stratégie «salt out» qui consiste en l'accumulation de fortes concentrations d'ions inorganiques (K<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup>) dans le cytoplasme, soit la stratégie «salt in» dans lequel la concentration ionique intracellulaire est maintenue faible et ceci en pompant les ions hors de la cellule et en accumulant des solutés organiques «compatibles» (bétaine, ectoïne, etc.) pour assurer un équilibre osmotique (Daoud et Ben Ali, 2020).

En plus de l'importance de ces techniques distinguées d'adaptation au sel, les microorganismes halophiles fournissent de nouvelles protéines et enzymes ayant des caractéristiques structurelles intéressantes, en les protégeant contre la dénaturation ou de la précipitation du sel (Daoud et Ben Ali, 2020).

En effet, les protéines halophiles contiennent plus d'acides aminés acides sur leurs surfaces que les acides aminés basiques, ce qui rend ces surfaces chargées négativement, permettant

alors plus de ligature avec les molécules d'eau du milieu. Cela se traduit par une meilleure hydratation et solvataion des protéines halophiles même à des concentrations élevées de sel **(Daoud et Ben Ali, 2020)**.

Par exemple, des lipases et des estérases ont été isolées qui peuvent supporter jusqu'à 5 M de NaCl **(Fucinos et al., 2012)**. Bon nombre de ces extrêmozymes et les microorganismes qui les produisent ont été utilisés pour l'assainissement dans des milieux riche en saumure et en hydrocarbures **(Sei et Fathepure, 2009; Al-Mailem et al., 2010, 2012, 2013; Najera-Fernandez et al., 2012; Erdogmus et al., 2013; Harada et al., 2013)**.

### *1.1.6.2 Applications actuelles et potentielles des halophiles*

Les micro-organismes halophiles peuvent survivre dans des environnements extrêmes où la plupart des autres micro-organismes ne peuvent pas se développer. Cela implique qu'ils constituent une alternative intéressante pour de nombreuses applications industrielles utilisant des environnements à forte salinité et / ou à faible activité de l'eau. En effet, l'industrie biotechnologique s'est considérablement développée ces dernières années afin de remplacer, autant que possible, l'industrie chimique. Cependant, les produits fabriqués biologiquement tels que les biocarburants, la biochimie et les bioplastiques sont encore très chers car leur coût de production est beaucoup plus élevé que celui de leurs homologues chimiques. Cela est dû à plusieurs facteurs tels que la hausse rapide des coûts des matières premières comme le glucose extrait de l'amidon, la demande excessive d'eau douce, qui aggrave encore la pénurie d'eau, la discontinuité des fermentations causée par la contamination qui affaiblit l'efficacité de la production et le coût de l'énergie nécessaire à la stérilisation des fermenteurs et des milieux. Pour pallier ces problèmes, des recherches sont menées depuis plusieurs années pour rechercher des alternatives microbiennes et / ou techniques de biotechnologie industrielle compétitives par rapport à l'industrie chimique.

Les microorganismes halophiles ont récemment été considérés comme apportant des solutions à ces problèmes. En fait, ils peuvent être utilisés dans des environnements hypersalins qui réduisent considérablement le risque de contamination, le taux d'eau douce utilisée et le coût de la stérilisation à la fois. Par exemple, les souches du genre *Halomonas* sont capables de croître à un pH et une salinité élevée et à une large gamme de températures, des conditions qui évitent la contamination pendant le processus de fermentation et permettent ainsi une fermentation continue dans des conditions non stériles **(Yin et al., 2015)**. En effet, les

microorganismes halophiles et halotolérants sont impliqués dans plusieurs applications industrielles telles que la production d'ectoïne à partir de plusieurs bactéries halophiles modérées qui est appliquée comme agent stabilisant pour les enzymes et dans les formulations cosmétiques. En outre, ils produisent de nombreux produits distingués qui peuvent avoir des applications biotechnologiques potentielles, mais qui ne sont pas encore valorisés à l'échelle industrielle (Oren, 2010 ; Yin et al., 2015). Les différentes applications biotechnologiques des microorganismes halophiles et halotolérants, actuels et potentiels, sont résumées dans le **tableau 2**.

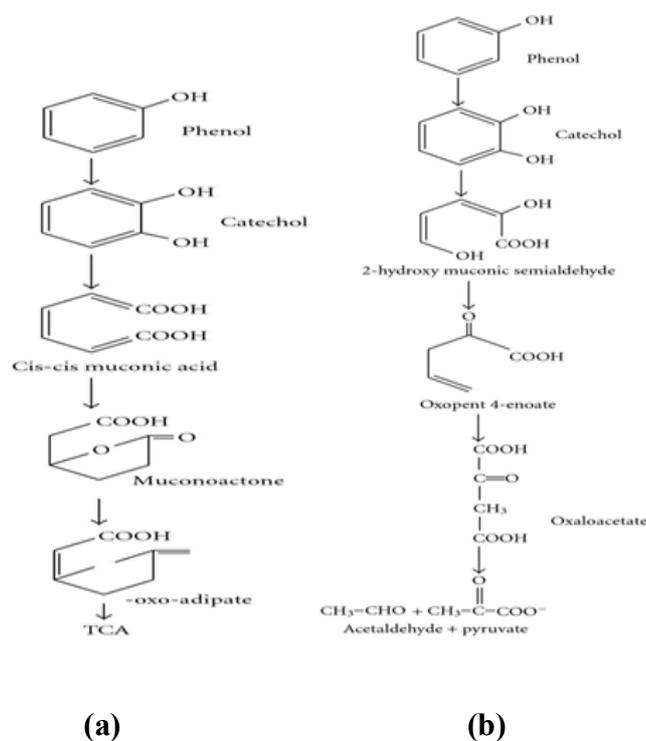
**Tableau 2:** Applications industrielles actuelles et potentielles des micro-organismes halophiles (Daoud et Ben Ali, 2020).

Produit	Application	Le microorganisme producteur
<b>Polyhydroxialkanoates (PHA)</b>	Biomatériaux	
<b>Polyhydroxialkanoates (PHB)</b>	Plastiques	<i>Halomonas boliviensis</i> <i>Halomonas sp. TD01</i>
<b>Poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalérate) (PHBV)</b>	Plastiques, matériaux médicaux	<i>Haloferax mediterranei</i>
<b>Ectoïne</b>	Protecteurs pour protéines et cellules	
<b>Ectoïne</b>	Protection de la membrane cellulaire, protection de la peau anti-âge	<i>Halomonas elongata</i> <i>Halomonas saline</i>
<b>Hydroxyectoïne</b>	Protection des protéines contre le mauvais repliement, la dégradation et la congélation	<i>Marinococcus M52</i>
<b>Amylases</b>	Industrie alimentaire	<i>Halomonas sp.</i> <i>Halobacillus sp.</i> <i>Streptomyces sp.</i> <i>Bacille sp.</i>
<b>Protéases et lipases</b>	Additifs dans les produits pharmaceutiques, les détergents à lessive, etc	<i>Halobacillus sp.</i> <i>chromohalobacter sp.</i> <i>Haloferax mediterranei</i> <i>CNCMM 50101</i>
<b>Xylanases et cellulases</b>	Bioblanchiment, hydrolyse de la cellulose	<i>Streptomonospora sp.</i> <i>Halomonas sp.</i>
<b>Biosurfactants et bioémulsifiants</b>	Solubilisation de substrats hydrophobes	<i>Halomonas spp.</i> <i>Natrialba sp. E21</i>
<b>β- Carotène</b>	Additif alimentaire	<i>Dunaliella spp.</i>
<b>Glycérol</b>	Industries cosmétiques	<i>Dunaliella spp.</i>

L'une des applications les plus attractives des halophiles est la bioremédiation des milieux salins et hypersalins (eau, sol, ...) contaminés par des composés huileux, tenaces et / ou toxiques qui sont lancés par de nombreuses industries. En fait, de nombreux microorganismes halophiles ont démontré leur capacité à dégrader les composés aromatiques tels que le phénol, les produits pétroliers comme le benzène et le toluène et les colorants azoïques (Daoud et Ben Ali, 2020).

### I.1.6.3 Biodégradation du phénol par des microorganismes halophiles

Les bactéries aérobies halophiles dégradent le phénol principalement par voies de clivage méta et ortho (figure 5).



**Figure 5:** Mode de clivage du phénol par voie ortho (a) ou méta (b) (Mahiuddin et al., 2012).

Certaines bactéries dégradent le phénol utilisant l'une de ces deux voies, tandis que d'autres peuvent dégrader le phénol en utilisant les deux voies (Jiang et al., 2006). La première étape du parcours, la conversion de phénol en catéchol, est catalysée par une phénol hydroxylase à plusieurs composants (Nordlund et al., 1990). L'accumulation de catéchol et cis, cis-acide muconique, intermédiaire de la dégradation du phénol par la voie de clivage ortho, a été observée au cours de la croissance de plusieurs souches *Halomonas* en présence du phénol,

indiquant que ces bactéries utilisaient la voie ortho (**Hinteregger et Schreiber, 1997; Alva et Peyton, 2003; Maskow et Kleinsteuber, 2004**). C'est également le cas pour *Halomonas organivorans*, un halophile modéré capable de dégrader le phénol et plusieurs acides aromatiques qui ont montré une forte activité catéchol 1,2-dioxygénase, indiquant la voie de clivage ortho (**García et al., 2005a**). Fait intéressant, *Halomonas sp.* souche EF11 assimilait le phénol à la fois par la voies ortho et méta en fonction du rapport C / N dans le milieu de culture (**Maskow et Kleinsteuber, 2004**).

La biodégradation du phénol dans les eaux usées hypersalines a été signalée par **Woolard et Irving (1994, 1995)**. Ces auteurs ont utilisé un biofilm de bactéries halophiles isolé à partir d'une saline du Grand Lac Salé. Plus de 99% du phénol ont été éliminés d'une eau usée synthétique contenant de 0,1 à 0,13 g/l de phénol et 15% (p/v) de NaCl. **Hinteregger et Schreiber (1997)** ont étudié la capacité de biodégradation de *Halomonas sp.* souche isolée du Grand Lac Salé. Cette souche dégrade le phénol comme seule source de carbone et d'énergie dans les eaux usées salines industrielles. La croissance optimale de cette souche sur le phénol s'est produite à des concentrations de 3 à 5% de NaCl. A ces salinités, 0,1 g/l de phénol a été dégradé en 13 h. La disparition de phénol a été accompagnée par l'accumulation de cis, cis-acide muconique, intermédiaire de la dégradation du phénol par voie de clivage ortho (**figure 5**).

**Alva et Peyton (2003)** ont signalé une biodégradation du phénol et du catéchol par la bactérie haloalkaliphile *Halomonas campisalis*. Cette bactérie est capable de se développer avec le phénol comme seule source de carbone et d'énergie à pH 8-11 et 0 à 150 g/l de NaCl, et le phénol a été minéralisé en CO<sub>2</sub>. Le catéchol et le cis, cis-acide muconique ont été identifiés comme produits intermédiaires indiquant que la biodégradation du phénol s'est déroulée à travers le voie de clivage ortho.

Lors d'un criblage approfondi de bactéries halophiles dégradant les composés aromatiques, **García et al. (2005a)** ont isolé la nouvelle espèce *Halomonas organivorans* (**García et al., 2004**) et *Thalassobacillus devorans*, une bactérie Gram-positive modérément halophile, dégradant le phénol (**García et al., 2005b**), capable d'utiliser le phénol comme seule source de carbone et d'énergie. Les deux bactéries ont produit une croissance optimale dans des milieux contenant 7,5 à 10% (p / v) de NaCl. Aucune bactérie n'a pu être isolée lorsque p- le crésol était la seule source de carbone et d'énergie.

**Matériels**

**Et méthodes**

## Chapitre II: Matériels et Méthodes

La crise sanitaire du Covid-19 a mis à mal les conditions d'accès au sein du laboratoire de centre de recherche et de Développement de Sonatrach (C.R.D) à cause des **conditions sanitaires** à respecter. Pour répondre aux objectifs tracés : *La biodégradation du phénol par une souche halophile extrême*, une description de la méthodologie adaptée pour la problématique posée en prenant 4 articles comme références.

### II.1 Matériels

#### II.1.1 Matériels non biologiques

L'appareillage, la verrerie, les solutions et réactifs.

#### II.1.2 Matériels biologiques

Les souches bactériennes utilisées durant cette étude sont des souches halophiles extrêmes isolées à partir de sebkhas algériennes par l'unité de recherche "Biodiversité Microbienne et Biotechnologies des Ecosystèmes Aquatiques salins et Pétroliers "BMBEAP" au sein du laboratoire Conservation et Valorisation des Ressources Biologiques de la faculté des sciences. Elles ont été identifiées comme étant des archaebactéries, appartenant à la famille des *Halobacteriaceae*. La conservation de ces souches a été faite à 4°C dans un milieu liquide spécifique SH standard, additionné de 25% de NaCl (**Khemili et al., 2015**).

#### II.1.3 Milieux de culture

Deux milieux de culture ont été utilisés :

- ✓ **Le milieu spécifique SH standard (Oren et al., 1995)** : utilisé pour la revivification des souches halophiles extrêmes. Ce milieu présente une forte salinité et l'amidon à raison de 2g/l comme source de carbone. Sa composition est donnée dans le tableau N°3
- ✓ **Le milieu spécifique SH modifié (Oren et al., 1995)** : utilisé pour l'essai de biodégradation de ces souches halophiles extrêmes sur le phénol comme seule source de carbone. Sa composition est donnée dans le tableau N°3

Les milieux solides sont préparés en rajoutant 20g/l d'agar.

Tableau 1:La composition des milieux SH et SH modifié

Composition	Milieu SH standards	Milieu SH modifié
NaCl	150g	150g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	160g	160g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5g	5g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,1g	0,1g
Extrait de levure	1g	1g
Casaminoacide	1g	1g
Amidon	2g	-
Hydrocarbure	-	3%
q. s. p. eau distillée	1000ml	1000ml
pH	7,5	7,5

## II.2 Méthodes

### II.2.1 Revivification des souches bactériennes

Cette opération se fait dans des Erlenmeyers de 100 ml préalablement autoclavés à 120°C pendant 20 min, remplis de 50 ml de milieu de culture SH standard liquide etensemencés à partir de tube de conservation. L'incubation s'est faite à une température de 40°C sous une agitation de 120rpm dans un incubateur agitateur, pendant 3 à 7 jours. Après incubation et apparition de la pigmentation rose rouge des moûts de fermentation (caractéristique des souches halophiles étudiées), nous avons procédé à l'ensemencement des bactéries revivifiées sur des boites de Pétri contenant le milieu SH standard solide. Les boitesensemencées et étiquetées, ont été mises dans des sacs en plastiques afin de réduire la dessiccation précoce du milieu, puis déposées à l'étuve à 40°C pendant 7 jours (**Kebbouche Gana et al., 2009**).

### II.2.2 Vérification de la pureté de la souche

Après incubation à 40°C pendant 3 à 7 jours, les boites de Pétri ont été retirées de l'étuve et soumises à deux types d'observations (macro et microscopique) afin de vérifier la pureté des souches halophiles extrêmes, selon les recommandations de « *Bergy's Manual of Systematic Bacteriology* » :

**a) Étude macroscopique** : Elle porte sur la description des colonies obtenues sur le milieu solide en se basant sur les caractères morphologiques. L'observation à l'œil nu est basée sur les éléments d'identifications données par **Thomas et al., (1970)** :

- La forme des colonies : circulaire, ondulée, filamenteuse.
- La taille des colonies : punctiforme (moins de 1mm de diamètre), non punctiforme (supérieure à 1mm).
- La chromogènes : couleur du pigment.
- L'opacité : transparente, translucide ou opaque.
- L'élévation : colonie plate, convexe ou concave.
- L'aspect de la surface : lisse, sèche, rugueuse, brillante ou émoussée.
- L'aspect du contour : régulier ou non (denté, étoilé...).
- La consistance : visqueuse ou non visqueuse.
- L'odeur : présence ou absence, et sa nature.

**b) Étude microscopique** : La pureté des souches halophiles extrêmes est vérifiée sous microscope photonique en deux étapes : observation à l'état frais suivi d'une coloration de Gram modifiée.

❖ **Observation microscopique à l'état frais** : Cette étape permet de mettre en évidence la forme et la mobilité de la bactérie étudiée. On dépose entre lame et lamelle une goutte de la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette Pasteur, et on observe au microscope photonique au grossissement x40.

❖ **Coloration de Gram modifiée** : Décrite par **Dussault (1955)**, cette technique permet de mettre en évidence le type de Gram de l'archaebactérie étudiée. La coloration de Gram modifiée se déroule en deux étapes :

✓ **Préparation du frottis** : On dépose au centre d'une lame 2 à 3 gouttes de la suspension archaebactérienne étudiée. Puis, on les étale à l'aide d'une pipette Pasteur stérile de façon à réaliser un étalement mince et homogène. Le frottis est ensuite séché et fixé par des passages rapides sur la flamme bleue du bec Bunsen.

✓ **Coloration du frottis** : le frottis est traité avec de l'acide acétique à 2% pendant 5 min, suivi d'une coloration au cristal violet de Gentiane pendant une minute, puis rincé à l'eau et recoloré par la fuchsine pendant une minute et 30 secondes.

- ✓ La lame est rincée par l'eau, séchée au bec Bunsen, puis observée au microscope photonique à immersion au grossissement x100.

### **II.2.3 Essai de biodégradation du phénol par les souches halophiles extrêmes**

Pour tester leurs capacités à dégrader le phénol, les souches halophiles extrêmes ont étéensemencées sur le milieu de culture (SH modifié) additionné de 3% de phénol. Les étapes de l'expérience sont décrites ci-dessous :

#### ***II.2.3.1 Préculture***

Des précultures ont été réalisées dans des Erlenmeyers de 100 ml contenant 50ml de milieu de culture SH modifié additionnés de 3% de phénol, etensemencés directement à partir des cultures jeunes du milieu SH standard liquide. Le phénol a été ajouté par filtration stérilisante (0.2 µm de pore) à partir d'une solution concentrée au milieu SH stérilisé dans un autoclave à 121.1 °C et 1 atm pendant 20 mn.

Les précultures ont été incubées à 40°C avec une agitation de 120 rpm dans un incubateur-agitateur pendant 3 à 4 jours jusqu'à l'apparition d'un trouble rose-rouge. L'agitation de 120 tours/min facilite l'accès des souches au substrat (phénol) et à l'oxygène.

#### ***II.2.3.2 Culture en batch***

Après quatre jours d'incubation, 10 ml de chacune des précultures ont été transvasés dans 100 ml de milieu de culture neuf SH modifié additionné de phénol à 3%.

#### ***II.2.3.3 Suivi de la fermentation***

Des prélèvements ont été effectués tous les jours pour un suivi régulier des paramètres suivants pendant 22 jours :

- ✓ Suivi de la croissance cellulaire (DO 600nm) en présence du phénol comme seule source de carbone.
- ✓ Suivi du mode de clivage du catéchol par les enzymes clés de nos souches halophiles extrêmes induites par la présence du phénol : Test *Rothera*
- ✓ Suivi de l'activité enzymatique extracellulaire et intracellulaire spécifique liée à la biodégradation du phénol à savoir : Activité catéchol 1,2-Dioxygénase, Activité catéchol 2,3-Dioxygénase.

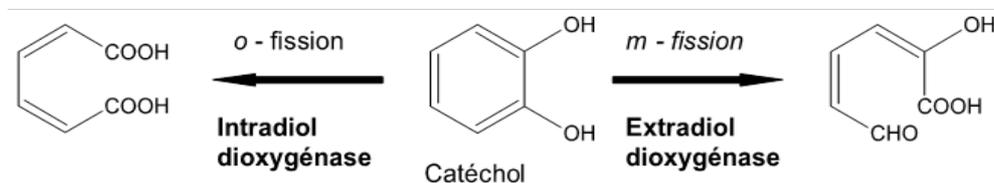
- ✓ Suivi de la production de biosurfactants par le calcul de l'index d'émulsification E24.
- ✓ Détermination de la tension superficielle des cultures en batch.

**a) Suivi de la croissance cellulaire**

Le suivi de la croissance cellulaire a été effectué en mesurant la densité optique cellulaire chaque jour pour chaque prélèvement à une longueur d'onde de 600nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

**b) Suivi du mode du clivage du catéchol par les enzymes clés de nos souches halophiles extrêmes induites par la présence du phénol : Test Rothera**

Les dioxygénases sont des enzymes clefs de la biodégradation des hydrocarbures aromatiques. Celles-ci consistent à l'incorporation d'un ou deux atomes d'oxygène dans l'hydrocarbure aromatique par l'intervention d'une dioxygénase entraînant ainsi l'oxydation du cycle aromatique clé intermédiaire tel le catéchol et sa dégradation complète soit par une voie *méta* ou une voie *ortho* selon les dioxygénases impliquées (Pérez-Pantoja et al., 2010) (voir figure6) .



**L'acide cis, cis  
muconique**

**2-semialdéhyde  
hydroxymuconique**

**Figure 6: Les deux modes de clivage du noyau aromatique intermédiaire par les catéchols dioxygénases: o-fission : pour fission en ortho; m-fission : pour fission en méta.**

Le test *Rothera* a été réalisé pour déterminer ou confirmer le mode de clivage *ortho* ou *méta* du cycle du catéchol par la présence de l'activité enzymatique spécifique Catéchol 1,2-Dioxygénase et Catéchol 2,3-Dioxygénase, respectivement (Stanier et Ingraham, 1954; Ottow et Zolg, 1974). Cette étude a été réalisée selon Acikgoz et Ozcan (2016).

Le test consiste à centrifuger 2 ml du moût de fermentation à 5000 rpm pendant 30 min à 4°C. L'extrait cellulaire (le culot) a ensuite été incubé avec 2ml de tris buffer (pH=8, 0.02mM) et de 2 ml de catéchol (4mM) comme substrat. Les échantillons ont été mis en incubation pendant 5min. Le développement de la couleur jaune indique la formation du 2-semialdéhyde hydroxymuconique donc la voie de dégradation métabolique du catéchol. Cependant, en cas d'absence de cette coloration jaunâtre.

***c) Suivi de l'activité enzymatique spécifique liée à la biodégradation du phénol***

Le but de ce test est de mettre en évidence l'activité enzymatique de la voie de dégradation du catéchol, en exposant ce dernier aux moûts de fermentations de nos souches bactériennes halophiles extrêmes contenant leurs enzymes dioxygénases induites par la présence du phénol comme source de carbone dans la fermentation en Batch.

***\* Préparation des extraits cellulaires et acellulaires :***

Après croissance des souches halophiles extrêmes K1, K2 et K3 sur le milieu de culture SH modifié, avec le phénol à raison des différentes concentrations comme seule source de carbone, un prélèvement de 2ml de moût de fermentation a été effectué pour l'analyse de l'activité enzymatique des Catéchol 1,2-Dioxygénase et Catéchol 2,3-Dioxygénase (**Mahiuddine et al., 2012**).

Après centrifugation à 15000 rpm pendant 15min :

- ✓ l'extrait acellulaire (le surnageant) obtenu a été conservé à 4°C pour une analyse dès que possible pour l'activité des catéchols dioxygénases extracellulaires.
- ✓ l'extrait cellulaire (le culot) a également été récupéré pour l'analyse de l'activité enzymatique intracellulaire. Ce dernier est tout d'abord traité avec de l'eau distillée pendant 24heures à 4°C afin de provoquer une lyse osmotique des cellules des souches halophiles extrêmes et leur destruction. Cette suspension est ensuite centrifugée à 15000 rpm pendant 15min et le nouveau surnageant obtenu a été analysé pour la mise en évidence de l'activité des catéchols dioxygénases intracellulaires.

***\*Activité enzymatique Catéchol 1,2-Dioxygénase***

Cette enzyme permet l'*ortho*-clivage du catéchol. Son activité est mesurée par la formation de l'acide cis, cis-muconique. Pour la mesure de son activité, les réactifs suivants ont été ajoutés à une cuve en quartz : 2 ml de tampon Tris-HCl (50mM) (pH 8,0); 0,7 ml d'eau distillée; 0,1 ml de 2-mercaptoéthanol (100 mM) et 0,1 ml de l'extrait acellulaire (extra ou intracellulaire).

Le contenu de la cuve est mélangé par inversion. 0,1 ml de catéchol (1mM) est ensuite ajouté et le contenu est mélangé à nouveau. L'absorbance est rapidement lue à 260 nm sur une période de 5 min: l'accumulation de l'acide cis, cis muconique est indiquée par une augmentation de l'absorbance(Khemili-Talbi et al., 2015).

**\*Activité enzymatique Catéchol 2,3-Dioxygénase**

Cette enzyme permet le *mé*ta-clivage du catéchol. Son activité est mesurée par la formation de 2-semialdéhyde hydroxymuconique. Pour la mesure de son activité, les réactifs suivants ont été ajoutés à une cuve en plastique: 2 ml de tampon Tris-HCl (50mM) (pH 7,5); 0,6 ml d'eau distillée et 0,1 ml de l'extrait acellulaire (intra ou extracellulaire). Le contenu de la cuve est mélangé par inversion et 0,2 ml de catéchol (100 mM) est ensuite ajouté au contenu. L'absorbance est rapidement lue à 375 nm sur une période de 5 min: la formation du 2-semialdéhyde hydroxymuconique est indiquée par une augmentation de l'absorbance(Khemili-Talbi et al., 2015).

**\* Calcul de l'activité enzymatique et l'activité enzymatique spécifique :**

Le calcul de l'activité catéchol dioxygénase est réalisé selon l'équation suivante (pour un volume total d'échantillon de 3ml) en se basant sur la loi de Beer Lambert :

$$\text{Activité enzymatique (U)} = (\Delta D \times 2 \times 10^6) / \epsilon \times l$$

**Où :**

**U**= Unité d'activité enzymatique. Elle est définie comme la quantité d'enzyme qui produit la transformation d'une micromole de substrat par minute à 25°C. Elle est exprimée en  $\mu\text{mole min}^{-1}$ .

**$\epsilon_{260}$**  = 16800 mol/L/cm, est le coefficient d'extinction molaire pour la catéchol 1,2-dioxygénase

**$\epsilon_{375}$**  = 14700 mol/L/cm, est le coefficient d'extinction molaire pour la catéchol 2,3-dioxygénase

**L** =largeur de la cuve 1cm.

**$\Delta DO$**  = la différence de la densité optique calculé après 5 minutes.

L'activité spécifique liée aux enzymes catéchol dioxygénases est par la suite calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité enzymatique spécifique (mU/mg de protéine)} = \frac{\text{Activité enzymatique (U)}}{\text{protéines totales}}$$

Cette dernière est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour générer 1  $\mu\text{mol}$  de produit par minute. L'activité spécifique est exprimée en milli-Unité (mU) par milligramme de protéine.

Les concentrations en protéines (protéines totales) dans les extraits acellulaires ont été déterminées par la méthode de Bradford.

**d) Dosage des protéines totales**

- a) La quantification des protéines totales est effectuée selon la méthode de Bradford, en utilisant le Bleu de Coomassie G250 comme réactif et l'albumine de sérum de bœuf (BSA) comme protéine standard, (**Bradford, 1997**).

**Mode opératoire :**

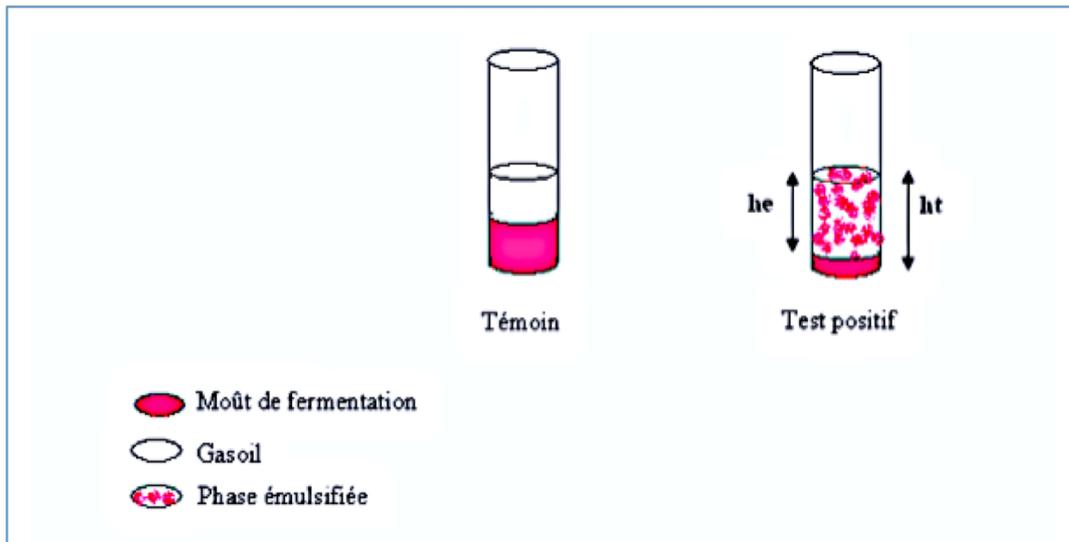
- Centrifugation des mouts de fermentation des souches L4 et L6 à 12000 tr /10min.
- Laver plusieurs fois avec du milieu minimal (sans substrat), après chaque lavage on fait la centrifugation à 12000tr/10min.
- Déposer l'échantillon sur un bain d'eau glacée pendant 24h.
- 0,5 ml d'échantillon + 0,5ml bleu de coomassie.
- L'absorbance des échantillons a été mesurée à 595nm.
- La concentration totale de protéine est déterminée par la courbe d'étalonnage.

**e) Suivi de la production de biosurfactants par le calcul de l'index d'émulsification E24**

Il s'agit d'un test qualitatif. Il a été mis au point par Broderick&Cooney, puis il est modifié par **Francy et al. (1991) et Bodour et al. (2004)**. Ce test permet de vérifier la capacité des souches microbiennes à émulsionner une phase hydrophobe (gasoil) dans une phase hydrophile (le moût de fermentation).

Le test consiste à mélanger 3 ml du milieu de culture avec 3 ml de gasoil dans des tubes. Les tubes sont agités au vortex pendant 3 min et après homogénéisation des deux phases, on procède au calcul de l'index d'émulsion. Ce résultat est comparé au témoin constitué du milieu de culture aseptique et de gasoil, soumis aux mêmes conditions (**figure N°7**).

Pour vérifier la stabilité de l'émulsion, l'index d'émulsification E24 est recalculé après incubation pendant 24h à température ambiante.



**Figure 7: Test d'émulsification (Akmoussi, 2009).**

**Calcul de l'index de l'émulsion E24 :** c'est le rapport de la hauteur de l'émulsion formée sur la hauteur totale de mélange multiplié par 100.

$$E24 = \frac{He}{Ht} \times 100$$

**He:** Hauteur de l'émulsion (cm)  
**Ht:** Hauteur totale du mélange (cm).

**f) Détermination de la tension superficielle :**

La tension superficielle est définie comme étant un état résultant des interactions s'exerçant entre les molécules à la surface d'un liquide au repos. Cette tension provient des forces intermoléculaires qui exercent une traction vers le bas sur les différentes molécules en surface. La méthode utilisée est celle décrite par **Abu-ruwaida et al. (1991)**, qui consiste à prélever un échantillon de culture toutes les 12h et ce pour une durée de 22 jours pour le suivi de la tension superficielle. Ce procédé a été réalisé pour chaque souche bactérienne étudiée. La mesure de la tension superficielle est effectuée par un tensiomètre.

**Résultats**

**Et Discussion**

## Résultats & Discussion

Le présent travail s'appuie sur quelques articles de recherche publiés pour obtenir et inclure les connaissances fournies à ce jour sur le potentiel réel des microorganismes halophiles extrêmes à appliquer dans les processus environnementaux et dans la réhabilitation des écosystèmes hypersalins contaminés. L'objectif de ce travail est de fournir un examen critique sur la dégradation des polluants organiques par les micro-organismes halophiles extrêmes, en mettant l'accent sur les enzymes impliquées dans le processus de biodégradation ainsi que la production de biosurfactant, il en ressort les résultats suivants :

### III.1 Essai de biodégradation du phénol par les souches halophiles extrêmes

Le phénol est un composé aromatique toxique produit comme sous-produit des activités industrielles. Le traitement biologique des eaux usées hautement salines contenant du phénol peut être effectué à l'aide de micro-organismes halophiles. Dans cette étude, la capacité des isolats halophiles archés à dégrader le phénol a été étudiée.

#### III.1.1 Adaptation des souches halophiles extrêmes au phénol :

Au cours du processus d'adaptation, les microorganismes développent des stratégies pour surmonter les problèmes d'inhibition du substrat (Lob et Tar, 2000). Bien que le phénol ait des effets inhibiteurs significatifs sur la croissance des microorganismes à des concentrations plus élevées (Kumar et Kumar, 2005), l'isolat A235 a été progressivement adapté simultanément à des concentrations accrues de phénol dans le milieu de croissance et que la biodégradation du phénol par les cellules adaptées était deux fois plus élevée que pour les cellules non adaptées. Alors que les cultures adaptées au toluène dégradaient le phénol significativement mieux que les cellules adaptées au phénol (Eda et Birgul, 2016). Dans une étude similaire, Kwon et Yeom (2009) ont indiqué que la préadaptation augmentait de près de deux fois le taux de dégradation du phénol par la souche *Pseudomonas fluorescens* KNU417. Un rapport précédent a également montré que les cultures adaptées au benzène ou au toluène dégradaient le phénol plus efficacement que celles adaptées au phénol (Yeom et al., 1997).

#### III.1.2 Croissance cellulaire sur des composés hydrocarbonés comme seule source de carbone et d'énergie

L'utilisation d'hydrocarbures a été étudiée avec divers substrats d'hydrocarbures aromatiques pour obtenir un aperçu de la biodégradation des hydrocarbures par les souches halophiles.

**Khemili et al. (2015)**, montrent clairement la capacité de la souche halophile *Natrialba sp.* C21 à dégrader les hydrocarbures aromatiques (tels que le phénol, le naphthalène et le pyrène) avec une bonne cinétique de croissance. Cependant, un rendement de croissance élevé a été détecté lorsque la souche *Natrialba sp.* C21 a été cultivé en présence de phénol qu'avec les autres substrats. Alors que, **Eda et Birgul (2016)**, ont apportés que les profils de croissance et de dégradation du phénol par l'isolat archée halophile A235 à différentes concentrations initiales de phénol (50-200 mg l<sup>-1</sup>), ont montrés des augmentations des temps des phases de latence avec l'augmentation des concentrations de phénol, les mêmes résultats ont également été décrites par **Kumar et Kumar (2005)** et **Agarry et al. (2008)**. Quelques souches halophiles archéennes telles que *Haloferax*, *Halococcus*, *Halobacterium* et *Haloarcula* ont été signalées comme des souches dégradant le naphthalène et le pyrène (**Al-Mailam et al., 2010; Bonfá et al., 2013; Erdoğmus et al., 2013**).

### III.1.3 Évaluation de la biodégradation du phénol par les souches halophiles extrêmes

#### a) Mode du clivage du catéchol par les enzymes clés des souches halophiles extrêmes induites par la présence du phénol : " Test Rothera "

Une voie permettant la mise en évidence de la biodégradation du phénol est la recherche des enzymes cataboliques clés. Dans les conditions aérobies, le phénol est dégradé par des enzymes dioxygénases par l'addition d'atome(s) d'oxygène à la partie aromatique, le convertissant en catéchol. Ce dernier est clivé soit par une voie *ortho* grâce au catéchol 1,2-dioxygénase, soit par une voie *méta* par l'enzyme catéchol 2,3-dioxygénase (**Fathepure, 2014**). Les métabolites formés pendant la dégradation du phénol ont été identifiés en utilisant le test Rothera comme décrit dans la section Matériel et méthodes.

**Eda et Birgul (2016)**, montrent que la souche archée halophile A235 possède la voie méta, car le développement d'un produit de couleur jaune a été observé, indiquant la présence d'acide semi-aldéhyde 2-hydroxymuconique, qui est le produit de clivage de la catéchol 2,3-dioxygénase (**Li et Humphrey, 1989**).

Or **Khemili-Talbi et al. (2015)**, ont montré que les résultats des tests Rothera de la souche *Natrialba sp.* C21 pourrait dégrader les hydrocarbures aromatiques avec le catéchol, par le clivage ortho car il n'y avait pas de développement d'un produit de couleur jaune résultant de méta-clivage.

**b) Suivi de l'activité enzymatique spécifique liée à la biodégradation du phénol**

Pour confirmer les résultats du test Rothera, les activités catéchol 1,2-dioxygénase et catéchol 2,3-dioxygénase ont été dosées dans des extraits acellulaires. L'absence d'absorbance à 260 nm indiquait l'absence de la voie d'ortho-clivage. Cependant, l'absorbance à 375 nm, qui est due à la formation d'acide semi-aldéhyde 2-hydroxymuconique, a confirmé la voie du méta-clivage. Par conséquent, il est probable que la souche A235 métabolise le phénol par la voie du méta-clivage (Eda et Birgul, 2016). Contrairement à la souche *Natrialba sp.* C21, où les dosages des enzymes clés impliquées dans le clivage du noyau de catéchol, indiquent que la dégradation du phénol, le naphthalène et le pyrène était via la voie d'ortho-clivage (Khemili-Talbi et al., 2015).

D'après la littérature, peu d'informations existent sur les gènes, les voies et les mécanismes de dégradation des hydrocarbures, et du phénol plus particulièrement, dans des conditions de haute salinité (Le Borgne et al., 2008). Très peu de travaux ont été rapportés sur l'activité métabolique des enzymes dioxygénases isolées à partir des microorganismes halophiles extrêmes (Fathepure, 2014). Seules quelques espèces des genres *Haloarcula*, *Haloferas*, *Halobacterium*, *Halorubrum* et *Natrialba* ont été identifiées comme dégradantes les hydrocarbures par voie *ortho* par l'intermédiaire de leurs catéchol 1,2 dioxygénases (Erdogmus et al., 2013 ; Khemili-Talbi et al., 2015).

**c) Production des biosurfactants**

L'assimilation des hydrocarbures comme seule source de carbone par les souches archées halophiles a conduit à la production de biosurfactants indiqués par l'indice d'émulsification et l'abaissement de la tension superficielle du surnageant acellulaire.

La souche *Natrialba sp.* C21 présentait un indice d'émulsification élevé et une réduction significative de la tension superficielle après 22 jours de croissance dans un milieu contenant du phénol (3% v/v), du naphthalène (3% v/v) et du pyrène (3% v/v) par rapport aux valeurs de la tension superficielle de l'eau (de 60 à 72 mN m<sup>-1</sup>) et du milieu minéral pur (70 mN m<sup>-1</sup>). Cette souche a présenté une activité émulsifiante de 86,3, 83,3 et 81,8% en l'absence de cellules, respectivement (Tableau 4) (Khamili-Talbi et al., 2015).

**Tableau 1:** Tension superficielle (ST) et indice d'émulsification (E24) au kérosène pour la souche *Natrialba sp.* C21 après 15 et 22 jours d'incubation, à 200 rpm, 40°C, pH 7,0 et NaCl 25% (Khamili-Talbi et al., 2015).

	ST (mN m <sup>-1</sup> )		E24 (%)							
	0 jour	Après 22 jours	Avec des cellules				Sans cellules			
			Après 14 jours	Après 22 jours	Stabilité après 1 mois	Stabilité après 3 mois	Après 14 jours	Après 22 jours	Stabilité après 1 mois	Stabilité après 3 mois
Croissance sur Phénol (3% v/v)	71,2±0,3	28,3 ±3,8	70,8 ±3,7	82,5 ±2,3	81,2 ±1,8	80,1 ±5,9	79,9 ±0,8	86,3 ±1,3	85,0 ±0,3	83,7 ±0,8
Croissance sur Naphtalène (3% v/v)	70,8±1,2	33,2 ±8,2	65,8 ±2,9	78,2 ±4,8	78,2 ±2,5	71,9 ±6,3	72,8 ±0,3	83,7 ±1,5	81,9 ±0,2	79,3 ±0,9
Croissance sur Pyrène (3% v/v)	71,3±0,8	34,8 ±2,0	68,5 ±1,9	79,1 ±2,5	78,1 ±5,8	76,1 ±3,2	69,9 ±2,3	81,8 ±0,6	79,8 ±0,4	78,2 ±0,7

Les barres d'erreurs sont ± l'écart type de la moyenne

De plus, un indice d'émulsification élevé (E24 > 80%) a également été signalé avec différents hydrocarbures (phénol, naphtalène, pyrène, kérosène et l'huile d'olive) utilisés comme substrats pour le test E24 (Tableau 5) (Khamili-Talbi et al., 2015).

**Tableau 2:** Indice émulsifiant (E24) du surnageant produit par la souche *Natrialba sp.* C21 après 22 jours d'incubation, à 200 rpm, 40°C, pH 7,0 et 25% de NaCl sans cellules avec différents hydrocarbures utilisés comme substrats pour le test E24 (Khamili-Talbi et al., 2015).

Composés d'hydrocarbures					
	<i>Phénol</i>	<i>Naphtaline</i>	<i>Pyrène</i>	<i>Kérosène</i>	<i>Huile d'olive</i>
E24(%)	83,9 ± 1,5	82,1 ± 1,9	81,9 ± 0,4	82,9 ± 1,8	86,9 ± 1,2

Les barres d'erreurs sont ± l'écart type de la moyenne

Par ailleurs une très faible tension superficielle a été obtenue en présence de phénol, de naphtalène et de pyrène, qui a atteint une valeur de 28,3 mN m<sup>-1</sup>, 33,2 mN m<sup>-1</sup> et 34,8 mN m<sup>-1</sup>, respectivement après 22 Jours d'incubation (Tableau 4). Les résultats démontrent que la souche *Natrialba sp.* C21 a pu produire des biosurfactants, facilitant ainsi l'absorption des hydrocarbures aromatiques et leur biodégradation même à des concentrations élevées en sel (Khemili-Talbi et al., 2015).

Selon Kebbouche-Gana et al. (2009), la souche *Halovivax sp.* A21 semble être capable de croître rapidement et de dégrader les hydrocarbures pétroliers (2% v/v) en milieu minéral à

25% de NaCl après 20 jours d'incubation à 40°C, pH 7,0. De même, la production de biosurfactant est corrélée à la croissance cellulaire de la souche halophile *Halovivax sp. A21* sur les hydrocarbures pétroliers. Cette souche présente un indice d'émulsification élevé et une réduction significative de la tension superficielle après 22 jours de croissance (Khemili-Talbi et al., 2015). Selon Mulligan (2005), un bon tensioactif peut abaisser la tension superficielle de l'eau de 72 à 35 mN/m.

### III.1.4 Effets de la température et du pH et de salinité sur la stabilité des biosurfactants bruts

La stabilité du biosurfactant a été réalisée en utilisant un surnageant de culture et en le soumettant à différents environnements correspondants

#### a) Effet de la température

Selon khamili-Talbi et al. (2015), la souche *Natrialba sp. C21* s'est révélé thermostable, ce qui donne une valeur d'indice E24 supérieure à 68% (Figure 8a). Ainsi, selon ces résultats, le biosurfactant produit par la souche *Natrialba sp. C21* conserve ses propriétés de surface intactes dans la plage de températures entre 30°C et 100°C.

Or, la stabilité du biosurfactant pour *Halovivax sp. A21* à différentes températures résiste même jusqu'à 100/120°C avec une activité optimale à 40°C. En effet, l'activité d'émulsion du biosurfactant n'a pas montré d'effet remarquable après chauffage à 100°C. Cela indique que le biosurfactant produit semble être thermostable (Figure 8b) (khamili-Talbi et al., 2015).

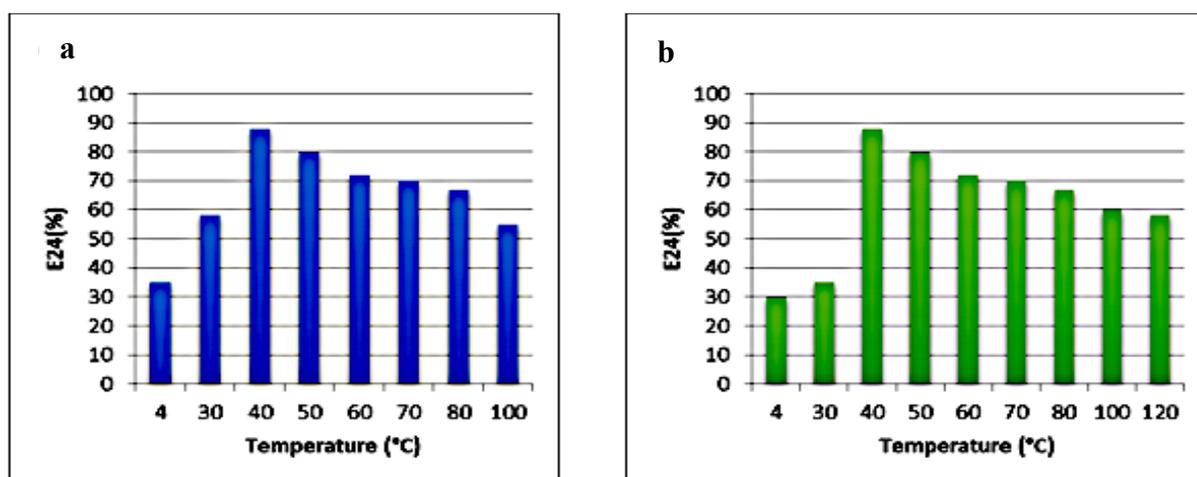


Figure 8: Effet de la température (a), (b) sur la stabilité du biosurfactant (Khemili-Talbi et al., 2015).

### b) Effet de PH

La stabilité du biosurfactant brut est restée relativement stable aux variations de pH (entre pH 5 et 12) pour la souche *Natrialba sp. C21* (Figure 9 a et b), montrant une stabilité plus élevée à pH alcalin. Par ailleurs à pH 12, la valeur de l'activité d'émulsification (E24) a montré une activité de près de 66%, alors qu'en dessous de pH 5, l'activité a été diminuée jusqu'à 50%. On peut conclure que l'augmentation du pH a un effet positif sur l'activité d'émulsification et la stabilité de l'émulsion (Khemili-Talbi et al., 2015).

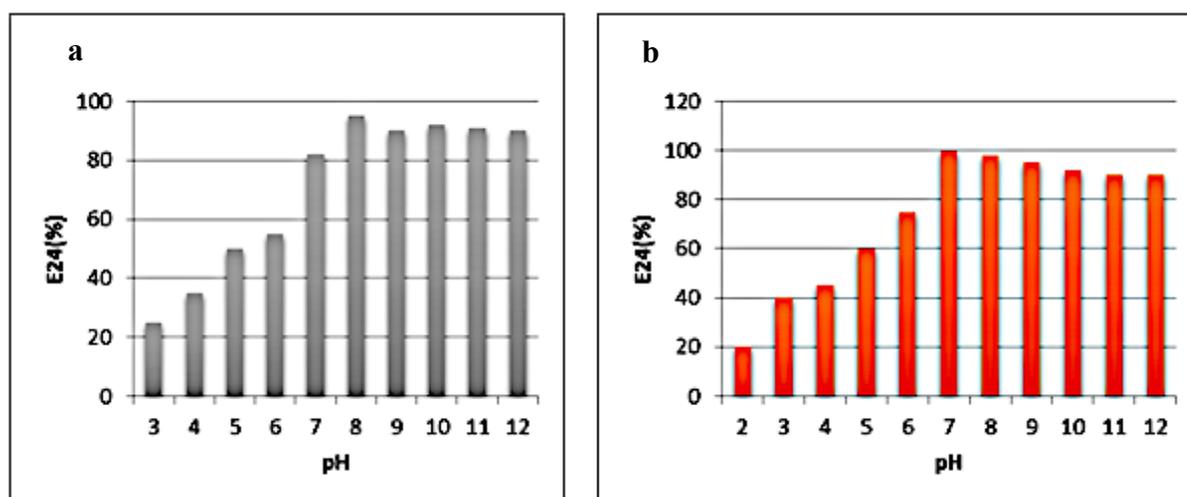
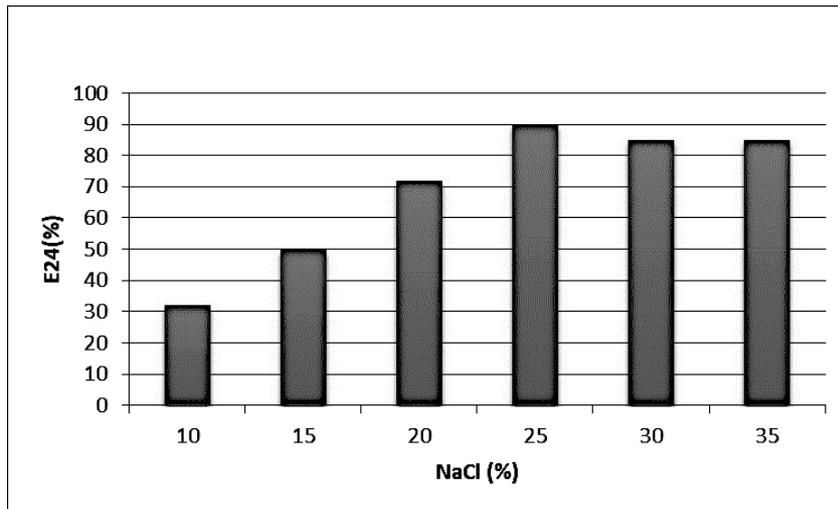


Figure 9: Effet de PH (a), (b) sur la stabilité du biosurfactant (Khemili-Talbi et al., 2015).

### c) Effet de salinité

Selon Khemili-Talbi et al. (2015), les taux de production de biosurfactants sur les hydrocarbures pétroliers comme source de carbone par la souche *Halovivax sp. A21* ont été améliorés avec l'augmentation de la concentration de NaCl dans le milieu. Cependant, Les concentrations optimales étaient de 15 à 35% de NaCl, mais même avec 25 à 35% de NaCl, les taux de biodégradation des hydrocarbures (représentés par la croissance de la souche halophile) étaient plus élevés qu'avec 15 à 20% de NaCl. Les mêmes propriétés stables étaient aussi observées avec les biosurfactants produits par la souche *Natrialba sp. C21* lorsqu'il s'est développé sur le phénol comme seule source de carbone à 25% de NaCl Khemili-Talbi et al. (2015).



**Figure 10:** Effet de la salinité sur la stabilité du biosurfactant (Khemili-Talbi et *al.*, 2015).

**Conclusion générale**

**Et perspectives**

## **Conclusion**

Les environnements hypersalins sont importants à la fois pour l'extension de la surface et pour leur importance écologique. Comme tous les autres écosystèmes, ils sont affectés par la pollution. Cependant, peu d'informations sont disponibles sur la biodégradation des polluants organiques par les microorganismes halophiles dans de tels environnements.

Les micro-organismes non extrémophiles conventionnels sont incapables d'effectuer efficacement l'élimination des polluants organiques à des concentrations élevées de sel. Les micro-organismes halophiles sont métaboliquement différents et sont adaptés à une salinité extrême; ces microorganismes sont de bons candidats pour la bioremédiation des milieux hypersalins et le traitement des effluents salins. La littérature indique que les bactéries modérément halophiles et les archées halophiles ont une polyvalence et une capacité cataboliques plus larges qu'on ne le pensait auparavant. La diversité des composés contaminants est susceptible d'être dégradée par les bactéries halotolérantes et halophiles.

Néanmoins, des efforts de recherche importants sont encore nécessaires pour estimer le potentiel réel de ces microorganismes à appliquer dans les processus environnementaux et dans la réhabilitation des écosystèmes hypersalins contaminés. Cet effort devrait également soutenir la recherche fondamentale pour comprendre le mécanisme global de dégradation, pour identifier les enzymes impliquées dans le processus de dégradation et la régulation du métabolisme.

**Références**

**Bibliographiques**

- Acikgoz, E., & Ozcan, B. (2016).** Phenol biodegradation by halophilic archaea. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 107, P141-142-144-145.
- Akmouci-Toumi, S. (2009).** Contribution à l'étude des boues de forage: isolement et évaluation de la capacité de quelques souches microbiennes à dégrader le gasoil (Doctoral dissertation). P84-121.
- Al-Mailem, D.M., Sorkhoh, N.A., Al-Awadhi, H., Elias, M., Radwan, S.S., 2010.** Biodegradation of crude oil and pure hydrocarbons by extreme halophilic archaea from hypersaline coasts of the Arabian gulf. *Extremophiles*. 14 (3), P321-328.
- Al-Mailem, D.M., Elias, M., Radwan, S.S., 2012.** Enhanced haloarchaeal oil removal in hypersaline environments via organic nitrogen fertilization and illumination. *Extremophiles*. 16 (5), P751-758.
- Al-Mailem, D.M., Elias, M., Radwan, S.S., 2013.** Oil-bioremediation potential of two hydrocarbonoclastic, diazotrophic marine bacter strains from hypersaline areas along the Arabian Gulf coasts. *Extremophiles*. 17 (3), P46-470.
- Aneela, I., Muhammad, A., Imran, H., Raghupathy, K., 2018.** Biodegradation of phenol and benzene by endophytic bacterial strains isolated from refinery wastewater-fed *Cannabis sativa*. *Environ. Technol.* 39 (13), P1-10.
- Arya, D., Kumar, S., Kumar, S., 2011.** Biodegradation dynamics and cell maintenance for the treatment of resorcinol and p-cresol by filamentous fungus *Gliomastix indicus*. *J. Hazard Mater.* 198, P49-56.
- Ballerini., Helmut Kettenmann, Bruce R., Ransom (1996)** .Techniques de traitement par voie biologique des sols pollués." Rapport pour l'ADEME: 248 pages.
- BONTON, A et al., 2015.** Revue de littérature des technologies et meilleures pratiques environnementales dans le secteur de l'exploration et de l'exploitation des hydrocarbures en milieu extracôtier. Contexte du golfe du Saint-Laurent, Québec, ministère du Développement durable, d'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, ISBN 978-2-550-72789-7 (PDF), P71.
- Bonfa, M.R.L., Grossman, M.J., Piubeli, F., Mellado, E., Durrant, L.R., 2013.** Phenol degradation by halophilic bacteria isolated from hypersaline environments. *Biodegradation* 24, 699-709.
- Bradford M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Butler et Mason, (1997).** Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: P3577-3585.

**Castillo-Carvajal, L.C., Sanz-Martín, J.L., Barragán-Huerta, B.E., 2014.** Biodegradation of organic pollutants in saline wastewater by halophilic microorganisms: a review. *Environ. Sci. Pollut. Control Ser.* 21 (16), 9578–9588.

**Dalvi S, Nicholsona C, Najarc F, Roec BA, Canaanb P, Hartsonb SD, Fathepurea BZ (2014).** Isolation of a novel *Arhodomonasp.* strain seminole and its genetic potential to degrade aromatic compounds at high salinity. *Appl Environ Microbiol* 80(21):P6664–6676

**Daoud, L., & Ali, M. B. (2020).** Halophilic microorganisms: Interesting group of extremophiles with important applications in biotechnology and environment. In *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles*. Academic Press. p51-55-61-62.

**Dussault H.P. (1955).** An improved technique for staining red halophilic bacteria, *J. Bacteriol.* 70: P 484–485.

**ElAhwany, A., Mabrouk, M., 2013.** Isolation and characterization of a phenol-degrading.

**Erdogmus, S.F., Mutlu, B., Korcan, S.E., Guven, K., Konuk, M., 2013.** Aromatic hydrocarbon degradation by halophilic archaea isolated from Camalti Saltern, Turkey. *Water Air Soil Pollut.* 224 (3), P1449.

**Fathepure BZ (2014).** Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. *Front Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00173>

**Felshia, S.C., Karthick, N.A., Thilagam, R., Chandralekha, A., Raghavarao, K.S.M.S., Fucinos, P., Gonzalez, R., Atanes, E., Fernandez Sestelo, A.B., Perez-Guerra, N., Pastrana, L., 2012.** Lipases and esterases from extremophiles: overview and case example of the production and purification of an esterase from *Thermus thermophilus* HB27. *Lipases Phospholipases: Methods Protoc.* 861, P239-266.

**FEKNOUS N., (2017).** Essais d'isolement et d'identification des souches bactériennes à pouvoir auto-épurateur vis-à-vis des hydrocarbures (Doctoral dissertation, UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA), P10.

**Gianfreda, L., Iamarino, G., Scelza, R., Rao, M.A., 2006.** Oxidative catalysts for the transformation of phenolic pollutants: a brief review. *Biocatal. Biotransform.* 24, P177–187.

**Gnanamani, A., 2017.** Efficacy of free and encapsulated *Bacillus licheniformis* strain SL10 on degradation of phenol: a comparative study of degradation kinetics. *J. Environ. Manag.* 197, P 373–383.

**Harzallah, B., (2018).** Étude de la biodégradation de composés phénoliques par le microbiote des effluents de la raffinerie de pétrole de Skikda (Doctoral dissertation, Université des Frères Mentouri Constantine 1, P 5-6.

**Harada, R.M., Yoza, B.A., Masutani, S.M., Li, Q.X., 2013.** Diversity of archaea communities within contaminated sand samples from Johnston atoll. *Bioremed. J.* 17 (3), 182-189.

**Harayama, (1992).** Organic solvent extraction as a versatile procedure to identify hydrophobic chloroplast membrane proteins. *Electrophoresis* 21: 3517-3526.

**HELCOM, 2002.** Response to Accidents at Sea Involving Spills of Hazardous Substances and Loss of Packaged Dangerous Goods. Baltic Marine Environment Protection Commission, Finland.

**Ineris, (2005).** “ Phénol Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Institut National de l'Environnement Industriel et des risques INERIS-DRC-01-25590-01DR021. N°2-1 1-47.

**Kiliç, N.K., 2009.** Enhancement of phenol biodegradation by *Ochrobactrum* sp. isolated from industrial wastewaters. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63, 778-781.

**Kebbouche-Gana, S., Gana, M. L., Khemili, S., Fazouane-Naimi, F., Bouanane, N. A., Penninckx, M., & Hacene, H. (2009).** Isolation and characterization of halophilic Archaea able to produce biosurfactants. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36(5), P728.

**KHARROUB, K., (2007).** Identification et étude moléculaire des bactéries et des archéobactéries aérobies halophiles de la sebkha Ezzemoul (Ain M'Lila). Thèse de doctorat de l'université Mentouri – Constantine. Spécialité Microbiologie et Biologie Moléculaire. P61-1-2.

**Khemili-Talbi S., Kebbouche-Gana S., Akmoussi-Toumi S., Angar Yassmina and; Gana M.L. (2015).** Isolation of an extremely halophilic archaeon *Natrialba* sp. C21 able to degrade aromatic compounds and to produce stable biosurfactant at high salinity. *Extremophiles*, 19(6), P1110-1111-1112-1114-1115-1116-1117-1118.

**Khemili-Talbi, S., Kebbouche-Gana, S., Akmoussi-Toumi, S., Gana, M. L., Lahiani, S., Angar, Y., & Ferrioune, I. (2017).** Biodegradation of Petroleum hydrocarbons and Biosurfactant production by an extremely halophilic Archaea *Halovivax* sp. A21. *Algerian Journal of Environmental Science and Technology*, 3(3).p 577-578.

**Kuony., S (2005).** Thèse de l'Université Joseph Fourier – Grenoble I. France. Caractérisation d'arénodioxygénases impliquées dans la biodegradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques chez *mycobacterium* sp. 6p1.

**Kwon, KH, Yeom, SH, 2009.** Voies optimales d'adaptation microbienne pour le rapide dégradation d'une concentration élevée de phénol. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 32, P 435-442.

**Le Borgne, S., Paniagua, D., & Vazquez-Duhalt, R. (2008).** Biodégradation des polluants organiques par les bactéries halophiles et les archées. *Journal of Molecular Microbiology and biotechnology*, P75.

**Li H., Meng F., Duan W., Lin Y., Zheng Y. (2019).** Biodegradation of phenol in saline or hypersaline environments by bacteria: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 184:P1-12.

**Li, Y., Li, J., Wang, C., Wang, P., 2010.** Growth kinetics and phenol biodegradation of psychrotrophic *Pseudomonas putida* LY1. *Bioresour. Technol.* 101 (17), 6740–6744.

**Lobo, C.C., Bertola, N.C., Contreras, E.M., 2013.** Stoichiometry and kinetic of the aerobic oxidation of phenolic compounds by activated sludge. *Bioresour. Technol.* 136, P58–65.

**Mahiuddin MD, Fakhruddin ANM, Al-Mahin A (2012).** Dégradation du phénol via la voie de clivage méta par *Pseudomonas fluorescens* PU1.

**Microbiologie**            **ISRN,**            **2012,**            ID741820.            [http: //](http://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/741820/)  
[www.hindawi.com/journals/isrn/2012/741820/](http://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/741820/) P 1-2.

**Martin, A.C., Gelbart, M., Fernandez-Gonzalez, R., Kaschube, M., Wieschaus, E.F. (2010).** Integration of contractile forces during tissue invagination. *J. Cell Biol.* 188(5): 735- 749. (Export to RIS)

**Najera-Fernandez, C., Zafrilla, B., Jose Bonete, M., Maria Martinez-Espinosa, R., 2012.** Role of the denitrifying haloarchaea in the treatment of nitrite-brines. *Int. Microbiol.* 15 (3), P 111-119.

**Oren A., Gurevich P., Gemmell R.T., Teske A. (1995).** *Halobaculum gomorrense* gen. nov., sp. nov., a novel extremely halophilic archaeon from the Dead Sea, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45 : P747–754.

**Pascaly., M, Duda. M, Schweppe. F, Zurlinden. K, Müller. FK, Krebs. B (2001)** .The systematic influence of tripodal ligands on the catechol cleaving activity of iron(III) containing model compounds for catechol 1,2-dioxygenases. *J. Chem. Soc.* P828–837.

**Peebles, T. L. (2014).** *Bioremediation Using Extremophiles. Microbial Biodegradation and Bioremediation*, 251–268. doi:10.1016/b978-0-12-800021-2.00010-8

**Ravikumar, S., Parimala, P.S., Gokulakrishnan, R., 2011.** **Biodegradation** of phenolic compounds by using halotolerant microbes. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences* 1 (2), P38–45.

**Rhodes, M.E., Spear, J.R., Oren, A., House, C.H., 2011.** Differences in lateral gene transfer in hypersaline versus thermal environments. *BMC Evol. Biol.* 11, 199.

**Schie, P.M., Young, L.Y., 2000.** Biodegradation of phenol: mechanisms and applications. *Ann. Finance* 4, P1–18.

**Sei, A., Fathepure, B.Z., 2009.** Biodegradation of BTEX at high salinity by an enrichment culture from hypersaline sediments of rozel point at great salt lake. *J. Appl. Microbiol.* 107 (6), P 2001-2008.

**Shahriari Moghadam, M., Safaei, N., Ebrahimipour, G.H., 2016.** Optimization of phenol biodegradation by efficient bacteria isolated from petrochemical effluents. *Global Journal of Environmental Science and Management* 2 (3), P249–256. strain of *Alcaligenes* sp. AM4. *Acta Biol. Hung.* 64 (1), 106–117.

**Soltani ,M.,( 2004).** Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse de doctorat de l'université Paris 6. Spécialité chimie analytique, P.15.

**Vetting.MW ., Ohlendorf. DH (2000).** The 1.8 Å crystal structure of catechol 1,2-dioxygenase reveals a novel hydrophobic helical zipper as a subunit linker. *J. Structure.*

**Xue, J., Yu, Y., Bai, Y., Wang, L., & Wu, Y. (2015).** Marine oil-degrading microorganisms and biodegradation process of petroleum hydrocarbon in marine environments: a review. *Current microbiology*, 71(2), P123.

**Yeom, SH, Kim, SH, Yoo, YJ, Yoo, IS, (1997).** Adaptation microbienne dans la dégradation du phénol par *Alcaligenes xylosoxidans* Y234. *Korean J Chem Eng* 14:P37–40.

**Yin, J., Chen, J. C., Wu, Q., & Chen, G. Q. (2015).** Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnology advances*, 33(7), 1433-1442, (P 2-3-5-7-10).

## Résumé

À la demande continue de l'industrie pour les matières premières chimiques, une grande quantité d'eaux usées à haute salinité contenant du phénol est rejetée dans le milieu aquatique, et la fuite de produits chimiques dangereux dans la mer peut conduire à une pollution phénolique de l'océan. Le phénol est un produit chimique courant qui présente un grave danger pour l'environnement. La bioremédiation de ces milieux contaminés par des microorganismes non extrémophiles conventionnels n'est pas valable en raison de leur incapacité à transformer efficacement les polluants organiques à des salinités élevées. Étant donné que les microorganismes halophiles sont métaboliquement plus adaptés à des concentrations élevées de sel, ils sont considérés comme des candidats appropriés et efficaces pour la biorestauration d'environnements hypersalins et d'effluents salins impactés par les hydrocarbures. Pour cela, il y a un grand intérêt porté au développement et à l'optimisation de nouveaux procédés de traitement des milieux salins contaminés par ces composés.

**Mots clés :** Phénol, biodégradation, les microorganismes halophiles, milieu salin.

## Abstract

with the continuous demand from industry for chemical raw materials, a large amount of high salinity wastewater containing phenol is discharged into the aquatic environment, and the leakage of dangerous chemicals into the sea may lead to phenol pollution of the ocean. Phenol is a common chemical posing serious environmental hazard. Bioremediation of these media contaminated with conventional non-extremophilic microorganisms is not valid due to their inability to efficiently transform organic pollutants at high salinities. Since halophilic microorganisms are metabolically more adapted to high salt concentrations, they are considered suitable and effective candidates for the bioremediation of hypersaline environments and saline effluents impacted by hydrocarbons. For this, there is great interest in the development and optimization of new methods of treatment of saline environments contaminated by these compounds.

**Keywords:** Phenol, biodegradation, halophilic microorganisms, saline environment.

## الملخص

نظرًا لاستمرار طلب الصناعة على المواد الكيميائية ، يتم إطلاق كمية كبيرة من مياه الصرف الصحي عالية الملوحة التي تحتوي على الفينول في البيئة المائية ، ويمكن أن يؤدي تسرب المواد الكيميائية الخطرة إلى البحر إلى تلوث الفينول من المحيط. الفينول مادة كيميائية شائعة تشكل خطراً جسيماً على البيئة. المعالجة الحيوية لهذه الوسائط الملوثة بالكائنات الحية الدقيقة التقليدية غير المحبة للحياة غير صالحة بسبب عدم قدرتها على تحويل الملوثات العضوية بكفاءة في درجات الملوحة العالية. نظرًا لأن الكائنات الحية الدقيقة المحبة للملوحة أكثر تكيفًا من الناحية الأيضية مع تركيزات الملح العالية ، فإنها تعتبر مرشحة مناسبة وفعالة للمعالجة الحيوية للبيئات شديدة الملوحة والنفايات السائلة المالحة المتأثرة بالهيدروكربونات. لهذا ، هناك اهتمام كبير بتطوير وتحسين طرق جديدة لمعالجة البيئات المالحة الملوثة بهذه المركبات.

**الكلمات المفتاحية :** الفينول ، التحلل البيولوجي ، الكائنات الحية الدقيقة المحبة للملوحة ، بيئة مالحة