

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie

THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: Sciences Biologiques

Option : Biologie moléculaire et Génétique des microorganismes

Présentée par

Mme BEKENNICHE NAHLA

Sous le thème intitulé :

*« Exploration de la biodiversité microbienne dans des sites pollués par les hydrocarbures
en Algérie »*

Soutenue Le :11/ 11/ 2021

Devant le jury :

Président	:	Pr. HAMMADI Kheira	Université de Mostaganem
Rapporteur	:	Pr. BEKADA Ahmed Mohamed Ali	Université de Tissemsilt
Co- Rapporteur	:	Pr. CHERIGUENE Abderrahim	Université de Mostaganem
Examineur	:	Pr. CHOUGRANI Fadela	Université de Mostaganem
Examineur	:	Pr. HASSAINE Omar	Université Oran1
Examineur	:	Pr. BEGHALIA Mohamed	Université de Tissemsilt

Année universitaire 2021/2022

Remerciements

&

Dédicaces

Remerciements

Je voudrais tous d'abord adresser mes remerciements les plus sincères à mon directeur de thèse, **Pr. BEKADA Ahmed Mohamed Alipour** ces conseils avisés et pour la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de ces années, Puisse ce travail être le reflet de mon profond respect, de ma gratitude et de toute ma sympathie.

J'adresse tous mes remerciements à mon co-directeur de thèse **Pr. CHERIGUENE Abderrahim** qui a toujours su placer les mots justes pour me soutenir moralement et m'encourager dans mon long parcours, je le remercie aussi pour ces conseils administratifs le long de mon projet.

Mes remerciements s'adressent aussi aux membres du jury, **Pr. HAMMADI Kheira**, **Pr. CHOUGRANI Fadela** de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger mon travail. Je remercie spécialement **Pr. BEGHALIAMohamed** et **Pr. HASSAINE Omard** d'avoir accepté de faire partie des membres du jury vu la situation actuelle du COVID 19, Soyez tous assurés de mon plus profond respect et de ma reconnaissance.

Mes remerciements vont également à l'équipe du laboratoire de Technologie Alimentaire et Nutrition ainsi qu'à ceux du Laboratoire pédagogique de microbiologie de l'Université de Mostaganem.

J'associe à mes remerciements tout le personnel de l'Université Abdel El Hamid Ibn Badiss de Mostaganem ainsi qu'à tous mes collègues.

Mes remerciements vont spécialement à Dr. SIDHOUM Warda, Dr. MOKHTAR Meriem qui ont toujours été présentes tous au long de ce travail et qui m'ont aidé et soutenues par leur savoir, leur présence et leur amitié.

Je n'oublie sur tous pas Pr. NEMMICHE Saïd qui a été pour moi comme un tuteur et qui a toujours su m'orienter dans ma recherche et qui m'a tendu la main chaque fois que je l'ai demandé.

En dernier, je voudrai remercier mes chers collègues et amis Dr. BAHIKhaira, Pr. DALACH Fatiha, Pr. HOUAT Naouel, et tous les membres du département de Biologie.

Dédicaces

Ce travail est le fruit de nombreuses années d'étude, auxquelles le soutien et la présence quotidienne de ma chère famille ont largement contribué

Je dédie ce travail :

A toute **la famille BEKENNICHE**, spécialement mes chers parents

A mon Papa Ali qui a su être présent pour moi et pour mes enfants

A matèrs chère maman Fatima qui a guetté mes pats qui a été pour moi le soutien moral, je t'exprime la profondeur de mes sentiments d'amour, que dieu te guérisse

A mes chères sœurs Wiem et Loubna qui m'ont supportés et écoutés dans les moments les plus difficiles, qui ont été des mères pour mes enfants alors que je préparai ma thèse

A mon frère Yassine et son épouse Kenza.

A toute **la famille AIT ABDESLAM**, en particulier mes belles sœurs Fadhela, Nacéra, Linda, Massiva et Zina, A mes beaux-frères Belaid, Mokran et Hammou qui m'ont encouragé à chaque étape par leurs prières.

A mes chers enfants: ma princesse Nilya Nour et mon prince Iyad Hamza qui me comblent de bonheur chaque jour, qui me donnent du courage et qui me soutiennent juste en me regardant dans les yeux en me souriant et juste en m'appelant maman. Je vous aime mes enfants, que dieu vous garde et vous protège.

En dernier, je dédie ce travail de thèse à mon cher époux Dr. Ait Abdeslam Arezki (Nacer): Je ne sais comment exprimer ma profonde reconnaissance pour le soutien continu dont tu as fait preuve. Tu m'as toujours encouragé et pousser pour aller de l'avants, tu a été l'ami dans mes moments de faiblesses, je ne peux oublier ton aide et ta patience avec les enfants. Que dieu protège notre union et notre amour l'un pour l'autre.

Il me sera difficile de vous citer tous mes sachez que vous êtes dans mon cœur...

Résumé

Résumé

L'industrie pétrolière en Algérie occupe une place prépondérante dans l'économie. Cette industrie amplifie la contamination environnementale et affecte la diversité microbienne des sols. La biorestauration est un processus rentable et efficace pour éliminer les polluants d'hydrocarbures. Les bactéries hydrocarbonoclastes ont la capacité de dégrader le pétrole brut et les hydrocarbures. Les objectifs de notre étude consistent à isoler ces bactéries telluriques cultivables et évaluer leur potentiel en tant qu'agents de biorémédiation contre la contamination des hydrocarbures pétroliers. Pour ceci, des échantillons de sol pollué par le pétrole brut ont été prélevés dans différentes raffineries et sites d'exploitation du pétrole brut en Algérie. L'analyse élémentaire a été déterminée par spectrométrie d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP-OES). Le criblage des bactéries isolées s'est basé sur la recherche de l'activité déshydrogénase. Le test de dégradation du pétrole brut a été perfectionné par : « la méthode de spray » sur milieu de sel minéral (gélose MSM) additionné de pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie pour la visualisation directe des zones claires sur des plaques de gélose. Parmi les isolats, dix ont été sélectionnés pour suivre leur croissance dans un milieu liquide pollué et pour la caractérisation phénotypique et génotypique. L'identification moléculaire a été réalisée par séquençage du gène codant pour l'ARNr 16s. La comparaison des séquences avec la base de données GenBank a montré une similitude avec différentes souches *Aeromonashydrophila*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterobacterxiangfangensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* et *Raoultellasp*. Ces résultats sont significatifs pour l'application de ces isolats à l'échelle environnementale en bioremédiation des sols pollués.

Mots clefs : Pollution, biodégradation, l'activité déshydrogénase, bactéries du sol, pétrole brut, criblage, ARNr 16S.

Abstract

The oil industry in Algeria occupies a preponderant place in the economy. This industry amplifies environmental contamination and affects the microbial diversity of soils. Bioremediation is a cost effective and efficient process for removing pollutants from hydrocarbons. Hydrocarbonoclast bacteria have the ability to degrade crude oil and hydrocarbons. The objectives of our study are to isolate these cultivable soil bacteria and to assess their potential as bioremediation agents against the contamination of petroleum hydrocarbons. For this, soil samples polluted by crude oil were taken from various refineries and crude oil production sites in Algeria. Elemental analysis was determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). The screening for bacteria isolates was based on the detection of dehydrogenase activity. The crude oil degradation test has been perfected by "the spray method" on mineral salt medium (MSM agar) with added crude oil as the sole source of carbon and energy for the direct visualization of light areas on plates agar. Among the isolates, ten were selected to follow their growth in a polluted liquid medium and for phenotypic and genotypic characterization. Molecular identification was performed by sequencing the gene encoding 16s rRNA. Comparison of the sequences with the GenBank database showed similarity with different strains *Aeromona shydrophila*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterobacter xiangfangensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* and *Raoultella* sp. These results are significant for the application of these isolates on an environmental scale in bioremediation of polluted soils.

Keywords: Pollution, biodegradation, dehydrogenase activity, soil bacteria, crude oil, screening, 16S rRNA.

ملخص

تحتل صناعة النفط في الجزائر مكانة بارزة في الاقتصاد. تضخم هذه الصناعة التلوث البيئي وتؤثر على التنوع الميكروبي المعالجة البيولوجية هي عملية فعالة من حيث التكلفة وفعالة لإزالة الملوثات من الهيدروكربونات. للتربة

تتمثل أهداف دراستنا في عزل بكتيريا التربة « Hydrocarbonoclast »

وتقييم إمكاناتها كعامل معالجة حيوي ضد تلوث الهيدروكربونات البترولية

لهذا الغرض، تم أخذ عينات التربة الملوثة بالنفط الخام من مختلف مصفى نفطومواقع إنتاج النفط الخام في الجزائر.

تم تحديد التحليل الأولي لعينات التربة عن طريق قياس

Spectrométrie d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP-OES).

استند فحص الجراثيم المعزولة إلى الكشف عن نشاط

L'activité déshydrogénase.

تم إتقان اختبار تحلل البترول الخام من خلال: "طريقة الرش" على وسط المعدني

المكمل بالبترول الخام كمصدر وحيد للكربون (C) من أجل الطاقة

الكشف عن المناطق المضيئة. من بين العزلات، تم اختيار عشر عزلات لمتابعة نموها في وسط سائل ملوث

وللتوصيف المظهري والوراثي. تم إجراء التحديد الجزيئي عن

ARNr 16s!تشابهاً مع سلالات مختلفة. أظهرت مقارنة التسلسلات مع قاعدة بيانات

Aeromonashydrophila و *Stenotrophomonas maltophilia* و *Enterobacterxiangfangensis* و

Pseudomonas aeruginosa و *Serratia marcescens* و *Raoultellasp.*

الكلمات المفتاحية:

ARNr16S ، التحلل البيولوجي، بكتيريا التربة ، البترول الخام، التلوث

Liste des abréviations

Liste des abréviations

LDC	Lysine décarboxylase
ODC	Ornithine décarboxylase
ADH	Arginine dihydrolase
VP	Voges-Proskauer
A.	<i>Aeromonas</i>
K.	<i>Klebsiella</i>
R.	<i>Raoultella</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNr 16S	Sous unité de l'ARN ribosomique 16S
ATCC	American Type Culture Collection
BET	Bromure d'éthidium
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
NCBI	National Center For Biotechnology Information
PCR	Polymerase Chain Reaction
MEGA-X	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MSM	Mineral Salt Medium
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy, Spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif.
GTFT	Groupement Tin Fouyé Tabankort
INT	le p-iodonitrotétrazolium chlorure
API	American Petroleum Institute
USEPA	United States Environmental Protection Agency

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 1	Teneur moyenne (mg.kg-1) des neufs éléments chimiques majeurs des sols correspondant à la couche de surface d'une épaisseur de 20cm	4
Tableau 2	Comparaison de la population microbienne d'un sol rhizosphérique et d'un sol non-rhizosphérique	6
Tableau 3	Composition élémentaire du pétrole brut	7
Tableau 4	Nombre de forage d'exploitation	17
Tableau 5	Le ménagement des déchets et des rejets liquides	19
Tableau 6	Avantages et limites de la technique de biodégradation	24
Tableau 7	Genres de bactéries qui utilisent les hydrocarbures comme seule source de carbone et d'énergie	28
Tableau 8	Quelques microorganismes producteurs de biosurfactants	35
Tableau 9	Facteurs influençant la biodégradation du pétrole	37
Tableau 10	Les sites de prélèvement des échantillons des sols pollués	46
Tableau 11	Solution de la réaction PCR	69
Tableau 12	Programme réactions d'amplification par PCR	70
Tableau 13	composition des consortiums	72
Tableau 14	Résultats des analyses physico-chimiques des échantillons des sols	74
Tableau 15	Concentrations d'éléments minéraux d'échantillons de sol mesurées par ICP-OES	76
Tableau 16	Résultat des caractères macroscopique des isolats	87,88
Tableau 17	Résultats de croissance les isolats sur milieux sélectifs des Gram –	91
Tableau 18	Caractéristiques physiologiques des 10 isolats sélectionnés	95
Tableau 19	Résultats des tests enzymatiques et biochimiques	96
Tableau 20	Résultats de l'identification par 16S rRNA des souches qui dégradent le pétrole	99
Tableau 21	Classifications des bactéries identifiées dégradant le pétrole brut	103

Liste des figures

Liste des figures

Figure 1	Produits et fractions d'hydrocarbures pétroliers par gammes de carbone	8
Figure 2	Composés hydrocarbonés et non hydrocarbonés présents dans les pétroles bruts	13
Figure 3	Consommation totale mondiale en année 2016	15
Figure 4	Offre totale mondiale d'énergie 1990-2016	16
Figure 5	Production primaire du pétrole	17
Figure 6	Production primaire des hydrocarbures	18
Figure 7	Les découvertes d'hydrocarbures	19
Figure 8	Le devenir de la pollution par le pétrole	20
Figure 9	Accident de la plate-forme pétrolière <i>Deepwater Horizon</i> et étendu de la marée noire	21
Figure 10	Bioactivation séquentielle du benzo(a)pyrène. De multiples enzymes catalysent la biotransformation du benzo(a)pyrène en 7, 8-diol-9, 10, époxyde, molécule cancérigène	31
Figure 11	Ortho-clivage de catéchol dans le cycle de TCA (acide tricarboxylique)	32
Figure 12	Méta-clivage de catéchol dans le cycle de TCA (acide tricarboxylique)	33
Figure 13	Exemple de structure hiérarchique du domaine des Bacteria	39
Figure 14	Schéma d'un arbre phylogénique	41
Figure 15	Les différents échantillons récoltés de la station d'épuration de Ain Amenas : groupement GTFT (Auparavant : Sonatrach) ainsi que la région de Bethioua et d'Arzew.	45
Figure 16	Localisation des différents sites d'échantillonnage par le service de cartographie en ligne : Google Maps.	47
Figure 17	Schéma représentatif des différentes étapes d'isolement et purification des isolats	50
Figure 18	Préparation des isolats pour le criblage des bactéries qui dégradent le pétrole	53
Figure 19	Test de dépistage colorimétrique par le p-iodonitrotétrazolium chlorure (INT)	55
Figure 20	Etude de la biodegradation du pétrole brut par la méthode de spray : « oil spreading technique »	57

Figure 21	Mesure de la cinétique de croissance des bactéries pendant 12 jours d'incubations	59
Figure 22	Extraction de l'ADN génomique par le kit commercial NucleoSpin® Microbial DNA	68
Figure 23	Concentrations variable des éléments minéraux dans chaque échantillon de sol	76
Figure 24	Observations macroscopiques de la diversité des cultures des échantillons du sol sur gélose nutritive	77
Figure 25	Résultat du test colorimétrique par le p-iodonitrotétrazolium chlorure (INT) sur les isolats en présence de pétrole brut comme seule source de Carbone	79
Figure 26	Résultats de l'activité de biodégradation des isolats bactériens sur milieu gélosé MSM supplémenté avec 40 µl de pétrole brut	80
Figure 27	Diamètre de la zone claire des isolats sur gélose MSM additionnée de 40 µl de pétrole brut	81
Figure 28	Résultat des culture bactériennes dans MSM additionné de 2% de pétrole brut après 15 jours d'incubation à l'obscurité	83
Figure 29	Croissance bactérienne d'isolats adaptés à 2% de pétrole brut dans milieu MSM liquide	85
Figure 30	Observation microscopie des isolats bactériens après coloration de Gram (x100)	89
Figure 31	Croissance des isolats sur gélose Hektoen. Incubation 24h à 30°C	92
Figure 32	Croissance des isolats sur gélose XLD. Incubation 24h à 30°C	93
Figure 33	Croissance de l'isolat AIN7 sur gélose au cétrimide, gélose King A et gélose King B. Incubation 24h à 30°C	94

-
- Figure 34** Résultats des tests enzymatiques et biochimiques des 10 isolats sélectionnés pour la biodégradation. Test de citrate : Milieu citrate de Simmons ; Test Voges-Proskauer(VP) : Milieu Clark et Lubs ; Type respiratoire : gélose Viande-foie ; Test lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et l'arginine dihydrolase (ADH) : milieu Møller ; Test ONPG : β -galactosidase. **97**
- Figure 35** Gel de l'amplification PCR pour les isolats (1): ARB3, (2): ARB6, (3): ARB7, (4): ARB8, (5): ARA6, (6): ARA7, (7): AIN1, (8): AIN6, (9): AIN7, et (10): AIN14, (M): marqueur moléculaire, (NC): contrôle négatif. **99**
- Figure 36** Dendrogramme basé sur les séquences génétiques de l'ARNr 16S montrant les relations entre les isolats ARB3, ARB6, ARB7, ARB8, ARA6, ARA7, AIN1, AIN6, AIN7, AIN14 et leurs positions avec des espèces d'autres taxons apparentés de la base de données NCBI. Les séquences ont été alignées en utilisant la méthode Neighbor-joining. **101**
- Figure 37** Croissance bactérienne des cultures mixtes (Mix1, Mix2, Mix3) dans milieu MSM liquide additionné de pétrole brut Mix1(ARA7+AIN7), Mix2(AIN6+AIN14+ARB7), Mix3(AIN1+ARB8+ARB3+ARB6+ARA6+AIN7) **104**
- Figure 38** Evaluation de l'hydrophobicité de la paroi cellulaire (%) chez les 10 souches en culture simple en présence de pétrole **106**
- Figure 39** Evaluation de l'hydrophobicité de la paroi cellulaire (%) des cultures mixtes. Mix1(ARA7+AIN7), Mix2(AIN6+AIN14+ARB7), Mix3(AIN1+ARB8+ARB3+ARB6+ARA6+AIN7) **106**
- Figure 40** Comparaison du pourcentage de l'hydrophobicité de la paroi cellulaire de Mix1 avec les deux cultures simples qui le constitu **107**
- Figure 41** Comparaison du pourcentage de l'hydrophobicité de la paroi cellulaire de Mix2 avec les trois cultures simples qui le constitu **107**
- Figure 42** Comparaison du pourcentage de l'hydrophobicité de la paroi cellulaire de Mix3 avec les six cultures simples qui le constitu **107**

Sommaire

Sommaire

Résumé en français	
Résumé en anglais	
Résumé en arabe	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
<i>Introduction</i>	1
 <i>Synthèse bibliographique</i>	
 <i>Chapitre I : Le sol</i>	
I. le sol	3
I.1. Définition	3
I.2. Structure et composition du sol	3
I.2.1 La phase gazeuse	3
I.2.2. La phase liquide	3
I.2.3. la phase solide	4
I.3. Les bactéries dans le sol	4
I.3.1. Répartition des microorganismes dans les sols	5
I.4. Interactions du sol	6
I.4.1. Interactions avec l'argile	6
I.4.2. Interactions avec les agrégats	6
 <i>Chapitre II : Le pétrole brut</i>	
II. Le pétrole brut	7
II.1. Généralités	7
II.2. Définitions et origines	7
II.2.1. Interaction des sols avec les hydrocarbures	9
II.3. Les propriétés physiques du pétrole	9
II.3.1. Densité	9
II.3.2. Viscosité	9
II.3.3. La solubilité	9

II.4. Les propriétés chimiques	10
II.5. Classification du pétrole brut	10
II.5.1. Les hydrocarbures saturés	10
II.5.1.1. Alcanes ramifiés	11
II.5.1.2. Cycloalcanes	11
II.5.2. Hydrocarbures Aromatiques	11
II.5.2.1. Mono-aromatiques	11
II.5.2.2. Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	11
II.5.3. Composés polaires	11
II.5.3.1. Résines	12
II.5.3.2. Asphaltènes	12
II.6. Forage pétrolier	14
II.6.1. Boue de forage	14
II.7. Exploitation pétrolifère dans le monde	14
II.7.1. Importance du pétrole	15
III.8. Exploitation pétrolifère en Algérie	16
II.8.1. Forage d'exploration	16
II.8.2. Production de pétrole brut	17
II.8.3. Production des hydrocarbures	18
II.8.4. Les découvertes d'hydrocarbures	18
II.8.5. Ménagement des déchets et rejets liquides	19
II.9. La pollution pétrolière des écosystèmes au monde	20
<i>Chapitre III : La bioremédiation</i>	
III. La bioremédiation	22
III.1. Généralités	22
III.2. Définition	22
III.3. Avantages de la bioremediation	23
III.4. Le processus de bioremédiation	24
III.4.1. La bioatténuation	25
III.4.2. La biostimulation	26
III.4.3. Bioaugmentation	26
III.4.4. Interaction entre les micro-organismes et les hydrocarbures dans le sol	26

III.5. Biodégradation microbiologique des polluants hydrocarbonés	27
III.5.1. Biodégradation bactérienne	27
III.5.3. Biodégradation fongique	29
III.5.3.1. Biodégradation des levures	29
III.5.3.2. Biodégradation des champignons filamenteux	29
III.6. Mécanisme de dégradation des hydrocarbures	29
III.6.1. Mécanisme de dégradation des alcanes linéaires	30
III.6.2. Mécanisme de dégradation des alcanes ramifiés	30
III.7. Impact environnementaux sur les bactéries et la biodégradation des hydrocarbures	34
III.7.1. Composition du pétrole	34
III.7.2. Production de biosurfactants	34
III.7.3. Rayonnement UV, température, salinité, ressources en oxygène	35
III.7.4. Les nutriments	36
III.7.5. Les microorganismes	36
<i>Chapitre IV : Identification bactérienne</i>	
IV. Identification bactérienne	38
IV.1. Classification des espèces	38
IV.2. Apport de la phylogénie moléculaire	40
IV.2.1. L'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S)	40
IV.2.1.1. Définition	40
IV.3. L'arbre phylogénique	41
IV.3. Les méthodes de génération d'arbres phylogénétiques	42

Partie expérimentale

Matériel et méthode

I. Caractérisations des sols pollués par le pétrole brut	44
I.1. Echantillonnage et site de prélèvement	44
I.2. Préparation et stockage des échantillons	45
I.3. Analyses physico-chimiques des sols	48
I.3.1. Humidité	48

I.3.2. Potentiel d'hydrogène (pH)	48
I.3.3. Conductivité électrique (CE)	48
I.3.4. Dosage des éléments chimiques par spectrométrie d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP-OES)	48
I.4. Isolement des microorganismes	49
I.4.1. Purification des isolats	51
I.4.2. Conservation des souches bactériennes	51
I.4.2.1. La conservation à longue durée	51
I.4.2.2. La conservation à courte durée	51
II. Criblage des bactéries qui dégradent le pétrole	52
II.1. Préparation des isolats	52
II.2. Activité déshydrogénase : test de dépistage colorimétrique par le p-iodonitrotétrazolium chlorure (INT)	54
II.3. Etude de la dégradation des hydrocarbures sur milieu MSM solide	56
II.4. La cinétique de croissance des isolats sélectionnés	58
II.5. Analyses statistiques	58
III. Identification phénotypique	60
III.1. Observation macroscopique	60
III.2. Observation microscopique	60
III.3. Isolement dans des milieux sélectifs	61
III.4. Tests respiratoires	61
III.5. Métabolisme protéique	63
III.6. Métabolisme glucidique	64
IV. Identification génotypique	66
IV.1. Extraction de l'ADNr16s au Bio Kit	66
IV.2. Amplification du gène codant pour l'ARNr 16S	69
IV.3. Vérification de la présence d'amplicons sur gel d'agarose à 1%	70
IV.4. Identification taxonomique des isolats séquencés	70
IV.5. Analyse phylogénétique	71
IV.6. Numéros d'accèsion de séquence nucléotidique	71
V. Biodégradation du pétrole brut par des cultures mixtes	72
V.1. Préparation des cultures mixtes	72
V.2. Test d'hydrophobicité de la surface cellulaire (CSH%)	73

Résultats

I. Caractéristiques des sols pollués	74
I.1. Mesure d'Humidité, du Potentiel d'hydrogène et de la Conductivité électrique	74
I.2. Dosage des éléments chimiques par spectrométrie d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP-OES)	75
I.3. Isolement et purification des microorganismes	77
II. Criblage (screening) des bactéries qui dégradent le pétrole	78
II.1. Résultats du test colorimétrique par le p-iodonitrotétrazolium chlorure	78
II.2. Révélation de la biodégradation du pétrole brut par méthode de spray	78
II.3. La cinétique de croissance	82
II.4. Etude statistique	84
III. Identification phénotypique	86
III.1. Caractérisation macroscopique et microscopique	86
III.2. Isolement dans des milieux sélectifs	90
III.3. Caractérisation physiologique, enzymatique et biochimique	95
III.4. Tests biochimiques	95
IV. Identification moléculaire	98
IV.1. Extraction et amplification de l'ARNr 16S	98
IV.2. Arbre phylogénétique	100
V. Biodégradation du pétrole brut par des cultures mixtes	104
V.1. Hydrophobicité de la paroi cellulaire	105

Discussion

I. Analyses physico-chimiques	108
I.1. Valeurs du pH, CE et humidité	108
I.2. Dosage des éléments chimiques par spectrométrie d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP-OES)	109
II. Criblage (screening) des bactéries qui dégradent le pétrole	110
II.1. Test colorimétrique par le p-iodonitrotétrazolium chlorure	110
II.2. La biodégradation du pétrole brut par méthode de spray	111
II.3. Cinétique de croissance	112
III. Identification phénotypique	113

IV. Identification moléculaire	115
V. Biodégradation du pétrole brut par des cultures mixtes	117
V.1. Hydrophobicité de la paroi cellulaire CSH%	119
<i>Conclusion et perspectives</i>	122
<i>Références</i>	124
<i>Annexes</i>	
<i>Publication</i>	

Introduction

Introduction

La pollution par les hydrocarbures est très préoccupante en raison de sa rapide propagation dans l'environnement marin et terrestre. Les échouements et les déversements accidentels de pétrole libèrent des tonnes de polluants dans la nature. Par exemple, en 2016, la quantité totale d'huile rejetée dans l'environnement impliquant des accidents pétroliers était de 6000 tonnes (ITOPF, 2021).

La quantité estimée d'hydrocarbures pétroliers perdus à partir des seuls rejets de pétroliers en 2020 était d'environ 1000 tonnes. Il s'agit de la même quantité enregistrée en 2012 et 2019. Les hydrocarbures pétroliers sont des polluants organiques très préoccupants en raison de leur grande persistance, de leur distribution, de leur composition complexe et de leur toxicité. Les plus communs comprennent les hydrocarbures aliphatiques et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (ITOPF, 2021).

Les populations microbiennes dans le sol jouent un rôle primordial dans l'écosystème dont la stabilité, la nutrition des plantes et le transfert de matière organique. Cependant, les polluants pétroliers peuvent changer la composition et la fonction des communautés microbiennes du sol en raison de leurs effets toxiques à long terme dans l'environnement et leur résistance à la biodégradation (Bidja Abena *et al.*, 2020).

Les microorganismes dégradant les hydrocarbures, appelés aussi hydrocarbonoclastes sont ubiquitaires dans les sols. Leur action dépendant de plusieurs paramètres environnementaux tels que la composition et la concentration du pétrole brut, la température, l'oxygène, la concentration des nutriments, la salinité, le pH et la présence et la densité des microorganismes (Siddiqui et Bano, 2018).

La biodépollution des sols contaminés est devenue aujourd'hui une nécessité absolue. La technologie de bioremédiation est une approche écologique, rentable et durable (Guntupalli *et al.*, 2016).

La diversité des polluants et donc leurs propriétés physico-chimiques accentuent la difficulté de cette décontamination. Tous ces déchets industriels servent non seulement de nutriments pour la croissance des organismes, mais agissent également comme la principale source de micro-organismes potentiels générant des biosurfactants (Sayed *et al.*, 2021).

Au cours des dernières années, il y a eu une demande croissante de biosurfactants qui ont plusieurs propriétés fonctionnelles, telles que la diminution de la tension superficielle et interfaciale des liquides et forment des micelles et une microémulsion entre deux phases différentes (Zhao *et al.*, 2016).

Le remplacement des biosurfactants naturels semble être une approche bonne et efficace car ils présentent de nombreux avantages, tels qu'une faible toxicité, une biodégradabilité élevée et une compatibilité environnementale (Karlapudi *et al.*, 2018).

C'est pour cela que, malgré certains risques fonciers dus à des méthodes pas encore maîtrisées, de nombreuses entreprises se sont lancées dans ce projet. Les produits à base de pétrole sont la principale source d'énergie pour l'industrie pétrochimique et la vie quotidienne. Des fuites et des déversements accidentels se produisent régulièrement pendant l'exploration, la production, le raffinage, le transport et le stockage du pétrole et de ses produits. Par conséquent, l'un des problèmes environnementaux majeurs d'aujourd'hui est la pollution hydrocarbonée issue des activités industrielles pétrochimiques. La pollution par les hydrocarbures a été discutée comme le principal défi dans les écosystèmes terrestres vu le caractère toxique des composés pétroliers (Karlapudi *et al.*, 2018).

C'est dans ce contexte là que ce travail de thèse a été mené. En effet, nous avons choisi d'étudier des bactéries isolées de différents sols pollués pour voir leur efficacité à dégrader le pétrole brut. Le présent travail se divise en trois parties :

La première est une bibliographie scientifique où sont exposées des informations relatives au sol (texture, type, flore...), au pétrole brut (composition, toxicité...), au développement des hydrocarbures pétroliers en Algérie, ensuite une étude de la dégradation biologique du pétrole brut par différentes espèces bactériennes.

La deuxième partie présentera le matériel et les méthodes détaillées dans cette étude avec des protocoles détaillés. La troisième partie présentera les résultats obtenus de la caractérisation des sols étudiés et le potentiel de dégradation du pétrole brut par des bactéries isolées et identifiées par ARNr 16S suivie d'une discussion détaillée de tous les résultats exposés basée sur des travaux réalisés par des chercheurs et des spécialistes dans le domaine de la dégradation des hydrocarbures.

Synthèse bibliographique

Chapitre I : le sol

I. le sol

I.1. Définition

Le sol est défini comme la couche superficielle de la croûte terrestre. Il est composé d'eau, d'air et d'organismes ainsi que de minéraux. Pour les géologues, Les différents sols résultent de l'érosion physique et biologique des roches-mères (Atteia, 2015). Sa texture se définit par ses proportions relatives en argile, limon, sable fin et sable grossier. Ces particules plus ou moins fines interviennent sur les propriétés physiques du sol.

I.2. Structure et composition du sol

La structure du sol est le mode d'assemblage des particules qui le composent. La porosité qui est un facteur important de la perméabilité. Donc pour apprécier la structure et la porosité, il faut réaliser une coupe dans le sol pour examiner les différentes couches du sol. Les sols, dans lesquels peuvent s'infiltrer des polluants du type hydrocarbures, sont des milieux complexes et variés, comprenant une phase gazeuse. Une phase solide, une phase liquide et Les propriétés physico-chimiques du sol et des polluants s'influencent mutuellement.

I.2.1 La phase gazeuse

La phase gazeuse d'un sol est constituée par les mêmes composants que ceux de l'air atmosphérique. L'oxygène et le dioxyde de carbone ont un rôle important. En effet, la concentration en oxygène maintient les conditions d'aérobie ou d'anaérobie du sol, impliquées dans les conditions de survie des micro-organismes. Le dioxyde de carbone influence l'acidité du sol par sa transformation chimique sous forme de carbonate en réaction avec la phase liquide du sol. La composition de cette phase gazeuse du sol peut contrôler fortement la distribution et l'activité des communautés bactériennes des sols (Siddiqui et Bano, 2018).

I.2.2. La phase liquide

Appelée aussi la phase aqueuse, cette phase est constituée essentiellement d'eau de pluie contenant des ions minéraux et des molécules organiques. La composition de l'eau du sol dépend du milieu géologique avec lequel elle interagit chimiquement. Du point de vue de la réactivité chimique et biologique, le pH de l'eau du sol constitue une propriété majeure qui

influe toutes les réactions biologiques et chimiques qui se déroulent dans le sol. Les processus de dissolution des roches contrôlent la présence du Ca et du Mg qui proviennent des carbonates, mais aussi du Na et du K provenant des feldspaths et des micas ou des anions HCO_3^- et NO_3^- (Siddiqui et Bano, 2018). Ces différentes réactions permettent la libération de nutriments et oligo-éléments, essentiels aux microorganismes du sol.

I.2.3. La phase solide

Cette phase représente 50 à 70 % du volume d'un sol. Elle est formée de trois types de constituants : les composés inorganiques (90 % du volume total), les composants organiques et les composants biotiques (les microorganismes).

La composition élémentaire au niveau de l'ensemble des sols pour les neuf principaux éléments chimiques (O, Si, Al, Fe, Ca, K, Na, Mg et Ti) sont quasiment toutes identiques (Tableau 1) quel que soit leur localisation (Sposito, 1989).

Tableau 1 : Teneur moyenne (mg.kg-1) des neufs éléments chimiques majeurs des sols correspondant à la couche de surface d'une épaisseur de 20cm (d'après Sposito (1989)).

Eléments	O	Si	Al	Fe	Ca	K	Na	Mg	Ti
Teneur (mg.kg-1)	490000	310000	72000	26000	24000	15000	12000	9000	2900

I.3. Les bactéries dans le sol

Dans les sols, les bactéries représentent le groupe biologique le plus important métaboliquement mais aussi en concentration (10^6 à 10^{10} cellules par gramme de sol sec). Les régions intérieures des micro-agrégats des sols peuvent constituer un habitat relativement stable et isolé pour les microorganismes, caractérisé par une pression de prédatons faible, une disponibilité d'eau relativement stable et de forts gradients de diffusion résultant en une faible disponibilité de nutriments et d'oxygène. Ces micro-agrégats protègent donc les bactéries qui les colonisent de la dessiccation et d'autres substances solubles toxiques exogènes. Il est aussi probable que les microorganismes habitant l'intérieur des micro-agrégats contribuent peu à l'ensemble des activités microbiennes mesurables. Ces microorganismes peuvent cependant jouer un rôle clé dans le fonctionnement de l'écosystème dans des environnements anoxiques et en aidant à la formation et à la stabilisation des agrégats (Faugier, 2010).

Les populations bactériennes présentes dans les sols sont affectées par les variations des conditions hydriques et gazeuses (O₂), alors que les conditions stables de l'intérieur des agrégats les plus petits contribuent au plus faible renouvellement des nutriments et des gaz. Dans les grosses fractions des sols, les nutriments disponibles sont plus limités car plus facilement lessivés au passage d'un flux d'eau, ce qui montre que les bactéries de ces fractions doivent s'adapter à des conditions d'oligotrophie. En développant un plus large éventail métabolique leur permettant de dégrader de grandes molécules organiques. Ces fractions sont riches en *Poteobacterie* et en *Sphingomonas*, qui sont des bactéries capables de dégrader de nombreux composés aromatiques. Les fractions granulométriques plus fines sont colonisées par les bactéries de la division des *Acidobacterium* (Navel, 2011). Certains changements environnementaux favorables à l'augmentation locale de l'activité microbienne des sols pourraient résulter dans la réorganisation des complexes sol-microbes (Young et Crawford, 2004). L'évolution des propriétés physicochimiques de ces micro-habitats spécifiques peut influencer les communautés bactériennes (Navel, 2011).

I.3.1. Répartition des microorganismes dans les sols

Dans les sols, les micro-organismes sont beaucoup plus nombreux dans les litières, les horizons de surface et la rhizosphère des plantes où les conditions énergétiques et nutritionnelles sont les meilleures (Tableau 2).

Comparaison de la population microbienne d'un sol rhizosphérique et d'un sol non rhizosphérique diffère d'un microorganisme à un autre.

Tableau 2 : Comparaison de la population microbienne d'un sol rhizosphérique et d'un sol non-rhizosphérique (Bonneau et Souchier, 1994).

Microorganismes	Sol rhizosphérique	Sol non rhizosphérique
Bactéries	12×10^8	5×10^7
Actinomycètes	46×10^6	7×10^6
Champignons	12×10^5	10^5
Protozoaires	24×10^2	10^3
Algues	5×10^3	27×10^3
Anaérobies	12×10^6	6×10^6
Dénitrifiant	126×10^6	10^5

I.4. Interactions du sol

I.4.1. Interactions avec l'argile

La présence d'argiles, leur nature et leur teneur peuvent modifier l'activité, le développement de populations et la survie de micro-organismes, mais leur rôle reste à préciser. Divers effets des minéraux argileux ont été observés (Bidaud, 1998).

La présence d'argile limiterait la respiration et la croissance des champignons, mais favoriserait celles des bactéries. La biodégradation des produits organiques pourrait être accélérée ou ralentie par la présence d'argiles qui assurent aussi une protection contre les métaux lourds (Bidaud, 1998).

I.4.2. Interactions avec les agrégats

Les bactéries et les champignons du sol jouent un rôle important dans la formation et la stabilité des agrégats du sol. Cette agrégation se produit par l'effet d'adhésion des produits du métabolisme bactérien ou racinaire (essentiellement polysaccharidiques) et par l'enchevêtrement des particules de sol par les champignons filamenteux.

Les bactéries interviendraient dans la formation de petits agrégats à l'échelle du micron, où elles sont liées aux particules d'argiles, chargées également négativement, par des ponts ioniques *via* des cations multivalents (Bidaud, 1998).

Chapitre II : Le pétrole

II. Le pétrole brut

II.1. Généralités

Le pétrole brut est le terme utilisé pour décrire une grande variété de fluides riches en hydrocarbures parce que presque tous sont constitués d'hydrogène et de carbone.

Les hydrocarbures représentent 50 à 98 % du pétrole brut et sont considérés comme un composant important selon la source de pétrole. Le pétrole brut est extrait des plates-formes pétrolières n'est d'aucune utilité directe, c'est pourquoi il doit subir un raffinage pour une variété d'applications. Les méthodes et processus de raffinerie de pétrole donnent des produits comme l'essence, le diesel, le carburéacteur, l'asphalte, la cire, l'huile lubrifiante, le goudron, le kérosène et le gaz de pétrole liquéfié (Al-Dhabaan, 2019).

II.2. Définitions et origines

Le pétrole brut est composé de plusieurs hydrocarbures. On y trouve d'autres éléments tels que l'azote, le soufre, les métaux mais aussi parfois de l'eau salé ou bien des produits sulfuré-thiols. Ces composants sont illustrés dans le tableau 3. Le pétrole est formé naturellement et on en distingue plusieurs sortes. Les trois grands types d'hydrocarbures sont les alcanes ou paraffine, les cycloalcanes ou naphènes et les composés aromatiques. Une grande partie du pétrole brut de la planète est emprisonné depuis des milliers d'années dans des gisements souterrains (Sayed *et al.*, 2021).

Tableau 3: Composition élémentaire du pétrole brut (Sayed *et al.*, 2021)

Eléments	Pourcentage %
Carbone	85–90
Hydrogène	10–14
Sulfure	0,2–3
Nitrogène	<0,1–2
Oxygène	1–1,5
Métaux *	<1

* Hg, Au, Cu, Al, Ca, Co, K, Mg, Si, Sr, Mo, Ti, Mn, Li, Se, Rb, Ag, Ba, Pb, As, Cd, Cr, Fe, Ni, V, Zn.

L'industrie pétrolière fournit une quantité substantielle de la demande mondiale d'énergie en plus des intermédiaires pétrochimiques populaires nécessaires à la production d'une vaste gamme de produits, à savoir. Les solvants, les colorants, les produits pharmaceutiques, les polymères et les produits chimiques, etc. Tous ces produits génèrent une pollution environnementale lorsqu'ils sont rejetés dans l'environnement (Zhang *et al.*, 2019). La figure 1 montre les différents produits obtenus à partir du raffinage d'hydrocarbures pétroliers avec leur rang de carbone moléculaire.

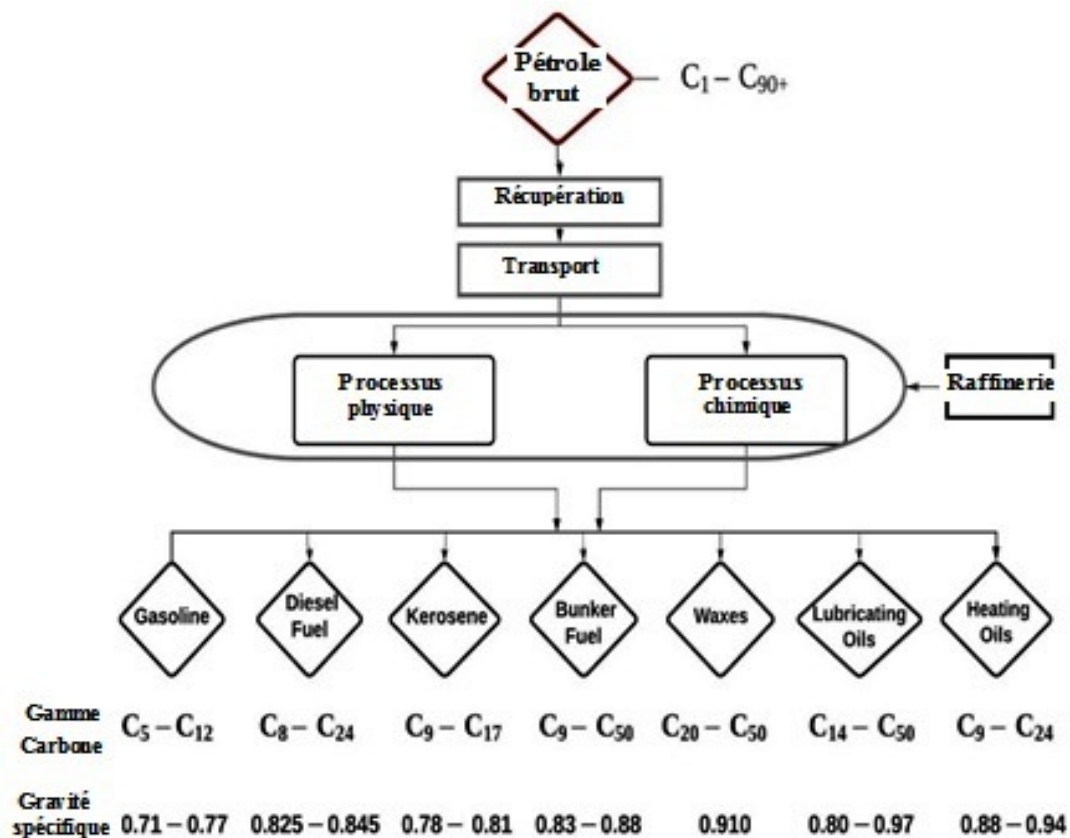


Figure 1: Produits et fractions d'hydrocarbures pétroliers par gammes de carbone (Sayed *et al.*, 2021)

II.2.1. Interaction des sols avec les hydrocarbures

Le sol est composé de matières organiques et inorganiques séparés par des pores contenant de l'eau ou de l'air. L'interaction entre les hydrocarbures et les minéraux à la surface (argile, limon et sable) ne sont significatives que lorsque la teneur en matière organique est de 0,1%. Ainsi, la matière organique est très importante dans le devenir et le comportement des contaminants organiques. La matière organique est divisée en deux phases: la première est le carbone mou (caoutchouteux) qui est l'expansion, structures flexibles ayant comme clé les acides humique et fulvique (phénol organique hautement soluble trouvé dans l'humus qui chélate les nutriments minéraux élémentaires). La deuxième phase est le carbone dur (vitreux) défini comme des structures rigides et condensées avec l'humine, le kérogène et les carbones pyrogènes. La sorption d'hydrocarbures dans la région vitreuse est caractérisée par un emprisonnement irréversible des hydrocarbures (Stroud *et al.*, 2007; Van Elsas *et al.*, 2007).

II.3. Les propriétés physiques du pétrole

II.3.1. Densité

La densité d'un pétrole dépend de celle de ses constituants et détermine la flottabilité. Presque tous les hydrocarbures liquides sont plus légers que l'eau.

Le "degré API" (American Petroleum Institute) est l'unité de mesure, utilisée dans le système anglo-saxon, pour mesurer la densité d'un liquide, en particulier d'un brut pétrolier, on parle généralement de brut lourd pour moins de 20°API, moyen dans les 20 à 30°API et léger au-delà, mais ces bornes varient selon les pays (Hassaine, 2016)

II.3.2. Viscosité

La viscosité mesure la résistance à l'écoulement d'un liquide (Fingas, 2013), et donc son taux de dispersion dans l'environnement marin. Son unité de mesure est le centistoke (*Cst*). Elle diminue lorsque la température augmente (Fingas, 2013) et elle s'accroît par évaporation des composés volatils, par l'oxydation photochimique et surtout par formation d'émulsions inverses qui modifient le comportement initial du produit (Hassaine, 2016).

II.3.3. La solubilité

Donne une idée de la capacité d'une molécule organique à se dissoudre dans l'eau. Elle est de l'ordre de : $\mu\text{g/l}$ (solubilité faible) ; mg/l (solubilité moyenne); g/l (solubilité importante). En général, les HAP ont une faible solubilité, comprise entre 30 mg/l pour les composés légers et 10 – 4 mg/l pour les plus lourds (Wauquier, 1994 ; Hassaine, 2016).

II.4. Les propriétés chimiques

La biodégradabilité des pétroles bruts est très fortement dépendante de leur composition. A une température déterminée, un pétrole léger est plus susceptible d'être biodégradé qu'un pétrole lourd, et plus le pétrole est raffiné plus il est dégradé rapidement (Sauret, 2011).

Le pétrole brut est avant tout un liquide naturel, collant et inflammable. Les pétroles bruts varient considérablement en composition chimique. Il est généralement brun foncé ou noir (bien qu'il puisse être de couleur jaune ou verte). D'un point de vue technique, les pétroles bruts sont généralement classés selon leurs sources, la gravité de l'American Petroleum Institute (API) et la quantité de soufre (S). Le pétrole brut est considéré comme « léger » lorsque sa densité est faible et « lourde » lorsqu'il est dense. Les pétroles bruts à relativement faible teneur en soufre sont appelés bruts « doux », tandis que ceux contenant des quantités importantes de soufre sont appelés bruts « acides ». Le pétrole brut est un mélange de diverses substances organiques, principalement des hydrocarbures, des composés organiques (Varjani et Upasani, 2017).

II.5. Classification du pétrole brut

Le pétrole brut est un mélange complexe d'hydrocarbures et de pétrole récupérés à partir de différents réservoirs, qui varie considérablement en propriétés compositionnelles et physiques (Chikere *et al.*, 2011). Reconnu depuis longtemps comme substrats favorisant la croissance microbienne, ces hydrocarbures sont à la fois des cibles et des produits de métabolisme. Le pétrole brut et les hydrocarbures peuvent être divisés en quatre classes: les aliphatiques, les aromatiques, les asphaltènes et les résines. Les hydrocarbures diffèrent dans leur sensibilité aux attaques des microbes et dans le passé, ont été généralement classés dans l'ordre suivant de susceptibilité décroissante: n-alcanes, alcanes ramifiés, aromatiques de bas poids moléculaire, alcanes cycliques, aromatiques de haut poids moléculaire (Figure 2) (Leahy et Colwell, 1990).

II.5.1. Les hydrocarbures saturés

Composés formés d'atomes de carbone et d'hydrogène reliés uniquement par une liaison simple. Les hydrocarbures saturés peuvent s'unir en des chaînes linéaires ou ramifiées

d'environ 25 atomes de carbone ou moins. Facilement biodégradables, bien que leur biodégradabilité diminue avec la longueur de la chaîne (Chikere *et al.*, 2011).

II.5.1.1. Alcanes ramifiés

Les alcanes ramifiés les plus abondants sont les iso-alcanes (groupement méthyle en position 2). Les autres composés ramifiés antéiso (groupement méthyle en position 3) ou polyramifiés tels que les isoprénoides (exemple : pristane, phytane), sont beaucoup moins nombreux. Ces composés se trouvent dans le pétrole brut à des proportions sensiblement égales à celles des n-alcanes (Chikere *et al.*, 2011).

II.5.1.2. Cycloalcanes

Les Cycloalcanes renferment des composés cycliques (à 5 ou 6 atomes de carbone) saturés et le plus souvent substitués. Quelques dérivés polycycliques sont aussi présents et certains d'entre eux tels que les stéranes et les triterpanes sont caractéristiques d'un pétrole brut. Cette famille peut représenter entre 30 et 40% des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut (Chikere *et al.*, 2011).

II.5.2. Hydrocarbures Aromatiques

Composés formés de cycles de 6 atomes de carbone reliés par des doubles liaisons :

II.5.2.1. Mono-aromatiques

Ce groupe d'hydrocarbures inclus le complexe BTEX : Benzène, Toluène, Éthylbenzène et Xylène. C'est composant sont volatils et facilement biodégradables, même lorsque des chaînes latérales y sont fixées. Ils sont très toxiques pour les organismes aquatiques.

II.5.2.2. Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) peuvent représenter jusqu'à 60% du pétrole brut. Les HAPs de faible poids moléculaire (1 à 3 cycles) représentent 90% des hydrocarbures aromatiques dans le pétrole brut. Ces composés présentent des cycles multiples et ceux présentant 4 cycles ou plus résistent davantage à la biodégradation. Ils sont sensibles à la photo-oxydation et sont considérés comme polluants prioritaires selon l'USEPA (United States Environmental Protection Agency).

II.5.3. Composés polaires

Les composés polaires correspondent à des molécules hétérocycliques, telle que : les composés oxygénés (phénols, acides carboxyliques, alcools, aldéhydes...etc), les composés

soufrés (mercaptans, sulfures, disulfures...etc) et les composés azotés (pyridines, quinoleines...etc) (Hassaine, 2016).

II.5.3.1. Résines

Les résines sont des composés très polaires, responsables des qualités adhésives du pétrole et ayant un caractère aromatique très marqué. Ils sont solubles dans les solvants organiques, tels que le *n*-heptane.

II.5.3.2. Asphaltènes

Composés polaires, responsables de la viscosité et de la densité élevée du pétrole. Les asphaltènes et les résines peuvent également être complexés à des métaux lourds, tels que le nickel et le vanadium, généralement présents à l'état de trace dans le pétrole (Tissot et Welte, 1984).

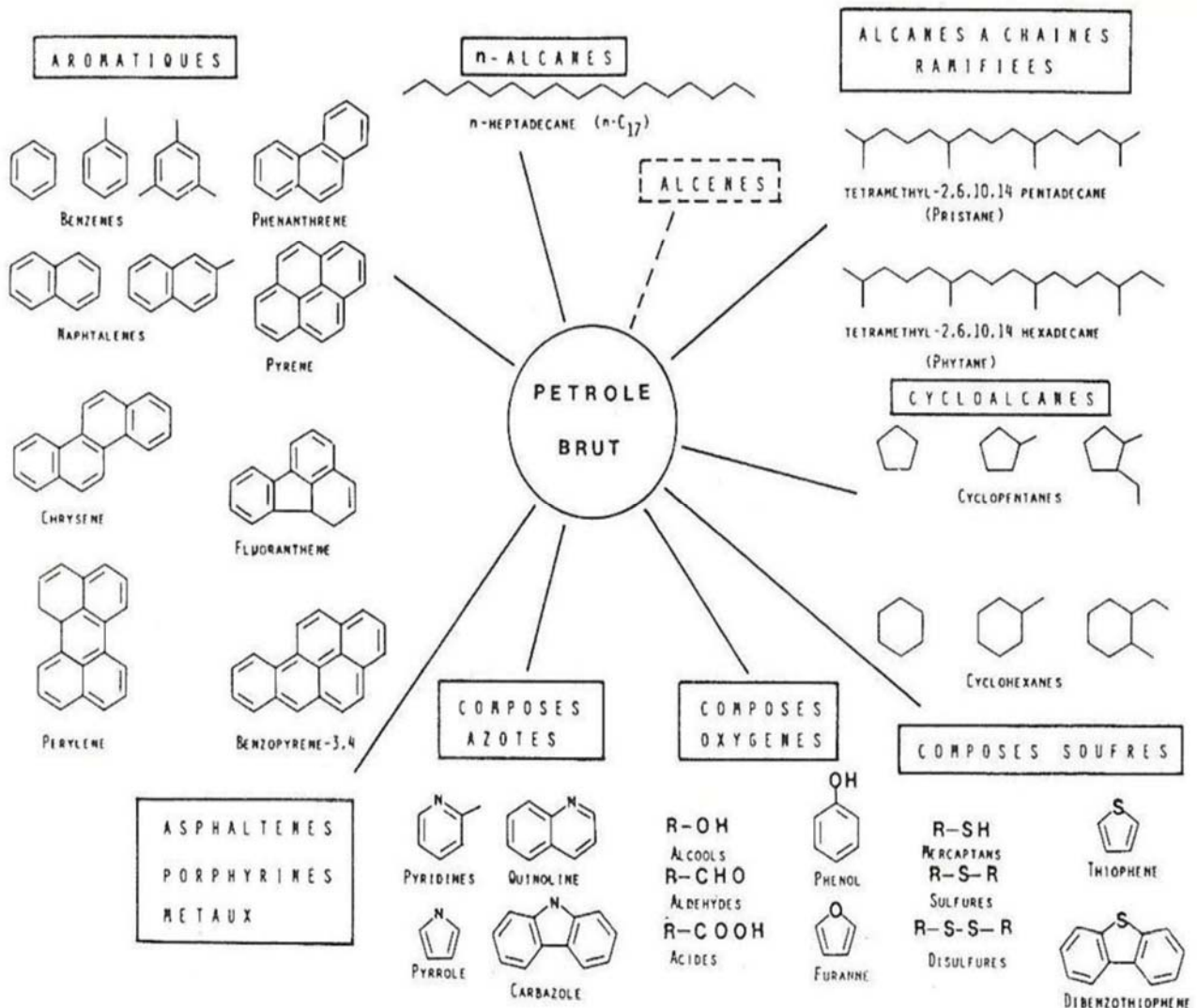


Figure 2: Composés hydrocarbonés et non hydrocarbonés présents dans les pétroles bruts (Bianchi *et al.*, 1989)

II.6. Forage pétrolier

On appelle "forage pétrolier" l'ensemble des opérations permettant d'atteindre les roches poreuses et perméables du sous-sol, susceptibles de contenir des hydrocarbures liquides ou gazeux, L'implantation d'un forage pétrolier est décidée à la suite des études géologiques et géophysiques effectuées sur un bassin sédimentaire. Ceci nous permet de nous faire une idée de la constitution de sous-sol et des possibilités de gisements, sans pour autant préciser la présence d'hydrocarbures. L'opération de forage peut alors confirmer les hypothèses faites et mettre en évidence la nature des fluides contenus dans les roches (Hazenet *al.*, 2016).

II.6.1. Boue de forage

Les boues de forage sont un système composé de différents constituants liquides (eau, huile) et/ou gazeux (air ou gaz naturel) contenant en suspension d'autres additifs minéraux et organiques (argiles, polymères, tensioactifs, déblais, ciments, ...) (Malo *et al.*, 2015). Plusieurs types de boue existent : des boues à base d'eau (Water Based Mud) et des boues à base d'huile (Oil Based Mud). Celles contaminées au pétrole brut sont souvent à base d'huile.

II.7. Exploitation pétrolière dans le monde

L'industrie pétrolière est un pilier de l'économie mondiale. Parmi les régions productrices de pétrole dans le monde, on note par ordre décroissant les principaux pays producteurs au cours de l'année 2005, avec quantités en Mbbls/j incluant le brut, les liquides de gaz naturel et le pétrole non conventionnel comme suit : Arabie saoudite : 9,57, Russie : 9,44, États-Unis : 7,27, Iran : 3,91, Mexique : 3,76, Chine : 3,63, Canada : 3,03, Norvège : 2,97, Vénézuéla : 2,64, Koweït : 2,51, Nigeria : 2,5, Émirats arabes unis : 2,5, Angola:1,8, Irak : 1,8, Brésil : 1,7, Royaume-Uni : 1,7, Algérie : 1.65 et Libye : 1,4 (OPEP).

Les principaux pays exportateurs sont classés par ordre décroissant aussi pendant l'année 2005 comme suit : Arabie saoudite : 7,38, Russie : 6,64, Norvège : 2,74, Iran : 2,34, Koweït : 2,18, Vénézuéla : 2,12, Nigeria : 2,09, Émirats arabes unis : 2,09, Mexique : 1,66, Algérie : 1.63, Libye : 1,38 (OPEP).

En 2005, les principaux pays consommateurs sont, en Mbbls/j États-Unis : 20,6, Chine : 7, Japon : 5,4, Russie : 2,8, Corée du Sud : 2,6, Allemagne : 2,6, Inde : 2,5, Canada : 2,2, Mexique : 2,0 et France : 2,0 (OPEP).

II.7.1. Importance du pétrole

Le pétrole est la plus importante source d'énergie au monde, Il satisfait plus de 30 % des besoins énergétiques. C'est la principale matière première des carburants qui alimentent les transports (voitures, camions, avions) (Figure 3) (UNSD, 2021).

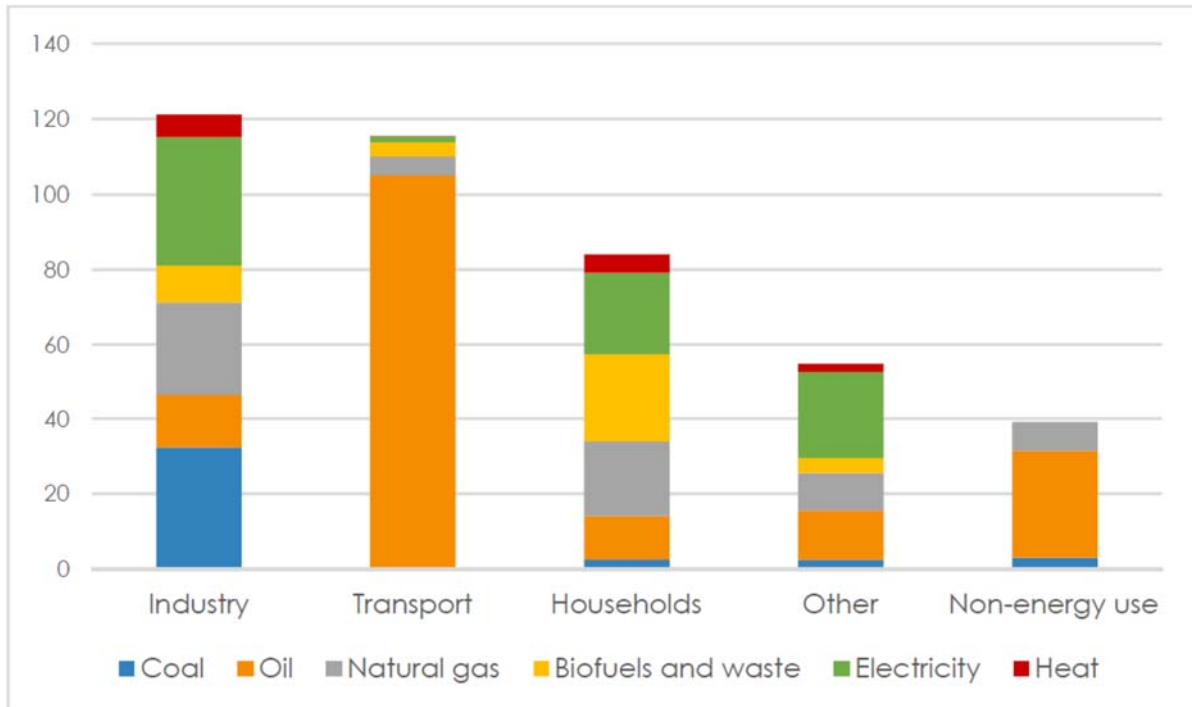


Figure 3: Consommation totale mondiale en année 2018 (UNSD, 2021)

C'est aussi une matière première irremplaçable pour l'industrie de la pétrochimie pour un grand nombre de produits de la vie quotidienne : matières plastiques, peintures, colorants, cosmétiques, etc. Enfin, le pétrole sert aussi comme combustible dans le chauffage domestique et comme source de chaleur dans l'industrie, mais dans une moindre mesure ; il ne représente que 4,6 % de l'électricité mondiale, les autres sources d'énergie électrique étant nombreuses (nucléaire, charbon, au gaz, hydraulique, éolienne) (Figure 4) (UNSD, 2021).

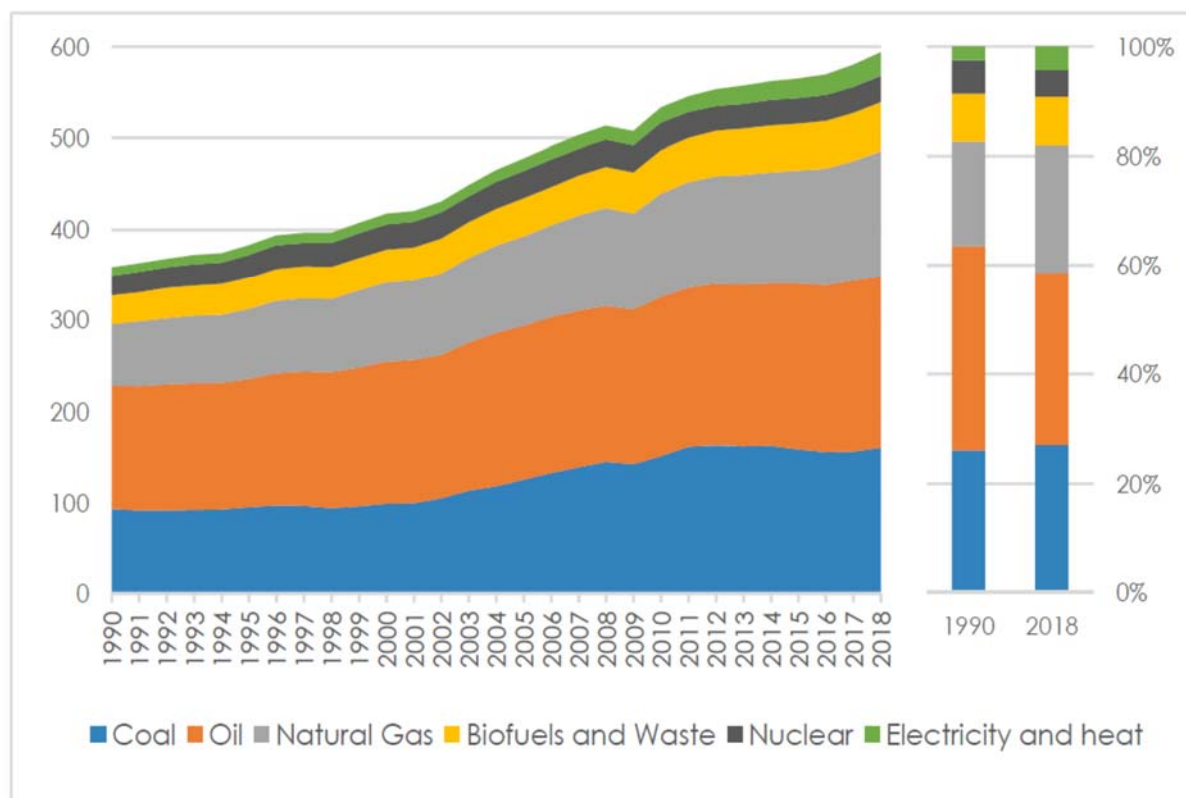


Figure 4: Offre totale mondiale d'énergie 1990-2018(UNSD, 2021)

III.8. Exploitation pétrolière en Algérie

Les travaux de recherche et de prospection ont commencé en Algérie en 1948 dans le bassin du Chélif à Oued Guetrini. Depuis cette date, le groupe n'a pas cessé de rechercher de nouveaux gisements pétroliers sur le territoire. Les nombres et les bilans cités ci-dessous dans les domaines de forage, d'exploitation pétrolière et le ménagement des déchets sont ceux de l'année 2019 dans différentes raffineries et sites d'exploitation du pétrole en Algérie.

II.8.1. Forage d'exploration

Le nombre de forages d'exploration en 2019 a atteint 80 puits, dont 71 puits en effort propre. Le bassin Berkine a vu la découverte de 17 puits, Le bassin Amguid Messaoud 15 puits, et le bassin Oued Mya 11 puits (Tableau 4)(Rapport annuel SONATRACH, 2019)

Tableau 4: Nombre de forage d'exploitation (Rapport annuel SONATRACH, 2019)

Forage d'exploration	Unité	Réalisation (2018)	Réalisation (2019)
	Volume d'activité (mètre)	294969	236138
	Puits terminés	80	80

II.8.2. Production de pétrole brut

La production de pétrole brut s'est stabilisée au même niveau que celui atteint en 2018, autour de 48,3 Millions Tonnes. La contribution des gisements exploités en partenariat représente 40% de ce volume, soit 19,6 Millions Tonnes (Figure5) (Rapport annuel SONATRACH, 2019).

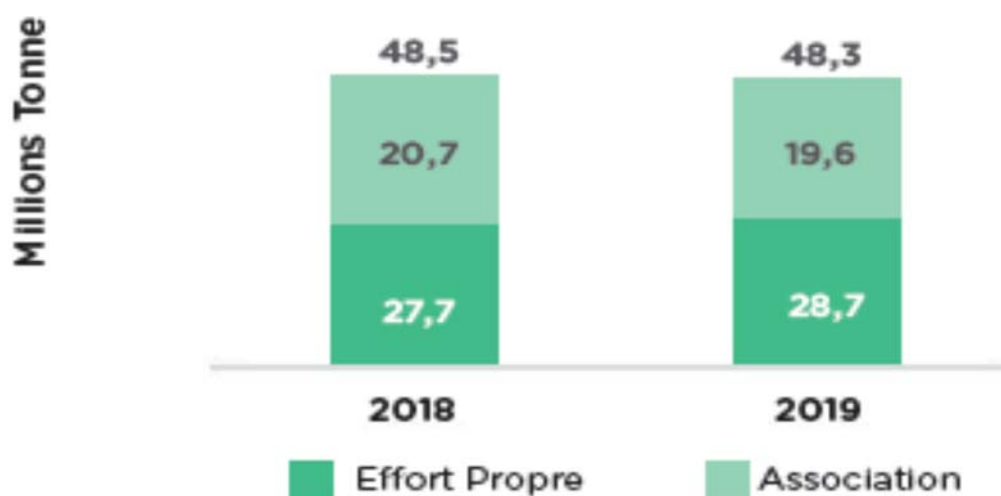


Figure 5: Production primaire du pétrole(Rapport annuel SONATRACH, 2019)

II.8.3. Production des hydrocarbures

La production primaire d'hydrocarbures s'est élevée à 186,8 Millions TEP durant l'année 2019, dont 25% réalisée en Association (figure 6) (Rapport annuel SONATRACH, 2019).

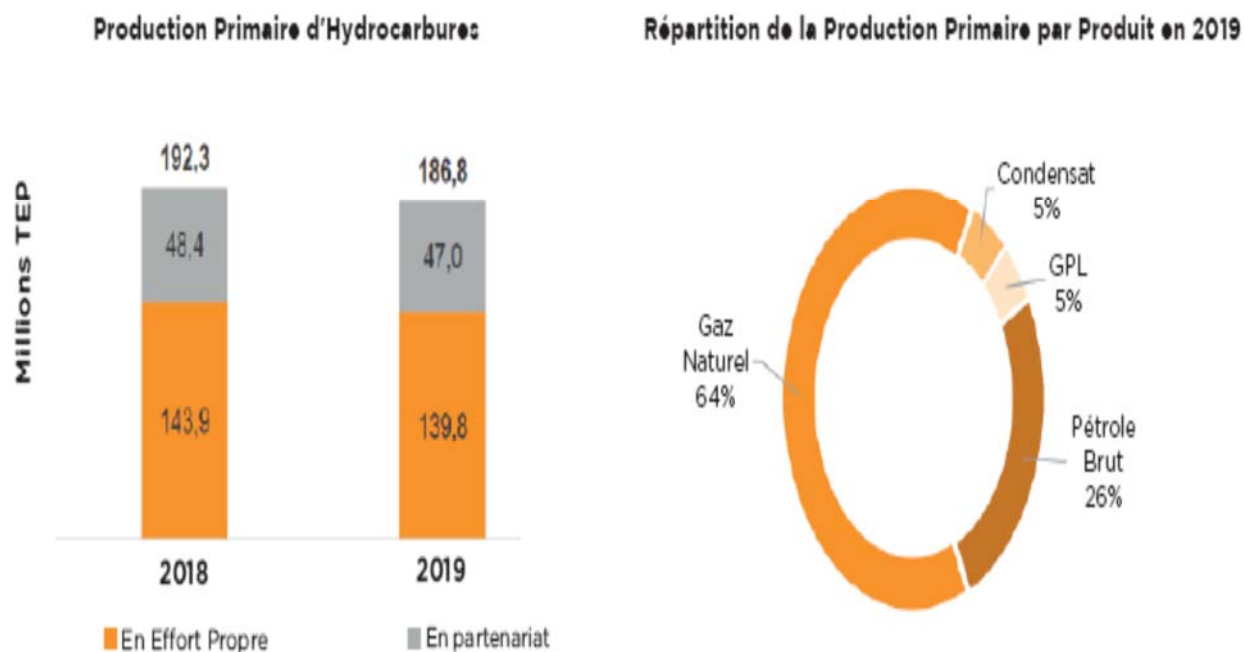


Figure 6: Production primaire des hydrocarbures(Rapport annuel SONATRACH, 2019)

II.8.4. Les découvertes d'hydrocarbures

Les efforts déployés pour le renouvellement des réserves en cette année 2019 ont permis de mettre en évidence dix-neuf (19) découvertes d'hydrocarbure dont une (01) en association.

Ces découvertes consistent en 07 découvertes d'huile, 08 découvertes de gaz à condensat et 04 découvertes de gaz (Figure 7) (Rapport annuel SONATRACH, 2019).

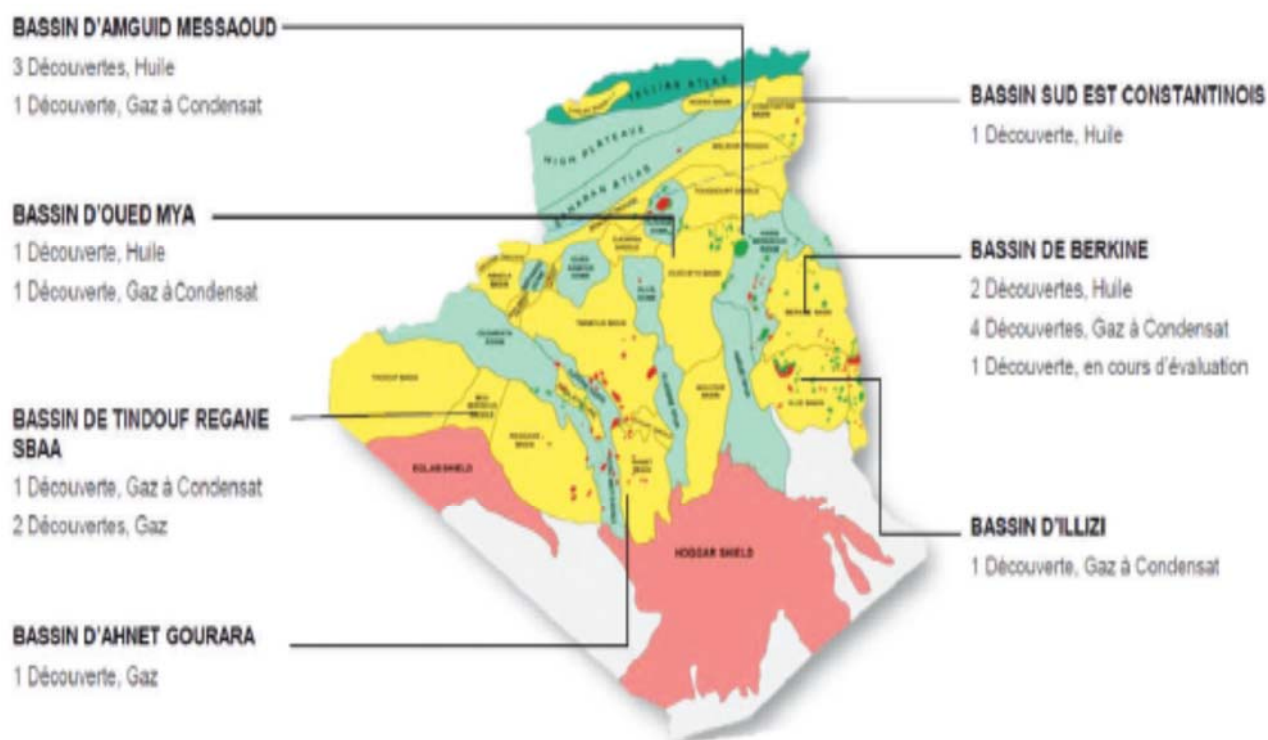


Figure 7: Les découvertes d'hydrocarbures(Rapport annuel SONATRACH, 2019)

II.8.5. Ménagement des déchets et rejets liquides

Les bourbiers de forage posent des problématiques au niveau des volumes cumulés aux files des années d'exploitation. Au d'épis des efforts fournis par la SONATRACH le nombre de bourbiers traités reste plus inférieurs à celui accumulé. Le bilan des réalisations pour l'année 2019 résume le ménagement des déchets et les rejets liquides traités et cumulés dans le tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5: Le ménagement des déchets et des rejets liquides (Rapport annuel SONATRACH, 2019)

Division	Nombre de bourbiers traités durant l'année 2019	Volume traité cumulé (m ²)
Forage	30	27115
Production	265	230000
Association	09	5725
Total	304	262840

II.9. La pollution pétrolière des écosystèmes au monde

La pollution pétrolière est une conséquence directe et inévitable de l'exploitation massive du pétrole. Tant que le pétrole sera exploité, l'ensemble des écosystèmes seront fortement menacés par la pollution. Avec le temps, les sources de pollution se sont diversifiées. Sous l'influence de l'exploitation pétrolière accrue et le manque de vigilance face à la toxicité du produit, de nombreux navires pétroliers ont échoué en mer (Amoco Cadiz, Exxon Valdez, Erika, Prestige...) déversant d'importantes quantités de pétrole (Figure 8).

Les rejets volontaires de raffineries, et de navires pétroliers (déballastages, dégazages) ont eux aussi provoqués une pollution dont les quantités étaient et restent encore aujourd'hui supérieures à celles provenant des déversements accidentels (Mascarelli, 2010).

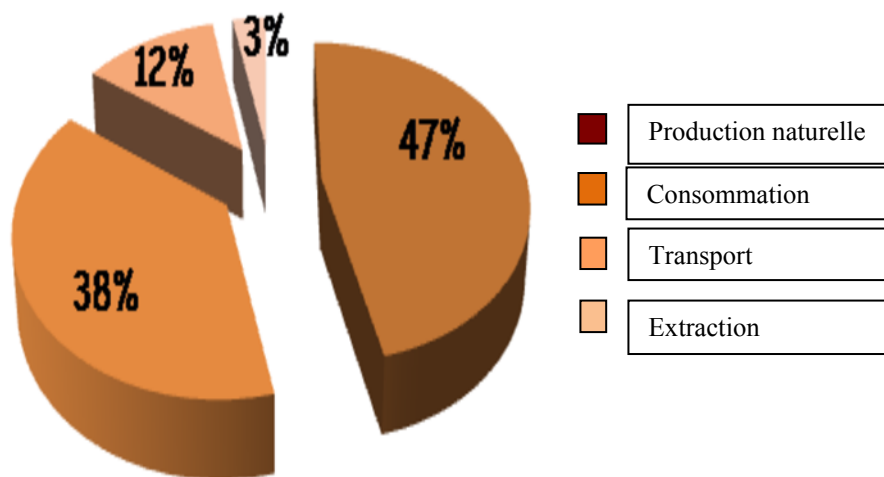


Figure 8: Le devenir de la pollution par le pétrole(Mascarelli, 2010).

On peut évoquer l'explosion qui a eu lieu en 2011 à la plate-forme pétrolière *Deepwater Horizon*, Louisiane, déversant ainsi 500000 à 1000000 tonnes de pétrole en moins de 2 mois ce qui est équivalent à 10 millions de litres de pétrole par jour dans le golfe du Mexique atteignant ainsi le record du plus important déversement connu à ce jour sur les côtes américaines et donnant un triste tableau d'huile sur mer (Figure 9). Une grande partie du pétrole a déjà disparu des eaux de surface et, jusqu'à présent, les effets les plus visibles ont été les oiseaux de mer mazoutés, les tortues et les marais salants (Mascarelli, 2010).

Ce type d'accidents pétroliers à répétition et les dommages économiques et écologiques résultant ont contribué à la prise de conscience et ont fini par attiré l'attention des autorités gouvernementales et des scientifiques pour la lutte contre la pollution pétrolière d'origine anthropique.

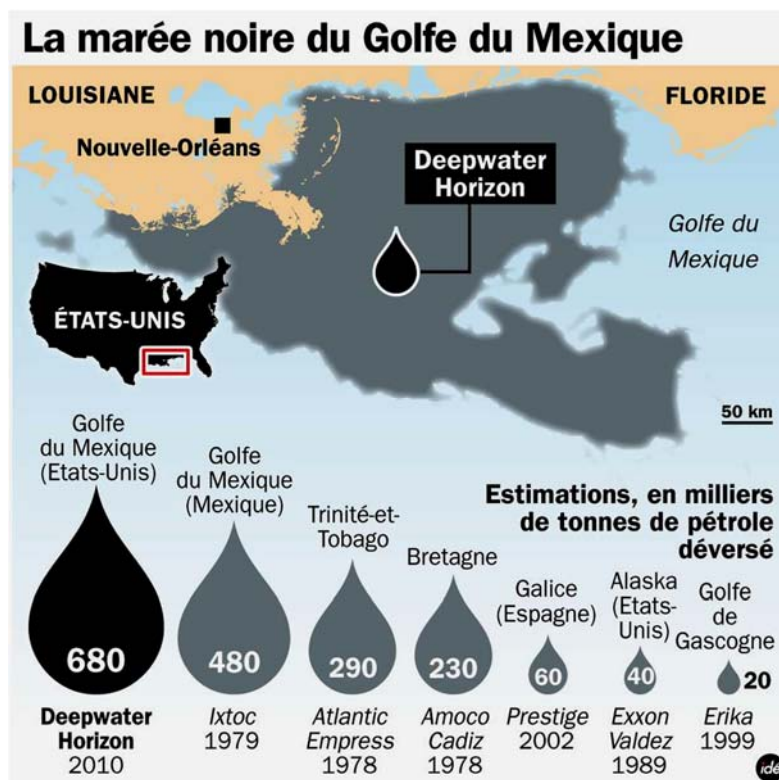


Figure 9: Accident de la plate-forme pétrolière *Deepwater Horizon* et étendu de la marée noire (Bossy, 2013)

Chapitre III :
La bioremédiation

III. La bioremédiation

III.1. Généralités

Les transformations microbiennes des hydrocarbures cycliques ont reçu beaucoup d'attention au cours des trois dernières décennies. L'intérêt pour la dégradation des polluants environnementaux ainsi que pour les applications des micro-organismes dans la catalyse des réactions chimiques a stimulé la recherche dans ce domaine. Les voies métaboliques de divers aromatiques, cycloalcanes et terpènes dans différents microorganismes ont été élucidées, et la génétique de plusieurs de ces voies a été clarifiée. La toxicité de ces composés vis-à-vis des microorganismes est très importante dans la dégradation microbienne des hydrocarbures (Sikkema *et al.*, 1995).

La composition d'un pétrole détermine sa toxicité et son potentiel de dégradation. La vitesse de biodégradation est plus élevée pour les hydrocarbures saturés, viennent ensuite les hydrocarbures aromatiques légers, les hydrocarbures aromatiques à haut poids moléculaire, les composés polaires ayant la vitesse de dégradation la plus faible. Les hydrocarbures saturés incluent les n-alcanes, les alcanes ramifiés et les cycloalcanes (naphtènes). Les alcanes normaux ou à chaînes linéaires sont les plus abondants et les plus dégradables : les n- alcanes à nombre de carbone supérieur à 44 peuvent être métabolisés par les micro-organismes mais ceux ayant de 10 à 24 atomes de carbone (C10-C24) sont généralement plus facilement dégradables. Les alcanes ramifiés sont plus récalcitrants à la biodégradation que les n-alcanes et plus le nombre de ramifications augmente, moins ces composés sont susceptibles à la dégradation microbienne. Les hydrocarbures cycliques constituent une fraction importante des hydrocarbures dans la plupart des bruts pétroliers, ils sont plus difficilement dégradables que les deux séries précédentes à cause de leur toxicité suite à l'interaction avec la membrane cellulaire des micro-organismes (Sikkema *et al.*, 1995).

III.2. Définition

La bioremediation est une dépollution biologique efficace pour purifier les environnements contaminés par des produits polluants dangereux. Cette méthode est réalisée par des microorganismes ayant le potentiel de digérer ces polluants et de les transformer en des composants moins complexe et moins dangereux. La bioépuration est possible pour Les hydrocarbures pétroliers ainsi que Les déchets d'exploitation et de transformation du pétrole (boues et résidus d'huiles de forages).

La biodégradation est définie comme la réduction de la complexité des composés chimiques catalysée biologiquement. En effet, la biodégradation est le processus par lequel les

substances organiques sont décomposées en composés plus simples par des micro-organismes vivants. Lorsque la biodégradation est terminée, le processus est appelé « minéralisation» (Joutey *et al.*, 2013).

III.3. Avantages de la bioremediation

Les avantages de la bioremédiation sont nombreux (tableau 6), le principal avantage est qu'il respecte l'environnement et ne laisse presque aucune substance inoffensive dans la nature après traitement (Dzionic *et al.*, 2016). La biodégradation est peut-être la technologie la plus propre et la plus respectueuse de l'environnement appliqué pour traiter la contamination par le pétrole brut et des dérivés dans divers environnements. Ainsi, la biodégradation semble être le moyen le plus prometteur pour traiter la contamination des sols (Imron *et al.*, 2020).

Cette méthode peut également être utilisée dans de larges zones contaminées (Azubuike *et al.*, 2016). Cette méthode convient également aux traitements des eaux marines contaminées. Puisque le pétrole brut a des caractéristiques hydrophobes, il a tendance à s'étendre sur une grande surface. La manipulation des grandes zones contaminées par traitement physico-chimique est très chère, donc la biodégradation semble être la plus rentable des technologies disponibles (Imron *et al.*, 2020).

Des techniques de bioremédiation in situ ont été utilisées avec succès pour traiter les solvants chlorés, les colorants, les métaux lourds et les sites pollués par les hydrocarbures (Frasca *et al.*, 2015; Roy *et al.*, 2015). Le statut d'accepteur d'électrons, la teneur en humidité, la disponibilité des nutriments, le pH et la température font partie des conditions environnementales importantes qui doivent être adaptées à une bioremédiation in situ réussie (Philp et Atlas, 2005).

Tableau 6: Avantages et limites de la technique de biodégradation(Philp et Atlas,2005)

Avantages	Limites
Respecte l'environnement	Solubilité du pétrole brut
Applicable pour le traitement des larges surfaces	Durée du traitement
Applicable dans divers environnement	Quantité de biomasse nécessaire pour l'application des larges surfaces
Les résidus décomposés peuvent être utilisés comme fertilisants	Disponibilité des nutriments
Potentiel de développement de la bioénergie à partir de la biomasse microbienne	Exigence d'experts dans le domaine de la bioremédiation du pétrole brut
Efficace en termes d'élimination des contaminants	
Rentable	

III.4. Le processus de bioremédiation

La compréhension du processus de biodégradation nécessite une compréhension des micro-organismes qui font fonctionner ce mécanisme. Les organismes microbiens transforment la substance par des transformations métaboliques ou enzymatiques. Il repose sur deux processus: la croissance et le cométabolisme. En croissance, un polluant organique est utilisé comme seule source de carbone et d'énergie. Ce processus entraîne une dégradation complète (minéralisation) des polluants organiques. Le cométabolisme est défini comme le métabolisme d'un composé organique en présence d'un substrat de croissance utilisé comme principale source de carbone et d'énergie. Plusieurs micro-organismes, y compris des champignons, des bactéries et des levures sont impliqués dans le processus de biodégradation. Les rapports sur les algues et les protozoaires sont rares en ce qui concerne leur implication dans la biodégradation. Les processus de biodégradation varient considérablement, mais le produit final de la dégradation est souvent le dioxyde de carbone. La matière organique peut être dégradée en aérobie, avec de l'oxygène ou en anaérobie, sans oxygène (Joutey *et al.*, 2013).

Le processus de bioremédiation peut être divisé en trois phases. Premièrement, grâce à l'atténuation naturelle, les contaminants sont réduits par les micro-organismes natifs sans aucune intervention humaine. Deuxièmement, la biostimulation est utilisée lorsque des nutriments et de l'oxygène sont appliqués aux systèmes pour améliorer leur efficacité et accélérer la biodégradation. Enfin, lors de la bioaugmentation, des microorganismes sont ajoutés aux systèmes. Ces organismes supplémentaires devraient être plus performants que la flore native pour dégrader le contaminant cible. Une technologie de remédiation réalisable nécessite que les micro-organismes soient capables de s'adapter rapidement et d'utiliser efficacement les polluants d'intérêt dans un cas particulier dans un délai raisonnable.

De nombreux facteurs incitent les micro-organismes à utiliser les polluants comme substrats ou à les métaboliser, comme le potentiel génétique et certains facteurs environnementaux tels que la température, le pH et la disponibilité des sources d'azote et de phosphore semblent donc déterminer la vitesse et l'étendue de la dégradation. La capacité d'une population microbienne à dégrader les polluants peut également être améliorée par la stimulation des micro-organismes indigènes par l'ajout de nutriments ou d'accepteurs d'électrons (Joutey *et al.*, 2013).

III.4.1. La bioatténuation

L'atténuation naturelle ou bioatténuation est la réduction des concentrations de contaminants dans l'environnement par des processus biologiques (biodégradation aérobie et anaérobie, des phénomènes physiques et des réactions chimiques comme les échanges d'ions). Dans les bonnes conditions, les micro-organismes peuvent provoquer ou favoriser des réactions chimiques qui modifient la forme des contaminants de sorte qu'il ne reste que peu ou pas de risque pour la santé. L'atténuation naturelle se produit dans la plupart des sites pollués. Cependant, les bonnes conditions doivent exister sous terre pour bien purifier les sites. Sinon, la purification ne sera pas assez rapide ou pas assez complète (EPA, 1999). Les scientifiques surveillent ces conditions pour s'assurer que l'atténuation naturelle fonctionne. Cette étape est dite atténuation naturelle surveillée ou (MNA) pour Monitored Natural Attenuation. Lorsque l'environnement est pollué par des produits chimiques, la nature peut agir de différentes manières pour le dépolluer. De minuscules insectes ou microbes qui vivent dans le sol et les eaux souterraines utilisent certains produits chimiques pour se nourrir. Lorsqu'ils digèrent complètement les produits chimiques, ils peuvent les transformer en eau et en gaz inoffensifs. Les produits chimiques peuvent se coller au sol, ce qui les maintient en place. Ceci ne nettoie pas les produits chimiques, mais empêche de polluer les eaux souterraines et de s'infiltrer

hors le site. Si l'atténuation naturelle n'est pas assez rapide ou assez complète, la biorestoration sera améliorée soit par biostimulation, soit par la bioaugmentation (EPA,2001).

III.4.2. La biostimulation

La biostimulation implique l'ajout de plusieurs éléments au sol comme les éléments nutritifs, les oligo-éléments, les accepteurs d'électrons ou les donneurs d'électrons. Cet ajout améliore la biotransformation des contaminants du sol (Li *et al.*, 2010).

III.4.3. Bioaugmentation

On peut définir la bioaugmentation comme la technique perfectionnée à dépolluer une matrice contaminée (sol ou autre biotope). L'élimination des polluants se fait par l'introduction de souches ou de consortiums compétents spécifiques de micro-organismes conduisant ainsi à des réactions de biodégradation productives et efficaces (Thierry *et al.*, 2008).

Le principe de base de cette intervention est que les capacités métaboliques de la communauté microbienne indigène déjà présente dans le biotope prévu pour la dépollution seront augmentées par une diversité génétique exogène améliorée, conduisant ainsi à un répertoire plus large de réactions de biodégradation productives (El Fantroussi et Agathos, 2005).

III.4.4. Interaction entre les micro-organismes et les hydrocarbures dans le sol

L'utilisation d'hydrocarbures comme substrats pour la croissance microbienne présente des problèmes particuliers aux microorganismes qui les utilisent comme source de carbone et d'énergie ainsi qu'aux chercheurs du domaine de la microbiologie pétrolière. Il y a deux caractéristiques essentielles qui définissent l'oxydation des hydrocarbures par les microorganismes:

La première est l'oxygénase, qui est un groupe spécifique qui se lie à la membrane et la seconde, est un mécanisme d'optimisation du contact entre les microorganismes et les hydrocarbures insolubles dans l'eau. La localisation des bactéries oxydant les hydrocarbures dans les milieux naturels ont fait l'objet d'une attention considérable en raison de la possibilité d'utiliser leur potentiel de biodégradation dans le traitement des déversements d'hydrocarbures. En raison de l'énorme quantité de pétrole brut et de ces dérivés qui sont transportés sur de longues distances et consommés en grand quantités, les hydrocarbures sont

maintenant devenus une classe très importante des substrats pour l'oxydation microbienne (Chikere *et al.*, 2011). Le devenir biologique des hydrocarbures dans le sol peut suivre un certain nombre d'itinéraires. Dans des conditions idéales, les hydrocarbures sont complètement minéralisés en dioxyde de carbone et d'eau, avec une certaine production de biomasse mais plus souvent, la biodégradation n'est pas complète.

III.5. Biodégradation microbiologique des polluants hydrocarbonés

III.5.1. Biodégradation bactérienne

La capacité à métaboliser les hydrocarbures est affichée par de nombreux types de micro-organismes. Il y a une multitude de littérature sur la dégradation des hydrocarbures par les micro-organismes et il est maintenant accepté qu'aucune espèce, seule, ne dégrade complètement une classe complexe d'hydrocarbures. Bien qu'il soit largement admis que les bactéries et les champignons sont les principaux dépollueurs des hydrocarbures, les bactéries se sont avérées plus polyvalentes que les champignons et peuvent donc jouer un plus grand rôle pendant la biodégradation des hydrocarbures. On nous basant sur des publications préalables, les bactéries les plus importantes dans le domaine de biodégradation des hydrocarbures appartiennent aux genres *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Collimonas*, *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Flavobacterium*, *Gordonia*, *Micrococcus*, *Mycobactérie*, *Nocardia*, *Nocardioïdes*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Variovorax* et autres (Hamamura *et al.*, 2006; Obayori et Salam, 2010).

Les bactéries présentent plus d'avantage dans la biodégradation des hydrocarbures dans le sol. Une partie de leurs performances réside dans la possession de plasmides dégradants et autres éléments génétiques mobiles, production de tensioactifs et la possession d'enzymes cataboliques spécifiques comme l'oxygénase et l'hydroxylase (Tableau 7)(Chikere *et al.*, 2011).

Tableau 7: Genres de bactéries qui utilisent les hydrocarbures comme seule source de carbone et d'énergie (Chikere *et al.*, 2011).

Genre	Substrat	Gène / enzyme de dégradation
<i>Aeromonas</i>	Diesel	Alcane hydroxylase
<i>Bacillus</i>	Toluène, pétrole brut,	Alcane hydroxylase, gènes plasmidiques pour les dioxygénases
<i>Pseudomonas</i>	Gasoil, pétrole brut	Alcane hydroxylase, gènes plasmidiques pour les dioxygénases
<i>Serratia</i>	pétrole brut	Alcane hydroxylase
<i>Stenotrophomonas</i>	Pyrène	gènes plasmidiques pour les dioxygénases
<i>Enterobacter</i>	Alcane	Alcane hydroxylase
<i>Nocardia</i>	Alcane, pétrole brut	Alcane hydroxylases
<i>Acidecella</i>	Naphtalène	gènes plasmidiques pour les dioxygénases
<i>Acidovorax</i>	Phénanthrène	gènes plasmidiques pour les dioxygénases
<i>Agrobacterium</i>	Essence aromatiques	gènes plasmidiques pour les dioxygénases
<i>Micrococcus</i>	Héxadécane	Alcane hydroxylases
<i>Xanthobacter</i>	Dibenzothiophène	Gènes transmis par les plasmides pour les dioxygénases étroitement liées à NAH7
Terrabacter	Fluorène	gènes plasmidiques pour les dioxygénases
<i>Desulfobacterium</i>	Xylène	Benzyl succinate synthase chromosomique

III.5.3. Biodégradation fongique

Les champignons jouent un rôle important dans la dégradation du microbiote car, comme les bactéries, ils métabolisent la matière organique dissoute, ce sont les principaux organismes responsables de la décomposition du carbone dans la biosphère. Mais, contrairement aux bactéries, les champignons peuvent se développer dans les zones à faible humidité et dans les solutions à faible pH, ce qui les aide à décomposer la matière organique. Équipés de complexes multi-enzymes extracellulaires, les champignons sont les plus efficaces, en particulier pour décomposer les composés polymères naturels (Joutey *et al.*, 2013).

III.5.3.1. Biodégradation des levures

Les levures sont connues pour jouer un rôle important dans l'élimination des métaux lourds toxiques. Il existe de nombreux rapports sur l'absorption des métaux lourds par les levures. Plusieurs études ont démontré que les levures sont capables d'accumuler des métaux lourds tels que Cu, Ni, Co, Cd et Mg et sont des accumulateurs métalliques supérieurs par rapport à certaines bactéries (Wang et Chen, 2006).

III.5.3.2. Biodégradation des champignons filamenteux

La majorité des champignons filamenteux sont incapables à eux seuls de minéraliser totalement les hydrocarbures aromatiques. Ils ne les transforment qu'en produits indirects de faible toxicité. Parmi les champignons filamenteux participant à la biodégradation des hydrocarbures aliphatiques figurent le *Cladosporium* et *Aspergillus*, tandis que les champignons appartenant à *Cunninghamella*, *Penicillium*, *Fusarium* et *Aspergillus* peuvent participer à la décomposition des hydrocarbures aromatiques. Les genres fongiques, à savoir, *Amorphoteca*, *Neosartorya* et *Talaromyces*, ont été isolés du sol contaminé par le pétrole brut et se sont avérés être les organismes potentiels de dégradation des hydrocarbures. Un groupe de champignons, à savoir *Aspergillus*, *Cephalosporium* et *Penicillium*, s'est également avéré être un dépolluant de pétrole brut (Steliga, 2012).

III.6. Mécanisme de dégradation des hydrocarbures

La biodégradation des hydrocarbures fait intervenir le dioxygène qui sert à l'utilisation d'enzymes de type oxygénase. L'attaque initiale intracellulaire est un processus oxydatif et

l'activation ainsi que l'incorporation d'oxygène est la clé de la réaction enzymatique catalysée par les oxygénases et les peroxydases. Les voies périphériques de dégradation convertissent les hydrocarbures étape par étape en intermédiaires du catabolisme, à l'aide par exemple du cycle des acides tricarboxyliques (TCA ou cycle de Krebs).

La biosynthèse de molécules pour la biomasse de la cellule se fait à partir de métabolites précurseurs comme l'acétyl-CoA, le succinate ou le pyruvate. Les sucres nécessaires à de nombreuses biosynthèses et à la croissance sont produits par la glycogénèse. Dans ce processus, on peut distinguer deux grands types de métabolismes, associés aux deux classes majoritaires qui composent les pétroles : les alcanes linéaires et les hydrocarbures aromatiques (Sauret, 2011).

III.6.1. Mécanisme de dégradation des alcanes linéaires

Les n-alcanes ayant un nombre de carbone supérieur ou égal à 9 sont les hydrocarbures les plus facilement dégradables par une très large variété de micro-organismes. Le principal mécanisme de dégradation des alcanes et le plus fréquent est celui correspondant à une oxydation du groupe méthyle terminal, conduisant à la formation d'un alcool primaire, d'un aldéhyde puis d'un acide mono-carboxylique faisant intervenir une mono-oxygénase (Chikere *et al*, 2011).

III.6.2. Mécanisme de dégradation des alcanes ramifiés

La dégradation des alcanes ramifiés est plus lente et plus difficile si on la compare à celle des alcanes linéaires. En ce qui concerne la dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), plus le nombre de cycles augmente dans la molécule plus celle-ci est difficilement dégradable. Ainsi de nombreuses bactéries ont été répertoriées pour la dégradation de molécules comme le benzène ou le naphthalène alors qu'à ce jour seules quelques espèces sont connues pour dégrader les HAP de plus de 4 cycles tel que le benzo[a]pyrène qui nécessite de multiples enzymes pour la catalyse de sa biotransformation (Técher, 2018) (Figure 10).

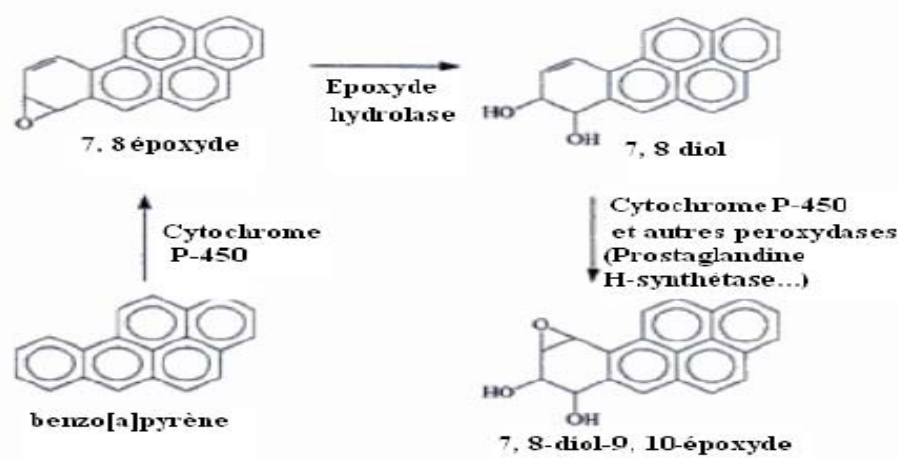


Figure 10 : Bioactivation séquentielle du benzo(a)pyrène. De multiples enzymes catalysent la biotransformation du benzo(a)pyrène en 7, 8-diol-9, 10, époxyde, molécule cancérigène (Técher, 2018)

Quel que soit l'HAP, la plupart du temps, une dioxygénase assure l'incorporation de deux atomes d'oxygène dans la première phase de l'oxydation qui conduit à des diols de configuration cis. Généralement, l'oxydation se poursuit par une rupture ortho ou méta du cycle portant sur les groupements hydroxyle, avec obtention d'un nouveau diol ayant un cycle aromatique de moins que le composé initial et ainsi de suite jusqu'à la dégradation de tous les cycles benzéniques (Bianchi *et al.*, 1988). Les dioxygénases sont classées en fonction du substrat qu'elles sont capables d'oxyder, toluène (TDO), naphthalène (NDO) et biphenyle (BPDO) (Techer, 2018).

Généralement, l'oxydation se poursuit par une rupture ortho ou méta du cycle portant sur les groupements hydroxyle, avec obtention d'un nouveau diol ayant un cycle aromatique de moins que le composé initial et ainsi de suite jusqu'à la dégradation de tous les cycles de l'hydrocarbure en question (Bianchi *et al.*, 1989).

Dans la voie d'ortho-clivage, l'anneau est clivé entre les deux atomes de carbone avec un groupe hydroxyle (Figure 11) tandis que dans la voie de méta-clivage, l'anneau se divise entre des atomes de carbone adjacents avec et sans groupe hydroxyle (Figure 12) (Chikere *et al.*, 2011).

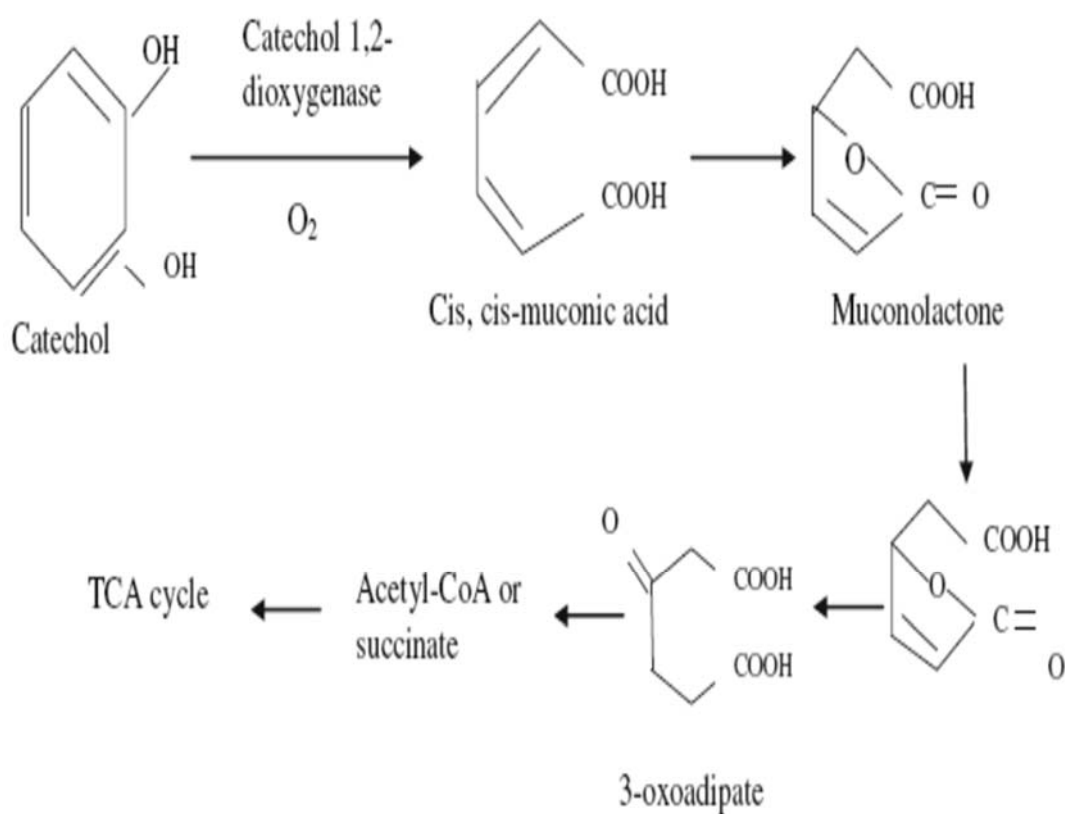


Figure 11 : Ortho-clivage de catéchol dans le cycle de TCA (acide tricarboxylique)
(Chikere *et al.*, 2011).

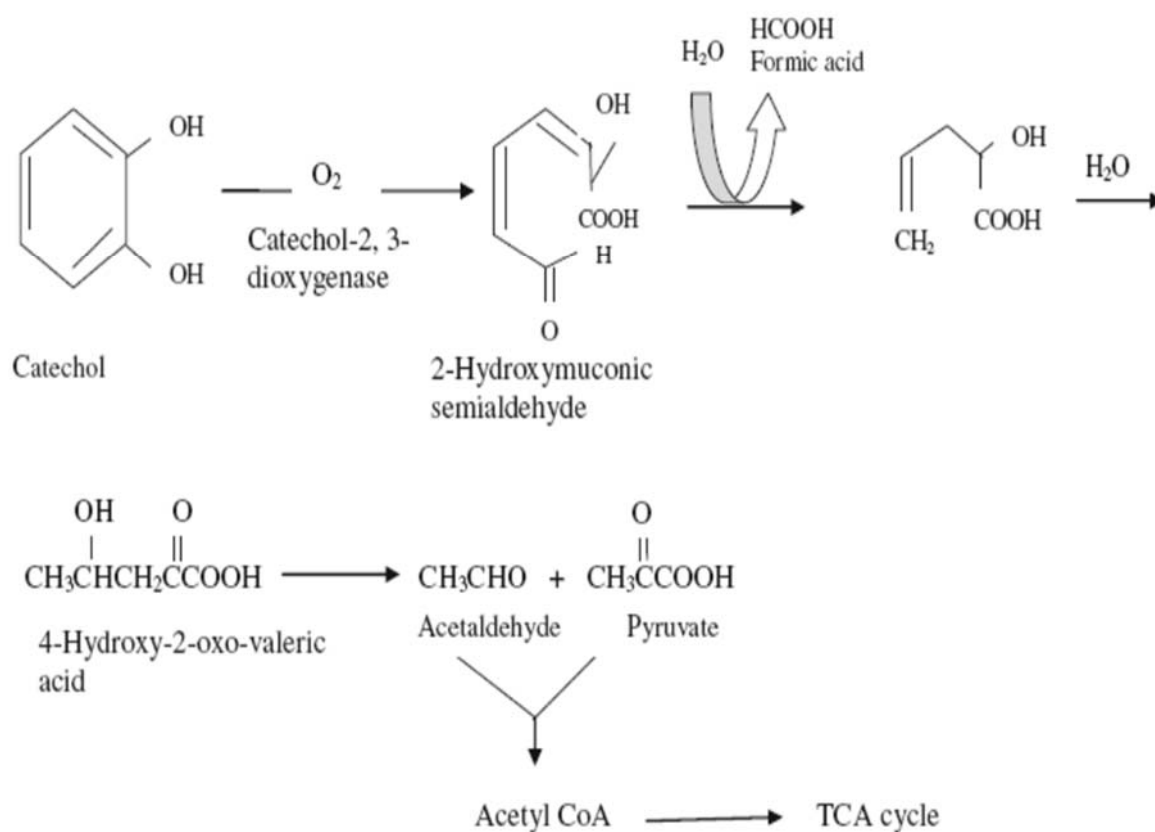


Figure 12 : Méta-clivage de catéchol dans le cycle de TCA (acide tricarboxylique) (Chikere *et al.*, 2011).

III.7. Impact environnementaux sur les bactéries et la biodégradation des hydrocarbures

Les facteurs physico-chimiques et biologiques influencent directement du pétrole brut dans le milieu terrestre comme ils peuvent modifier l'activité des populations bactériennes dans leur fonction de biodégradation des hydrocarbures.

III.7.1. Composition du pétrole

La dégradation du pétrole dépend en grande partie de sa composition et de sa concentration. Plus il est raffiné, plus le pétrole est dégradé rapidement. Ainsi un pétrole de type « léger d'Arabie » sera mieux dégradé qu'un pétrole brut de type « Bunker C ». Les composés saturés sont dégradés en premier, viennent ensuite les aromatiques et les asphaltènes et résines qui résistent à la dégradation, ce qui entraîne une modification dans la composition du pétrole au cours de sa dégradation. Plus les molécules d'un pétrole sont saturées mieux celui-ci est biodégradé. Tandis que les asphaltènes, les composés soufrés et les cycles aromatiques compliquent la biodégradation (Jobson *et al.*, 1972)

III.7.2. Production de biosurfactants

Les biosurfactants microbiens également appelés composés tensioactifs : « SAC pour Surface-Active Compounds » sont des molécules amphipathiques et structurellement diverses qui consistent en de groupements : hydrophiles et hydrophobes, qui forment une partition entre des substances liquides avec différents niveaux de polarité et liaisons hydrogènes. Habituellement, le fragment hydrophobe est une chaîne hydrocarbonée constituée d'acides gras à longue chaîne (saturé ou insaturé) alors que le fragment hydrophile peut être ioniques, non ioniques, amphotères, acides aminés ou polysaccharides. Ils se composent de phospholipides, de glycolipides, de lipides neutres ou d'acides gras etc. avec un poids moléculaire de 500 à 1500 Da (Sauret, 2011).

Les bioémulsifions sont composés de lipopolysaccharides, de protéines, de lipoprotéines ou glycoprotéines qui contribuent à leur émulsification et à leur stabilisation des émulsions (Uzoigwe *et al.*, 2015).

Ces biomolécules sont produites par des micro-organismes tels que les levures, les bactéries et les champignons filamenteux (Tableau 8). En raison de leur source biologique, les biosurfactants sont moins toxique, biodégradable, compatible avec l'environnement, hautement sélectif et spécifiques (en termes de leurs activités à pH, températures et salinité extrêmes) et peut être produite à partir de sources renouvelables et économiques. De

plus, ils possèdent des propriétés émulsifiantes similaires ou améliorées (Banat *et al.*, 2014). Ils possèdent diverses propriétés fonctionnelles distinctes y compris l'émulsification, le mouillage, le moussage, l'inhibition de la corrosion, dispersion, nettoyage et activité de surface qui font d'eux un candidat approprié pour diverses applications biotechnologiques comme la biorestauration (Araújo *et al.*, 2019; Mujumdaret *et al.*, 2019).

Tableau 8: Quelques microorganismes producteurs de biosurfactants

Microorganismes	Biosurfactant/ Bioémulsifion	Référence
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactine	Mireles <i>et al.</i> , 2001
<i>Pseudomonas</i> sp.	Rhamnolipids	Raval <i>et al.</i> , 2017
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Biosurfactant	Dagbert <i>et al.</i> , 2006
<i>Serratia marcescens</i>	Serrawettin	Matsuyama <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus ustus</i> MSF3	Glycolipoprotein	Kiran <i>et al.</i> , 2009
<i>Penicillium chrosogenum</i> SNP5	Lipopeptide	Gautam <i>et al.</i> , 2014
<i>Achromobacter</i> sp. HZ01	Lipopeptide	Deng <i>et al.</i> , 2016

III.7.3. Rayonnement UV, température, salinité, ressources en oxygène

L'action des UV sur les molécules aromatiques et polaires, en particulier, libère des radicaux libres capables de dégrader ces mêmes molécules. Ainsi les processus photochimiques peuvent rapidement altérer la composition initiale du pétrole, ce qui peut avoir une influence sur la biodégradabilité des hydrocarbures par les bactéries. Même si la biodégradation est un processus pouvant se faire toute l'année, certains auteurs proposent qu'elle soit plus efficace en été qu'en hiver (Sauret, 2011).

A part dans les zones hyper salées, la salinité n'est pas une barrière à la dégradation des hydrocarbures en raison du manque d'oxygènes dans ces zones (Tableau 9).

En milieu aérobie, la dégradation des hydrocarbures est initiée par une étape d'oxydation faisant intervenir des hydroxylases et des oxygénases à forte dépendance en oxygène. En milieu anaérobie, l'oxygène est remplacé par d'autres types d'accepteurs d'électrons mais le rendement est réduit (Sauret., 2011).

III.7.4. Les nutriments

Les nutriments peuvent influencer la biodégradation de composants pétroliers à divers niveaux. La biodégradation d'hydrocarbures aromatiques semble être sensible au pH. L'azote (N) n'affecte pas le pH directement, cependant un apport en ammonium (NH_4^+) conduit à une acidification progressive qui s'accompagne de l'inhibition de la dégradation des composés aromatiques, principalement des HAPs. De plus, un apport d'hydrocarbures pétroliers contenant une faible concentration en nutriments et une forte concentration en carbone produit souvent des ratios carbone/azote et carbone/phosphore élevés. Ces conditions sont globalement défavorables à la croissance microbienne. La disponibilité de l'azote et du phosphore dans le milieu récepteur est donc un élément limitant de la biodégradation des hydrocarbures (Leahy et Colwell, 1990).

III.7.5. Les microorganismes

Les bactéries issues de sites chroniquement contaminés ont la capacité de dégrader avec plus d'efficacité les composés pétrolés grâce à un système enzymatique déjà adaptée aux polluants (Oliveira *et al.*, 2015). Dans la mesure où le pétrole stimule la prolifération des bactéries hydrocarbonoclastes en leur offrant un avantage sélectif, les milieux pollués chroniquement sont plus riches en bactéries hydrocarbonoclastes (HCB). En cas d'apport soudain de pétrole, l'abondance relative de ces HCB permet d'assurer la mise en place rapide d'un consortium de dégradation dans les zones polluées, des mécanismes d'induction des enzymes d'intérêt ont été retrouvés en présence de pétrole (Sauret, 2011).

En termes de structure de communautés, cette adaptation se traduit par une plus grande stabilité des bactéries face à l'apport de pétrole dans les zones chroniquement polluées. Cette stabilité confère aux bactéries la capacité de répondre plus rapidement aux nouvelles sources d'hydrocarbures que les bactéries dépourvues de contamination. Cela leur permet également de dégrader avec plus d'efficacité les composés les plus simples et de débiter la dégradation des composés les plus complexes plus rapidement grâce à une machinerie enzymatique pré-adaptée (Bordenave *et al.*, 2008). Les techniques de la bioremédiation devraient, dans ce cas-là, prendre davantage en compte l'historique des sites pollués par les hydrocarbures.

Tableau 9:Facteurs influençant la biodégradation du pétrole(Oliveira *et al.*, 2015)

Facteurs	Rôle dans la décomposition
Biodisponibilité	Concentration en hydrocarbures affectent le taux et l'efficacité de la biodégradation
Température	Affecte le comportement physicochimique des hydrocarbures (la viscosité, la diffusion, la solubilité). Affecte la physiologie et la diversité des microorganismes indigènes
pH	Inhibe l'activité microbienne en régulant le métabolisme microbien
Nutriments	Limite la disponibilité des substances nutritives (N, P, K, Fe). Affecte la croissance microbienne et par conséquent les taux de biodégradation
Oxygène	La biodégradation aérobie présente un rendement beaucoup plus élevé. Une réduction de la concentration en oxygène entraîne donc une réduction de l'efficacité de la biodégradation
Salinité	Les variations de salinité modifient la structure et la diversité des communautés microbiennes indigènes.
Matière organique	Séquestration des hydrocarbures, diminuant ainsi leur disponibilité pour la biodégradation microbienne
Diversité de la communauté Microbienne indigène	Une communauté adaptée au milieu pollué comme les bactéries hydrocarbonoclastes sera plus efficace dans le domaine de dégradation des hydrocarbures

Chapitre IV :
Identification bactérienne

IV. Identification bactérienne

L'identification bactérienne se fait traditionnellement à partir des caractères phénotypiques de la bactérie : coloration de Gram, morphologie, aptitude à croître sur certains milieux de culture, caractères biochimiques détectés par diverses techniques commerciales.

Toutefois certaines bactéries sont mal identifiées phénotypiquement pour diverses raisons. En effet, certaines bactéries expriment peu de caractères phénotypiques. Une identification basée exclusivement sur des caractères phénotypiques peut donc mener à un résultat erroné. Par ailleurs, les bactéries rares ne sont pas répertoriées dans les bases de données des systèmes commercialisés et en conséquence, les techniques basées sur les caractères phénotypiques ne permettront pas de les identifier.

Enfin, pour certaines bactéries à croissance difficile les caractères phénotypiques sont difficiles à déceler ; la biologie moléculaire simplifie dans ce cas l'identification (Petti *et al.*, 2005). Dans ces situations, l'amplification et le séquençage du gène de l'ARNr 16S suivi de la comparaison de la séquence obtenue à des bases de données ont démontré leur efficacité pour l'identification bactérienne. Il s'agit d'une méthode universelle, précise et objective, dont la variabilité inter opérateur est limitée par rapport aux techniques conventionnelles (Petti *et al.*, 2005).

IV.1. Classification des espèces

La classification des espèces isolées permet de mettre de l'ordre dans l'énorme quantité de connaissances que nous avons des organismes, parce que tous les membres d'un groupe donné partagent de nombreuses caractéristiques.

Elle permet de faire des prédictions et des hypothèses pour une recherche future, basée sur la connaissance d'organismes similaires ainsi que la répartition des micro-organismes en groupes significatifs, utiles, avec des noms précis, de sorte que les microbiologistes peuvent les étudier et communiquer efficacement. Actuellement les différentes études d'identifications et de classification sont principalement basées sur la caractérisation de séquences d'ARNr. Les biologistes utilisent les systèmes de classification par deux méthodes principales pour la construction (Leroy, 2015).

La première est dite phénétique, elle groupe les organismes suivant la similitude de leurs caractères phénotypiques et la deuxième est appelée phylogénique, elle groupe les organismes selon des relations évolutives plutôt que des ressemblances générales. Elle utilise des caractères de nature moléculaire pour regrouper les espèces (Figure 13).

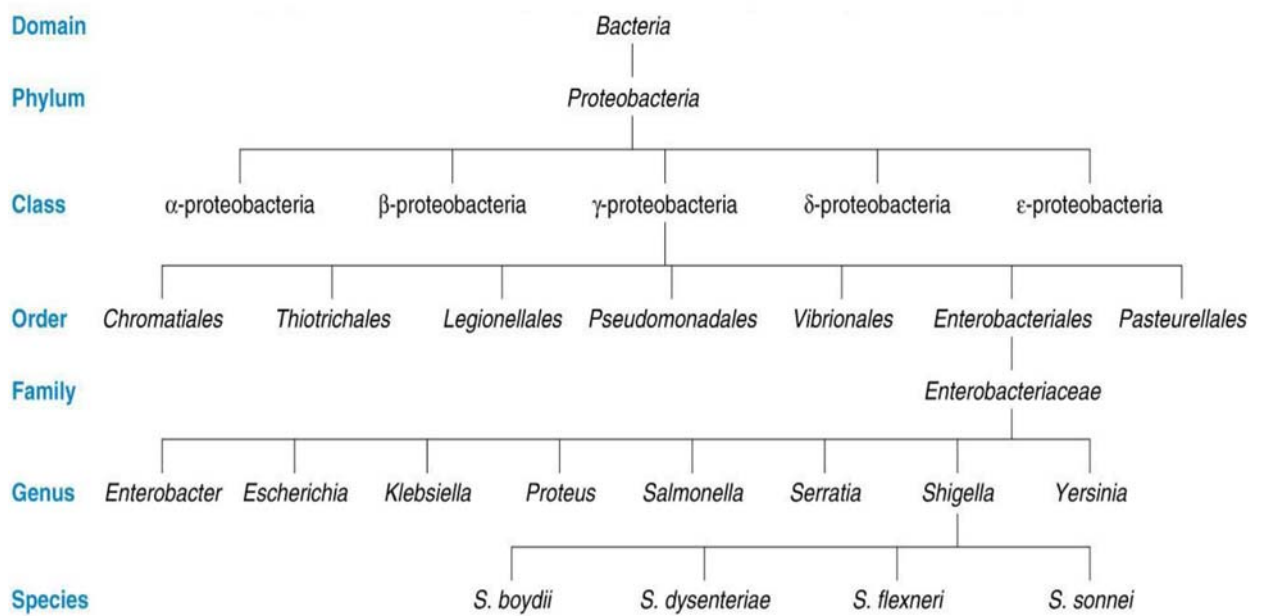


Figure 13: Exemple de structure hiérarchique du domaine :*Bacteria*, phylum: *Proteobacteria*(Prescott et al.,2003)

IV.2. Apport de la phylogénie moléculaire

L'identification moléculaire des bactéries repose sur le fait que chaque bactérie possède un génome qui lui est propre. L'exploitation phylogénétique des différences observées entre les séquences des gènes bactériens permet de reconstituer les relations généalogiques entre les organismes.

IV.2.1. L'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S)

IV.2.1.1. Définition

Le ribosome est un complexe ribonucléoprotéique (c'est-à-dire composé de protéines et d'ARN) ; il permet la synthèse des protéines en utilisant l'ARNmessenger comme source d'information et les ARN de transfert associés aux acides aminés comme substrats. Cette synthèse protéique, encore appelée traduction est divisée en cinq phases principales : la liaison de l'ARN messenger au ribosome, l'initiation, l'élongation, la terminaison et le recyclage des sous unités ribosomales. Chez les bactéries, le ribosome est composé d'une grande sous-unité (50S) et d'une petite sous-unité (30S) (Leroy,2015).

Le ribosome fonctionnel a une masse moléculaire de 2,5 mégadalton et un coefficient de sédimentation de 70S. La petite sous-unité est composée de l'ARN ribosomal 16S qui est codé par un gène d'environ 1500 nucléotides et d'environ 20 protéines. La grande sous-unité est composée de l'ARN ribosomal 23S codé par un gène d'environ 2900 nucléotides, de l'ARN ribosomal 5S (codé par un gène d'environ 120 nucléotides et d'environ 30 protéines.

Dans les années 1970, il a été montré que les relations phylogéniques entre les êtres vivants pouvaient être déterminées en comparant leurs séquences nucléiques. Des travaux ont pu montrer que le gène de l'ARNr 16S avait plusieurs avantages dont le fait qu'il code pour un ARN ribosomal de fonction constante dans l'évolution et qu'il soit présent parmi presque toutes les bactéries, existant comme une famille multigénique ou opérons, ce gène peut donc servir d'un outil moléculaire pour suivre l'évolution des bactéries. Les séquences du gène de l'ARNr 16S ont ainsi joué un rôle majeur dans l'étude de la phylogénie et de la taxonomie bactérienne (Leroy,2015).

Ce gène de 1500 paires de bases répond à plusieurs critères essentiels pour la taxonomie : il est ubiquiste c'est-à-dire présent chez tous les procaryotes, où il remplit la même fonction, il évolue lentement, il peut être facilement séquencé car il possède des domaines hautement conservés avec peu de mutations fixées au cours de l'évolution et enfin il

présente des régions de séquences plus variables qui sont d'autant plus différentes entre deux espèces que celles-ci sont phylogénétiquement éloignées. Ainsi, pour positionner dans un groupe phylogénétique une nouvelle espèce, on procède à l'amplification et au séquençage de ce gène puis à sa comparaison avec les séquences déjà connues disponibles dans les banques de données. Le nombre de séquences des gènes d'ARNr 16S est sans cesse en très forte augmentation dans les banques informatiques de données (Alauzet, 2009).

IV.3. L'arbre phylogénétique

Les méthodes phylogénétiques, au-delà de la simple appréciation qualitative ou quantitative des différences ou des similitudes, reconstituent l'histoire des séquences en fonction des processus évolutifs qu'elles ont subis. Parmi ces méthodes, les méthodes de distance qui transforment les différences observées entre les séquences en distances évolutives, tenant compte des événements substitutifs passés. Ces distances sont ensuite agglomérées dans un arbre phylogénétique, dont les longueurs de branches représentent les taux de mutations, et où les nœuds qui donnent la position probable des différentes espèces. Les familles, les genres et les espèces bactériennes sont reconnus comme groupes d'organismes issus d'un même nœud (Figure 14) (Rappe et Giovannoni, 2003).

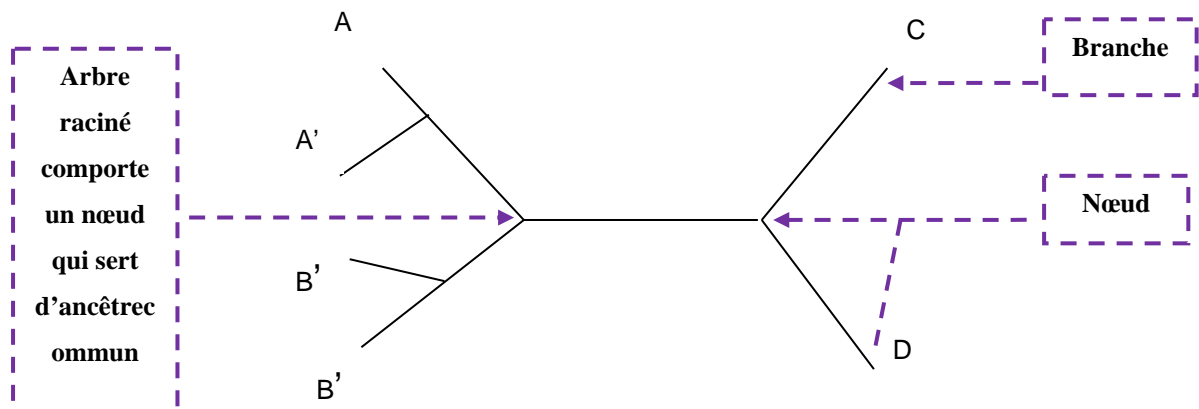


Figure 14: Schéma d'un arbre phylogénétique
(Rappe et Giovannoni, 2003)

L'avantage d'une classification phylogénétique par rapport à la classification phénotypique classique est de pouvoir reconstituer les relations entre tous les groupes bactériens, y compris ceux qui n'ont pas de caractéristiques phénotypiques communes évidentes (Rappe et Giovannoni, 2003).

Le pourcentage d'identité de ce marqueur phylogénétique est ainsi utilisé pour regrouper les séquences dans des unités taxonomiques opérationnelles ou OTUs (Operational Taxonomic Unit).

La majorité des études de diversité basées sur l'ADNr 16S définissent les OTUs comme étant des ensembles de séquences présentant au moins 97% d'identité entre elles. Ce seuil a été défini par Stackebrandt et Goebel, (1994) comme équivalent au seuil d'hybridation ADN-ADN de 70% observé dans des expériences de réassociation réalisée entre les membres d'espèces bactériennes préétablies, issues d'organismes mis en culture. La notion d'espèce est souvent vue comme l'unité de base de la biodiversité. Les OTUs sont devenues l'unité de mesure de la richesse spécifique en microbiologie du sol.

Notons toutefois que concernant les pourcentages de similarité, il n'y a pas de valeur seuil clairement établie au-delà de laquelle la communauté scientifique s'accorde pour définir le rang d'espèce. La plupart des taxonomistes acceptent des seuils de 97% pour le genre et de 99% pour l'espèce. Alors que certains auteurs suggèrent 99,5% d'homologie pour l'espèce (Stackebrandt et Goebel, 1994).

IV.3. Les méthodes de génération d'arbres phylogénétiques

Les séquences alignées sont ensuite comparées et servent à la construction d'arbres phylogénétiques. Les méthodes de construction d'arbres phylogénétiques sont des méthodes mathématiques basées sur des approches arithmétiques (distance), probabilistes (maximum de vraisemblance, méthodes bayésiennes) ou algorithmiques (parcimonie). Contrairement aux méthodes phénétiques de clusterisation, une méthode phylogénétique permet la détermination des caractères ancestraux et dérivés. Ces méthodes permettent la comparaison des séquences, leur clusterisation et la détermination des ancêtres communs.

Après calcul de la matrice de distance, les programmes de construction d'arbre procèdent par regroupements successifs depuis la paire des séquences les plus proches aux plus éloignées : il s'agit d'une méthode de "clusterisation". Un arbre unique sans racine, appelé phénogramme ou dendrogramme, est obtenu. Parmi les différentes méthodes fondées

sur les distances, la méthode du Neighbor-Joining développée par Saitou et Nei (1987). C'est actuellement la plus utilisée pour reconstruire des phylogénies par méthode de distance.

On la retrouve dans le programme NEIGHBOR du package PHYLIP. BIONJ et Weighbor Tree sont des méthodes améliorées, dérivées du Neighbor-Joining, recommandées pour analyser des alignements montrant de forts taux de substitution (Saitou et Nei, 1987).

Partie expérimentale

Matériel et Méthodes

Matériel et méthodes

I. Caractérisations des sols pollués par le pétrole brut

I.1. Echantillonnage et site de prélèvement

Différents échantillons de sols et de boue ont été prélevés de sites pollués par les hydrocarbures dans le Nord-Ouest et le sud-Est de l'Algérie. Le but de ces échantillonnages et d'isoler des bactéries qui ont le potentiel de dégrader le pétrole brut.

Le premier échantillonnage a été fait dans le sud Algérien, dans une station d'épuration d'In Amenas « groupement TFT, champs gaziers situé à Illizi (anciennement Sonatrach).

Le groupement TFT est une association Algéro-franco-espagnole : SONATRACH, TOTAL, REPSOL, dans le jargon des pétroliers, Tin Fouyé Tabankort, pour les autochtones, petit village situé à 500 km au sud de Hassi Messaoud, à 290 km au nord d'In Amenas et à 180 Km de Bordj Omar Driss, est aussi et surtout un important champ de gaz humide de 1 500 km.

Deux prélèvements ont été effectués dans des conditions d'asepsie dans ce site (gant, masque, Flacon, Eppendorf) à une profondeur de 10 Cm.

Le premier prélèvement est celui de la boue provenant directement du premier bassin d'épuration (E1) et le second prélèvement est celui du sable pollué accumulé près du gésier de pétrole (E2).

Le second échantillonnage a été fait à Oran, une région située au Nord-Ouest algérien, après avoir écarté les résidus de surface pour la collecte de deux types de sols à deux raffineries différentes.

Le premier prélèvement est une boue provenant du bassin d'épuration avant traitement (E3) au niveau de la raffinerie d'Arzew, Oran (Sonatrach, compagnie Algérienne de pétrole) NAFTEC/RA1Z. Le second prélèvement est un sol pollué avant traitement (E4) à la raffinerie de Bethioua, Oran.

Le tableau 10 résume les différents échantillons prélevés au cours de cette étude avec leurs coordonnées géographiques, ainsi que leurs codes attribués.

La figure 15 montre les échantillons collectés dans des bouteilles stériles le temps de les transférer au laboratoire.

Les sites de l'échantillonnage ont été illustrés dans la figure 16 par utilisation du service de cartographie en ligne : Google Maps.

L'échantillon sec est pesé et l'humidité de l'échantillon initial est calculée comme suit:

$$\% \text{ humidité} = (m_0 - m_1 / m_0) \times 100$$

Où : m_0 est la masse de l'échantillon avant séchage en gramme (g) et m_1 est la masse de l'échantillon après séchage en gramme (g) (Bidaud, 1998).

La conservation des échantillons se fait immédiatement, à $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans des flacons en verre stériles et à l'abri de la lumière. Ceci pour la conservation de la flore microbienne et pour limiter les transformations biotiques et les pertes abiotiques.

I.2. Préparation et stockage des échantillons

Les échantillons prélevés sont un mélange de cailloux et de sol. La fraction du sol de granulométrie $> 2\text{mm}$, formée de cailloux et graviers, n'est pas la fraction dans laquelle se niche la pollution pétrolière c'est pour cela qu'un tamisage à 2mm a été réalisé à l'aide d'un tamis afin d'obtenir des échantillons homogènes qui permettront de comparer les expériences entre elles (Jeannot *et al.*, 2000).



Figure 15: Les différents échantillons récoltés de la station d'épuration de Ain Amenas : groupement GTFT (Auparavant : Sonatrach) ainsi que la région de Bethioua et d'Arzew.

Tableau 10 : Les sites de prélèvement des échantillons des sols pollués

Echantillon	Nature de l'échantillon	Site d'isolement	Conditions de l'échantillonnage	Coordonnées géographiques
E 1	Boue	Station d'épuration, In Aménas	10 Cm de la surface du sol	28°10'59.0"N 9°26'54.0"E
E2	Sable	Station d'épuration, In Aménas	Le plus près possible du gésier de pétrole	28°10'59.0"N 9°26'54.0"E
E3	Boue	La raffinerie d'Arzew bassin d'épuration avant le traitement chimique	Mélanger un peu avant de prélever direct	35°53'13.1"N 0°21'54.4"W
E4	Sol	La raffinerie de Bethioua, Oran.	10 Cm de la surface du sol	35°45'43.8"N 0°14'20.4"W

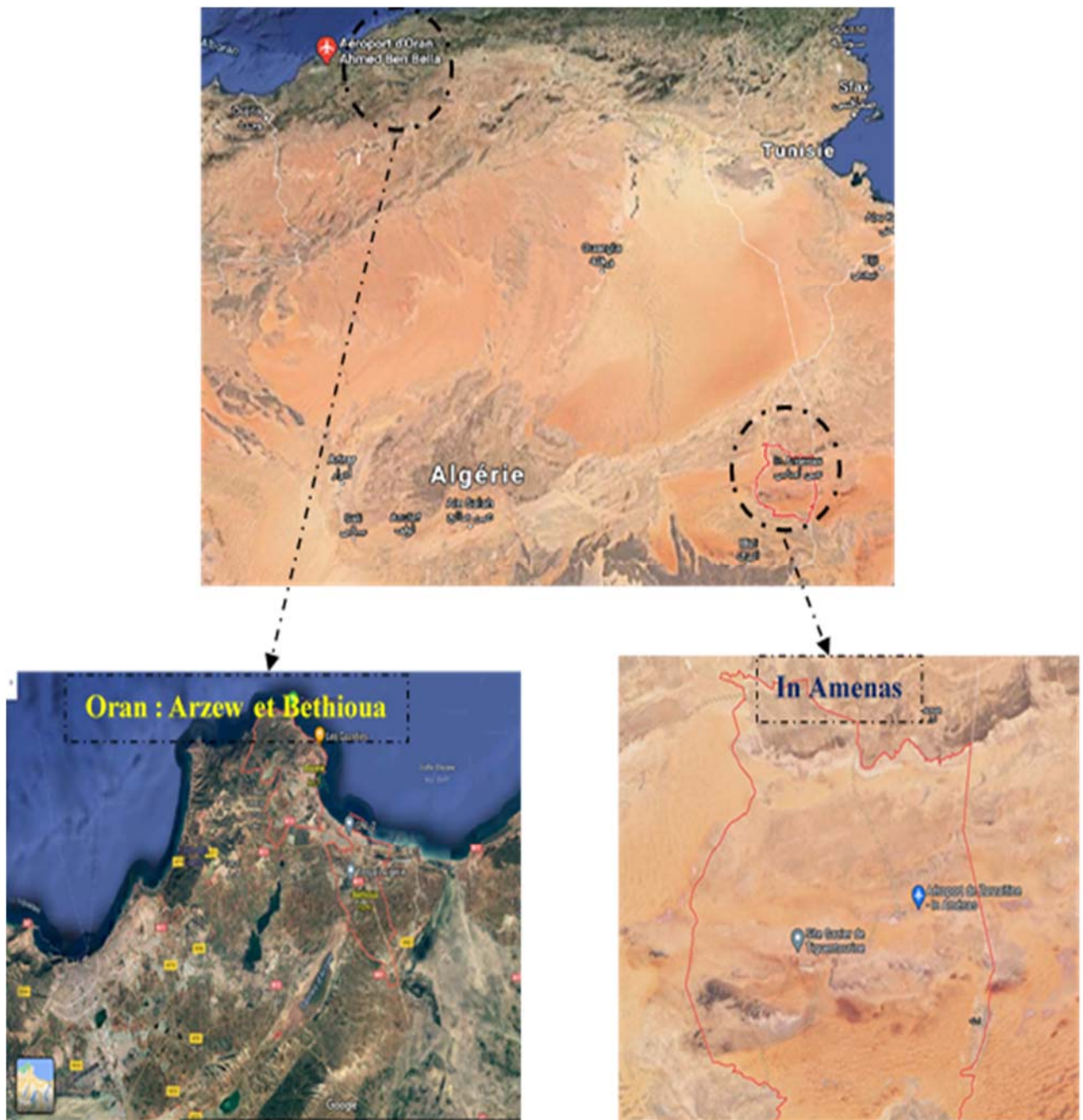


Figure 16 : Localisation des différents sites d'échantillonnage par le service de cartographie en ligne : Google Maps.

I.3. Analyses physico-chimiques des sols

I.3.1. Humidité

Pour mesurer l'humidité d'un sol, un échantillon humide est pesé dans un creuset en céramique puis séché à une température de 40°C dans une étuve. Après refroidissement,

I.3.2. Potentiel d'hydrogène (pH)

Cette mesure est décrite par la norme NF EN 12457-2 AFNOR (2002). Le principe de la méthode est la mise en équilibre ionique d'une certaine masse de solide avec un volume donné d'eau déminéralisée. Dix grammes des échantillons ont été préparés pour l'analyse dans un bêcher, où on y ajoute 25ml d'eau distillée, on agite ensuite avec un agitateur magnétique pendant 60min dans une pièce dont la température ambiante est de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Cela permet de mettre en suspension la totalité de l'échantillon et d'obtenir ainsi un équilibre entre la phase solide et la phase liquide. La suspension est ensuite laissée au repos 2 heures à l'abri de l'air puis on mesure le pH de la suspension. L'utilisation du sédiment brut lors de la phosphatation suppose une mesure préalable de son pH. Pour cela, le pH des deux sédiments bruts a été également mesuré (pH mètre de type Inolab MLM)(Bidaud, 1998).

I.3.3. Conductivité électrique (CE)

Pour la mesure de la conductivité électrique les normes AFNOR sur la « Qualité des sols » (AFNOR, 1994) ont été utilisées. La conductivité électrique est une mesure indirecte de la salinité. L'unité de la conductivité électrique est le Siemens par mètre (S/m). On pèse 10g d'échantillon de sédiment préparé pour essai qu'on transvase dans un flacon en polyéthylène, on y ajoute 50 ml d'eau distillée, on ferme le flacon et on le place dans l'agitateur mécanique à mouvement horizontal, on agite pendant 30min. Après filtration, on mesure la conductivité de la solution obtenue par un conductimètre.

I.3.4. Dosage des éléments chimiques par spectrométrie d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP-OES)

Les applications de la spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-OES) sont multiples et permettent d'analyser tous les produits pétroliers. L'industrie pétrolière a un besoin urgent de techniques rapides, sensibles et précises de ces différents éléments aux teneurs de l'ordre du ppb.

Les concentrations totales d'Al, Ba, Ca, Cr, Cu, Fe, K Li, Mg, Mn, Na, Ni, Sr et Zn ont été déterminées dans les quatre sols selon l'EPA 3050 (USEPA, 1996). La quantification a été réalisée par émission optique de plasma à couplage inductif (ICP-OES, Optima 7000 DV).

Les échantillons des sols ont été soigneusement criblés pour déterminer la présence d'animaux et de débris, placés dans des récipients en polyéthylène et stockés à 4 ° C. Avant l'analyse, les échantillons ont été lyophilisés, homogénéisés et tamisés avec un tamis en plastique pour sélectionner la fraction de sédiment avec un diamètre de particule inférieur à 63 µm. Comme on le sait, les métaux sont concentrés dans cette fraction de sédiments.

Les échantillons ont été digérés par la méthode USEPA 3050B et les éléments ont été quantifiés directement lors de la digestion par solution par ICP-OES.

Environ 1 g d'échantillon a été pesé avec précision dans un flacon Erlenmeyer en Pyrex de 250 ml et 10 ml de HNO₃ à 8,5 M ont été ajoutés. La solution a été chauffée sur une plaque chauffante à ~ 95 ° C sans ébullition et cette température a été maintenue pendant 15 minutes. Après refroidissement à moins de -70 ° C, 5 ml de HNO₃ à 17 M ont été ajoutés et l'échantillon a été chauffé au reflux pendant 30 minutes à ~ 95 ° C sans ébullition. Cette étape a été répétée une seconde fois. Par la suite, l'échantillon a été évaporé à ~ 5 ml sans ébullition. Après refroidissement à moins de -70 ° C, 2 ml d'eau ont été ajoutés, suivis par l'addition lente de 3 ml de H₂O₂ à 8,8 M. La solution a ensuite été chauffée jusqu'à ce que l'effervescence diminue. Plus tard, 8 ml supplémentaires de 8,8 M H₂O₂ dans des aliquotes de 1 ml ont été ajoutés et la solution a été chauffée au reflux. Après refroidissement à -70 ° C, puis 10 ml de HCl à 12 M ont été ajoutés et l'échantillon a été chauffé au reflux pendant 15 minutes sans ébullition. Après refroidissement à température ambiante, l'échantillon a été filtré et dilué à 100 ml avec de l'eau bidistillée.

I.4. Isolement des microorganismes

Pour procéder à l'isolement des microorganismes de nos quatre échantillons E1, E2, E3 et E4 (boue, sol, et sable), nous avons prélevé dix grammes de chaque échantillon qu'on a ajoutés dans des flacons contenant 90 ml de bouillon nutritif stérile (BN) (composition voir l'annexe).

Après une bonne agitation à la main, les flacons ont été incubés à une température de 30° C pendant 24 à 48 heures en aérobiose.

Une série de dilutions décimale dans de l'eau physiologique stérile (0,9%, m/v, NaCl) a été préparée pour chaque flacon. Après, une quantité de 100 µl des dilutions 10⁻⁴ et 10⁻⁵ ont été prélevés par une micropipette et ensemencés en surface des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive (GN) (composition voir l'annexe). Les cultures ont été incubées à 30 ° C pendant 24 à 48 heures en aérobie (Figure 17).

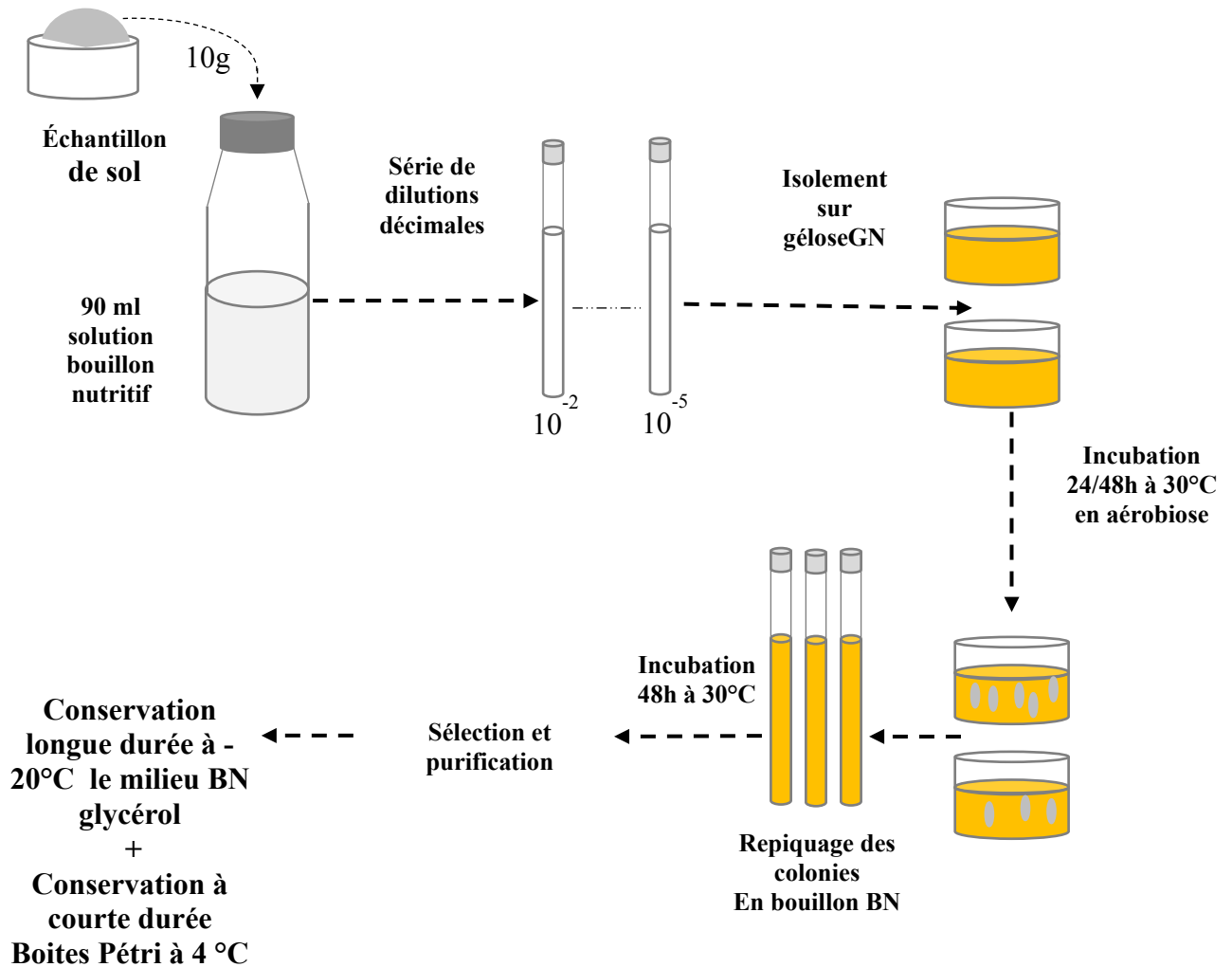


Figure 17: Schéma représentatif des différentes étapes d'isolement et purification des isolats

I.4.1. Purification des isolats

A partir des boîtes incubées, 50 colonies ont été prélevées puis ensemencées dans un milieu BN. Les tubes ont été incubés pendant 24 heures à 30 °C.

La purification des cultures en milieu liquide a été faite sur milieu GN pour obtenir des colonies qui ont le même aspect macroscopique (Delarras, 2007).

I.4.2. Conservation des souches bactériennes

I.4.2.1. La conservation à longue durée

Une culture de 24 heures des isolats purifiés dans du BN a été récupérée et centrifugée à 3000t/m pendant 20 minutes.

Le culot récupéré a été additionné d'un milieu de conservation préalablement autoclavé à base de BN et de glycérol à 20% (v/v) dans des tubes Eppendorf stériles à -20 °C (Hassanshahian *et al.*, 2014).

I.4.2.2. La conservation à courte durée

Les différentes cultures pures sur boîte Pétri en phase exponentielle sont mises dans un réfrigérateur à 4 °C pour un usage quotidien.

Les boîtes de culture doivent être entourées d'un film et stockées à l'envers pour minimiser le risque de contamination et pour conserver une hydratation adéquate de la culture et de la gélose afin d'éviter les cassures sur la surface.

II. Criblage des bactéries qui dégradent le pétrole

II.1. Préparation des isolats

Tous les isolats isolés préalablement sur GN ont subi un protocole de préparation pour le criblage des bactéries qui dégradent le pétrole

Les isolats bactériens ont été cultivés pendant 24 heures dans du bouillon nutritif sous agitation continue, en aérobie et à 30 °C. La croissance de ces bactéries se témoigne par un trouble dans le milieu de culture.

Ces cultures ont été centrifugées à 3000 tr / min pendant 20 min puis le culot a été récupéré et le surnageant a été délicatement retiré.

Les culots bactériens ont subi un lavage répété avec 200 ml de solution saline (MSM)(Pfennig et Truper, 1992) contenant en gramme par litre :

Le K_2HPO_4 (Merck) (1,8 g / L); NH_4Cl (Merck) (4 g / L); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Merck) (0,2 g / L); $NaCl$ (Sigma) (0,1 g / L); $Na_2SO_4 \cdot 7H_2O$ (Merck) (0,01 g / L); agar (20 g / L); le pH a été ajusté à 6,8, puis recentrifugé à 3000 tr / min pour 20 minutes. Cette opération de lavage a été répétée 5 fois.

Au dernier lavage, le surnageant a été retiré et 200 ml du milieu MSM a été ajouté à chaque culot dans des tubes stériles puis conservés à 4°C pour les manipulations des différentes méthodes de criblage (Figure 18).

Le lavage des cultures est indispensable dans cette étape pour éliminer toutes les sources de Carbone et d'énergie du milieu.

Le principe de ce criblage se base sur l'ajout du pétrole brut comme seule est unique source de carbone et d'énergie pour les bactéries.

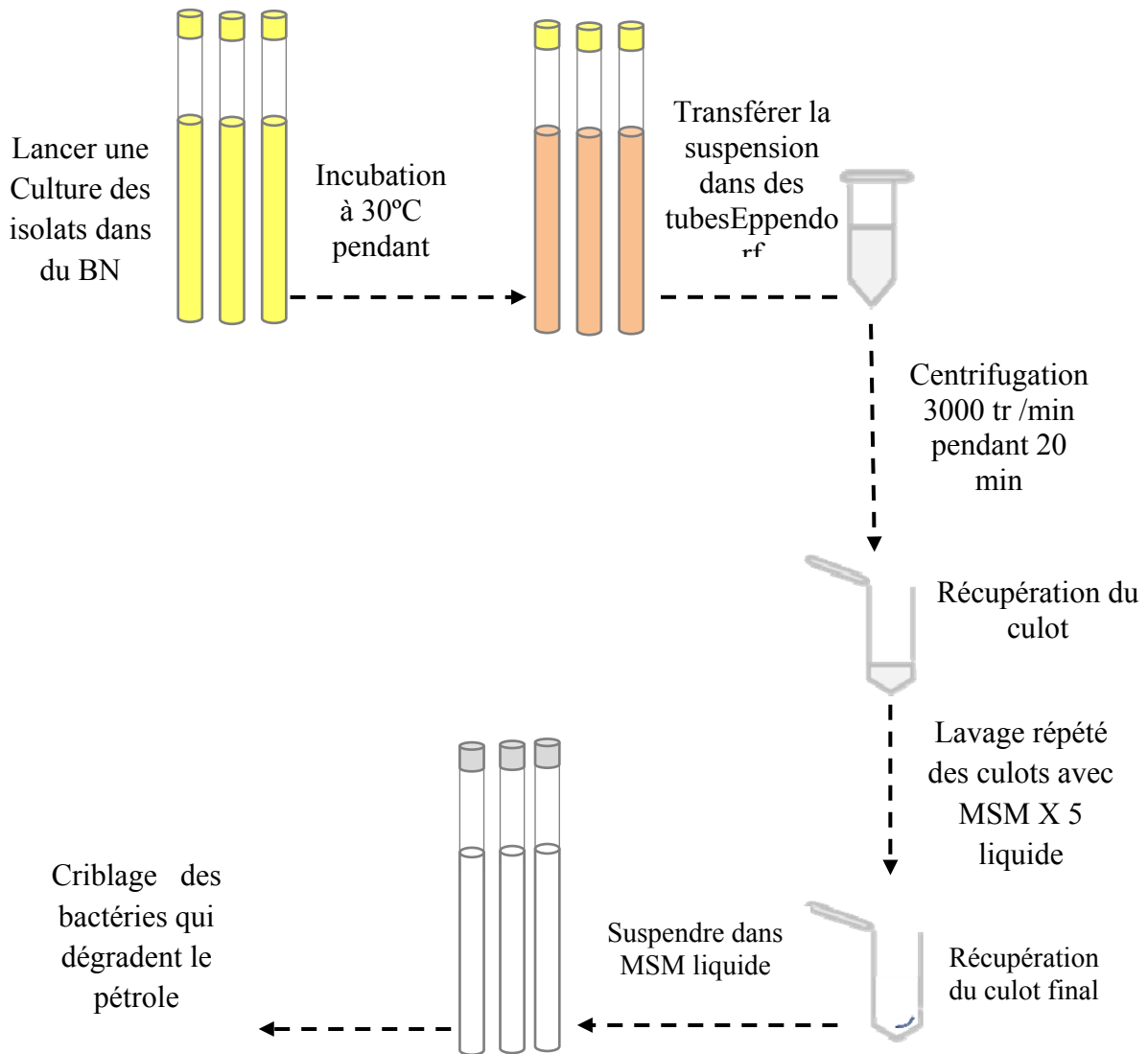


Figure 18: Préparation des isolats pour le criblage des bactéries qui dégradent le pétrole

II.2. Activité déshydrogénase : test de dépistage colorimétrique par le p-iodonitrotétrazolium chlorure (INT)

Le potentiel de dégradation des bactéries a été détecté par une méthode fiable et rapide, se basant sur la détection de l'activité enzymatique déshydrogénase en condition aérobie.

Cette réduction de l'INT se traduit par la capacité des bactéries à dégrader le pétrole brut comme seule source de carbone. Cette réaction est catalysée par une enzyme : la déshydrogénase.

C'est une synthèse enzymatique qui fait intervenir un transfert d'électrons en présence de l'oxygène. L'oxydation du substrat est donc rendue possible grâce à l'activation de l'oxygène dans le milieu.

La réalisation de ce test est délicate et doit se faire sur des cultures incubées sur une période prolongée allant de 15 à 30 jours et dans des conditions d'obscurité pour ne pas fausser les résultats.

Cette méthode colorimétrique a pour principe d'utiliser le sel p-iodonitrotétrazolium chlorure (INT) comme indicateur colorimétrique de la dégradation des hydrocarbures. L'INT est oxydé par le NADH dans les bactéries, lorsqu'elles dégradent les hydrocarbures, le sel de tétrazolium est réduit à un composé rouge foncé à pourpre insoluble dit formazan (Marchand *et al.*, 2017).

Le pétrole brut a été additionné aux tubes de MSM contenant l'inoculum puis une incubation à 30 °C sous agitation et à l'obscurité a été requise pendant deux semaines. Après l'incubation, 50 µL d'INT stérilisé par filtration au filtre millipore (0,45µm) a été ajouté à chaque suspension.

Le contrôle négatif consistait en un milieu de culture MSM additionné de pétrole brut seulement sans bactéries. Les tests sont laissés à une température ambiante jusqu'à une heure de temps pour observer le virage de la couleur. Les souches les plus performantes dans ce test de dépistage ont par la suite été sélectionnées pour leur capacité à réduire le formazan rapidement avec une forte coloration pourpre (Figure 19).

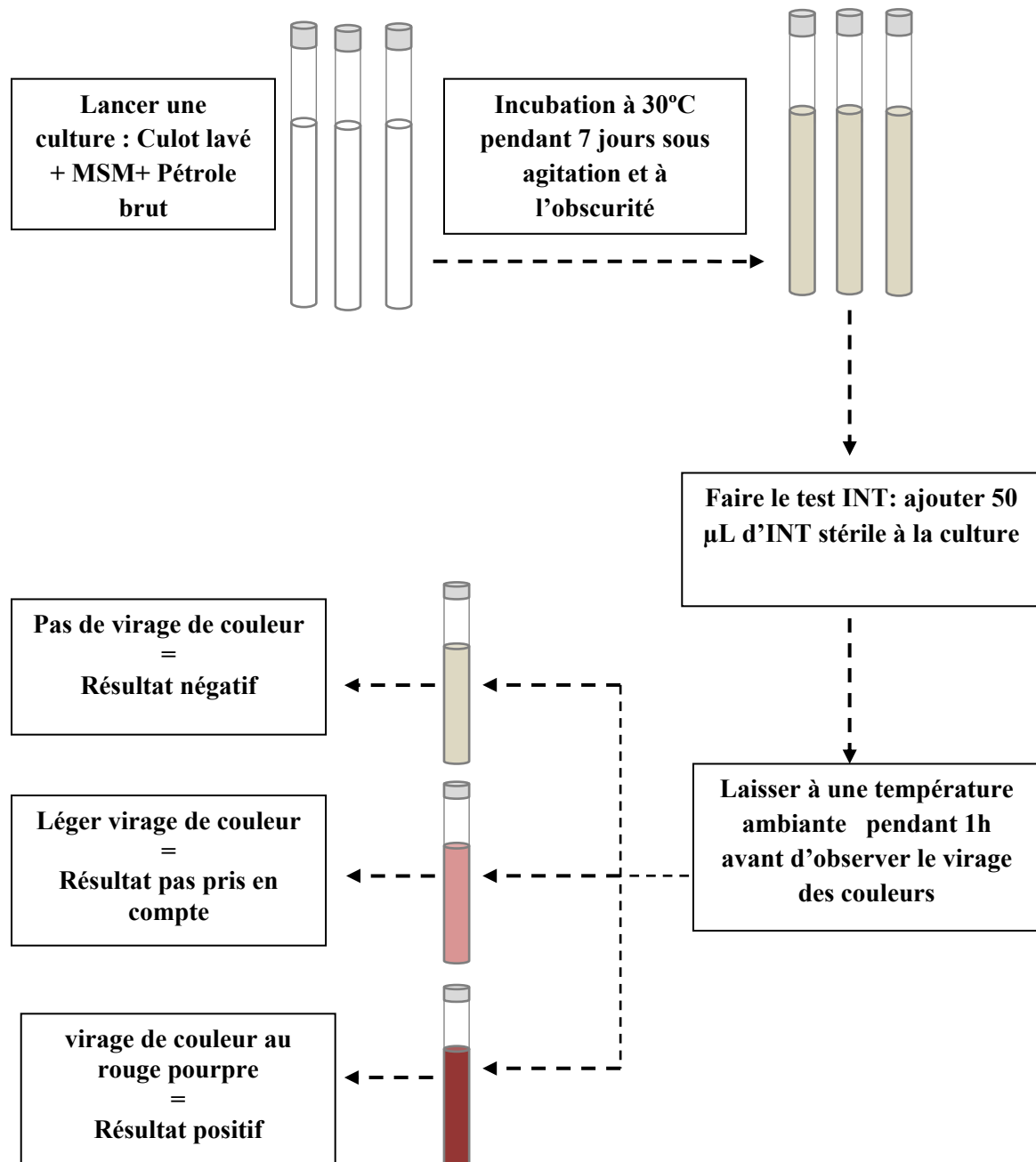


Figure 19: Test de dépistage colorimétrique par le p-iodonitrotétrazolium chlorure (INT) (Marchand et al. 2017)

II.3. Etude de la dégradation des hydrocarbures sur milieu MSM solide

Les isolats qui ont données une couleur pourpre au test des sels de tetrazolium (INT) ont été choisis pour être testés sur milieu solide.

Ces isolats ont été sélectionnés pour détecter leur capacité à dégrader le pétrole brut sur une surface gélosée, par la méthode de spray : « oil spreading technique » sur le milieu MSM solide additionné de 40 µl de pétrole brut comme seule et unique source de carbone et d'énergie.

Le pétrole brut a été offert par la raffinerie d'Arzew (Algérie) et stérilisé par filtration avec un filtre Millipore 0,45 µm. Les boîtes Pétri inoculées par spot ont été incubées dans l'obscurité à 30 °C pendant 10 jours en condition aérobie.

L'activité de biodégradation la plus élevée des bactéries était indiquée par l'apparition d'une zone claire (halo) autour de la bactérie, et le diamètre de cette zone a été mesuré par une règle (Syakti *et al.*, 2019).

L'expérience a été réalisée en triple exemplaire (Figure 20). Une boîte Pétri contenant le milieu MSM vaporisé de pétrole a été considérée comme contrôle négatif.

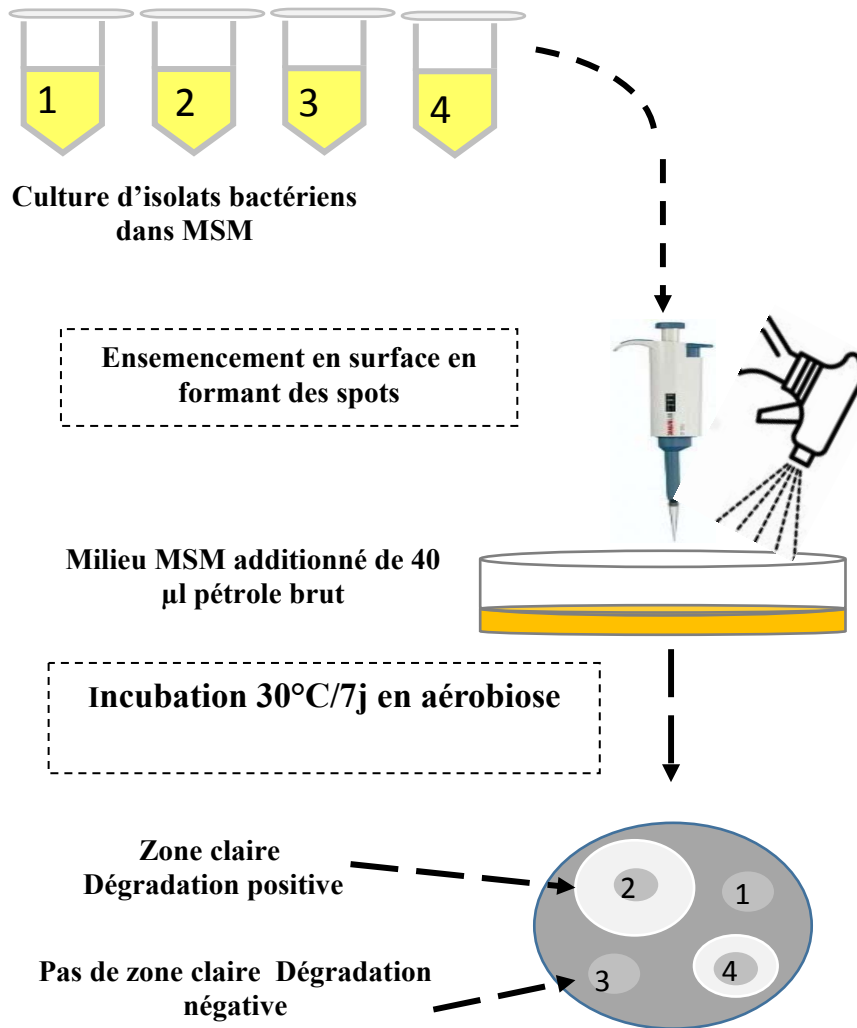


Figure 20: Etude de la biodegradation du pétrole brut par la méthode de spray : « oil spreading technique » (Syakti *et al.*, 2019).

II.4. La cinétique de croissance des isolats sélectionnés

Les isolats qui ont été sélectionnés par la méthode de spray grâce au diamètre bien distingué des zones claires (halo claire) sur le milieu MSM ont été à leur tour suivis pour mesurer leur croissance dans un milieu minéral liquide.

La turbidité consiste à déterminer la croissance bactérienne en utilisant les hydrocarbures comme source de carbone dans le bouillon MSM. Cela montre si la bactérie possède l'activité dégradante des hydrocarbures comme le pétrole brut dans notre étude.

Ces isolats sélectionnés ont été inoculés dans un Erlenmeyer avec 50 ml de milieu MSM liquide avec 2% (v / v) de pétrole brut filtré comme seule source de carbone.

L'incubation a été réalisée à 30 °C et à l'obscurité pendant 12 jours sous agitation (150 rpm). Le potentiel de dégradation du pétrole brut a été indiqué en surveillant la turbidité du milieu, mesurée à 600 nm à intervalles régulières de 2 jours à l'aide d'un spectrophotomètre UV.

Un flacon contenant les mêmes composants sans inoculum a été utilisé comme contrôle négatif (Figure 21) (Syakti *et al*, 2019). L'expérience a été réalisée en triple exemplaire.

Des cultures sans augmentation de la turbidité par rapport à la densité optique (DO) initiale (Jour 1 de la manipulation) ont été notés comme cultures sans croissance cellulaire (-) Tandis que les cultures avec une turbidité accrue et croissante quotidiennement ont été notés comme cultures à croissance cellulaire présente (+).

II.5. Analyses statistiques

La différence entre la croissance des souches a été analysée par ANOVA paramétrique unidirectionnel (analyse de variance).

Des différences significatives (valeur $P \leq 0,05$) ont été détectées par un test de comparaison multiple, Tukey. Tous les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel commercial: « Statistical Package for the Social Sciences » (SPSS version 23.0).

Les données ont été transférées sur une page Excel pour un traitement ultérieur.

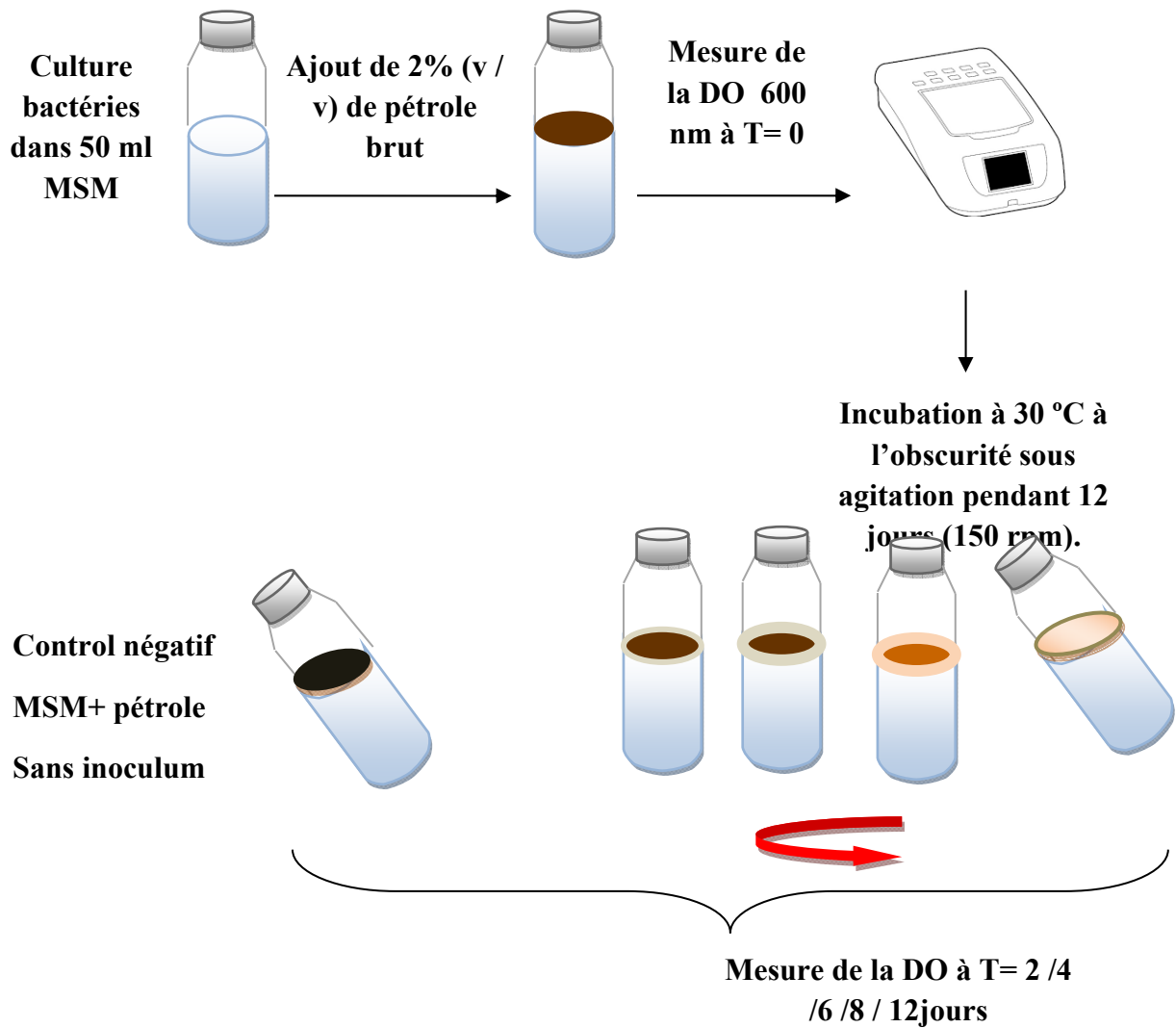


Figure 21: Mesure de la cinétique de croissance des bactéries pendant 12 jours d'incubations (Syakti *et al*, 2019).

III. Identification phénotypique

L'identification phénotypique des isolats a été réalisée sur les bactéries qui ont témoigné une activité de biodégradation sur milieu solide et liquide, en utilisant des critères morphologiques, physiologiques et biochimiques. Ces derniers ont été comparés aux caractéristiques connues du Manuel de Bergey de Bactériologie systématique (Brenner *et al.*, 2004).

III.1. Observation macroscopique

L'observation de l'aspect des colonies des isolats a été faite sur gélose GN. Après incubation, plusieurs paramètres sont observés : la taille, la couleur (pigmentation), l'aspect de la surface, la transparence, l'allure de contours et la consistance (Singleton, 1999).

III.2. Observation microscopique

Test de coloration de Gram

Cette coloration permet de connaître le type de Gram de bactérie, sa forme (Cocci, bacille...), sa taille, et le mode de regroupement (en chaîne, en amas, en palissades...) et parfois l'observation la forme sporulée.

Nous commençons par réalisation d'un frottis, à partir d'une culture jeune, sur lame de microscope et le fixer à la chaleur.

D'abord, une première coloration par le violet de gentiane (ou cristal violet) pendant 1 min. En suit le mordantage par l'ajout du Lugol durant 1 min, puis un rinçage à l'eau. Troisièmement, une décoloration avec de l'alcool 90° (10 seconde) succédé par un rinçage à l'eau. Enfin la contre coloration avec la safranine (ou Fuschine) durant 1 min. les lame sont rincé à l'eau de robinet et sécher à l'air ou entre deux papier absorbant (Denis *et al.*, 2007).

L'observation microscopique se fait à l'objectif x100 avec de l'huile à immersion. Les Gram positives apparaissent en violet foncé, et les Gram négatives apparaissent rose (Prescott *et al.*, 2003).

Test de sporulation (méthode de Benito Trujillo):

Permet de mettre en évidence la présence des spores au sein d'une cellule bactérienne. Réaliser un frottis fixé sur lame de verre. Recouvrir la lame avec une solution aqueuse au vert de malachite à 0,5% et chauffer jusqu'à émission de vapeurs. Laisser refroidir et chauffer à nouveau. L'opération doit durer 10min. Laver à l'eau. Contre-colorer en recouvrant la lame d'éosine durant 2 min. Laver et sécher. Observation à l'objectif 100 à immersion. Les spores

apparaissent roses et les cellules vertes, elles peuvent être déformantes ou non déformantes, terminales, subterminales ou centrales (Joffin et Leyral, 1997).

Observation de la mobilité

L'observation à l'état frais permet de déterminer la forme des bactéries ainsi que leur mobilité. Il consiste en l'observation d'une goutte de suspension bactérienne, préparée avec de l'eau physiologique et placée entre lame et lamelle. L'observation se fait au microscope photonique sous l'objectif 40 (Joffin et Leyral, 1997).

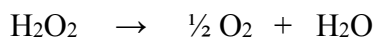
III.3. Isolement dans des milieux sélectifs

Les isolats sont ensemencés par des stries dans les milieux suivants: Gélose Hektoen, Gélose XDL, Gélose au cétrimide, gélose King A et gélose King B (composition voir l'annexe). L'incubation a été effectuée à 30°C pendant 24 heures.

III.4. Tests respiratoires

Test catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène.



Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram+.

Dans une lame propre et sèche on dépose une goutte d'eau oxygénée H_2O_2 (10 volumes). Avec une pipette Pasteur boutonnée, on dépose une colonie isolée de la souche à tester dans la goutte. L'apparition des bulles signifie que la bactérie possède l'enzyme catalase (Joffin et Leyral, 1997).

Test oxydase

Le test consiste à mettre en évidence l'enzyme cytochrome oxydase que possède la bactérie en oxydant le réactif incolore (la NN-diméthyl-paraphénylène diamine) en un dérivé rose violacé.

Ce test est pour l'identification des Gram négatives et les cocci Gram+ qui possèdent de catalase+.

Dans un tube à hémolyse stérile, on prépare une suspension bactérienne avec 1 ml eau physiologique et des une ou deux colonies prélevées d'une gélose ordinaire. A l'aide d'une pince flambée, on dépose le disque de test oxydase dans le tube et on observe le changement de couleur. Si la couleur est rose violet, on dit que la bactérie possède une activité oxydase+, si elle reste transparente alors la bactérie est oxydase négative (-) (Joffin et Leyral, 1997).

Nitrate réductase

La réduction du nitrate en nitrite a été détectée avec la diméthyl-a-naphtylamine et l'acide sulfanilique. Le test consiste à ensemencer les isolats dans un bouillon nitraté (composition voir l'annexe).

Après incubation de 30°C/24h, quelques gouttes des réactifs Nitrates 1 et 2 (ou du réactif de Griess) sont ajoutés aux cultures. Une coloration rouge signe la présence de nitrites : la bactérie est nitrate réductase +, stade nitrites.

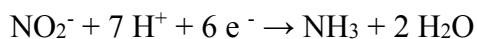
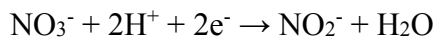
En cas où le milieu reste incolore, on ajoute du zinc (réducteur des nitrates). Après quelques minutes, une coloration rouge montre la présence de nitrites : la bactérie est Nitrate réductase (il y avait des nitrates dans le milieu qui ont été réduits par le zinc). Une absence de coloration montre l'absence de nitrates : la bactérie est Nitrate réductase -, stade diazote (N₂) (Joffin et Leyral, 1997).

Les bactéries peuvent utiliser les nitrates de deux façons :

❖ Réduction des nitrates en azote : respiration nitrates en anaérobiose



❖ Réduction des nitrates en nitrites puis NH₃ : réduction assimilatrice

***Type respiratoire à la gélose Viande-foie:***

Les isolats ont été ensemencés dans des tubes contenant la gélose Viande-Foie (composition voir l'annexe), dégazé et en surfusion à 45°C, par un ensemencement spiral en remontant dans la gélose à l'aide d'une pipette Pasteur boutonné. Après solidification, les tubes ont été incubés à 30°C pendant 24h.

- Si la croissance bactérienne est en surface, la bactérie est aérobie stricte.
- Si la croissance est au fond de tube, la bactérie est dite anaérobie stricte.
- Si la croissance est toute au long du tube, la bactérie est aéro-anaérobie facultatif.
- Si la croissance est limitée entre 0,5 et 1,5 cm du haut de la gélose, la bactérie est micro-aérophile (Joffin et Leyral, 1997).

III.5. Métabolisme protéique

Recherche des décarboxylases LDC, ODC, ADH

Les décarboxylases bactériennes sont des enzymes qui catalysent les réactions de décarboxylation des acides aminés. Les réactions les plus importantes sont la recherche de la lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et l'arginine dihydrolase (ADH).

Pour la détermination de ces caractères nous avons utilisé le milieu Møller (Møller, 1955) (composition voir l'annexe). Les isolats ont été ensemencés dans des tubes à hémolyse contenant le milieu Møller additionné d'acide aminé (L-Arginine, L-ornithine et L-lysine) et un tube contrôle milieu Møller sans acide aminé. Les tubes sont recouverts de 0,2 mL d'huile de vaseline stérile et incubés à 30°C pendant 24/72h.

Après l'incubation la culture dans le milieu contrôle (milieu Møller sans acide aminé) se manifeste par un virage du pourpre au jaune dû à la fermentation du glucose par les lactobacilles.

Pour les autres tubes (milieu Møller à l'acide aminé), le milieu vire du pourpre au jaune au bout de quelques heures (acidification du milieu). Ensuite du jaune au pourpre si la souche possède une décarboxylase (alcalinisation du milieu). Dans le cas contraire le milieu resté jaune.

Recherches Désaminases (tryptophanase)

Les désaminases bactériennes sont des enzymes qui catalysent les réactions de désamination oxydative des acides aminés. Certaines bactéries désaminent puis hydrolysent le tryptophane pour donner une molécule d'indole.

Les isolats ont été ensemencés dans un milieu urée-indole (composition voir l'annexe) et incubés 30°C/24h. La production d'indole est détectée par le réactif Kovacs. Le diméthylamino-4-benzaldéhyde du réactif de Kovacs réagit avec l'indole avec formation d'un anneau rouge (Clarke et Cowan, 1952).

Recherche d'une uréase

L'uréase est une enzyme qui hydrolyse l'urée et conduit à la formation d'ammoniac et de dioxyde de carbone. En solution, le produit final de la réaction est le carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu.

Les isolats ont été ensemencés dans un milieu urée-indole. Recouvrir la surface du milieu d'huile de paraffine pour éviter la libération d'ammoniac. Incuber à 30 °C/24h (Joffin et Leyral, 1997).

- Uréase positive : le milieu présente une coloration rouge violacée ou orange foncée.
- Uréase négative : le milieu a une teinte jaune.

Recherche de Thiosulfate réductase

L'hydrogène sulfuré peut être formé par le métabolisme des acides aminés soufrés (méthionine, cystéine, cystine) ou par la réduction de composés oxydés du soufre comme le thiosulfate. On ensemence un milieu contenant du thiosulfate et du sulfate de fer, puis on incube à 30°C/24h. La synthèse d'une thiosulfate réductase conduit à l'apparition d'une coloration noire.

III.6. Métabolisme glucidique

Test de croissance sur gélose TSI (Triple sugar iron)

Les bactéries ciblées dans ce test sont les bactéries Gram négatifs à oxydase négative. Des tubes contenant de la gélose TSI (composition voir l'annexe) ont été ensemencés par les isolats Gram négatifs à oxydase négative. L'incubation a été réalisée à 30°C pendant 24 à 48h (Delarras, 2007).

- Le milieu reste rouge : pas de fermentation, la bactérie est aérobie
- La pente rouge et le culot jaune: fermentation du glucose+ ; lactose et saccharose -.
- Le milieu vire au jaune: fermentation du glucose+ et lactose et/ou saccharose +.
- Fissure et décollement de la gélose : bactéries productrices du gaz.
- La formation d'une coloration noire dans la gélose, indique la production de sulfure d'hydrogène (H₂S).

Test ONPG (β -galactosidase)

Dans un tube à essai contenant 0,5 ml d'eau distillée stérile, une suspension dense a été réalisée avec 1 à 3 colonies pures fraîchement isolées sur un milieu TSI. Un disque d'O.N.P.G. a été déposé dans chaque suspension bactérienne. Les tubes ont été incubés au bain-marie à 30°C et observer toutes les 5 minutes pendant 30 minutes (Joffin et Leyral, 1997).

En présence de β -galactosidase, l'orthonitrophényl-B-D-galacto-pyranoside (ONPG) incolore est scindé, et libère l'orthonitrophénol jaune en solution.

Réaction de Voges-Proskauer

Les microorganismes peuvent produire de l'acétoïne (3-hydroxy-butanone) par une voie de fermentation du glucose et de pyruvate.

La méthode de recherche consiste à faire réagir le 3-hydroxy-butanone ou son produit d'oxydation (butanedione) sur les peptones en présence de naphht-1-ol en milieu alcalin oxygéné (Joffin et Leyral, 1997).

Les isolats ont été ensemencés dans milieu Clark et Lubs (composition voire l'annexe) et incubés à 30 °C/72h. La production de l'acétoïne a été révélée par l'ajout de 0,5 ml d'une solution d' α -naphhtol à 6% dans l'alcool à 90° et 0,5 ml d'une solution aqueuse de soude à 16%.

L'apparition d'une coloration rouge, indiquant la production 3-hydroxy-butanone ou un de ses dérivés (acetylméthylcarbinol), est considérée comme positive.

Utilisation du citrate

Les isolats ont été ensemencés par strie sur gélose incliné du milieu citrate de Simmons (composition voire l'annexe). Les tubes ont été incubés à 30°C pendant 5 jours (Joffin et Leyral, 1997).

- Les bactéries "citrate positive" bleussent ce milieu en donnant une culture souvent abondante.
- Les bactéries "citrate négative" ne donnent ni culture, ni bleuissement du milieu, même après plusieurs jours d'étuvage.

IV. Identification géotypique

IV.1. Extraction de l'ADNr16s au Bio Kit

Le kit NucleoSpin® Microbial DNA est conçu pour un isolement efficace de l'ADN génomique à partir d'échantillons microbiens. L'ADN peut être isolé à partir d'une grande variété de micro-organismes telles que les bactéries gram-négatives et gram-positives ainsi que les levures.

L'extraction de l'ADN génomique bactérien de nos isolats a été réalisée avec le kit commercial NucleoSpin® Microbial DNA (Macherey-nagel, Düren, Allemagne)(Hudlow *et al.*, 2011) suivant les recommandations du manuel d'utilisation(Figure 22).

Pour la préparation et le stockage des matières premières, les cellules ont été prélevées à partir de cultures microbiennes fraîches par sédimentation via centrifugation et le surnageant a été déplacé par aspiration.

Les culots récupérés peuvent être utilisé frais ou conservé entre -20 °C et -80 °C avant de commencer l'isolement de l'ADN.

Le protocole d'extraction d'ADN bactérien commence en premier lieu par récolter les cellules bactériennes des cultures par centrifugation dans un tube de micro-centrifugation.

Le culot de culture cellulaire peut être utilisé comme échantillon. Ajouter 100 µL de tampon d'élution BE et remettre les cellules en suspension.

La deuxième étape est la lyse de la paroi, pour ceci l'échantillon est Transféré dans la suspension cellulaire dans le NucleoSpin® Tube à billes de type B.

Ajouter 40 L de tampon MG ensuite, ajoutez 10 L de liquide Protéinase K et fermer le tube puis centrifuger le tube de billes NucleoSpin® pendant 30 secondes à 11 000 x g pour nettoyer le couvercle.

Ajuster les conditions de liaison à l'ADN en ajouter 600 µL de tampon MG et mélanger (eg, vortexer pendant 30 s) puis centrifuger à 11 000 x g pendant 30 secondes.

Transférer le surnageant (~500-600 µL) sur le Colonne d'ADN microbien NucleoSpin®, placée dans un Tube de prélèvement de 2 ml, puis centrifuger pendant 30 s à 11 000 x g.

Laver la membrane de silice deux fois, le 1er lavage se fait en ajoutant 500 µL de tampon BW et centrifuger pendant 30 s à 11 000 x g. Jetez le flux continu et placez la colonne dans le tube collecteur.

Le 2ème lavage se fait en ajoutant 500 µL de tampon B5 dans la colonne et centrifuger pendant 30 s à 11 000 x g.

Pour rendre la membrane de silice sèche, centrifuger la colonne pendant 30 s à 11 000x g.

Éluer de l'ADN hautement pur et placer la colonne d'ADN microbien NucleoSpin® dans un tube sans nucléase de 1,5 mL et ajouter 100 µL de tampon BE sur la colonne puis incuber en température ambiante pendant 1 min et centrifuger 30 secondes à 11 000 x g.

Les composants du kit d'ADN microbien NucleoSpin® contiennent des contenus dangereux. Donc il était impératif de porter des gants et des lunettes de protection.

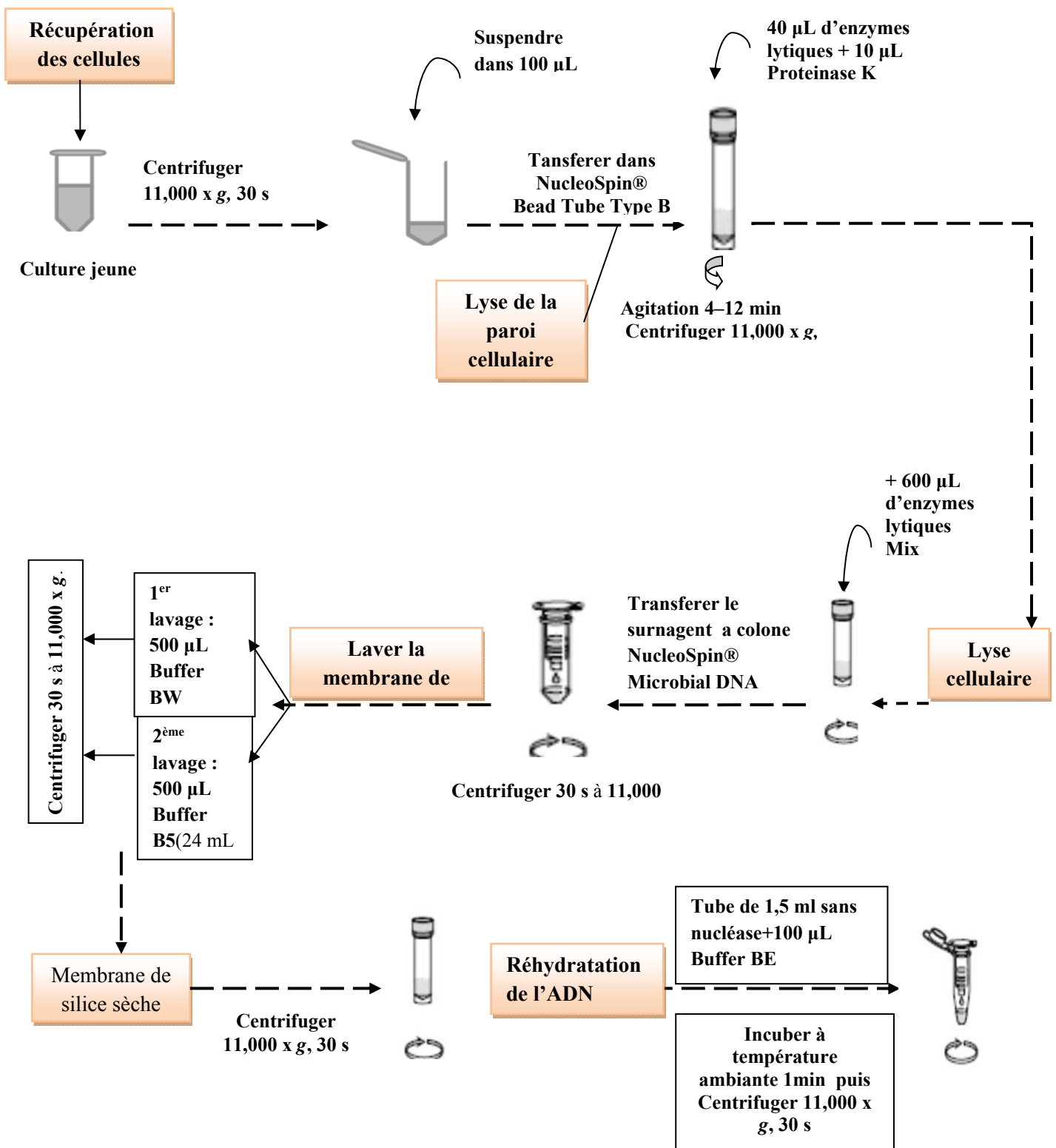


Figure 22: Extraction de l'ADN génomique par le kit commercial NucleoSpin® Microbial DNA (Macherey-nagel, Düren, Allemagne)

IV.2. Amplification du gène codant pour l'ARNr 16S

L'amplification du gène de l'ARNr 16S à partir de l'ADN génomique a été réalisée avec les amorces universelles suivantes: amorce sens 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et amorce antisense 1492R: 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3' comme décrit précédemment par Arulazhagan *et al.*(2017).

Conditions d'amplification

La réaction d'amplification a été réalisée dans un volume total de 25 μL de 1 μl de l'ADN, 10X solution tampon avec Mg^{2+} 2,5 μl , une concentration de 2,5 mM de chaque nucléotide à 1 μL , 10 μM de chaque amorce à 0,5 μl de sens et 0,5 μl de l'antisens.

Ajouter 0,2 μl d'enzymes et enfin compléter le volume final par l' H_2O double distillée (dd), pour réaliser l'amplification dans un thermocycleur Biorad (Biorad, USA) (Tableau 11).

Tableau 11: Solution de la réaction PCR

Composant	Quantité
Tampon avec Mg^{2+}	2,5 μl
dNTPs	4 μL
Amorce F	0,5 μl
Amorce R	0,5 μl
Enzymes	0,2 μl
H2O (dd)	17,3 μl

Amplification en chaîne par polymérase (PCR)

Les réactions d'amplification par PCR ont été réalisées par suivant un programme commençant par une dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min, suivie de 35 cycles d'une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, d'une hybridation à 55°C pendant 45 secondes et extension à 72°C pendant 90 secondes. La procédure a été complétée par une étape d'élongation finale à 72 ° C pendant 10 min (Tableau 12) (Wang *et al.*, 2019).

Tableau 12: Programme réactions d'amplification par PCR

Etape	Température	Temps
dénaturation initiale	95°C	5 minutes
35 cycles		
dénaturation à	94°C	30 secondes
hybridation	55°C	45 secondes
extension	72°C	90 secondes
d'élongation finale	72 ° C	10 min

IV.3. Vérification de la présence d'amplicons sur gel d'agarose à 1%

La taille attendue des amplicons était de 1500 pb et a été confirmée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (p/v) coloré au bromure d'éthidium (BET) (voir l'annexe). Les fragments d'ADN amplifiés sont visualisés sous lumière ultraviolette.

IV.4. Identification taxonomique des isolats séquencés

Le BLAST a été utilisé pour trouver la séquence identique dans la base de données de séquences nucléotidiques du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

La séquence unique la plus abondante pour chaque isolat a été recherchée par rapport à la base de données microbienne NCBI 16S en utilisant BLASTn, avec l'argument -max_target_seqs 20.

Les résultats obtenus ont été triés en premier par leur valeur, puis par leur score et la taxonomie de la séquence de score la plus élevée a été rapportée (voir l'annexe).

IV.5. Analyse phylogénétique

Pour la construction d'un arbre phylogénétique, les séquences ont été alignées avec l'ARNr bactérien 16s connu obtenu à l'aide de MEGA-X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Kumar *et al.*, 2018), disponible sur <https://www.megasoftware.net/>.

Les distances ont été calculées en utilisant la méthode : « The Neighbor-Joining Method » de Jukes-Cantor (Saitou et Nei, 1987).

La séquence représentative de chaque espèce a été sélectionnée et soumise au site Web du NCBI (www.submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs) pour obtenir les numéros d'accès GenBank.

IV.6. Numéros d'accession de séquence nucléotidique

Les séquences génétiques de l'ARNr 16S des souches : ARB3, ARB6, ARB7, ARB8, ARA6, ARA7, AIN1, AIN6, AIN7 et AIN14 ont été soumis à la base de données nucléotidique NCBI Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) et des codes de soumission ont été attribués pour chaque isolat.

V. Biodégradation du pétrole brut par des cultures mixtes

V.1. Préparation des cultures mixtes

Les souches ARA6, ARA7, ARB3, ARB6, ARB7, ARB8, AIN1, AIN6, AIN7 et AIN14 ont été cultivées individuellement en milieu LB pendant 24h. Ensuite, les suspensions bactériennes ont été centrifugées et les culots ont été lavés et remis en suspension mixte dans du milieu MSM.

Trois consortiums ont été préparés en culture et constitués de deux et trois souches bactériennes :

Mix1 : l'isolat (ARA7) a été mis en culture avec l'isolat (AIN7).

Mix2 : l'isolat (AIN6) a été mis en culture dans MSM liquide avec l'isolat (AIN14) et l'isolat (ARB7).

Mix3 : Les isolats AIN1, ARB8, ARB3, ARB6, ARA6 et AIN7 ont été toutes mises en culture pour constituer le 3ème consortium (Tableau 13).

Tableau 13: composition des consortiums

<i>Mix1</i>	isolat ARA7
	isolat AIN7
<i>Mix2</i>	isolat AIN6
	isolat AIN14
	isolat ARB7
<i>Mix3</i>	isolat AIN1
	isolat ARB8
	isolat ARB3
	isolat ARB6
	isolat ARA6
	isolat AIN7

Ces cultures mixtes mises dans des Erlenmeyer contenant 50 ml de milieu MSM liquide ont été additionnées de 2% (v / v) de pétrole brut filtré.

Ensuite, 5 mL des cultures mixtes (2,5 mL d'inoculum de chaque souche) a été inoculé dans des flacons en triple exemplaire. Le flacon sans bactéries a été considéré comme contrôle négatif.

Tous les flacons, y compris le contrôle, ont été incubés en aérobie à 30 °C pendant 20 jours sous agitation continue et une mesure de la DO a été requise tous les 2 jours (Bidja Abena, 2020).

V.2. Test d'hydrophobicité de la surface cellulaire (CSH%)

Le pourcentage d'hydrophobie de la surface cellulaire (CSH%) a été déterminé utilisant le MATH (Microbial Adhesion Test Hydrocarbons) eau-hydrocarbure méthode biphasique décrite par Rosenberg *et al.* (1980).

Les souches bactériennes ont été cultivées dans le milieu LB avec le pétrole brut (0.5%). Des échantillons bactériens ont été prélevés après 7 jours d'incubation par trois lavages avec la solution tampon PUM [Phosphore-Urée-Magnésium : (g/L) : 19,7 K₂HPO₄, 7,26 KH₂PO₄, 1,8 MgSO₄·7H₂O, pH 7,1] pendant 15 min à 8000 g (Muriel-Millán *et al.*, 2019).

Les cultures mixtes *Mix1*, *Mix2* et *Mix3* ont été ajusté à une DO_{600nm} initiale de 0,516, 0,515 et 0,514 respectivement, dans une solution tampon phosphate. Tandis que les cultures des souches individuelles: ARA7, ARB3, ARB6, ARB7, ARB8, AIN1, AIN6, AIN7 et AIN14 ont été ajusté à une DO_{600nm} initiale de 0,5.

Deux millilitres de la suspension bactérienne mixte ont été transférés dans des tubes de dilution avec 2 mL de diesel, agité vigoureusement pendant 2 min dans un vortex, et reposé à une température ambiante pendant 1 heure pour permettre la séparation des phases.

La phase aqueuse inférieure du mélange a été soigneusement pipeté pour mesurer sa DO. L'hydrophobie cellulaire a été exprimée en pourcentage de cellules adhérant aux hydrocarbures, calculé comme suit :

$$\text{CSH\%} = [1 - (\text{DO}_{600\text{nm}} \text{ Finale} / \text{DO}_{600\text{nm}} \text{ Initial})] \times 100$$

Résultats

Résultats

I. caractéristiques des sols pollués

I.1. Mesure d'Humidité, du Potentiel d'hydrogène et de la Conductivité électrique

Les résultats des analyses physico-chimiques des échantillons des sols prélevés sont résumés dans le tableau 14.

Les résultats montrent que le pH des quatre sols bruts est légèrement différent. Ceci peut être attribué à la différence du rapport liquide/solide ainsi qu'à la composition chimique des échantillons.

La valeur de la conductivité électrique de l'échantillon E2 qui est très élevée de l'ordre de 14.8dS/m alors que les trois autres échantillons ont enregistré des valeurs plus au moins proches les unes des autres.

Une humidité relative variant de 0.96 à 4.9% a été notée pour les quatre échantillons. La plus faible teneur en eau des échantillons était pour l'échantillon E2 de nature sableuse. Cette humidité est relative aux sols sahariens (Monod, 1999), il est à noter qu'un faible taux d'humidité peut avoir un effet négatif sur l'activité microbienne en limitant le contact microorganisme / polluant et en inhibant le processus de dégradation enzymatique (Lecomte, 1995).

Tableau 14: Résultats des analyses physico-chimiques des échantillons des sols. E1 : Boues d'In Amenas, E2 : Sables d'In Amenas, E3 : Boues d'Arzew, E4 : Sol de Bethioua

Echantillon	Nature de l'échantillon	Humidité %	Potentiel d'hydrogène (pH)	Conductivité électrique (CE)
E 1	Boue	4,9	6,73	2,6
E2	Sable	0,96	6,08	14,8
E3	Boue	4,8	6,54	3,5
E4	Sol	4,4	6,8	3,1

I.2. Dosage des éléments chimiques par spectrométrie d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP-OES)

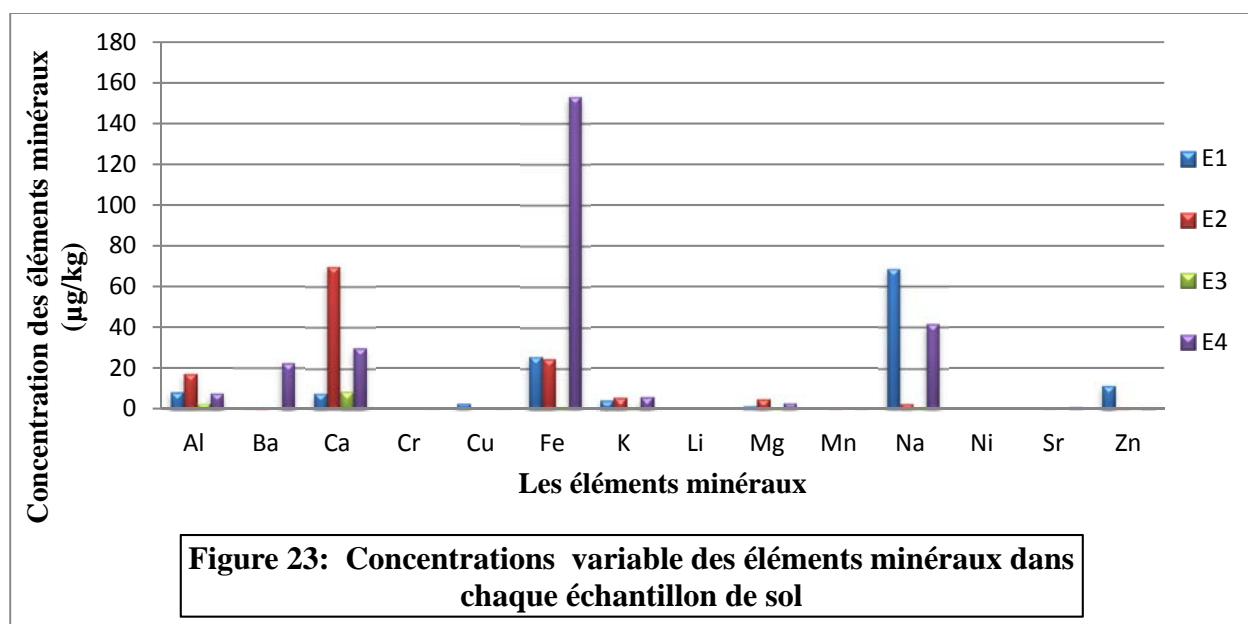
Les résultats de concentration des éléments minéraux dans différents échantillons de sol quantifiés à l'aide de l'ICP-OES sont illustrés dans le tableau 15. La composition de base des quatre sols pollués par le pétrole brut a montré la présence de différents métaux à différents niveaux de concentration. Quatorze éléments ont été détectés et mesurés (Al, Ba, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Sr et Zn).

Certains de ces métaux sont nécessaires à la survie microbienne, tels que Fe, Cu, Zn, Ca et K. D'autres sont toxiques et s'accumulent dans le sol tels que Cr, Ba, Sr et Ni (Chettri et Singh, 2019).

Les quantités de ces éléments varient d'un échantillon à un autre. La concentration du Ba, Cr, Cu, Li, Mn, Ni et Sr est presque nulle. On a noté les concentrations les plus élevées du Fe dans l'échantillon E4, du Na et du Zn dans l'échantillon E1, du Ca dans l'échantillon E2 et E3 la figure 23 ci-dessous montre les différentes concentrations des éléments minéraux dans les quatre prélèvements (Figure 23).

Tableau 15: Concentrations d'éléments minéraux d'échantillons de sol mesurées par ICP-OES.
E1 : Boues d'In Amenas, E2 : Sables d'In Amenas, E3 : Boues d'Arzew, E4 : sol de Bethioua

Echantillons	Al	Ba	Ca	Cr	Cu	Fe	K	Li	Mg	Mn	Na	Ni	Sr	Zn
$\mu\text{g kg}^{-1}$														
E1	8,4	0,2	8,0	0,1	2,4	25,9	4,1	0,0	1,6	0,1	68,5	0,1	0,0	11,3
E2	17,0	0,3	69,8	0,0	0,1	24,8	5,3	0,0	4,7	0,3	2,9	0,0	0,2	0,4
E3	3,0	0,0	8,7	0,0	0,1	1,4	0,8	0,0	0,8	0,0	0,9	0,0	0,0	0,2
E4	8,0	22,3	30,3	0,2	0,2	153,1	5,6	0,1	3,0	0,3	41,6	0,1	0,7	0,7



I.3. Isolement et purification des microorganismes

L'ensemencement sur milieu nutritif gélosé a permis d'obtenir des colonies à caractère phénotypique varié (couleur, aspect, forme, ...) à partir de différents échantillons (Figure 24).

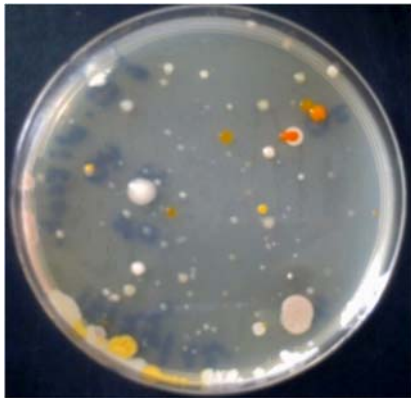
**E1****E2****E3****E4**

Figure 24: Observations macroscopiques de la diversité des cultures des échantillons du sol sur gélose nutritive

II. Criblage (screening) des bactéries qui dégradent le pétrole

II.1. Résultats du test colorimétrique par le p-iodonitrotétrazolium chlorure

Les résultats du test colorimétrique du sel de tétrazolium (INT) sont observés par un virage de couleur au rouge et au pourpre dans la figure 25.

Cette figure montre les différentes intensités de la couleur chez les bactéries testées. Parmi ces isolats, 42 bactéries ont été retenues comme résultat positif. Ces isolats ont montré un rapide virage de couleur avec une forte intensité d'un rouge pourpre lors de l'ajout de l'INT.

Les tubes qui n'ont pas donné de virage de couleur (-) étaient considérés comme un résultat négatif et le léger virage de couleur vers un rose claire (+) était considéré comme un résultat positif pas très satisfaisant et donc n'ont pas été retenus pour les études à suivre.

Alors que les tubes qui ont montrés un virage de couleur très intense vers le pourpre (+++) ont été considérés comme résultat important et ont été sélectionnés pour des études de criblages ultérieures. Ces isolats ont été comptés au nombre de 42 isolats au total.

II.2. Révélation de la biodégradation du pétrole brut par méthode de spray

Les 42 isolats sélectionnés ont subi un autre criblage sur boîte de MSM additionné de pétrole par spray en surface afin de déterminer le potentiel de dégradation des bactéries face à un polluant organique par la méthode oil spreading technique.

L'activité de biodégradation des hydrocarbures a été enregistrée par l'apparition de zones claires sur la fine couche de pétrole autour de l'inoculum bactérien (figure 26).

Parmi les 42 isolats testés, vingt ont pu pousser sur la couche mince du pétrole et ont pu croître sans aucune autre source de Carbone et d'énergie ajoutée.

Parmi ces isolats, seuls ceux qui ont montré de grandes zones claires ont été sélectionnées

Les isolats qui ont montré des zones claires importantes étaient du nombre de 10 isolats avec des diamètres bien claire et supérieur à 0,5 cm. Les diamètres de 0,2 ; 9 0,3 et 0,4 ont étaient négligés.

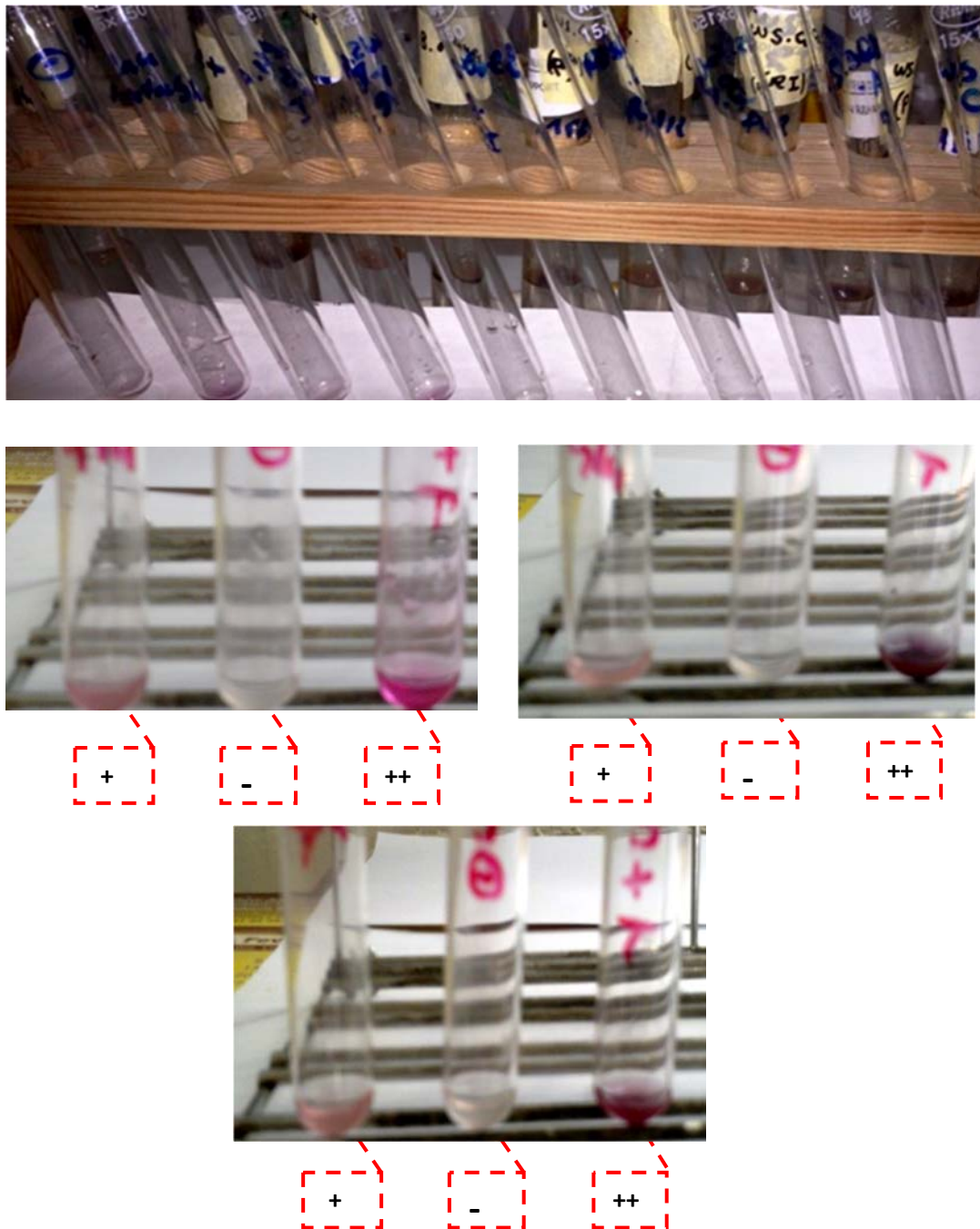
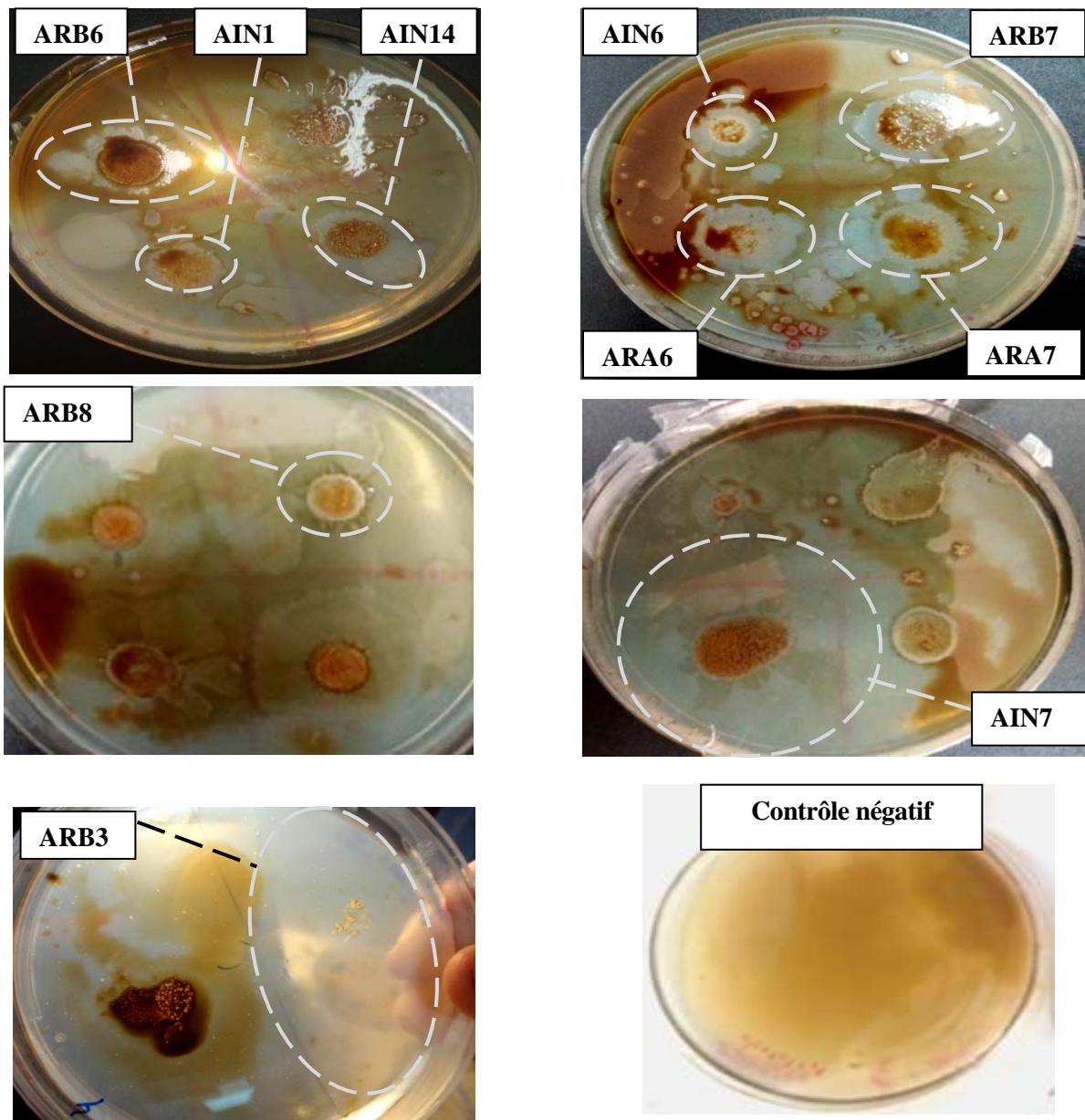


Figure 25: Résultat du test colorimétrique par le p-iodonitrotétrazolium chlorure (INT) sur les isolats en présence de pétrole brut comme seule source de Carbone

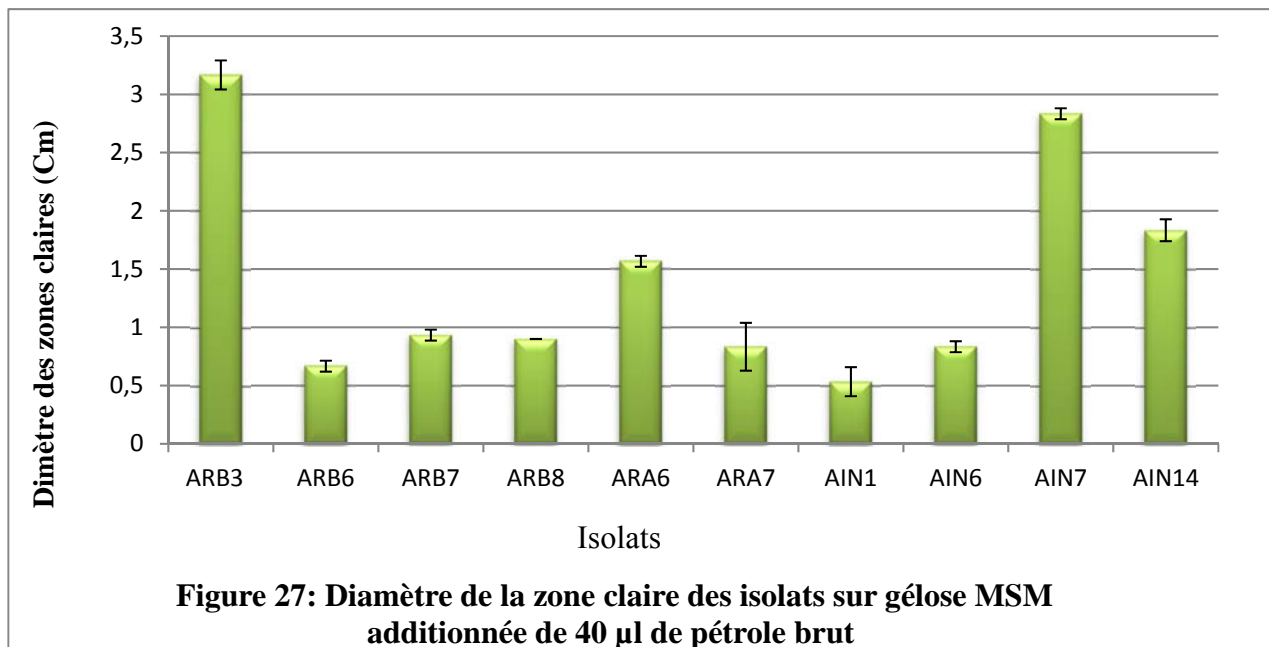
(-) Pas de virage de couleur, (+) Léger virage de couleur rose, (+++) : important Virage de couleur au rouge pourpre.



**Figure 26 : Résultats de l'activité de biodégradation des isolats bactériens sur milieu gélosé MSM supplémenté avec 40 µl de pétrole brut.
Contrôle négatif : MSM + pétrole sans inoculum bactérien**

La figure 27 est un histogramme résumant les résultats des différents diamètres de zones claires apparus pendant la durée d'incubation des boîtes à l'obscurité.

Les isolats ARB3, ARB6, ARB7, ARB8, ARA6, ARA7, AIN1, AIN6, AIN7 et AIN14 ont été testés en triple essai sur MSM supplémenté avec du pétrole comme seule source de carbone. Le schéma montre que les zones claires varient entre 0,5 Cm et 3,2 Cm de diamètre.



II.3. La cinétique de croissance

La culture bactérienne des dix isolats sélectionnés et testés dans un milieu liquide MSM additionné de pétrole est portée sur la figure 28.

La comparaison des tubes représentant ces cultures microbiennes inoculées avec du pétrole brut avec le contrôle négatif montrent la différence de l'intensité de l'anneau de pétrole sur la surface de MSM.

A l'œil nu nous pouvons remarquer que l'anneau de pétrole s'amincit tous au long des jours d'incubation sous agitation continue et à l'obscurité.

Tous les isolats ont donné un trouble dans le milieu de culture avec une manifestation de gouttelettes d'huile collées à la paroi du tube.

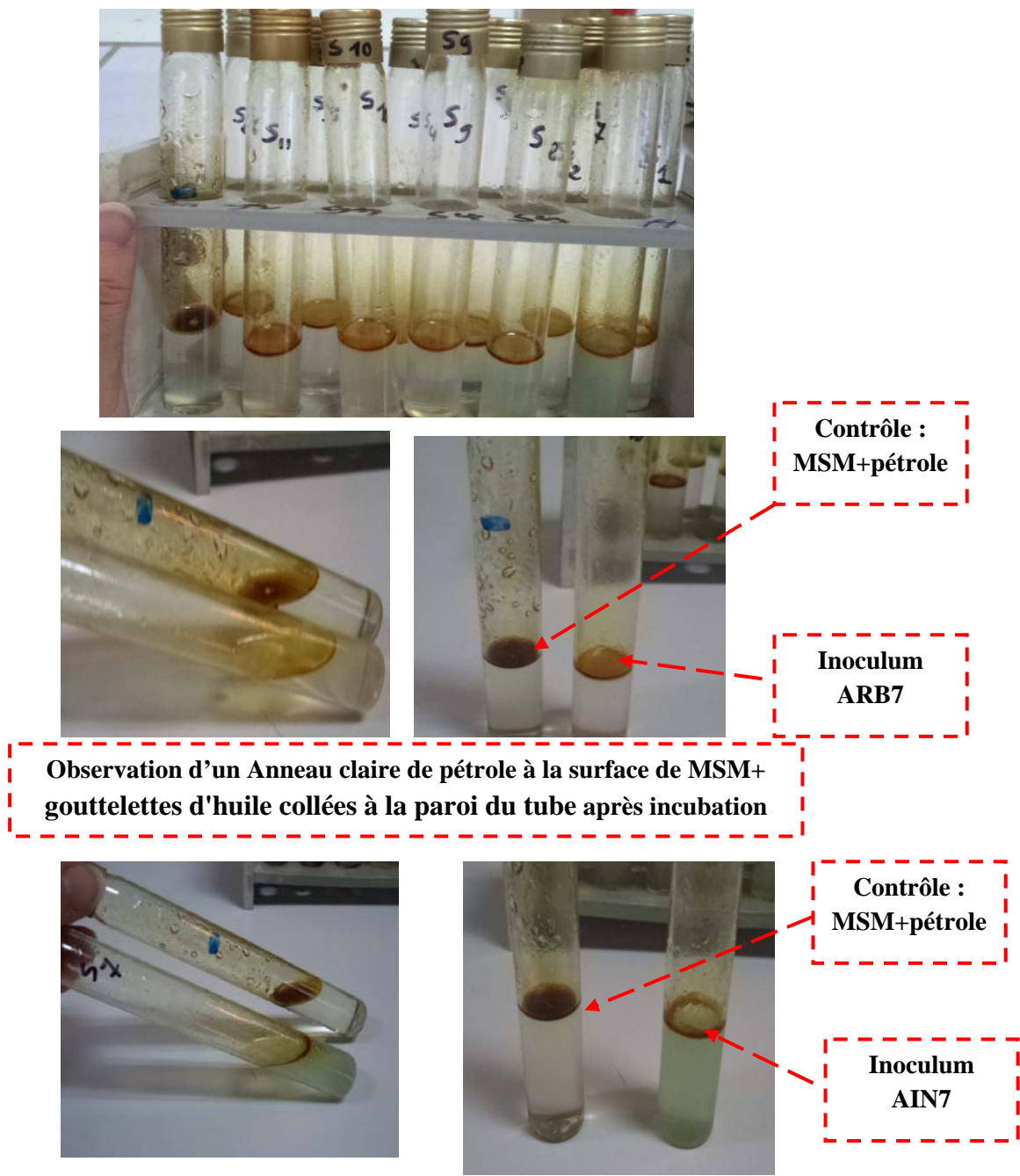


Figure 28:Résultat des culture bactériennes dans MSM additionné de 2% de pétrole brut après 15 jours d'incubation à l'obscurité

La cinétique de croissance n'a été établie que pour les souches sélectionnées par méthode de spray.

Suite à la mesure de la DO mesurée à 600 nm à intervalles régulières de 2 jours à l'aide d'un spectrophotomètre UV à partir des cultures liquides précédentes, nous avons remarqué que la croissance cellulaire avait commencé dès le deuxième jour d'incubation.

Les isolats ARB3, ARB6, ARB7, ARB8, ARA6 et ARA7 ont montré une augmentation continue de la densité cellulaire allant jusqu'au 8^{ème} jour d'incubation.

Cette augmentation progressive de la concentration du bouillon a été notée principalement entre les jours 3 et 10 tandis qu'une diminution progressive de la concentration du bouillon a été marquée principalement au 12^{ème} jour d'incubation.

Les isolats AIN1, AIN6, AIN7 et AIN14 ont marqué leur plus grand potentiel de croissance au 10^{ème} jour.

Une baisse progressive de la concentration de la culture a été marquée après 10 jours d'incubation pour la totalité des isolats.

Le taux de croissance a été mesuré puis classé du plus élevé au plus faible commençant par ARB3, AIN7, AIN14, ARA6, ARB7, ARB8, ARA7, AIN6, ARB6 et en fin AIN1. Un histogramme a été réalisé pour plus d'explication dans la figure 29.

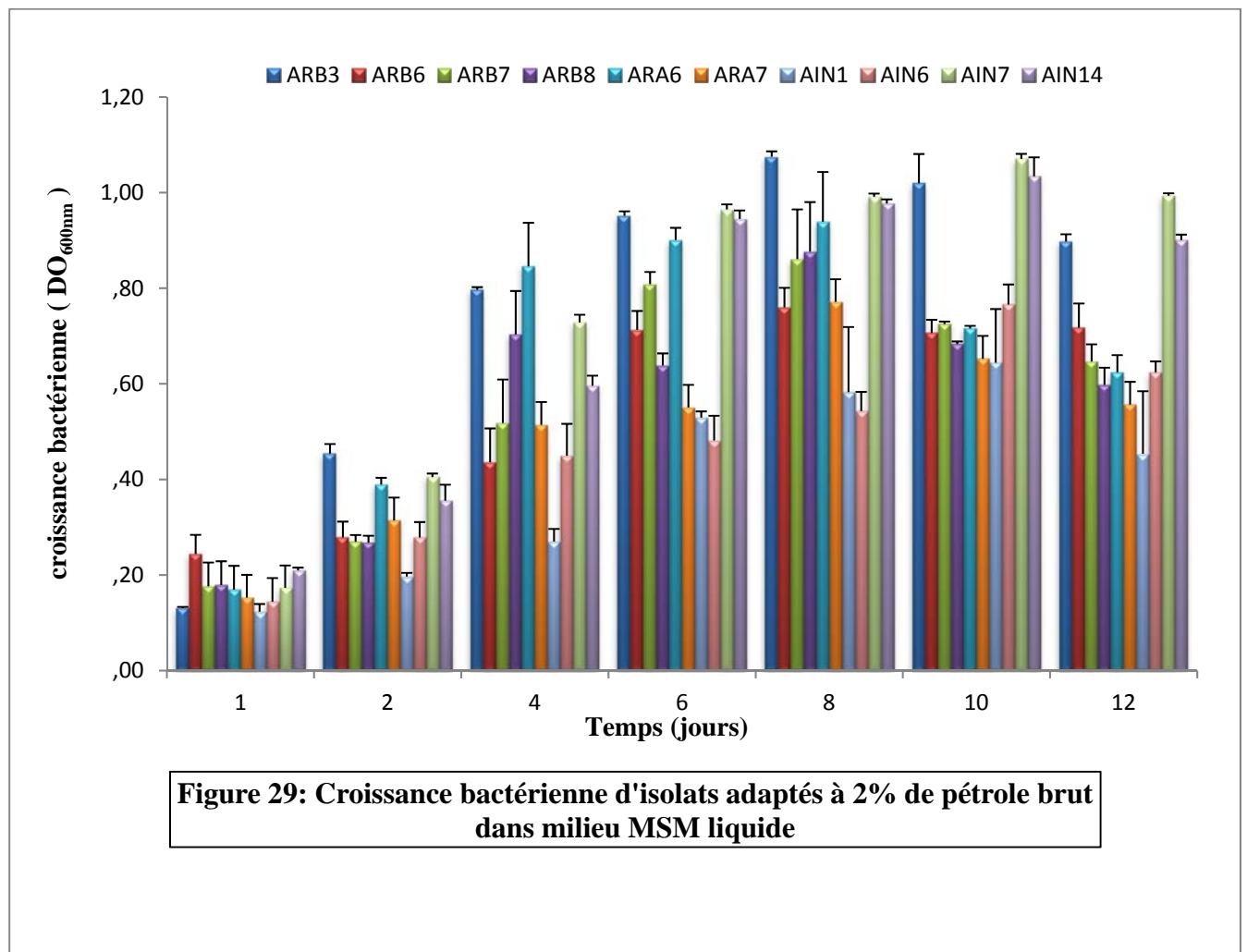
II.4. Etude statistique

L'étude statistique a été réalisée sur les isolats dégradant le pétrole dans un milieu liquide additionné de pétrole brut pendant une durée de 12 jours d'incubation à 30 °C afin de déterminer les différences de croissance entre les isolats.

La croissance microbienne au cours des 7 premiers jours d'incubation n'était pas significative ($P > 0,05$) entre les 10 isolats, tous les isolats ont commencé leur croissance ensemble et de manière simultanée au bous du 2^{ème} jour.

Au 4^{ème} jour d'incubation, nous avons pu noter une croissance significative ($P < 0,05$) des isolats ARB3, ARA6 et AIN7 par rapport aux autres vu que ces trois isolats ont enregistré des DO beaucoup plus élevées que les autres.

Une croissance microbienne très significative ($P < 0,001$) a été observée entre le 8^{ème} et le 10^{ème} jour d'incubation, exprimant la croissance la plus élevée pour tous les isolats. Les isolats ARB3 avec AIN7 et ARB7 avec ARB8 n'ont pas montré de différences significatives entre eux ($P > 0,05$) au cours de leur croissance vue que leur performance était aussi grande les unes que les autres.



III. Identification phénotypique

III.1. Caractérisation macroscopique et microscopique

Dix isolats ont été sélectionnés par les méthodes de criblage pour leur potentiel de biodégradation du pétrole.

Les caractères macroscopique et microscopique des dix isolats sélectionnés pour leur potentiel de biodégradation sont rapportés dans le tableau 16.

Ils montrent une diversité de couleurs, d'aspect, de forme et de taille. Cette diversité a été étudiée minutieusement afin de différencier les souches entre elles. Tous les isolats sont des Gram négatifs avec des formes bacillaires et coccobacilles (figure 30).

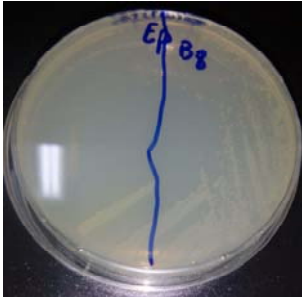


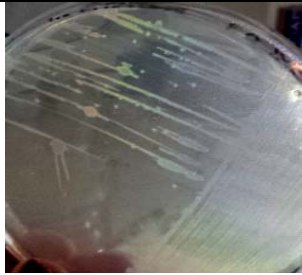

Les caractéristiques morphologiques des colonies bactériennes ont été décrites dans termes de forme (y compris la forme et l'élévation), la texture et la pigmentation. La forme fait référence à la forme de la colonie, c'est-à-dire sphérique, ovale,

L'élévation fait référence au côté profil, qui peut être plat, surélevé, ombiliqué, cratériforme, convexe ou concave, tandis que la marge ou le bord de la colonie peut être décrit comme entière (lisse), irrégulière, ondulée (ondée), filiforme, etc.

La texture de la surface de la colonie peut apparaître brillante et lisse, terne, veiné, rugueux ou luisant. Certaines bactéries produisent des pigments, notamment vert comme AIN7, rouge comme l'isolat AIN14, jaune comme l'ARA7 et ARB8, blanc comme ARA6 et ARB6, et certains sont opaques comme ARB3, ARB6 et ARB7, ARB8, AIN1 et AIN6, tandis que d'autres sont translucides ARA6, ARA7, AIN7 et AIN14.

Tableau 16: Résultat des caractères macroscopique des isolats

Echantillon	Code	Observation Macroscopique	Forme/ aspect	opacité	couleur
E1	ARA6		Ronde Petite Brillante	translucide	blanche
	ARA7		Ronde Petite	translucide	Jaune/orange claire
E2	ARB3		Très Petite Ronde	opaque	beige
	ARB6		Grande Crèmeuse Ronde	Opaque	blanche
E3	ARB7		Très petite Ronde	opaque	beige

	ARB8		petite Ronde	opaque	jaune
E4	AIN1		petite Ronde	opaque	blanche
	AIN6		Petite Ronde Bombé	opaque	Jaune claire
	AIN7		Crémeuse brillante	translucide	Jaune/vert
	AIN14		Grande Irrégulière Crémeuse brillante	translucide	Rouge orangé

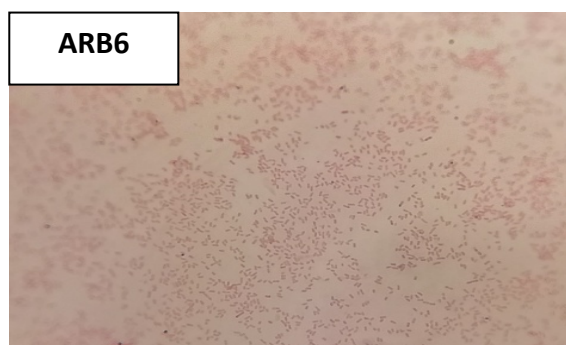
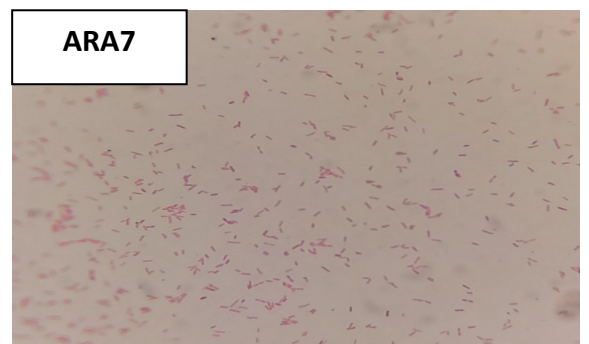
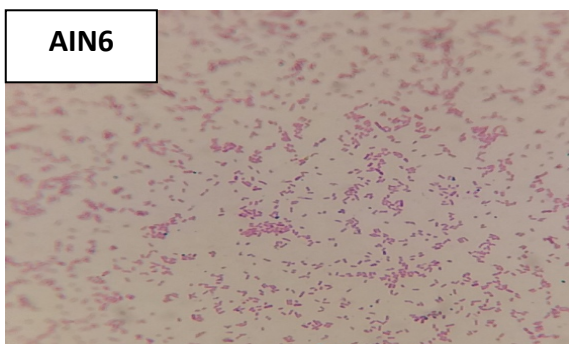
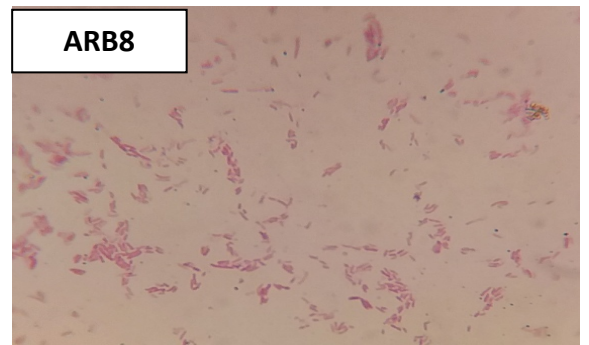
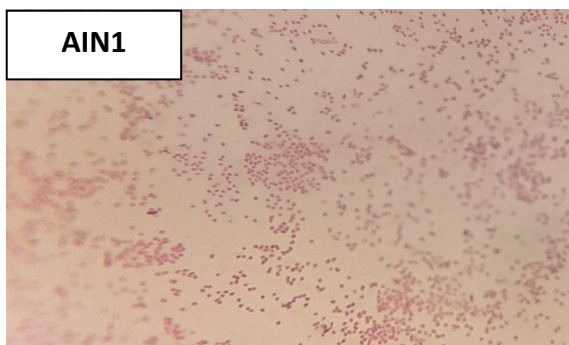
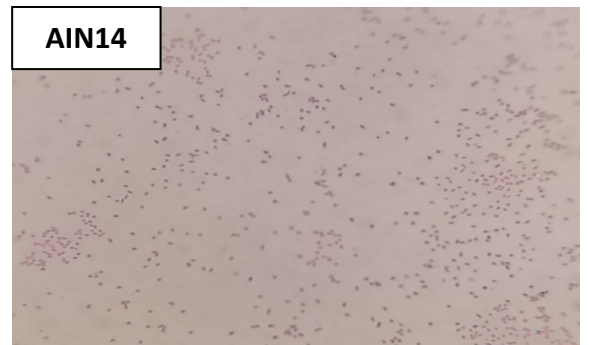
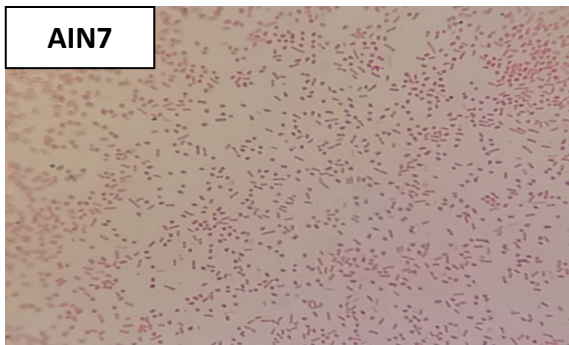


Figure 30: Observation microscopie des isolats bactériens après coloration de Gram (x100).

Tous les isolats sont Gram négatif

III.2. Isolement dans des milieux sélectifs

Tous les isolats se sont développés sur les milieux Hektoen et XLD (tableau 17). Les isolats ARB3, ARB6, ARB7 et AIN6 ont donné des colonies jaunes sur les deux milieux (figure 31, 32). Les isolats ARB8, ARA7 et AIN7 ont donné des colonies vertes et des colonies rouges sur les milieux Hektoen et XLD, respectivement.

L'isolat AIN1 a donné des colonies saumons au milieu Hektoen et jaunes au milieu XLD. L'isolat ARA6 a donné des colonies vertes et jaunes sur les milieux Hektoen et XLD, respectivement. L'isolat AIN14 a donné des colonies rouges sur les deux milieux.

La figure 33 illustre l'aspect macroscopique des colonies de l'isolat AIN7 sur gélose au cétrimide, gélose King A et gélose King B.

L'isolat AIN7 donne des colonies pigmentées en vert et présente une fluorescence sous rayonnement ultraviolet à 360 nm.

Des tests de confirmation de la production de pigmentation de l'isolat AIN7 ont été réalisés sur gélose King A et gélose King B. Les résultats ont révélé une couleur bleu verte sur King A et un jaune verdâtre fluorescent sur King B.

Les isolats ARB3, ARB6, ARB7, AIN6, ARB8, ARA7 et AIN14 ont montré une croissance positive sur les trois géloses sans produire de pigmentation verte ou de fluorescence sous la lampe ultraviolette. L'isolat AIN1 n'a pas montré de croissance sur la gélose au cétrimide.

Tableau 17: Résultats de croissance les isolats sur milieux sélectifs des Gram -.

Milieux		Isolats									
		AR B3	AR B6	AR B7	AR B8	AR A6	AR A7	AI N1	AI N6	AIN 7	AIN 14
Gélose Hektoen	croissance	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Aspect des colonies	J	J	J	V	V	V	S	J	V	R
Gélose XLD	croissance	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Aspect des colonies	J	J	J	R	J	R	J	J	R	R
Gélose au Cétrimide	croissance	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	Aspect des colonies	NP	NP	NP	NP	NP	NP	-	NP	V	R

+ : croissance, - : pas de croissance, NP : pas de pigmentation verte, R : rouge, J : jaune, V : vert, S : saumon

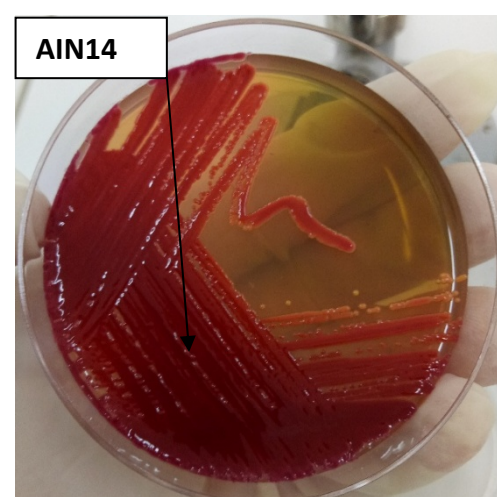
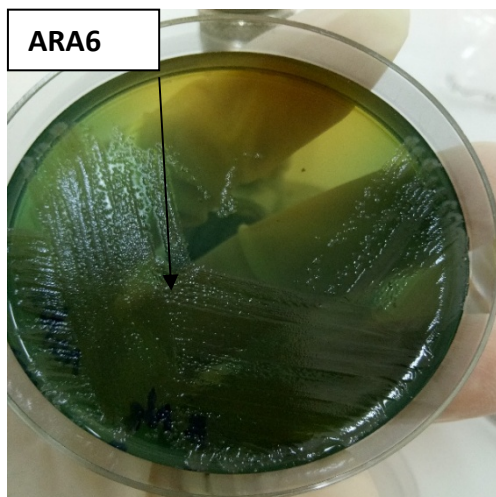
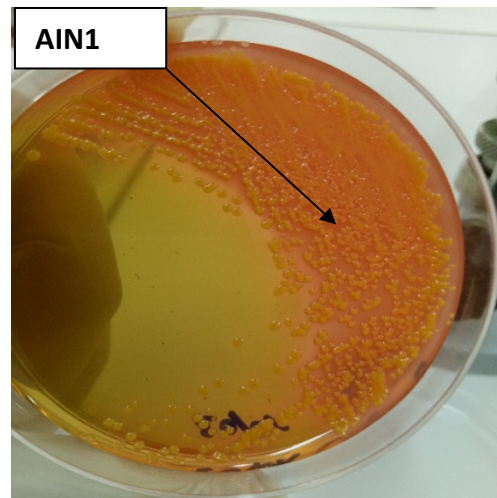
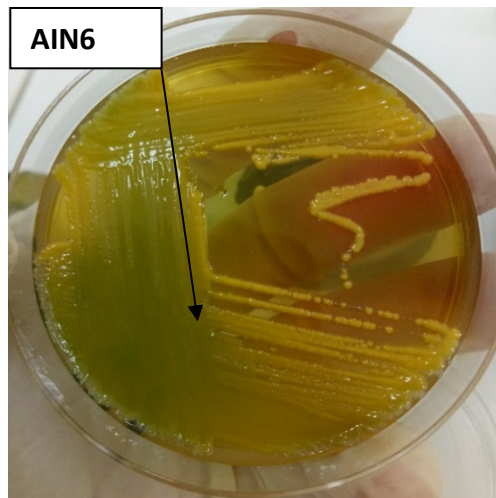
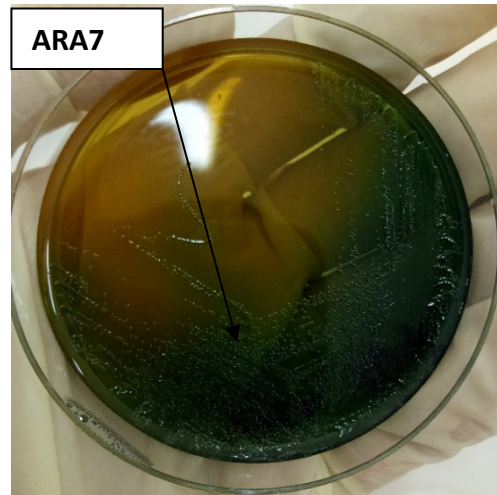
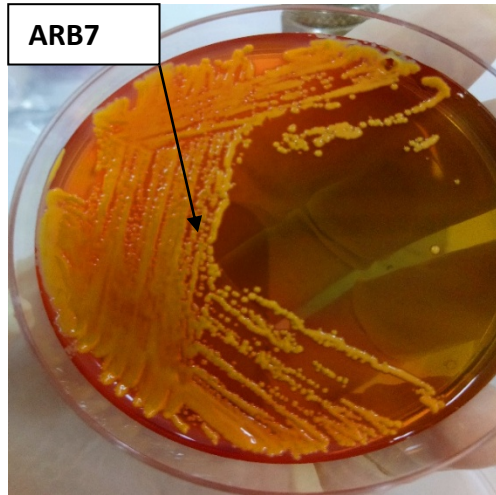


Figure 31: Croissance des isolats sur gélose Hektoen. Incubation 24h à 30°C.

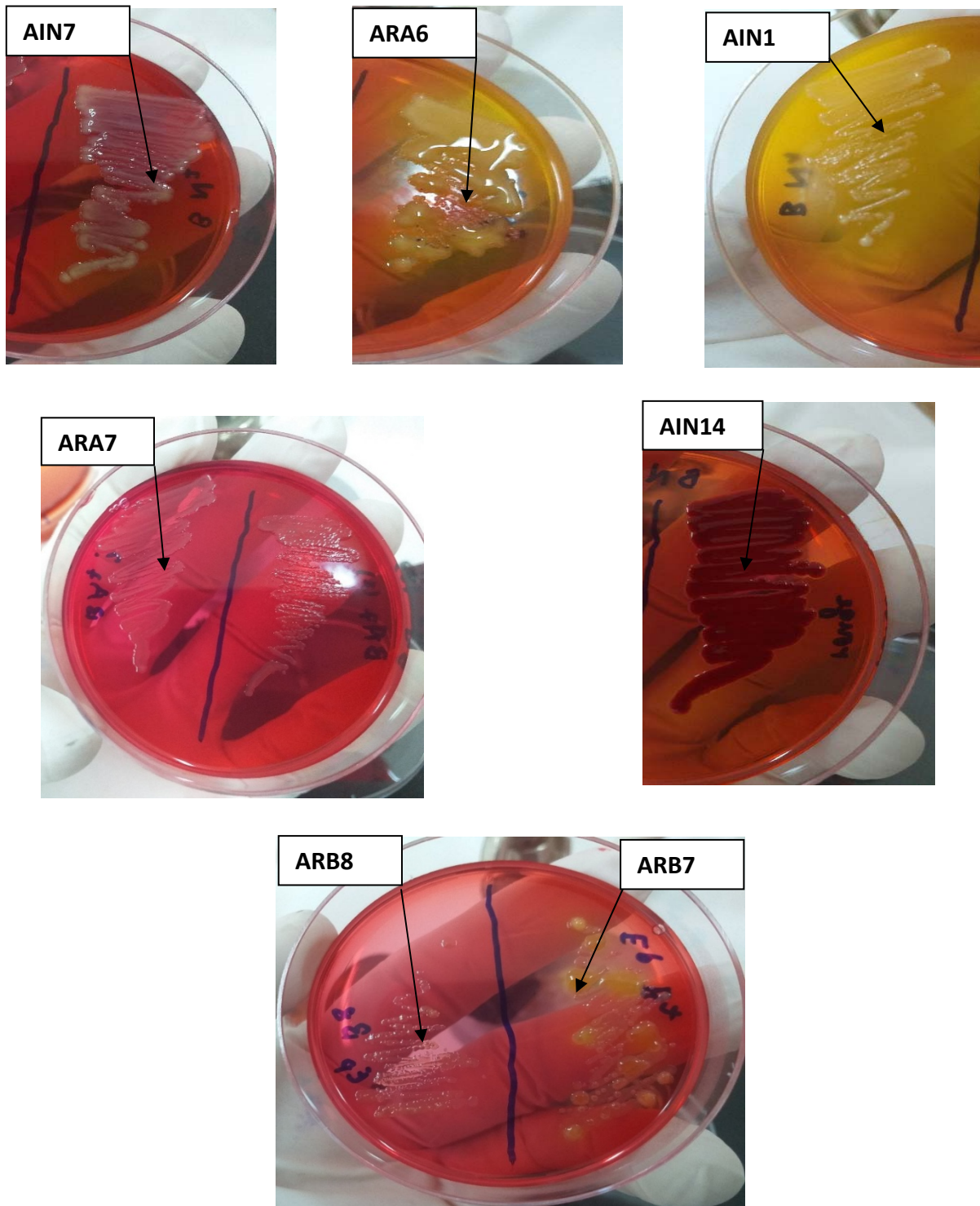
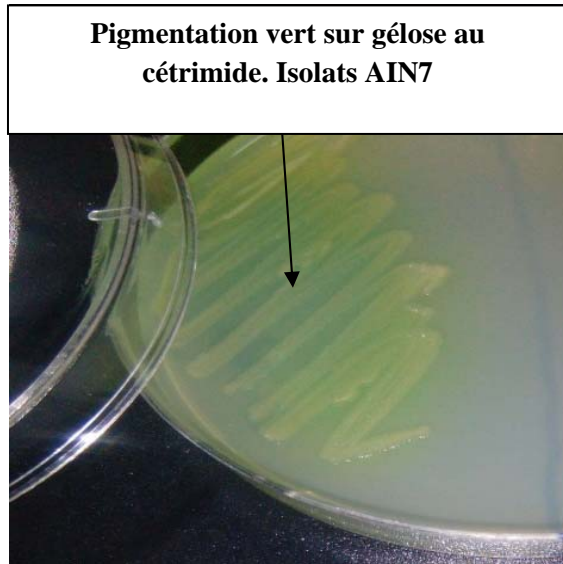
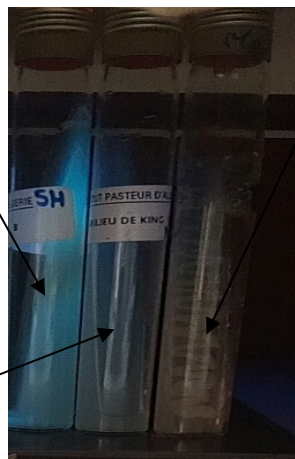


Figure 32: Croissance des isolats sur gélose XLD. Incubation 24h à 30°C.



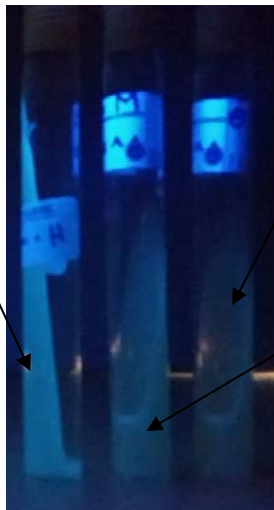
Fluorescence sous le lompe ultraviolet à 360 nm. Isolat AIN7



Croissance de l'isolat ARB6 sans production de pigmentation et sans Fluorescence

Gélose King B non ensemencé (Control -)

Fluorescence sous le lompe ultraviolet à 360 nm. Isolat AIN7



Croissance de l'isolat ARB6 sans production de pigmentation et sans Fluorescence

Gélose King A non ensemencé (Control -)

Figure 33: Croissance de l'isolat AIN7 sur gélose au cétrimide, gélose King A et gélose King B. Incubation 24h à 30°C.

III.3. Caractérisation physiologique, enzymatique et biochimique

Les caractéristiques physiologique, enzymatique et biochimique sont indiquées dans les tableaux 18 et 19.

Les résultats montrent que tous les isolats sont des bâtonnets Gram-négatifs, catalase et nitrate positifs et ne forment pas de spores. Tandis que pour les autres, les caractéristiques varient d'un isolat à un autre.

Tableau 18: Caractéristiques physiologiques des 10 isolats sélectionnés

Tests	Isolats									
	ARB 3	ARB 6	ARB 7	AR B8	ARA 6	AR A7	AIN 1	AI N6	AI N7	AIN 14
Forme des cellules	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
formation de Spores	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mobilité	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Croissance à 10 °C	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Croissance à 25 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à 45°C	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
+: réaction positive ; -: réaction négative ; B : Bacille										

III.4. Tests biochimiques

Le tableau 19 regroupe les résultats des tests biochimiques effectués sur les différentes souches isolées des sols pollués. La figure 34 montre les différents résultats des tests enzymatiques et biochimiques des 10 isolats sélectionnés dans la biodégradation.

Ces tests sont : le test de citrate dans le milieu citrate de Simmons ; Test Voges-Proskauer (VP) dans le milieu Clark et Lubs ; le type respiratoire sur gélose Viande-foie ; le test lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et l'arginine dihydrolase (ADH) sur milieu Møller et le test ONPG : β -galactosidase.

Tableau 19: Résultats des tests enzymatiques et biochimiques											
Tests		Isolats									
		AR B3	AR B6	AR B7	AR B8	AR A6	AR A7	AI N1	AI N6	AI N7	AIN14
Tests Respiratoires	Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Oxydase	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
	Viande foie	AF	AF	AF	A	AF	A	AF	AF	A	AF
	Nitrate	+	+	+	+	+	+	*	+	+	+
Métabolismes glucidique	Glucose	+	+	+	*	+	*	+	+	*	+
	saccharose	+	+	+	*	+	*	+	+	*	-
	Gaz	+	+	+	*	+	*	+	+	*	-
	Lactose	+	+	+	*	+	*	+	+	*	-
	ONPG	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
	VP	+	+	+	-	+	-	*	+	+	+
	Citrate perméase	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Métabolisme protéique	ADH	+	+	+	*	+	*	+	+	*	-
	LDC	+	+	+	*	-	*	-	+	*	+
	ODC	-	-	-	*	-	*	-	+	*	+
	uréase	+	+	+	-	-	*	*	*	*	-
	Indole	+	+	+	-	-	-	*	*	-	-
	H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: réaction positive ; -: réaction négative ; VP : Voges-Proskauer ; LDC : lysine décarboxylase ; ODC : ornithine décarboxylase ; ADH : arginine dihydrolase ; ONPG : orthonitrophényl-B-D-galacto-pyranoside ; A : Aérobie ; AF : Aéro-anaérobie facultatif, * : Non testé

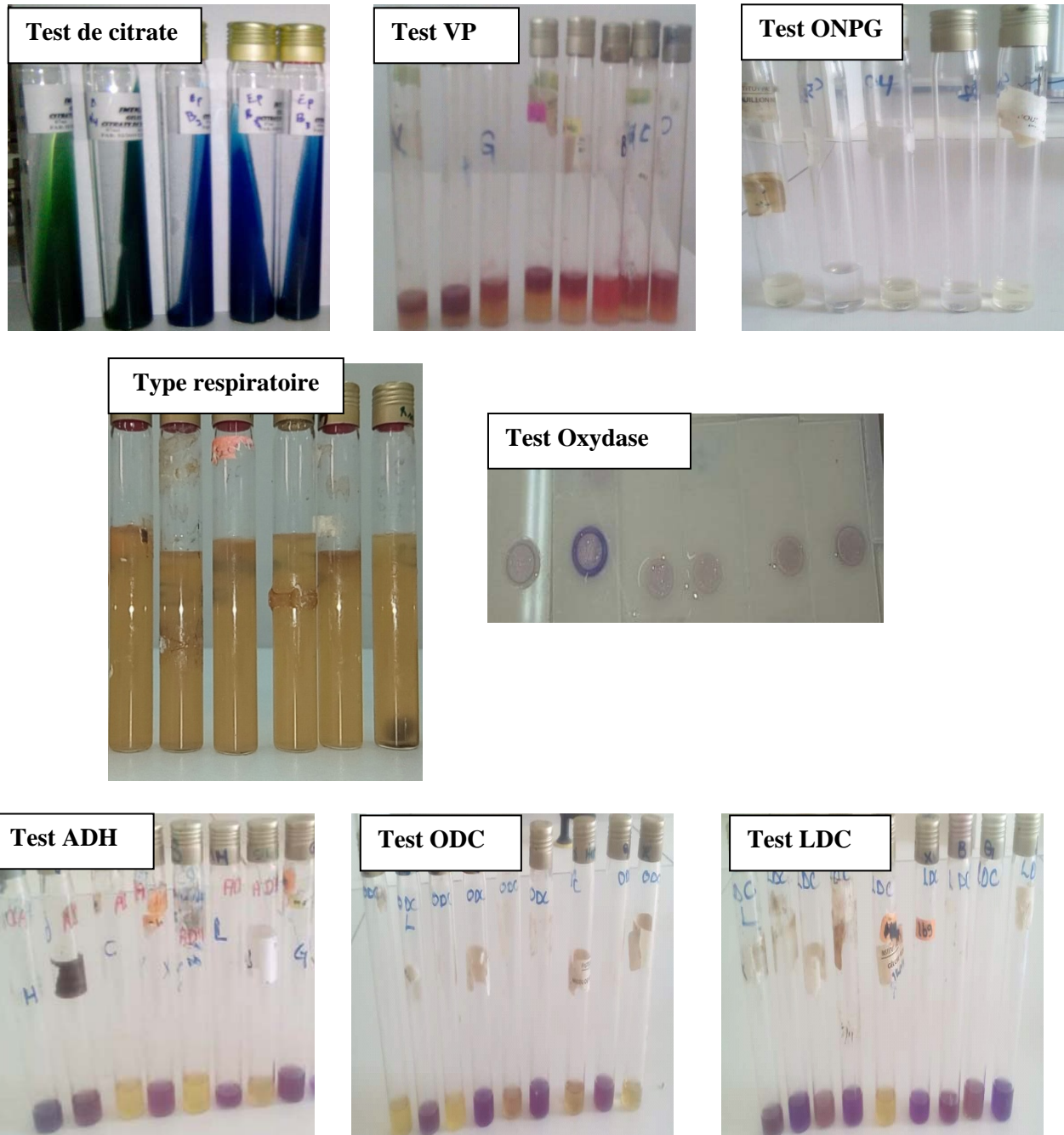


Figure 34: Résultats des tests enzymatiques et biochimiques des 10 isolats sélectionnés pour la biodégradation. Test de citrate : Milieu citrate de Simmons ; Test Voges-Proskauer(VP) : Milieu Clark et Lubs ; Type respiratoire : gélose Viande-foie ; Test lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et l'arginine dihydrolase (ADH) : milieu Møller ; Test ONPG : β -galactosidase.

IV. Identification moléculaire

IV.1. Extraction et amplification de l'ARNr 16S

L'électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN génomique des 10 isolats étudiés (ARB3, ARB6, ARB7, ARB8, ARA6, ARA7, AIN1, AIN6, AIN7 et AIN14) a été réalisée dans l'objectif de vérifier l'efficacité du protocole d'extraction ainsi que la pureté de l'ADN. Le gel du produit de l'amplification par PCR est illustré sur la figure 35 et la taille préconisée est de 1500 pb.

Les séquences obtenues ont été analysées par la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI). Les résultats du BLAST ont identifié des isolats de six genres et de six espèces et l'homologie nucléotidique est présentée dans le tableau 19.

Les isolats ARB3 et ARB7 ont montré un pourcentage d'homologie de 99,70% et 99,72% respectivement avec *Aeromonas hydrophila*.

Les deux isolats, ARB8 et ARA7 ont montré une similitude de 99,90% et 99,88% respectivement avec l'espèce *Stenotrophomonas maltophilia*.

L'isolat AIN1 a été classé dans la base de données comme *Enterobacter xiangfengensis* à 99,79% d'homologie.

L'isolat AIN7 a été identifié à 99,69% comme l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* qui est prédominante dans la majorité des sites pollués.

L'isolat AIN14 a été identifié comme *Serratia marcescens* (99,86%). L'isolat AIN6 a été assimilé au genre *Raouletella* sp. avec un pourcentage de similitude de 99,52%.

Pour l'isolat ARB6, le BLAST a donné le même pourcentage de similitude (98,53%) avec quatre différentes souches de référence qui sont *Aeromonas veronii* biovar *veronni*, *A. jandaei*, *A. media* et *A. hydrophila*. Dans un tel cas, la souche est assimilée au genre, qui est *Aeromonas* (Drancourt *et al.*, 2000).

Enfin, l'isolat ARA6 avait un pourcentage de similitude assez bas qui est de 92% avec le genre *Enterobacter* sp.

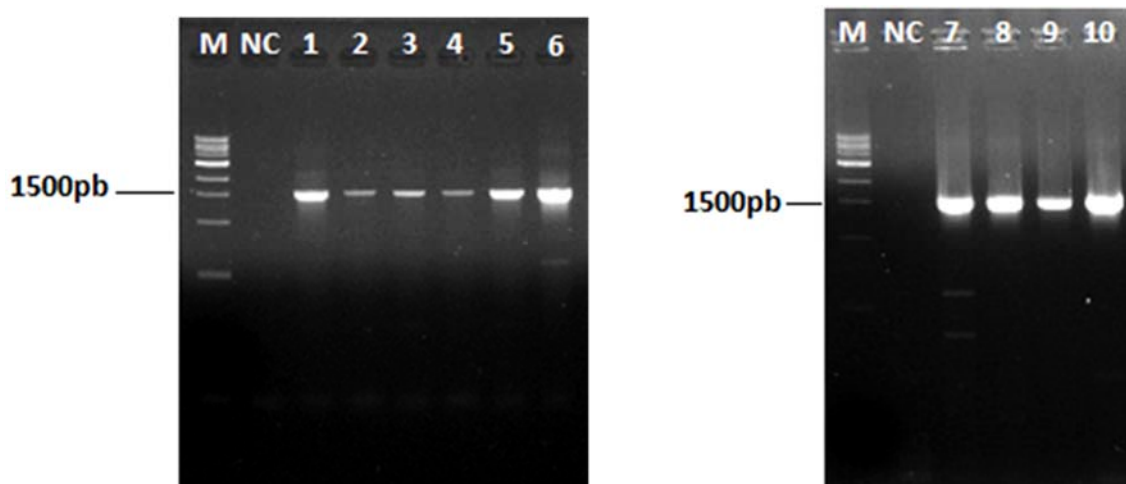


Figure 35: Gel de l'amplification PCR pour les isolats (1): ARB3, (2): ARB6, (3): ARB7, (4): ARB8, (5): ARA6, (6): ARA7, (7): AIN1, (8): AIN6, (9): AIN7, et (10): AIN14, (M): marqueur moléculaire, (NC): contrôle négatif.

Tableau 20: Résultats de l'identification par 16S rRNAs des souches qui dégradent le pétrole

Isolats	Identification	Homologie (%)	GenBank Numéros d'accèsion
ARB3	<i>Aeromonas hydrophila</i>	99,70	MT572504
ARB6	<i>Aeromonas</i> sp.	98,53	MT572502
ARB7	<i>Aeromonas hydrophila</i>	99,72	MT572500
ARB8	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99,90	MT572503
ARA6	<i>Enterobacter</i> sp.	92	MT572507
ARA7	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99,88	MT572505
AIN1	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	99,79	MT572501
AIN6	<i>Raoultella</i> sp.	99,52	MT572499
AIN7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99,69	MT572506
AIN14	<i>Serratia marcescens</i>	99,86	MT572498

IV.2. Arbre phylogénétique

Un dendrogramme a été produit de l'alignement des séquences d'ARNr 16S des différentes souches et des séquences des espèces de la base de données NCBI.

L'analyse phylogénétique illustrée par la figure 36 a indiqué trois espèces du genre *Aeromonas*, deux espèces des deux genres *Stenotrophomonas* et *Enterobacter* et une espèce de chaque genre de *Pseudomonas*, *Raouletella* et *Serratia*.

La classification ascendante hiérarchique (CAH) des 10 souches bactériennes a permis de visualiser trois groupes homogènes identifiés. Ce regroupement des séquences des isolats avec les espèces de la base de données NCBI est cohérent avec les résultats du séquençage du gène de l'ARNr 16S.

L'analyse des distances phylogénétiques sur le dendrogramme par le Neighbor-joininga montré que les souches ARB8 et ARA7 qui sont des *Stenotrophomonas maltophilia* étaient proches du genre de *Pseudomonas* (AIN7).

Dans un autre groupe, on a noté que le genre *Raoultella* sp. (AIN6) pourrait éventuellement appartenir à trois espèces différentes *R. planticola*, *R. ornithinolytica* et *R. terrigena*.

Pour la souche ARB6, positionné sur un autre nœud du même groupe, elle peut avoir un lien avec quatre espèces qui sont *Aeromonas veronii* biovar *veronni*, *A. jandaei*, *A. media* et *A. hydrophila*.

En examinant les niveaux de similitudes, le dernier cluster nous aide à comprendre que la souche ARA6 est plus loin dans l'arbre phylogénique par rapport à son groupe de souches vu que le niveau de similarité diminue fortement entre AIN6 (99,52%) et ARB6 (92%).

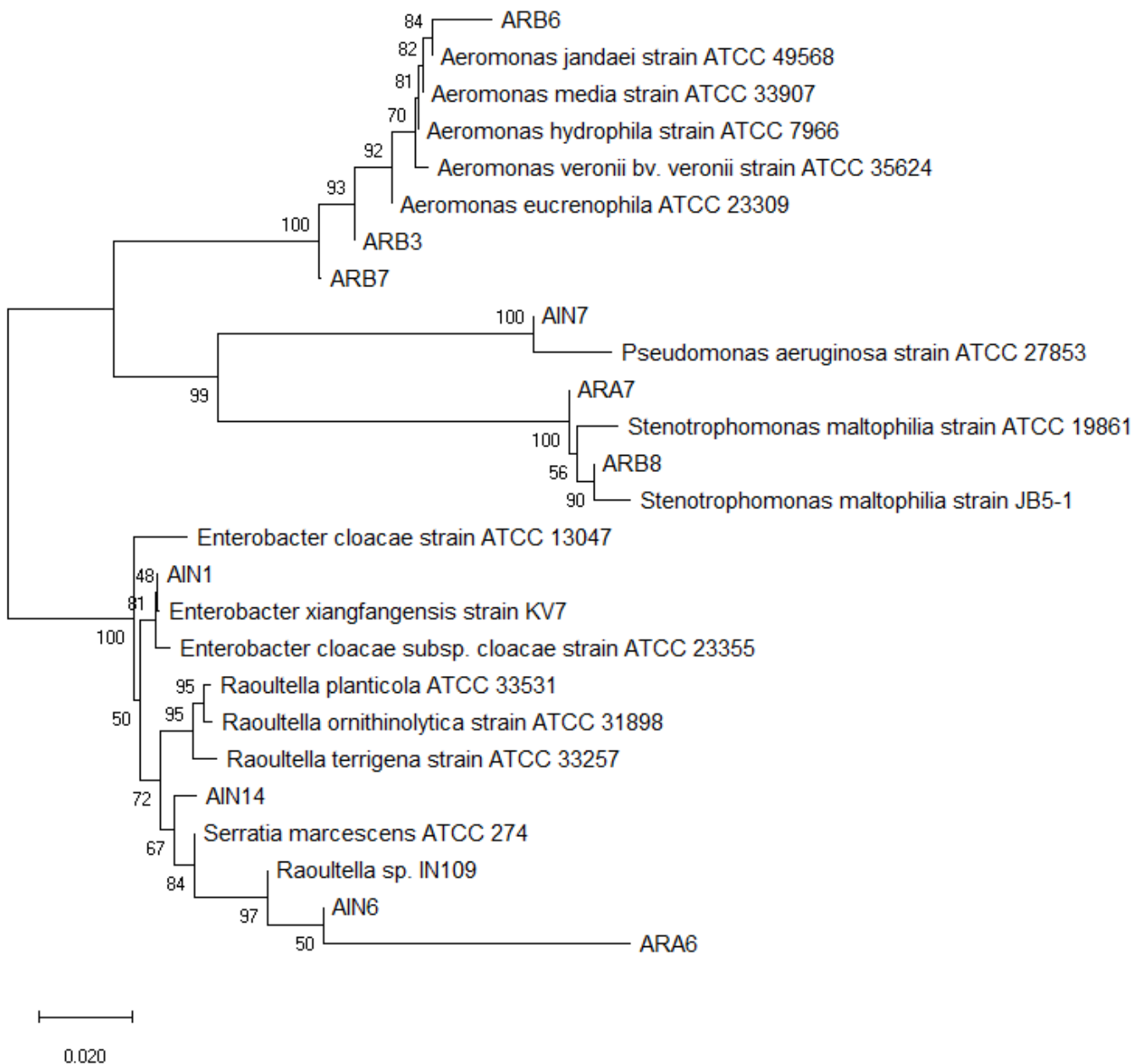


Figure 36: Dendrogramme basé sur les séquences génétiques de l'ARNr 16S montrant les relations entre les isolats ARB3, ARB6, ARB7, ARB8, ARA6, ARA7, AIN1, AIN6, AIN7, AIN14 et leurs positions avec des espèces d'autres taxons apparentés de la base de données NCBI. Les séquences ont été alignées en utilisant la méthode Neighbor-joining.

L'arbre phylogénique ci-dessus nous a aussi permis d'avoir la classification de chacune des bactéries identifiées pour mieux comprendre leurs origines (Tableau 21).

La division de toutes les espèces est *Proteobacteria*, ils sont aussi communs pour la classe des *Gammaproteobacteria*. Tandis que l'ordre, la famille et le genre varie selon les espèces.

Dans l'ordre des *Aeromonadales*, famille des *Aeromonadaceae* nous avons pu grouper 3 genres de *Aeromonas* dont deux espèces identifiées comme *Aeromonas hydrophila* isolées toutes de sites différents.

Dans l'ordre des *Xanthomonadales*, famille des *Xanthomonadaceae* nous avons pu classer deux espèces de *Stenotrophomonas maltophilia* issues de deux sites différents.

L'ordre des *Enterobacterales*, famille des *Enterobacteriaceae*, regroupé quatre espèces de trois différents genres qui sont *Enterobacter xiangfangensis*, *Raoultella* sp. et *Serratia marcescens*.

Le quatrième ordre est celui de *Pseudomonadales*, famille des *Pseudomonadaceae* qui a réuni une seule espèce de *Pseudomonas aeruginosa*.

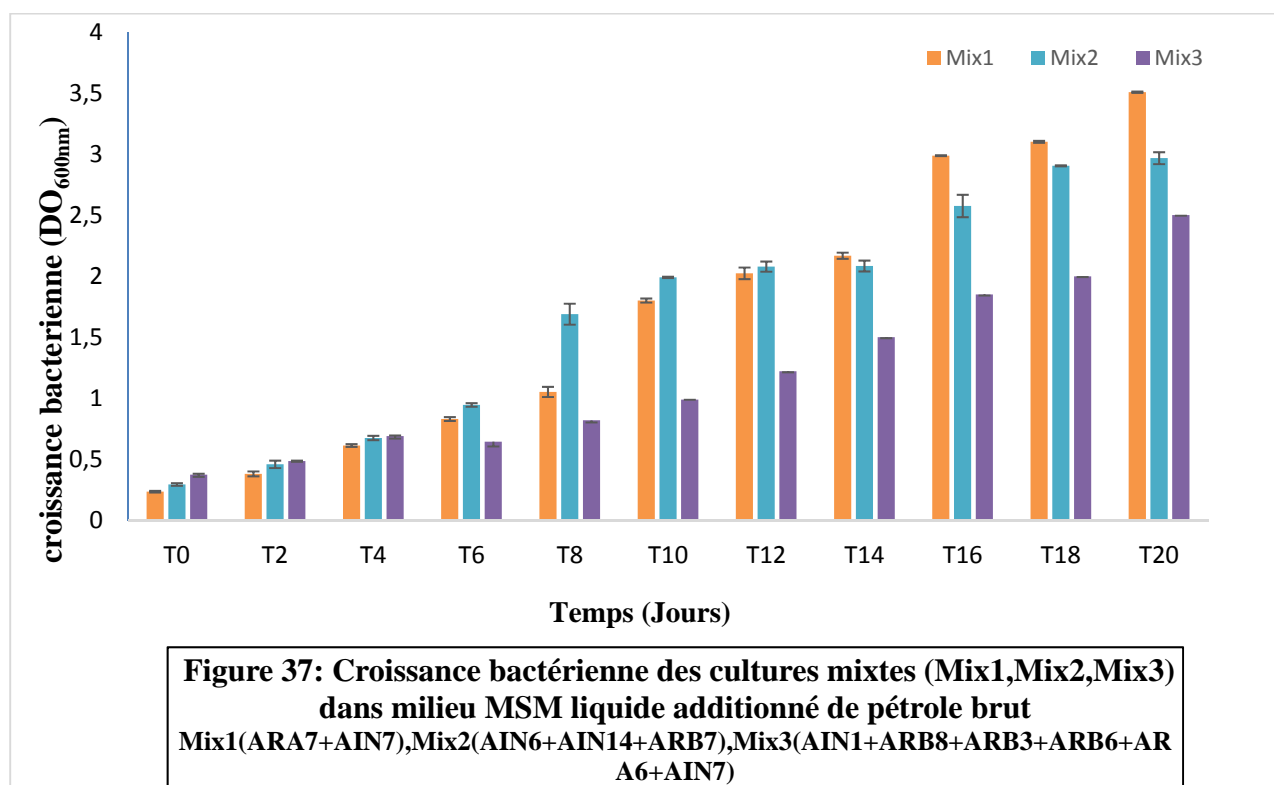
Tableau 21 : Classification des dix isolats sélectionné pour la biodégradation du pétrole

Division	Classe	Ordre	Famille	Isolats genre et espèce
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Aeromonadales</i>	<i>Aeromonadaceae</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> ARB3
				<i>Aeromonas</i> sp. ARB6
				<i>Aeromonas hydrophila</i> ARB7
		<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ARB8
				<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ARA7
		<i>Enterobacterales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter</i> sp. ARA6
				<i>Enterobacter xiangfangensis</i> AIN1
				<i>Raoultella</i> sp. AIN6
				<i>Serratia marcescens</i> AIN14
		<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AIN7

V. Biodégradation du pétrole brut par des cultures mixtes

Les cultures mixtes étaient constituées des souches suivantes : *Mix1* : la souche *Stenotrophomonas maltophilia* (ARA7) a été mise en culture avec la souche *Pseudomonas aeruginosa* (AIN7). *Mix2* : la souche *Raouletella sp.* (AIN6) avec la souche *Serratia marcescens* (AIN14) et la souche *Aeromonas hydrophila* (ARB7). *Mix3* : Les souches AIN1, ARB8, ARB3, ARB6, ARA6 et AIN7 qui sont respectivement *Enterobacter xiangfangensis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sp.*, *Enterobacter sp.* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Suite à la mesure de la DO mesurée à 600 nm à intervalles régulières de 2 jours à l'aide d'un spectrophotomètre UV à partir des cultures liquides précédentes, nous avons remarqué que la croissance cellulaire avait commencé dès le deuxième jour d'incubation. Cette croissance cellulaire était croissante pour les trois cultures mixtes jusqu'au 20^{ème} jour d'incubation. Nous avons pu noter que pendant les six premiers jours, les trois consortiums ne représentaient de différence quelconque et que leur croissance n'était pas très élevée. Au 8^{ème} jour le Mix2 les a dépassés suivie du Mix1 au 10^{ème} jour. Le Mix3 a représenté une légère baisse de croissance au 6^{ème} jour pour continuer ensuite une augmenté de la densité optique jusqu'à la fin de la période d'incubation (Figure 37).



V.1. Hydrophobicité de la paroi cellulaire

En utilisant la méthode rapportée préalablement par Rosenberg et al. (1980), nous avons mesuré l'adhérence de ces bactéries seules en présence de pétrole afin de pouvoir comparer leurs adhérences avec celle des consortiums qu'elles forment.

L'adhérence cellulaire (CSH%) de ces souches a variée de la plus faible 29,06% jusqu'à la plus élevée 81,39% (Figure 38).

Ces mêmes souches ont été ensuite cultivées ensembles pour créer des cultures mixtes (consortium) et comme le montre la figure 38, l'adhérence cellulaire des cultures mixtes a marquée des pourcentages élevés : 80,93 pour *Mix1*%, 89,29% pour *Mix2* et 90,50% pour *Mix3* (Figure 39).

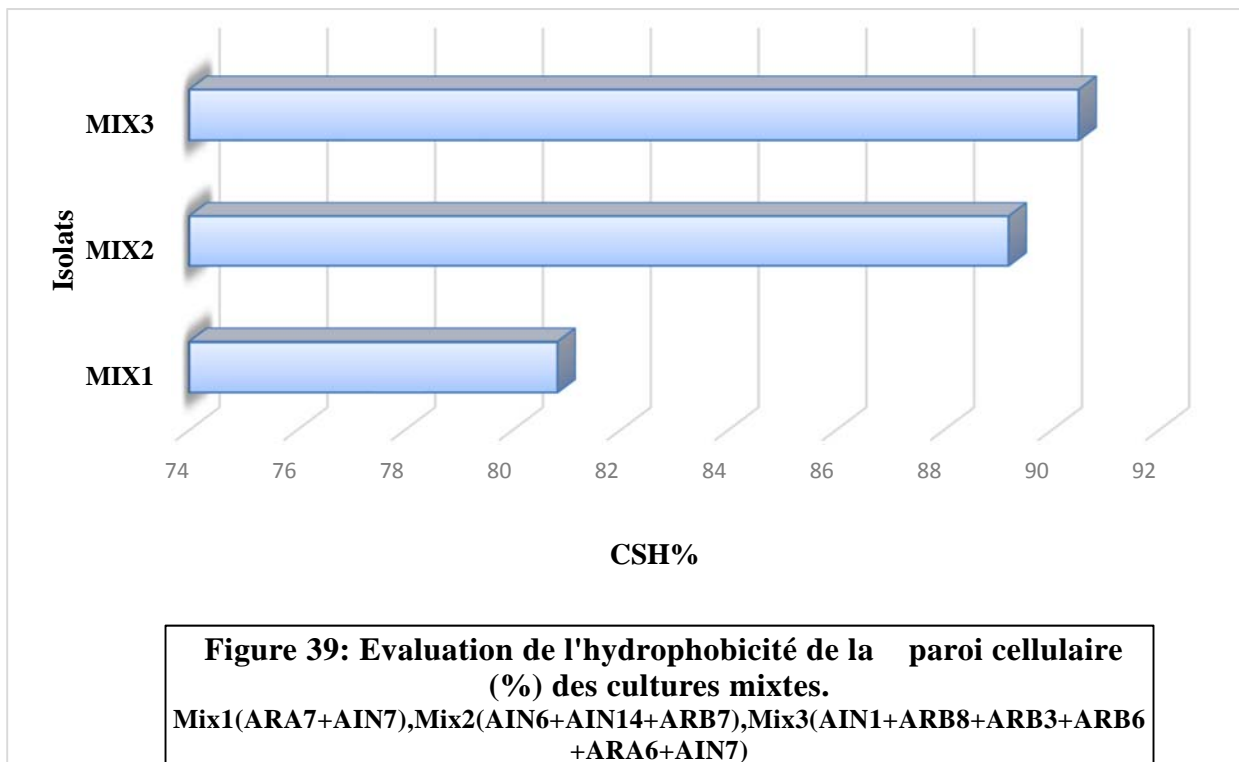
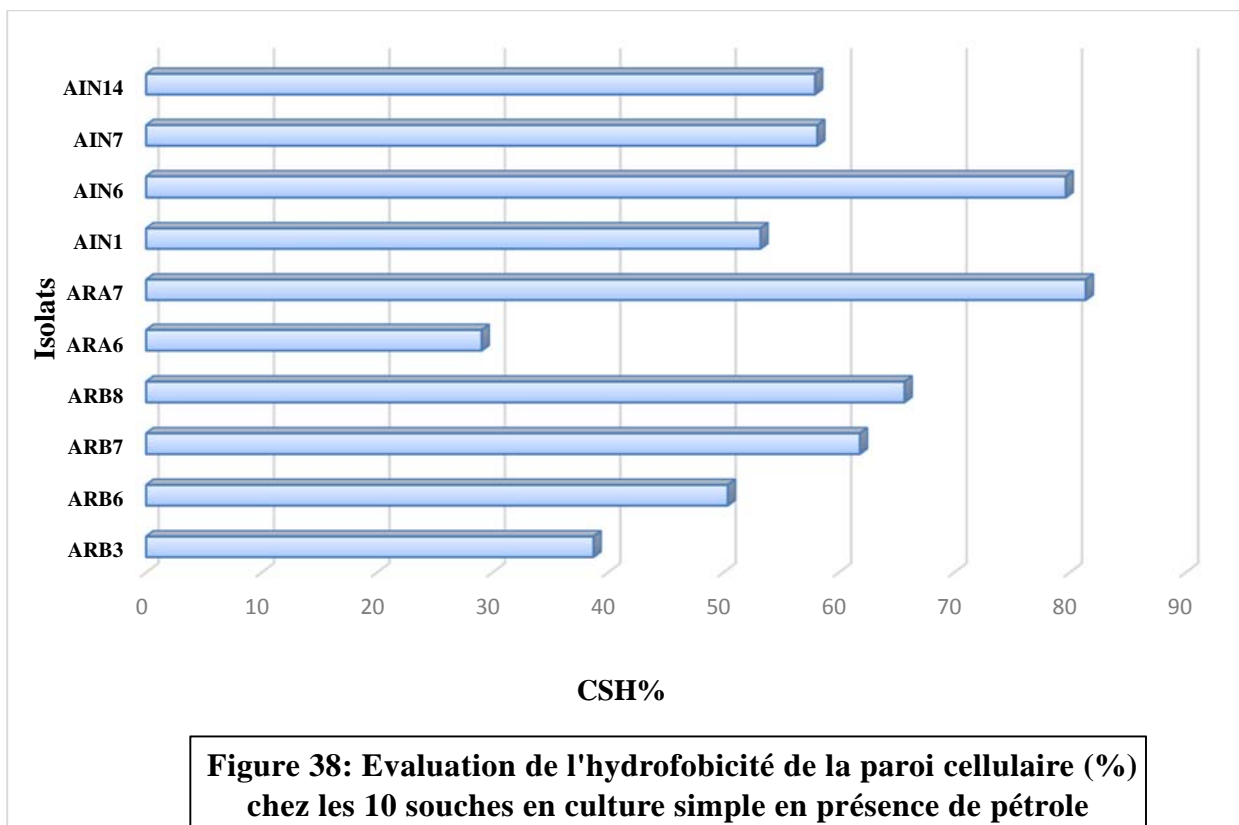
Le pourcentage d'hydrophobie permet d'évaluer indirectement la dégradation d'un produit contaminants organiques hydrophobe donné tels que le pétrole.

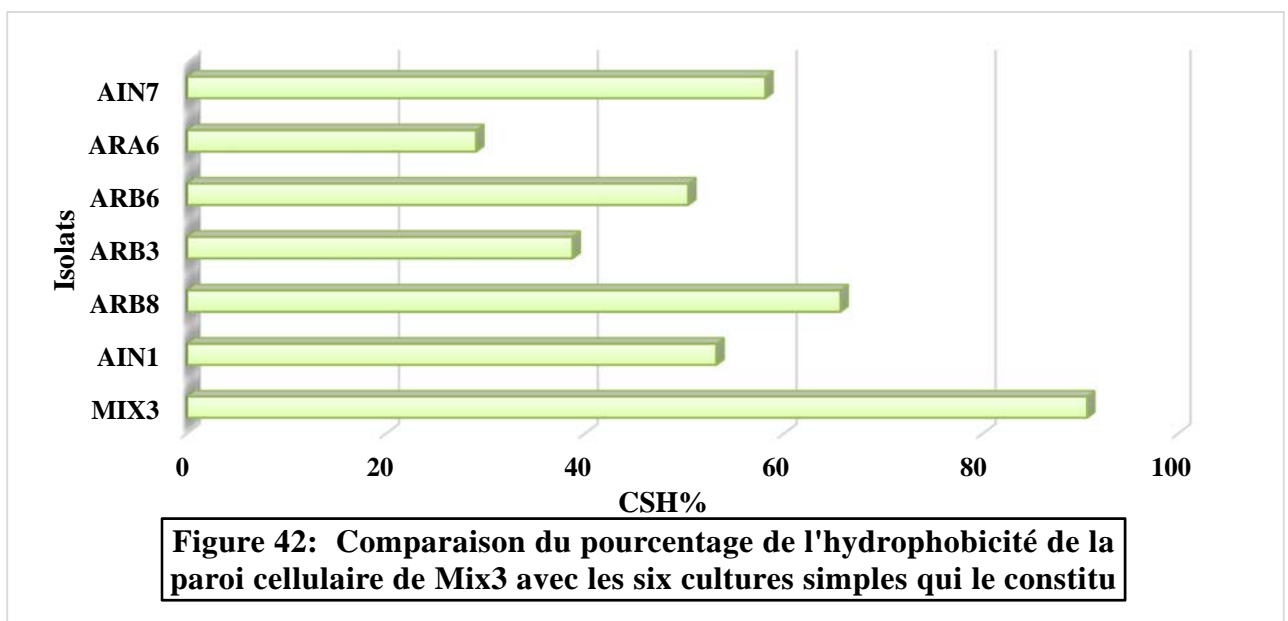
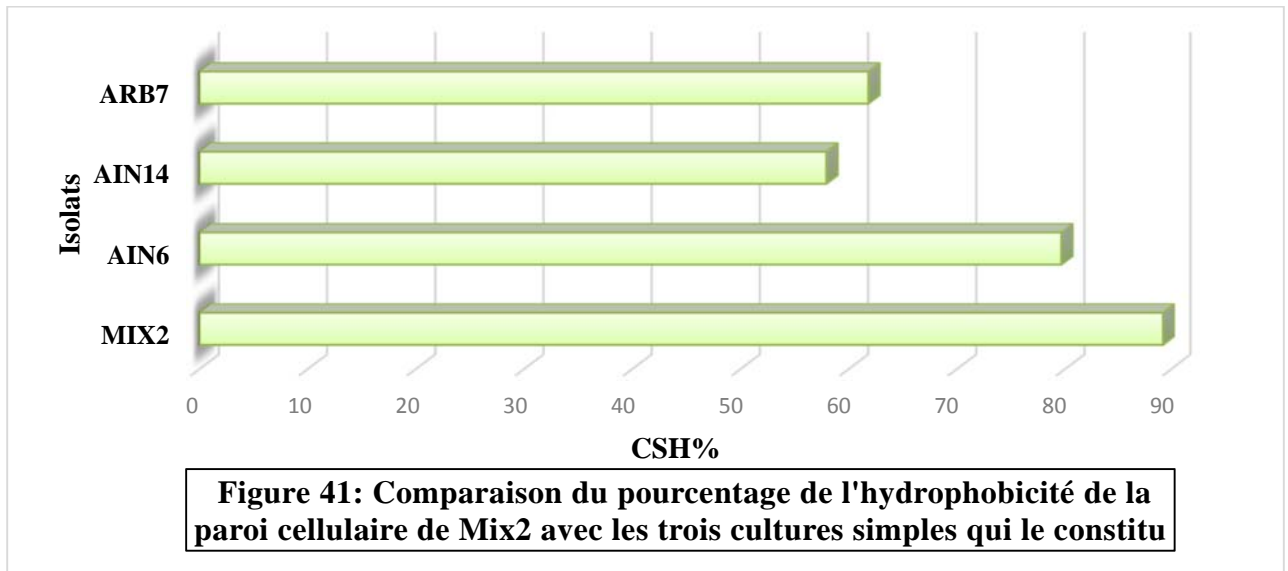
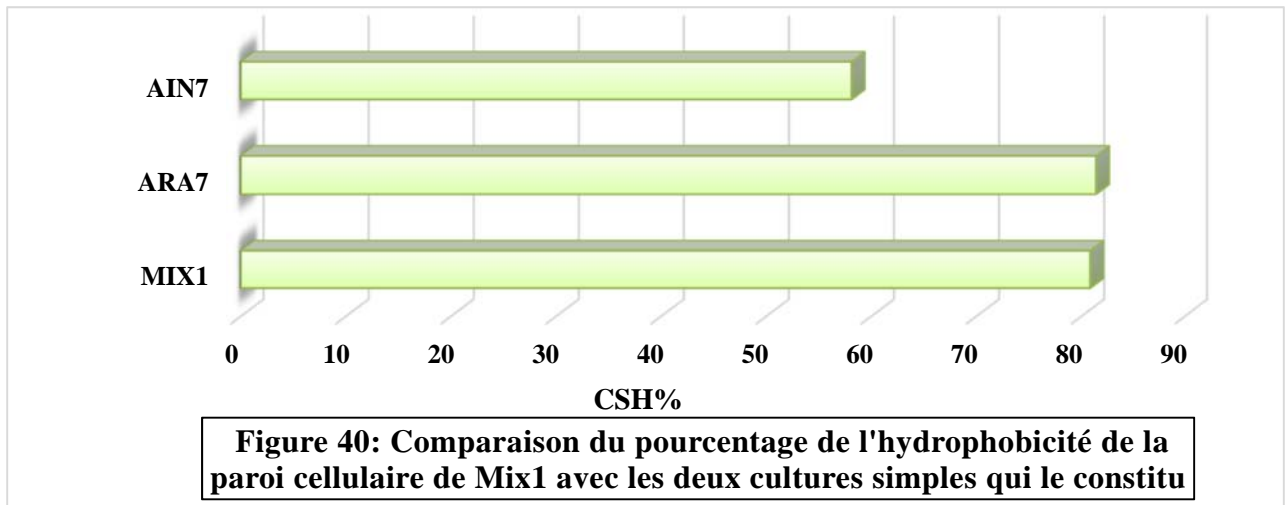
Dans notre étude nous voulions prouver les performances que représente un consortium lorsqu'il est face à un polluant organique (pétrole).

Le calcul de l'hydrophobicité cellulaire de ce consortium nous renseignera sur la capacité des cultures mixtes à adhérer au pétrole brut et ceci ne peut se faire sauf si en compare les résultats des CSH% des cultures mixtes avec les CSH% des cultures simples des isolats. Ces résultats sont exposés par des histogrammes dans les figures 40,41 et 42.

On remarque que la CSH de culture mixte *Mix1* (80,83%) est presque la même que celle de la souche ARA7 (81,39%).

La CSH de *Mix2* (89,2%) et *Mix3* (90,5%) sont supérieurs à toutes les souches qui les composent.





Discussion

Discussion

La biodégradation utilisant des micro-organismes a été considéré comme une technologie efficace pour traiter les milieux contaminés par des hydrocarbures, car ils sont capables de biodégrader les polluants et de les transformer en des composants plus simples dans la nature (Siddiqui et Bano, 2018).

Un sol qui contient des hydrocarbures modifie l'activité des microorganismes. Ceux-ci doivent donc adapter leur activité enzymatique afin de pouvoir s'y attaquer. Les bactéries vont ensuite subir une période de forte croissance au cours de laquelle elles seront capables de dégrader les hydrocarbures. Cette biodégradation peut prendre plusieurs mois. Parfois, seule une partie des polluants est dégradés car les hydrocarbures se lient partiellement à la matière organique du sol et deviennent alors moins accessibles aux microorganismes. Le niveau de dégradation des pétroles (mélange de composés facilement dégradables et de composés récalcitrants) dépend de la diversité métabolique des bactéries hydrocarbonoclastes présentes dans l'environnement pollué. L'efficacité des micro-organismes dépend d'un certain nombre de facteurs tels que le niveau de toxicité dans les sols contaminés, les facteurs de croissance, Conditions environnementales...etc (Borah *et al.*, 2019).

I. Analyses physico-chimiques

I.1. Valeurs du pH, CE et humidité

La nature variée de nos échantillons et des sites choisis pour l'isolement font que nos souches soient un atout dans le domaine de la biodégradation. La texture des 4 échantillons est assez variable : dans le sol arides (E2) on a noté la valeur la plus élevée de la conductivité électrique (14,8) ceci est due à sa nature sablonneuse. Les trois autres échantillons (E1, E3 E4) ont à eux, un taux élevé d'humidité qui fait d'eux un biotope idéal pour les microorganismes.

La mesure du pH des échantillons E1, E2, E3 et E4 est de 6,73 ; 6,08 ; 6,54 et 6,8 respectivement. Toutes les valeurs sont proches de la neutralité. En outre, le pH recommandé pour une biodégradation optimale des hydrocarbures est entre 6.5 et 8 donc ces sols sont peu susceptibles de poser un problème (au niveau acidité) et donc devraient favoriser les populations bactériennes car la réaction de carboxylation peut se produire dans un milieu neutre (Imron *et al.*, 2020). Le pH est le facteur le plus important dans les réactions enzymatiques par des bactéries, car certaines enzymes produites par des bactéries ne peuvent fonctionner qu'à des valeurs de pH spécifiques (Kurniawan *et al.*, 2018 ; Hasan *et al.*, 2016;

Ibrahim, 2016). La plupart des bactéries hétérotrophes préfèrent se développer dans un milieu neutre à un pH alcalin (Al-Hawash *et al.*, 2018).

I.2. Dosage des éléments chimiques par spectrométrie d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP-OES)

De nombreux facteurs environnementaux tels que la température, les nutriments, les accepteurs d'électrons et les substrats jouent un rôle essentiel dans la bioremédiation et influencent les réactions de biodégradation (Varjani et Upasani, 2017). C'est pourquoi la plupart des chercheurs ont découvert que de nombreuses bactéries dégradant les hydrocarbures pétroliers peuvent obtenir d'excellents résultats lors de la dégradation des hydrocarbures pétroliers dans des conditions de laboratoire, mais présentent des résultats insatisfaisants lors d'essais sur le terrain.

L'existence de métaux dans les combustibles fossiles, et notamment dans les pétroles, fut établie dans les années 1930. Cependant, l'analyse des métaux dans les produits pétroliers pose de nombreux problèmes tant en terme de nature du produit qui peut être très diverse, que de la concentration des métaux, qui hormis le Fe, Ni et V sont souvent en concentration faible et donc difficilement mesurables (Lienemann, 2005).

De même, les formes chimiques sous lesquelles les métaux dans les pétroles sont présents ainsi que leur distribution entre formes organiques et inorganiques sont souvent peu connues. Ceci est dû en particulier aux difficultés à analyser ces composés et ces éléments dans les pétroles.

D'un point de vue pétrochimique, l'analyse d'éléments traces métalliques dans les produits pétroliers peut servir à quantifier la présence dans le pétrole d'éléments poisons pour les différents procédés de raffinage et de la conversion du pétrole. Ces éléments peuvent avoir été intégrés dans le pétrole naturellement (Hg, As, Ni, V, etc.), par pollution (ex. : Pb), ou dériver de la mise en œuvre de certains additifs (ex. : Si).

Ces effluents se doivent d'avoir des teneurs inférieures au $\mu\text{g/l}$. À ce jour, la plupart de ces pollutions est mise en évidence par une désactivation des catalyseurs de réaction, qui une fois déchargés et analysés montrent des teneurs cette fois-ci non négligeables en métaux provenant de l'accumulation dû au passage de plusieurs tonnes de produits pétroliers ayant libérés les métaux sur les sites actifs du catalyseur (Lienemann, 2005).

Le site contaminé par le pétrole brut est souvent pollué par des niveaux de métaux tels que K, Ca, Ti, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br, Rb, Sr, Zr, Ba et Pb (Obiajunwa *et al.*, 2002). Bien que certains de ces métaux tels que Fe, Cu, Zn, Mn, Ca et K sont essentiels pour la survie

cellulaire, d'autres tels que Cu, Cr, Ba, Sr et Ni sont toxiques et constituent une menace sérieuse pour le processus de bioremédiation. Nos 4 échantillons sont contaminés par des quantités faiblement détectables de métaux comme Li, Cr, Ni, Sr et Mn. La valeur de Ba est faible dans tous les échantillons sauf pour l'échantillon E4 qui atteint 22.3 µg/kg. Nos souches ont montré une bonne tolérance à ces sels minéraux.

Concernant les métaux ayant donné des concentrations égales à zéro, leurs absences dans les solutions peuvent être expliquées de différentes manières : la concentration des métaux dans les solutions est plus faible que le seuil de détection de l'appareil de mesure (ICP-OES) ou bien la méthode qui a été choisie pour la mise en solution des métaux après phosphatation n'est pas adéquate pour mettre en évidence leur évolution avec celle du phosphore. Les métaux se solubilisent et réagissent rapidement, ce qui rend difficile le suivi de leur évolution. Ou enfin, le pH du mélange réactionnel n'est pas suffisamment faible pour mettre ces métaux en solution (Kribi, 2005).

L'ICP-OES est considérée comme l'une des techniques instrumentales les plus appropriées pour la détermination de Pd, Pt, Hg et bien d'autres éléments dans différents échantillons solides en raison de sa capacité multiélément, de sa large plage dynamique linéaire et de sa bonne précision (Senila *et al.*, 2020).

II. Criblage des bactéries qui dégradent le pétrole

Le criblage des bactéries hydrocarbonoclastes est basé sur le fait que le milieu doit contenir une seule source de Carbone pour que la bactérie puisse l'utiliser comme source d'énergie. Dans notre étude, la source de Carbone est le pétrole brut ajouté au milieu minéral.

II.1. Test colorimétrique par le p-iodonitrotétrazolium chlorure

Cette méthode colorimétrique basée sur la réduction de l'INT, fournit une analyse précise de l'activité déshydrogénase dans les conditions aérobies.

D'après les travaux de Marchand en 2017, la réduction de l'INT reflète la capacité des bactéries à utiliser les HAP comme source de carbone pour leur croissance. Il est considéré comme un indicateur pour évaluer la tolérance des souches microbiennes au pétrole brut. La biodégradation se manifestant par une couleur rouge pourpre (Marchand *et al.*, 2017). Ce virage de couleur est dû à la réaction de l'INT basée sur le transfert d'électron sur le NADH. Un produit comme la thréonine déshydrogénase (TDH) catalyse cette réaction à la coloration du tétrazolium (p-iodonitrotétrazolium violet). La TDH des bactéries catalyse l'oxydation de

la thréonine à NAD-dépendant en 2-amino-3-ketobutyrate et NADH.

Durant cette phase active de croissance des bactéries, un électron est transféré sur le NADH au p-iodonitrotétrazolium violet, donnant un colorant formazan rouge-pourpre. Cette méthode s'avère, simple et pratique pour le dépistage des bactéries qui ont le potentiel de dégrader les hydrocarbures par un simple indicateur de couleur.

D'après les travaux de Guermouche (2014) l'activité totale de la déshydrogénase est liée à l'intensité du virage de couleur dans l'échantillon, par conséquent cette activité augmente avec l'augmentation des cellules viables et elle est liée directement avec le nombre de cellules métaboliquement actives dans la culture bactérienne (Guermouche, 2014).

II.2. La biodégradation du pétrole brut par méthode de spray

On suppose généralement que les sols contaminés peuvent avoir des concentrations élevées d'hydrocarbures qui représentent les nutriments essentiels à la survie des bactéries. Pendant la biodégradation, il devrait y avoir une prolifération massive de ces bactéries. Cette hypothèse pourrait être fautive. Avant qu'une bactérie hétérotrophe puisse commencer à se développer et à se multiplier, elle doit dépenser de l'énergie pour maintenir sa viabilité qui dite : « maintenance d'énergie ». Cette énergie est dérivée de l'oxydation de composés organiques présents dans le milieu (pétrole brut).

Quand l'approvisionnement de ces composés organiques est grand, là, l'énergie totale disponible sera en excès d'énergie d'entretien, et donc la croissance et la multiplication va avoir lieu.

Syakti *et al.* (2019) ont pu trouver des bactéries émulsifiantes pour la biorestauration des hydrocarbures pétroliers. L'apparition des zones claires autour des inocula peut s'expliquer par la production de métabolites secondaires tels que les biosurfactants qui élargissent la zone de dégradation (Syakti *et al.*, 2019).

Syakti *et al.* (2019) sont arrivés à sélectionner des bactéries qui dégradent le pétrole par méthode de spray avec un diamètre allant de 0,99 Cm à 2,05 Cm.

Dans notre présente étude, le diamètre des zones claires des dix isolats dépasse légèrement celui des auteurs cités précédemment et il varie de 0,5 Cm à 3,2 Cm.

Roy *et al.* (2018) ont mentionné que plus la zone de déplacement du pétrole brut est grande plus l'activité du surfactant est élevée. La couche du biosurfactants réduit la viscosité du pétrole piégé dans le milieu et fonctionne comme une émulsion (Deepika *et al.*, 2016).

Cette émulsion élargit le contact entre les bactéries et le pétrole brut dans la phase aqueuse pour une plus grande dispersion des hydrocarbures (Thavasi *et al.*, 2011).

Une croissance bactérienne sur la couche du pétrole brut peut aussi être un résultat positif témoignant la tolérance des souches aux hydrocarbures comme unique source de carbone.

II.3. Cinétique de croissance

La survie des souches inoculées est l'une des questions les plus difficiles car de nombreux microorganismes endogènes diminuent généralement après l'inoculation dans le milieu (Bidja Abena *et al.*, 2020).

Les croissances de tous les isolats testés sont la preuve solide de leur capacité de dégradation des hydrocarbures. Les tubes contenant la suspension bactérienne et le pétrole ont montré un anneau de pétrole réduit et fin par rapport au control.

Au premier jour, la fine couche de pétrole brut flottait sur le milieu liquide et suite à une agitation continue et à l'incubation, la couche s'est transformée en gouttelettes d'huile collées à la paroi du tube et à un anneau clair sur la surface du milieu MSM liquide.

La mesure de la DOa montré que les cellules étaient capables de croître dans les 3 premiers jours de l'étude ($p < 0,05$), ce qui indique qu'elles étaient capables de s'adapter à 2% de pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie de façon très rapide vu l'absence de phase de latence. La baisse progressive de la concentration du bouillon suggère une diminution de la population bactérienne et une dégradation de l'hydrocarbure.

La croissance microbienne nécessite non seulement une source de carbone mais aussi d'autres nutriments, tels que l'azote, le phosphore et les oligo-éléments. Il est également affecté par d'autres conditions physiques et chimiques dans l'environnement telles que le pH, la pression, la salinité et la température (Li *et al.*, 2020).

Des résultats similaires ont été trouvés dans des études antérieures sur la biodégradation du pétrole et du diesel par Morales-Guzmán *et al.* (2017).

John *et al.* (2012) ont témoigné que la dégradation et l'utilisation du pétrole brut par les bactéries entraîne une augmentation de la densité optique des organismes vivants.

Prince *et al.* (2003) a déclaré que le temps de génération différait entre les différentes générations de bactéries de quelques minutes, d'heures ou de jours, en fonction du taux de

croissance et des conditions environnementales telles que la température, le pH et la disponibilité des nutriments, qui influencent la croissance des bactéries.

III. Identification phénotypique

Plusieurs tests physiologiques et biochimiques ont été utilisés pour caractériser les isolats (ARB3, ARB6, ARB7, ARB8, ARA6, ARA7, AIN1, AIN6, AIN7 et AIN14) issus des sols pollués. Les 10 isolats ont été sélectionnés selon leurs potentiels biodégradant du pétrole brut.

Les résultats microscopiques nous révèlent que les 10 isolats sont de forme bacillaire, Gram négatif et pas de formation de spores. Selon Denis et Ploy (2011), les bacilles à Gram négatif sont les plus rencontrés dans notre environnement. Dans ce groupe figurent des familles bactériennes très variées sur le plan du type respiratoire, du caractère d'oxydase et pour leur exigence de culture. Les familles bactériennes les plus rencontrées sont : *Enterobacteriaceae* (Octavia et Lan, 2014), *Aeromonadaceae* (Huys, 2014), *Vibrionaceae* (Gomez-Gilet *et al.*, 2014), *Xanthomonadaceae* (Gutierrez, 2019), *Pseudomonadaceae* (Garrity *et al.*, 2005).

La caractérisation enzymatique et biochimique nous a permis d'affilier les isolats aux genres suivants :

-1- L'isolat AIN7 a été apparenté au genre *Pseudomonas*. L'isolat est catalase -, Oxydase+, aérobic strict et non fermentaire. Selon Martin (2011), les espèces du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, aérobies stricts, oxydase positive, non fermentaires, mobiles par une ciliature polaire monotriche ou multitriche, sauf quelques exceptions, respirant ou non les nitrates, oxydant ou non le glucose. Le genre *Pseudomonas* comprend des espèces fluorescentes (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. monteilii*, *P. mosselii*, *P. chlororaphis*, *etc.*) produisant de la pyoverdine et des espèces non fluorescentes (*P. alcaligenes*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*).

L'isolat AIN7 a donné des colonies pigmentées en vert sur gélose au cétrimide et présentent une fluorescence sous rayonnement ultraviolet. La gélose au cétrimide est un milieu sélectif et différentiel pour l'isolement et l'identification de *Pseudomonas aeruginosa*. Ce milieu stimule la production des pigments par *Pseudomonas* tels que la pyocyanine et la pyoverdine, qui présentent une couleur bleu-vert et jaune-vert caractéristique (Palleroni, 2005b). *Pseudomonas aeruginosa* produit une pigmentation bleu-vert (pyocyanine). La synthèse de pyocyanine et pyoverdine par *P. aeruginosa* peut être stimulée par croissance dans le milieu King A et King B (King *et al.*, 1954). Trois espèces du groupe fluorescent (*P.*

fluorescens, *P. putida* et *P. monteilii*) peuvent synthétiser de la pyoverdine. La révélation d'une couleur bleu-vert sur King A et un jaune verdâtre fluorescent sur King B de l'isolat AIN7. Et sa capacité de pousser à température 45°C et de réduire le nitrate nous a permis de supposer qu'il s'agit de *Pseudomonas aeruginosa* (Martin, 2011).

-2- Les isolats ARA6, AIN1, AIN6 et AIN14 ont été rattachés à la famille des *Enterobacteriaceae* et présentent les caractéristiques suivantes: forme bacillaire, à Gram négatif, catalase positive, oxydase négative, aéro-anaérobie, fermentent le glucose, pousse sur milieu ordinaire (gélose GN).

Les entérobactéries sont une famille de bâtonnets Gram-négatifs, anaérobies facultatifs, non sporulés. Les caractéristiques générales de cette famille incluent la mobilité, catalase positive, oxydase négative, l'utilisation de la voie Embden-Meyerhof pour le métabolisme du sucre et la production d'acide à partir de la fermentation du glucose (Octavia et Lan, 2014). Cette famille se distingue des autres familles de bactéries Gram-négatives de la disposition flagellaire, de la production d'oxydase, des besoins en sodium, ainsi que de la présence d'antigène (Francino *et al.*, 2006).

L'isolat AIN14 est mobile, capable d'utiliser le citrate de sodium comme unique source de carbone, fermente le glucose sans produire de gaz, réduit le nitrate, possède une β -galactosidase, LDC positive, ODC positive et positive au test Voges-Proskauer. Compte tenu de ces résultats, l'espèce serait probablement *Serratia marcescens* (Brenner et Farmer, 2005). La révélation d'une couleur rouge des colonies de l'isolat AIN14 sur gélose nutritif confirme l'appartenance de l'isolat à l'espèce *Serratia marcescens*. Cette coloration rouge est due à la synthèse d'une pigmentation de tripyrrole rouge orangé appelé prodigiosine typique de l'espèce *Serratia marcescens* (Grimont et Grimont, 2005).

D'après les résultats des tests physiologiques et biochimiques des isolats ARA6, AIN1 et AIN6 et par comparaison avec ceux établis par Octavia et Lan (2014), Bidet et Bingen (2011) et Brenner et Farmer (2005). L'isolat AIN6 a été rattaché aux genres *Raoultella* et *Klebsiella* vu qu'il est immobile et test VP positive. Les isolats ARA6 et AIN1 ont été apparentés au groupe KES. Dans le groupe *Klebsiella – Enterobacter – Serratia*, dit K.E.S., sont rassemblées des *Enterobacteriaceae* qui ont en commun plusieurs caractères. Le caractère VP+ est la clé du regroupement ce type de genre. Ce groupe est composé de plusieurs genres (*Klebsiella*, *Raoultella*, *Enterobacter*, *Cronobacter*, *Serratia*...)(Bidet et Bingen, 2011).

-3- Les isolats ARB3, ARB6 et ARB7 sont des bacilles Gram négatif, mobile, aéro-anaérobie, catalase positive, oxydase positive, fermente le glucose. Ces caractéristiques nous conduit dans un premier temps de regrouper les trois isolats sous deux familles (*Aeromonadaceae* et *Vibrionaceae*) et un genre (*Plesiomonas*). Les genres appartenant à ces familles bactériennes possèdent des caractéristiques communes : mobilité par ciliature polaire, aéro-anaérobies facultatifs fermentant les glucides, catalase négative et oxydase positive (Barraud *et al.*, 2011). La comparaison des résultats des tests biochimiques des isolats ARB3, ARB6 et ARB7 avec ceux établis par Barraud *et al.* (2011) nous a permis de rattacher les trois isolats à la famille *Aeromonadaceae* et spécifiquement au genre *Aeromonas*.

-4- Les isolats ARB8 et ARA7 sont des bacilles Gram négatif, mobile, aérobie, catalase positive, oxydase négative et ne fermente pas le glucose. Un tableau établi par Martin (2011) sur les principaux caractères d'orientation des bacilles à Gram négatif non fermentaires (hors *Pseudomonas*). Ce tableau regroupe plusieurs genres (*Burkholderia*, *Ralstonia*, *Pandoraea*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Sphingomonas*...). Parmi ces genres, *Stenotrophomonas maltophilia* est la plus proche des isolats ARB8 et ARA7. *Stenotrophomonas maltophilia* sont des bâtonnets à Gram négatif, oxydase négative, catalase positive, mobile en raison de flagelles polaires. Aérobie strictes, ayant un métabolisme de type strictement respiratoire avec de l'oxygène comme accepteur d'électrons. Le nitrate est réduit mais il n'est pas utilisé comme source d'azote pour la croissance. Les colonies sont jaunes, verdâtres ou grises. La couleur jaune n'est pas due aux caroténoïdes ou aux xanthomonadines (Palleroni, 2005a). *Stenotrophomonas maltophilia* a été initialement classée comme *Pseudomonas maltophilia* et également regroupée dans le genre *Xanthomonas* avant de devenir finalement l'espèce type du genre *Stenotrophomonas* en 1993 sous la famille *Xanthomonadaceae* (Palleroni et Bradbury, 1993).

IV. Identification moléculaire

Les souches de *Aeromonas hydrophila* excellent dans la biodégradation des hydrocarbures polyaromatiques tels que ceux à 5 cycles benzéniques ainsi que le pétrole brut et la dégradation du diesel par l'enzyme dégradante l'alcane hydroxylase (Chikere *et al.*, 2011).

Les espèces *Stenotrophomonas maltophilia* qui sont dotées d'un gène plasmidique pour les dioxygénases peuvent dégrader le pyrène (Chikere *et al.*, 2011).

L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* est prédominante dans la plupart des sites pollués. Cette bactérie a été testée dans le domaine de la résistance aux métaux lourds, aux solvants organiques et la biodégradation des hydrocarbures (Edward Raja, 2018). *Pseudomonas aeruginosa* est une souche typique dans la production de ramnolipide et la digestion du pétrole brut comme seule source de carbone par leur activité alcane hydroxylases ainsi que les gènes plasmidiques de la dioxygénase (Chikere *et al.*, 2011).

La proximité de l'espèce *Stenotrophomonas maltophilia* avec le genre *Pseudomonas* sur l'arbre phylogénétique s'explique par un reclassement de nombreuses espèces du genre *Pseudomonas* telles que *P. betchi*, *P. geniculat* et *P. hibiscicolat* qui ont été incluses dans le cluster du genre *Stenotrophomonas maltophilia* (Anzai *et al.*, 2000).

La souche AIN1 classée dans la base de données comme *Enterobacter xiangfengensis* possède une activité enzymatique qui peut facilement dégrader les alcanes (Chikere *et al.*, 2011).

L'isolat AIN14 identifié comme *Serratia marcescens* et connu dans le domaine de la santé. Elle a aussi fait ses preuves dans la dégradation du pétrole brut par la dégradation des alcanes hydroxylés (Chikere *et al.*, 2011). Plusieurs auteurs l'ont étudié également pour la dégradation des pesticides dans le sol, comme elle peut réduire le molybdène et absorber les matières radioactives, l'uranium et le radium (Zakeri *et al.*, 2010).

L'isolat identifié comme *Raouletella* sp. est à l'origine d'une reclassification par Drancourt (2000) de trois espèces de *Klebsiella*: *K. planticola*, *K. ornithinolytica* et *K. terrigena* comme respectivement *R. planticola*, *R. ornithinolytica* et *R. terrigena* (Drancourt *et al.*, 2000).

Pour plusieurs auteurs, la comparaison des séquences du gène de l'ARNr 16S utilisé seul n'est pas un outil assez puissant dans la discrimination des espèces d'un genre lorsque le pourcentage d'homologie est trop élevé (> 97%) (Leroy, 2015).

Pour l'isolat ARB6, le BLAST a donné le même pourcentage de similitude avec les différentes souches de référence: *Aeromonas veronii* biovar. *veronni* (98.53%), *A. jandaei* (98.53%), *A. media* (98.53%) et *A. hydrophila* (98.53%). Dans un tel cas, la souche est assimilée au genre, qui est *Aeromonas* (Drancourt *et al.*, 2000).

L'isolat ARA6 avait une similitude de 92% avec le genre *Enterobacter* sp. Selon Drancourt *et al.* (2000) et Agogué *et al.* (2005), lorsque le pourcentage d'homologie des souches est supérieur à 97% ceci indique la même espèce et lorsque le pourcentage d'homologie est de 93% à 97% ceci indique le même genre mais une espèce différente.

Tandis qu'un pourcentage d'homologie inférieur à 93%, qui est le cas de notre isolat ARA6 (92%), plus vraisemblablement indiquera une nouvelle espèce bactérienne pas encore répertoriée dans la base de données.

Pour les isolats assimilés au genre ARB6: *Aeromonas* sp., ARA6: *Enterobacter* sp. et AIN6: *Raoultella* sp., la comparaison des séquences du gène de l'ARNr 16S ne peut suffire pour les attribuer à l'espèce. C'est pourquoi d'autres outils d'identification doivent être utilisés.

V. Biodégradation du pétrole brut par des cultures mixtes

La biodégradation des hydrocarbures pétroliers est complexe et généralement nécessite différentes espèces microbiennes ou consortiums avec des capacités enzymatiques qui accélèrent le taux de dégradation du pétrole.

Néanmoins, l'efficacité de la bioremédiation par action microbienne est généralement limitée par la faible disponibilité et solubilité des hydrocarbures pétroliers en raison de leur hydrophobie et de leur adsorption dans les particules du sol et de leur altération.

Certaines bactéries du sol sont capables de produire des biosurfactants qui favorisent l'émulsification des hydrocarbures. Donc, l'adhésion des cellules microbiennes à des substrats hydrophobes leur permet d'utiliser le pétrole à la fois comme co-substrat et source de carbone pour satisfaire leur métabolisme (Hassanshahian *et al.*, 2014).

De nombreuses études ont déjà rapporté l'efficacité de consortium de deux ou plusieurs souches dans la dégradation du pétrole brut. Cependant, il convient de noter que lorsque l'on compare la capacité d'un consortium à un autre, une conclusion ne doit pas être tirée uniquement sur la biodégradabilité des souches utilisées, car la performance globale d'un consortium dépend de nombreux facteurs, dont la température, la densité et la concentration du pétrole brut utilisé, le temps d'incubation, qui diffèrent d'une étude à l'autre (Bidja Abena *et al.*, 2020).

La croissance cellulaire des consortiums *Mix1* et *Mix2* n'ont pas montré une différence très significative entre elles pendant les 15 jours d'incubation ($p=0.0001$). Tandis que la

croissance cellulaire du *Mix1* et *Mix2* était significativement différentes avec la concentration cellulaire de *Mix3*.

Le mélange des souches ensemble a augmenté la croissance cellulaire très rapidement et au bout de quelques jours d'incubation nous avons pu observer des valeurs de DO croissantes pendant les 20 jours d'incubation indiquant qu'il y avait une interaction synergique entre les souches.

Les études de Ameen *et al.* (2016) ont montré que l'interaction synergique entre les membres d'un consortium se traduirait par un taux de dégradation supérieur à celui observé avec des souches individuelles.

Li *et al.* (2016) ont rapporté un consortium de *Bacillus* TCOB-4 et *Castellaniella* TCOB-5, qui pourraient dégrader de pétrole brut (2 %, p/v) après 7 jours d'incubation. Xia *et al.* (2017) ont signalé un consortium de cinq souches qui ont dégradé le pétrole brut (1%, v/v) après 15 jours d'incubation. De même, Chen *et al.* (2017) ont testé la capacité d'une culture mixte de cinq souches à dégrader différentes concentrations de pétrole brut et a signalé que la dégradation la plus élevée du pétrole brut (75,10 %) a été observée à la plus faible concentration de pétrole brut (1%, p/v).

De même, Yang *et al.* (2019) ont comparé la capacité de deux consortiums constitués de deux et quatre souches bactériennes. Leurs résultats ont montré que le consortium avec quatre souches était plus affectif et dégradé 73,00 % du pétrole brut, alors que la culture mixte de deux souches n'a dégradé que 53,00 % du pétrole brut (Yang *et al.* 2019).

Dans notre étude, la cinétique de croissance du consortium de trois bactéries (*Mix2*) était légèrement plus importante que celle du consortium qui contient deux bactéries (*Mix1*).

On remarque au consortium *Mix3* une augmentation quotidienne de la croissance jusqu'au 7^{ème} et 8^{ème} jour où on a noté une légère baisse de la DO puis elle est restée stationnaire pendant 24 heures pour poursuivre juste après une croissance modérée au 13^{ème} jour d'incubation.

La survie des souches inoculées est l'une des problèmes les plus difficiles comme le nombre de micro-organismes diminuent généralement peu de temps après l'inoculation. Cependant, la culture mixte reste la plus efficace dans le domaine de biodégradation. Plusieurs études doivent se faire pour comprendre le métabolisme et les voies de dégradation

de ces bactéries pour que les cultures mixtes soient de bons candidats pour la biorestauration in situ de sols contaminés par le pétrole brut.

Les bactéries du consortium sont parfois nécessaires pour fournir un mécanisme en chaîne. Un consortium de bactéries peut entraîner une dégradation de la symbiose (Imron *et al.*, 2020).

D'après Almansoory *et al.* (2017), plusieurs espèces comme *Vibrio sp.*, *Acinetobacter sp.* et *Serratia marcescens* libèrent un biosurfactant pour augmenter la solubilité du diesel et de l'essence, respectivement, tandis que *Bacillus sp.* et *Pseudomonas sp.* ont la capacité d'attaquer les cycles benzéniques des hydrocarbures aromatiques.

V.1. Hydrophobicité de la paroi cellulaire CSH%

Étant donné que la capacité d'adhérer aux hydrocarbures est un trait de bactéries dégradant les hydrocarbures (Muriel-Millán *et al.*, 2019), nous avons mesuré la capacité des cultures mixtes à adhérer au pétrole brut.

Les résultats indiquent que la croissance en présence de pétrole brut comme seule source de carbone augmente l'hydrophobicité cellulaire des cultures bactériennes, ce qui a été associée à une forte capacité à dégrader les hydrocarbures (Obuekwe *et al.*, 2009).

Les bactéries à haute surface d'hydrophobicité cellulaire (CSH) sont capables d'interagir directement avec les composés hydrophobes tels que les hydrocarbures, tandis que les bactéries à faible CSH peuvent interagir avec les composés hydrophiles ou adhérer aux hydrocarbures encapsulés dans les micelles (Saborimanesh et Mulligan, 2015).

Ces auteurs ont observé que les résultats du test d'hydrophobicité peuvent montrer que la bactérie cultivée dans le diesel, le biodiesel et le pétrole brut léger évalués, modifié leurs structures de surface cellulaire en fonction de la disponibilité et les compositions des hydrocarbures.

Ils ont conclu que la surface d'hydrophobie cellulaire a été significativement influencée par les types des hydrocarbures et la présence de biosurfactant sophorolipide (Saborimanesh et Mulligan, 2015).

Les résultats de cette étude sont en accord avec les études sur l'effet des hydrocarbures sur la propriété de surface des cellules bactériennes et nous avons pu observer que le

pourcentage le plus élevé d'hydrophobicité cellulaire était chez le consortium composé de 6 souches.

En comparant l'hydrophobicité cellulaire des consortiums avec celle des souches cultivées individuellement, on remarque que celle des consortiums est plus considérable et plus élevée.

L'adhérence Cellulaire avec des composés hydrophobes comme le pétrole brut est examinée sérieusement parce que les cellules s'attachent aux gouttelettes d'huile en produisant des composés tensioactifs appelés biosurfactants.

Le principal investissement dans le domaine de la biodégradation se présente dans les processus des cultures bactériennes impliquées dans les applications. Cette méthode implique un coût de maintenance très faible, offrant ainsi un moyen moins coûteux de traiter les polluants organiques. L'ajout d'éléments nutritifs est parfois nécessaire pour augmenter les performances de dégradation pour un rendement de dégradation meilleur. L'ajout des nutriments et certains composés chimiques pour augmenter l'efficacité d'élimination des polluants peut être réduit en sélectionnant des bactéries performantes avec un puissant potentiel de dégradation.

La sélection des bactéries les plus efficaces en tant que meilleur agent de dégradation est crucial pour réduire le coût supplémentaire nécessaire à l'exploitation et à la maintenance. L'utilisation de la méthode de biodégradation est une solution rentable pour les applications de bioremédiation à grande échelle (Imron *et al.*, 2020).

Pour la contamination du sol, la biodégradation par les bactéries offre également une chance d'améliorer la qualité du sol contaminé. Une fois les processus de dégradation terminés, les bactéries résiduelles seront décomposées par des mécanismes naturels. La décomposition de la biomasse résiduelle libère plusieurs composés des cellules bactériennes comme le C, N, P, S, K et d'autres minéraux (Panikov, 2016), qui sont des éléments essentiels qui peuvent augmenter la fertilité du sol.

Ces composés libérés peuvent être utilisés comme substitut du conditionneur de sol et de l'engrais (Pavlova, 2017).

Les résultats globaux montrent que la biodégradation du pétrole brut atteint son maximum au cours des 10 premiers jours d'inoculation. Après cette période, le processus de biodégradation ralentit avec le temps.

Cette recherche préliminaire a donné des résultats encourageants pour des études plus complémentaires, comme l'identification de gènes spécifiques de dégradation des hydrocarbures présents dans ces bactéries, et leurs applications dans différents sites pollués en Algérie.

Une enquête plus approfondie visant à quantifier la biodégradation du pétrole brut par des bactéries et des consortiums sera mise au défi pour améliorer l'efficacité du processus de bioremédiation dans les sols pollués.

Conclusion générale

&

Perspectives

Conclusions

Grace à ce travail de thèse nous avons pu élaborer un soucier de bactéries hydrocarbonoclastes isolés toutes d'un environnement naturel pollué par le pétrole brut.

Les sols visés étaient pollués par les hydrocarbures ainsi que de métaux tels que K, Ca, Ti, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br, Rb, Sr, Zr, Ba et Pb. Certains de ces métaux sont nécessaires à la cellule et d'autres sont aussi toxiques que les hydrocarbures.

Ce travail concerne plus spécifiquement l'évaluation du potentiel de biodégradation de ces bactéries face un milieu minéral vide de toute source de carbone et de nutriments. Pour ceci, trois approches ont été utilisées pour la sélection les bactéries les plus performantes dans la biodégradation du pétrole.

Le criblage a commencé par la recherche de l'activité déshydrogénase : test de dépistage colorimétrique par le p-iodonitrotétrazolium chlorure (INT). Ensuite, les isolats ont été testés sur un milieu MSM solide additionné de pétrole et sur la base de cette méthode de spray nous avons pu sélectionner dix isolats qu'on a testé dans un milieu MSM liquide additionné de pétrole pour suivre leur croissance cellulaire.

Tous ces résultats montrent que le phénomène de la biodégradation du pétrole par ces bactéries hydrocarbonoclastes a atteint son maximum durant les dix premiers jours de l'incubation pour s'atténuer naturellement juste après et ceci sans même l'ajout de nutriments à part la source de pétrole qui est le pétrole brut.

En observant les résultats expérimentaux on conclut que les microorganismes dégradant les hydrocarbures existent dans la nature et peuvent avoir ce potentiel génétiquement mais lorsqu'ils sont en contact de polluants hydrocarbonés ils montrent leurs caractères de dégradation.

Une approche génotypique par ARNr 16S a été utilisée pour identifier les dix isolats issus de sites pollués par les hydrocarbures dans des régions d'exploitation pétrolière en Algérie.

Nous avons pu noter la présence, dans le sol, de différentes espèces telles que *Aeromonas hydrophila*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter xiangfengensis*, *Serratia marcescens* ainsi que le genre *Raouletella* sp témoignant de la diversité microbienne de ces sites pollués.

Perspectives

La particularité de cette étude réside dans le fait que les microorganismes dégradateurs ont été isolés sur des sites pollués et près de gésier de pétrole. Ce qui rendra le traitement indispensable une fois les études terminées.

Toutefois, l'utilisation de ces microorganismes pour la biodépollution peut s'avérer risquée pour l'environnement et l'homme si nous n'avons pas une connaissance totale de ces microorganismes et de leur pouvoir pathogène.

Plusieurs études complémentaires doivent être envisagées pour l'identification bactérienne des souches qui sont assimilées au genre. Une comparaison des séquences de l'ARNr 16S seule n'est pas suffisante pour les attribuer à l'espèce c'est pour quoi d'autres méthodes d'identifications seront nécessaires. Une autre perspective prometteuse peut impliquer la détection d'espèces nouvelle et celle de nouvelles enzymes et composés bioactifs. Le MALDI-TOF est une méthode efficace et rapide pour identifier les communautés bactériennes isolées du sol et pour une comparaison plus approfondie des espèces entre elles.

Il serait particulièrement intéressant d'élargir les banques métagénomiques afin de compléter l'identification des OTUs à des niveaux taxonomiques plus fins (espèces et/ou sous espèces). La recherche de gènes spécifiques à la dégradation des hydrocarbures chez ces bactéries sera aussi envisageable pour plus de sélection des espèces comme le gène *alk B*, *nahAc*, *nid A*...etc. Construire des bactéries génétiquement modifiées en utilisant la technologie de la biologie synthétique pour leur donner plus de capacité de dégradation des hydrocarbures pétroliers.

La quantification de la capacité de biodégradation de ces bactéries pourra être mesuré par des méthodes quantitatives comme l'HPLC ou la GC et évaluer leur potentiel face au pétrole. Envisager l'étude de la biodégradation du pétrole par des *consortia* serai judicieux vu que leur capacité de dégradation est plus importante qu'un microorganisme seul.

Enfin, une application de ces souches par les méthodes de dégradation étudiées sur les bassins d'épuration et les bassins de traitement des eaux et des boues est indispensable pour améliorer l'efficacité et le rendement de la dégradation biologique dans le domaine des industries pétrolières.

Références

Références bibliographiques :

- AFNOR 1994 Qualité des sols. Recueil des Normes Française. AFNOR, 1994, 250 p. Agence de l'Eau Artois Picardie 2000 (a) Agence de l'Eau Artois Picardie. Enlèvement des sédiments – guide méthodologique. Evaluation détaillée des risques liés à la gestion des sédiments et aux opérations de curage [en ligne]. Picardie : Agence de l'Eau Artois Picardie, 2000, 146 p.
- Agogué H., Casamayor E.O., Bourrain M., Obernosterer .I, Joux F., Herndl G.J. & Lebaron P. (2005). A survey on bacteria inhabiting the sea surface microlayer of coastal ecosystems. *FEMS Microbiology Ecology* 54: 269–280
- Alauzet C. (2009). Taxonomie des bactéries anaérobies : De la reclassification à la découverte de nouveaux pathogènes. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2009. Français. NNT : 2009NAN10123.
- Al-Dhabaan F.A. (2019). Morphological, biochemical and molecular identification of petroleum hydrocarbons biodegradation bacteria isolated from oil polluted soil in Dhahran, Saud Arabia. *Saudi J. Biol. Sci.* 26: 1247–1252.
- Al-Hawash A.B., Dragh M.A., Li S., Alhujaily A., Abbood H.A., Zhang X. & Ma F. (2018). Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. *Egypt. J. Aquat. Res.* 44: 71-76.
- Almansoori A.F., Hasan H.A., Idris M., Abdullah S.R.S., Anua, N. & Tibin E.M.M., (2017). Biosurfactant production by the hydrocarbon-degrading bacteria (HDB) *Serratia marcescens*: optimization using central composite design (CCD). *J. Ind. Eng. Chem.* 47: 272-280.
- Ameen F., Moslem M. & Hadi S. (2016). Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia Saudi. *J Biol Sci* 23:211–218.
- Anzai. Y, Kim H., Park J.Y., Wakabayashi H. & Oyaizu H. (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1563–1589

- Araújo H.W.C., Andrade R.F.S., Montero-Rodríguez D., Rubio-Ribeaux, D., da Silva C.A.A. & Campos-Takaki G.M. (2019). Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. *Microb. Cell Fact.* 18: 2.
- Arulazhagan P., Al-Shekri K., Huda Q., Godon J. J., Basahi J. M. & Jeyakumar D. (2017). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by an acidophilic *Stenotrophomonas maltophilia* strain AJH1 isolated from a mineral mining site in Saudi Arabia. *Extremophiles*, 21:163–174.
- Atteia, O. (2015). Chimie et pollutions des eaux souterraines, Lavoisier. Tec&Doc
- Azubuiké C.C., Chikere C.B. & Okpokwasili G.C. (2016). Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal Microbiol Biotechnology* 32: 180.
- Banat I.M., Satpute S.K., Cameotra S.S., Patil R. & Nyayanit N.V. (2014). Cost-effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Front. Microbiol.* 5: 697.
- Barraud O., Denis F. & Ploy M.-C. (2011). Chapitre 34.3 *Vibrionaceae – Aeromonadaceae – Plesiomonas*. In : Bactériologie médicale. © Elsevier Masson SAS.
- Bianchi, M., Martyet, D. & Bertrand J.C. (1989). Micro-organismes dans les écosystèmes océaniques. Masson, Paris.
- Bidaud C. (1998). Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Approche microbiologique et application au traitement d'un sol pollué, Génie des procédés. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne.
- Bidet P. & Bingen E. (2011). Chapitre 34.2 *Enterobacteriaceae* (à l'exception du genre *Yersinia*). In : Bactériologie médicale. © Elsevier Masson SAS.
- Bidja Abena MT., Chen G., Chen Z, Zheng X., Li S., Li T. & Zhong W. (2020). Microbial diversity changes and enrichment of potential petroleum hydrocarbon degraders in crude oil, diesel, and gasoline contaminated soil. *Biotechnology* 3 : 10-42.

- Bonneau M. & Souchier B. (1994). Constituants et propriétés du sol. Deuxième édition, MASSON, Paris Milan Barcelone.
- Borah D., Agarwal K., Khataniar A., Konwar D., Borgohain Gogoi S. & Kallel M.. (2019). A newly isolated strain of *Serratia* sp. from an oil spillage site of Assam shows excellent bioremediation potential. *Biotechnology* 9:283.
- Bordenave S., Goni-Urriza M. S., Caumette P. & Duran R. (2007). Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(19): 6089-6097.
- Bossy D. (2013). <https://www.futura-sciences.com/planete/actualites/oceanographie-hecatombe-dauphins-tortues-depuis-explosion-deepwater-horizon-45674/>. Consulté en 2021.
- Brenner D. J. & Farmer J.J. (2005). Family I. Enterobacteriaceae. In.: Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, Volume Two the Proteobacteria Part B the Gammaproteobacteria. Eds.: (Brenner D. J., Krieg N. R. et Staley J.T.), © Springer.
- Brenner D. J., Krieg N. R. & Staley J. T. (2004). Volume 2 "The Proteobacteria." (2004), Part B, the Gammaproteobacteria, Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. In.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Ed.: Garrity G.M. © Springer.
- Chen W, Li J, Sun X et al (2017) High efficiency degradation of alkanes and crude oil by a salt-tolerant bacterium *Dietzia* species CN-3. *Int Biodeter Biodegr* 118:110-118
- Chikere C.B. , Okpokwasili G.C. & Chikere B.O. (2011). Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. *Biotech*, 1:117–138.
- Clark W. M. & Lubs H. A. (1915). The differentiation of the colon-aerogenes family by the use of indicators. *Jour. Inf. Dis.*, 17:160-173.
- Clarke P. H. & Cowan S.T. (1952). Biochemical methods for bacteriology. *J. Gen. Microbiol.*: 6(1-2):187-97.

- Dagbert C., Meylheuc T. & Bellon-Fontaine M.N. (2006). Corrosion behavior of AISI 304 stainless steel in presence of biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Electrochem. Acta* 51: 5221-5227.
- Deepika KV., Kalam S., Ramu Sridhar P., Podile AR. & Bramhachari PV. (2016). Optimization of rhamnolipid biosurfactant production by mangrove sediment bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KVD-HR42 using response surface methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 5: 38-47.
- Delarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire. Paris: Editions TEC & DOC, 476 p.
- Deng M.C., Li J., Hong Y.H., Xu X.M., Chen W.X., Yuan J.P., Peng J., Yi M. & Wang J. H., (2016). Characterization of a novel biosurfactant produced by marine hydrocarbon-degrading bacterium *Achromobacter* sp. HZ01. *J. Appl. Microbiol.* 120 : 889–899.
- Denis F. et Ploy M.C. (2011). Bacilles à Gram négatif aérobies et aéro-anaérobies, Chapitre 34.1 Généralités. In : Bactériologie médicale. © Elsevier Masson SAS.
- Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E., Quentin R. (2007). Bactériologie médicale. Paris : Masson, 594 p.
- Drancourt M., Bollet C., Carliz A., Martelin R., Gayral J.P. & Raoult D. (2000). 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 : 3623–3630.
- Dzionic A, Wojcieszynska D. & Guzik U. (2016). Natural carriers in bioremediation: A review, *Electronic Journal of Biotechnology*, 23: 28-36.
- Edward Raja C. (2018). Cadmium (heavy metals) bioremediation by *Pseudomonas aeruginosa*: A mini review. *Applied Water Science* 8:154.
- El Fantroussi S. & Agathos SN. (2005). Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Current Opinion in Microbiology*, 8: 268-275.
- EPA (Environmental Protection Agency). (2001). A Citizen's Guide to Monitored Natural Attenuation. U.S. Environmental Protection Agency Office of Solid Waste and Emergency Response Directive 542-F-01-004. . <https://www.epa.gov>

- EPA (Environmental Protection Agency) (1999). Use of monitored natural attenuation at superfund, rcra corrective action, and underground storage tank sites. U.S. Environmental Protection Agency Office of Solid Waste and Emergency Response Directive 9200.4-17P. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-02/documents/d9200.4-17.pdf>
- Faugier A. (2010). Diversité bactérienne des sols : accès aux populations à effectifs minoritaires "the rare biosphere" Ecole Centrale de Lyon,
- Fingas M. (2013). The basic of oil spill cleanup. Troisième édition, Boca Raton. CRC Press, 266p
- Francino M.P., Santos S.R. & Ochman H. (2006). Phylogenetic relationships of bacteria with special reference to endosymbionts and enteric species. In.: The prokaryotes: proteobacteria: gamma subclass, vol 6., Eds. (Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H. & Stackebrandt E.), © Springer, New York.
- Frasconi D., Zanaroli G. & Danko AS. (2015). In situ aerobic cometabolism of chlorinated solvents: a review. *J. Hazard Mater* 283: 382-399.
- Garrity G. M., Bell J. A. & Lilburn T. (2005). Order IX. Pseudomonadales Orla-Jensen 1921, 270AL. In.: Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, Volume Two the Proteobacteria Part B the Gammaproteobacteria. Eds.: (Brenner D. J., Krieg N. R. et Staley J.T.), © Springer.
- Gautam G., Mishra V., Verma P., Pandey A.K. & Negi S. (2014). A cost effective strategy for production of biosurfactant from locally isolated *Penicillium chrosogenum* SNP5 and its application. *J. Bioprocess. Biotech.* 4: 177.
- Gomez-Gil B., Thompson C. C., Matsumura Y., Sawabe T., Iida T., Christen R., Thompson F. & Sawabe T. (2014). The Family Vibrionaceae. In.: The Prokaryotes – Gammaproteobacteria, Eds. (Rosenberg E. et al.), © Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Grimont F. & Grimont P.A.D (2005). Genus XXXIV. *Serratia* Bizio 1823, 288AL. In.: Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, Volume Two the Proteobacteria Part

- B the Gammaproteobacteria. Eds.: (Brenner D. J., Krieg N. R. et Staley J.T.), © Springer.
- Guermouche M. A. (2014). Caractérisation moléculaire des bactéries impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures. Thèse de doctorat, faculté SNV, université Oran1 Ahmed Ben Bella.
- Guntupalli S., Thunuguntla V.B.S.C., Reddy K.S., Newton M.I., Rao C.V. & Bondili J.S. (2016). Enhanced degradation of carcinogenic PAHs benzo (a) pyrene and benzo (k) fluoranthene by a microbial consortia. *Iran. J. Sci. Technol.* 9.
- Gutierrez T. (2019). Aerobic Hydrocarbon-Degrading Gammaproteobacteria: Xanthomonadales. In.: Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes, Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, Ed. (McGenity T.J.). © Springer International Publishing AG.
- Hamamura N., Olson SH., Ward DM. & Inskeep WP. (2006). Microbial population dynamics associated with crude oil biodegradation in diverse soils. *Appl Environ Microbiol* 72:6316-6324.
- Hasan H.A., Abdullah S.R.S., Kofli N.T. & Yeoh S.J. (2016). Interaction of environmental factors on simultaneous biosorption of lead and manganese ions by locally isolated *Bacillus cereus*. *J. Ind. Eng. Chem.* 37: 295-305.
- Hassaine A. (2016). Biodégradation des Hydrocarbures (Pétrole brut et Kérosène) par la Microflore Microbienne des Eaux de la région de Skikda.
- Hassanshahian M, Zeynalipour MS & Musa FH. (2014). Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr provenance). *Marine Pollution Bulletin* 82:39–44
- Hazen, T. C., Prince R. C. & Mahmoudi N. (2016). Marine Oil Biodegradation. *Environnemental Science and Technological* 50 : 2121-2129.
- Hudlow W. R., Krieger R., Meusel M., Sehhat J. C., Timken M. D. & Buoncristian M. R. (2011). The NucleoSpinc® DNA Clean-up XS kit for the concentration and

- purification of genomic DNA extracts: An alternative to microdialysis filtration. *Forensic Science International: Genetics*, 5: 226–230.
- Huys G., (2014). The Family Aeromonadaceae. In.: The Prokaryotes – Gammaproteobacteria, Eds. (Rosenberg E. *et al.*), © Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Ibrahim H.M.M. (2016). Biodegradation of used engine oil by novel strains of *Ochrobactrum anthropi* HM-1 and *Citrobacter freundii* HM-2 isolated from oil-contaminated soil. 3 *Biotech*, 6: 226.
- Imron Muhammad Fauzul, Setyo Budi Kurniawan, Nur ‘Izzati Ismail & Siti Rozaimah Sheikh Abdullah (2020). Future challenges in diesel biodegradation by bacteria isolates: A Review, *Journal of Cleaner Production*, 251:119716.
- ITOPF (International Tanker Owners Pollution Federation) (2021). Oil Tanker Spill Statistics 2020 <http://www.itopf.com/knowledgeresources/data-statistics/statistics/>
- Jeannot R., Lemièrre B. & Chiron S. (2000). Guide méthodologique pour l'analyse des sols pollués. Rap. BRGM R 50128, 110 p., 44 fig, 3 ann.
- Jobson A., Cook F.D. & D. W. S. Westlake (1972). Microbial utilization of crude oil. *Applied and environmental microbiology*, 23(6): 1082-1098.
- Joffin J.N. & Leyral G. (1997). Microbiologie technique 1 Dictionnaire des techniques. Centre régional de documentation pédagogique d'aquitaine, bordeaux cedex.
- John R.C., Essien J.P., Akpan S.B. & Okpokwasili G.C. (2012). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-degrading Bacteria from Aviation Fuel Spill Site at Ibeno, Nigeria. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88:1014–1019.
- Joutey T. N., Bahafid W., Sayel H. & El Ghachtouli N. (2013). Biodegradation: Involved Microorganisms and Genetically Engineered Microorganisms. In.: Agricultural and Biological Sciences: Biodegradation, Life of Science. Eds.: Chamy R. & Rosenkranz F.
- Karlapudi A.P., Venkateswarulu T.C., Tammineedi J., Kanumuri L., Ravuru B.K., Dirisala V.R. & Kodali V.P. (2018). Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution. *A review. Petroleum*. 03.007.

- King E.D., Ward M.K. & Raney D.E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44: 301–7.
- Kings S. & Metzger W.I. (1968). A new plating medium for the isolation of enteric pathogens. II. Comparison of hektoen enteric agar with SS and EMB agar. *Applied Microbiology*, 16: 577-578.
- Kiran G.S., Hema T.A., Gandhimathi R., Selvin J., Thomas T.A., Ravji T.R. & Natarajaseenivasan K. (2009). Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. *Colloids Surf.B: Biointerfaces* 73 : 250–256.
- Kribi S. (2015). Décomposition des matières organiques et stabilisation des métaux lourds dans les sédiments de dragage, Thèse de doctorat, Science de l'Environnement Industriel et Urbain, Lyon, France.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. & Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35:1547-1549.
- Kurniawan S.B., Purwanti I.F. & Titah H.S. (2018). The effect of pH and aluminium to bacteria isolated from aluminium recycling industry. *J. Ecol. Eng.* 19: 154-161.
- Leahy JG. & Colwell RR. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol Rev*, 54:305-315.
- Leroy J. (2015). Evaluation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF et du séquençage multi-génique pour l'identification des *Raoultella* en bactériologie médicale. Université de Picardie Jules Verne UFR de médecine.
- Li CH., Wong YS. & Tam NF. (2010). Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with amendment of iron (III) in mangrove sediment slurry. *Bioresource Technology* 101 : 8083-8092.
- Li H., Lai R., Jin Y., Fang X., Cui K., Sun S., Gong Y., Li H., Zhang Z., Zhang G. & Zhang G. (2020). Directional culture of petroleum hydrocarbon degrading bacteria for enhancing crude oil recovery. *Journal of Hazardous Materials* 390:122-160

- Li X., Zhao L. & Adam M. (2016). Biodegradation of marine crude oil pollution using a salt-tolerant bacterial consortium isolated from Bohai Bay, China. *Mar Pollut Bull* 105:43-50.
- Lienemann C.P. (2005). Analyse de métaux traces dans les produits pétroliers, état de l'art. *Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP*, 60 (6) : 951-965.
- Malo M., Lefebvre R., Comeau F A. & Séjourné S. (2015). Synthèse des connaissances portant sur les pratiques actuelles et en développement dans l'industrie pétrolière et gazière. Institut national de la recherche scientifique, Centre Eau Terre Environnement, 490 de la Couronne, Québec. Rapport de recherche 1553.
- Marchand C., St-Arnaud M., Hogland W., Bell T H. & Hijri M. (2017). Petroleum biodegradation capacity of bacteria and fungi isolated from petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* 116 :48-57
- Martin C. (2011). Chapitre 34.4 Bacilles à Gram négatif non fermentaires. In : *Bactériologie médicale*. © Elsevier Masson SAS.
- Mascarelli A. (2010). Deepwater Horizon: After the oil. *Nature*, 467 :22-24
- Matsuyama, T., Tonikawa, T. & Nakagawa, Y. (2011). Serrawettins and othersurfactants produced by *Serratia*. In: *Biosurfactants*. Microbiol. Monogr. Ed.: Soberón-Chávez G. Vol. 20, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Mireles J.R., Toguchi A. & Harshey, R.M. (2001). *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* swarming mutants withaltered biofilm forming abilities: Surfactin inhibits biofilm formation. *J. Bacteriol.*, 183: 5848.
- Möller V. (1955). Simplified tests from some amino acid decarboxylase and for the arginine dihydrolase système. *Acta. Pathol. Microbiolol. Scand.*, 36: 158-172.
- Morales-Guzmán G., Ferrera-Cerrato R., Torres-Bustillos LG., Arteaga-Garibay RI., Mendoza-López MR., Esquivel-Cote R. & Alarcón A. (2017). Diesel degradation by emulsifying bacteria isolated from soils pol-luted with weathered petroleum hydrocarbons. *Applied Soil Ecology* 121: 127-134

- Mujumdar S., Joshi P. & Karve N. (2019). Production, characterization, and applications of bioemulsifiers (BE) and biosurfactants (BS) produced by *Acinetobacter* spp.: A review. *J. Basic Microbiol.* 59: 277–287.
- Muriel-Millán LF., Rodríguez-Mejía JL., Godoy-Lozano EE., Rivera-Gómez N., Gutierrez-Rios R-M., Morales-Guzmán D., Trejo-Hernández MR., Estradas-Romero A. & Pardo-López L (2019) Functional and Genomic Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* Strain Isolated From the Southwestern Gulf of Mexico Reveals an Enhanced Adaptation for Long-Chain Alkane Degradation. *Front. Mar. Sci.* 6:572.
- Navel A. (2011). Distribution, spéciation, impact et transfert du cuivre dans un sol sous vigne : rôle de la structuration spatiale et du statut organique. Thèse de doctorat, Sciences de la Terre. Université de Grenoble
- NF EN 12457-2 AFNOR. Caractérisation des déchets - Lixiviation - Essai de conformité pour lixiviation des déchets fragmentés et des boues - Partie 2 : essai en bâchée unique avec un rapport liquide-solide de 10 l/kg et une granularité inférieure à 4 mm (sans ou avec réduction de la granularité). NF EN 12457-2. Paris : AFNOR, 2002, 29p
- Obayori SO. & Salam LB. (2010). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: role of plasmids. *Sci Res Ess* 5:4093-4106.
- Obiajunwa E I., Pelemo D A., Owolabi SA., FasasiM.K & Johnson-Fatokun F.O. (2002). Characterisation of heavy metal pollutants of soils and sediments around a crude-oil. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. 194 : 61-64.
- Obuekwe C. O., Al-Jadi Z. K., & Al-Saleh E. S. (2009). Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwait desert environment. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 63 : 273–279.
- Octavia S. & Lan R. (2014). The Family Enterobacteriaceae. In.: The Prokaryotes – Gammaproteobacteria, Eds. (Rosenberg E. et al.), © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014.

- Oliveira V., Gomes N.C., Almeida A., Silva A.M., Silva H. & Cunha A. (2015). Microbe-assisted phytoremediation of hydrocarbons in estuarine environments. *Microb Ecol* 69:1-12
- Palleroni N. J. (2005a). Genus IX. *Stenotrophomonas* Palleroni and Bradbury 1993, 608VP*. In.: Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, Volume Two the Proteobacteria Part B the Gammaproteobacteria. Eds.: (Brenner D. J., Krieg N. R. et Staley J.T.), © Springer.
- Palleroni N. J. (2005b). Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894, 237AL (Nom. Cons., Opin. 5 of the Jud. Comm. 1952, 121). In.:Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, Volume Two the Proteobacteria Part B the Gammaproteobacteria. Eds.: (Brenner D. J., Krieg N. R. et Staley J.T.), © Springer.
- Palleroni N.J. &Bradbury J.F. (1993). *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al., 1983. *Int J Syst Bacteriol* 43: 606–609.
- Panikov N.S. (2016). Kinetics of microbial processes. *In: Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. Elsevier.
- Pavlova M. (2017). Effects of residual biomass use in agriculture. *Trakia J. Sci.* 15: 330-337.
- Petti C. A., Polage C. R. & Schreckenberger P. (2005). The Role of 16S rRNA Gene Sequencing in Identification of Microorganisms Misidentified by Conventional Methods. *J Clin Microbiol.*, 43(12): 6123–6125.
- Pfennig N. & Truper H. G. (1992). The family Chromatiaceae. In.: *The Prokaryotes*, 2nd edition ,Eds. Balows A., Truper H. G., Dworkin M., Harder W. & Schleifer K. H. New York: Springer.
- Philp JC. & Atlas RM. (2005). Bioremediation of contaminated soils and aquifers. *In.: Bioremediation: applied microbial solutions for real-world environmental cleanup* Eds.: Atlas RM. & Philp JC. American Society for Microbiology Press, Washington, pp 139–236.

- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. (2003). Microbiologie, 2e édition française de boeck, traduction de 5ème édition américaine.
- Prince R.C., Lessard R.R. & Clark R. (2003). Bioremediation of marine oil spills. *Oil Gas Sci. Technol.* 58 (4): 463–468.
- Rappe M. & Giovannoni S J. (2003).The Uncultured Microbial Majority. *Annual Review of Microbiology* 57(1): 369-94
- Rapport annuel SONATRACH. (2019). <https://sonatrach.com/rapports>
- Raval M.S., Gund S.S., Shah N.R. & Desai R.P. (2017). Isolation and characterization of biosurfactant producing bacteria and their application as an antibacterial agent. *Int. J. Pharma Bio Sci.*, 8, 302–310.
- Rosenberg M., Gutnick D. & Rosenberg E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 9 : 29–33
- Roy A., Dutta A., Pal S., Gupta A., Sarkar J., Chatterjee A., Saha A., Sarkar P., Sar P. & Kazy S.K. (2018). Biostimulation and bioaugmentation of native microbial community accelerated bioremediation of oil refinery sludge. *Biores. Technol.* 253 : 22–32.
- Roy M., Giri AK., Dutta S. & Mukherjee P. (2015). Integrated phytobial remediation for sustainable management of arsenic in soil and water. *Environ Int.* 75:180-198.
- Saborimanesh, N. & Mulligan, C.N. (2015). Effect of sophorolipid biosurfactant on oil biodegradation by the natural oil-degrading bacteria on the weathered biodiesel, diesel and light crude oil. *J. Bioremed. Biodegr* 6:6e11.
- Saitou N. & Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Sauret C. (2011). Ecologie des communautés bactériennes marines soumises a une pollution pétrolière: influence des facteurs environnementaux, de la prédation et de la récurrence des pollutions. Ecole Doctorale Sciences de l'Environnement d'Ile de France (ED129)

- Sayed K., Baloo L. & Sharma N.K. (2021). Bioremediation of Total Petroleum Hydrocarbons (TPH) by Bioaugmentation and Biostimulation in Water with Floating Oil Spill Containment Booms as Bioreactor Basin. *International Journal of Environmental Reserch and Public Health*, 18: 2226.
- Senila M., Cadar O., Senila L., Böringer S., Seaudeau-Pirouley K., Ruiu A. & Lacroix Desmazes P. (2020). Performance Parameters of Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry and GraphiteFurnace Atomic Absorption Spectrometry Techniques for Pd and Pt Determination in Automotive Catalysts. *Materials*, 13 : 5136.
- Siddiqui S. & Bano A. (2018). *Microbial Action on Hydrocarbons*. Springer Nature Singapore Pte Ltd.
- Sikkema, J., De Bont. J.A.M. & Poolman, B. (1995). Metabolism of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbial Reviews*, 59 :201-222.
- Simmons J.S. (1926). A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi. *J. Infect. Dis.*, 39: 209.
- Singleton P. (1999). *Bactériologie 2ème cycle*. 4ème édition. Paris : Dunod, 415 p.
- Sposito G. (1989). *The Chemistry of Soils*. New York, Oxford: Oxford University Press. ISBN 0 19 504615 3.
- Stackebrandt E. & M. Goebel B. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 44: 4
- Steliga T. (2012). Role of fungi in biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Drill Waste. *Polish Journal of Environmental Studies* 21(2): 471-479.
- Stroud JL., Paton GI. & Semple KT. (2007). Microbe–aliphatic hydrocarbon interactions in soil; implications for biodegradation and bioremediation. *J Appl Microbiol*, 102:1239-1253.
- Syakti AD., Lestari P., Simanora S., Sari LK., Lestari F., Idris F., Agustiadi T., Akhlus S., Hidayati NV. & Riyanti. (2019). Culturable hydrocarbono-clastic marine bacterial

- isolates from Indonesian seawater in the Lombok Strait and Indian Ocean. *Heliyon* 5:e01594
- Taylor W.I. (1965). Isolation of *Shigellae*. I. Xylose lysine agars; new media for isolation of enteric pathogens. *American Journal of Clin. Path.*, 44(4): 471-475.
- Técher D. (2018). Réhabilitation de sols pollués par des HAP grâce aux bactéries associées à la rhizosphère de *Miscanthus Xgiganteus*. *Ecotoxicologie*. Université Paul Verlaine - Metz, 2011. Français.
- Thavasi R., Sharma S. & Jayalakshmi S. (2011). Evaluation of Screening Methods for the Isolation of Biosurfactant Producing Marine Bacteria, *J Pet Environ Biotechnol*, S1:6.
- Thierry L., Armelle B. & Karine J. (2008). Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: A review. *Environmental Pollution*, 153: 497-522.
- Tissot B.P. & Welt D. H. (1984). Petroleum formation and occurrence. Berlin, Heidelberg, New York.
- UNSD (United Nations Statistics Division) (2021). Energy Statistics Pocketbook 2021. <https://unstats.un.org/unsd/energystats/pubs/documents/2021pb-web.pdf>
- USEPA Method 3050 (1996) Acid digestion of sediments, sludges, and soils. Available from: <www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/3050b.pdf>. Revise Don December, 1996.
- Uzoigwe C., Burgess J.G., Ennis C.J. & Rahman P.K.S.M. (2015). Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Front. Microbiol.* 6: 245.
- Van Elsas J.D., Jansson J.K. & Trevors J.K. (2007). Modern soil microbiology, 2nd edn. CRC Press, New York.
- Varjani S J. & Upasani V. N. (2017). A new-look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 120 : 71–83

- Varjani S.J. & Upasani, V.N. (2017). A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 120:71–83.
- Wang J. & Chen C. (2006). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A Review. *Biotechnology Advances* 24: 427-451.
- Wang M., Deng B., Fu X., Sun H. & Xu Z. (2019). Characterizations of microbial diversity and machine oil degrading microbes in machine oil contaminated soil. *Environmental Pollution* 255:113190.
- Wauquier J.P. (1994). Le raffinage du pétrole : Pétrole brut, produits pétroliers, schémas de fabrication. Publication de l'Institut Français du Pétrole. Edition OPHRYSS, 478 P.
- Xia M., Liu Y. & Taylor AA. (2017). Crude oil depletion by bacterial strains isolated from a petroleum hydrocarbon impacted solid waste management site in California. *Int Biodeter Biodegr* 123:70-77.
- Yang R, Zhang G, Li S *et al.* (2019). Degradation of crude oil by mixed cultures of bacteria isolated from the Qinghai–Tibet plateau and comparative analysis of metabolic mechanisms. *Environ Sci Pollut Res*, 26 (2):1834–1847
- Young I. & Crawford J. (2004). Interactions and Self-Organization in the Soil-Microbe Complex. *Science* Vol. 304
- Zakeri H., Jowkar B. & Razmjoe M. (2010). Parenting styles and resilience. *Procedia Social and Behavioral Sciences* 5:1067–1070
- Zhang B., Matchinski E.J., Chen B., Ye X., Jing L. & Lee K. (2019). Marine Oil Spills. Oil Pollution, Sources and Effects. In.: *World Seas: An Environmental Evaluation*, Ed. (Sheppard C.) © Elsevier: London, UK
- Zhao F., Zhou J D., Ma F., Shi R J., Han S Q., Zhang J. & Zhang Y. (2016). Simultaneous inhibition of sulfate-reducing bacteria, removal of H₂S and production of rhamnolipid by recombinant *Pseudomonas stutzeri* Rhl: applications for microbial enhanced oil recovery. *Bioresour. Technol.* 207 : 24–30.

Annexes

Annexe 1 : Composition des milieux de culture**Milieu gélose nutritive (GN) (Bio-Rad)www.bio-rad.com**

Extrait de viande	3g
Peptone	5g
NaCl	5g
Agar	15g
Eau distillée (qsp)	1000 mL
pH final	$7,3 \pm 0,2$

Préparation du milieu :

Mettre en suspension 28g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.

- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et le maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Milieu bouillon nutritif (BN) (Bio-Rad)www.bio-rad.com

Extrait de viande	3g
Peptone	5g
NaCl	5g
Eau distillée (qsp)	1000 mL
pH final	$7,3 \pm 0,2$

Préparation du milieu :

Mettre en suspension 13g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.

- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et le maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Principe

Le milieu nutritive (en gélose ou en bouillon) est un milieu largement utilisé pour la culture des micro-organismes peu exigeants. Elle est recommandée dans de nombreuses méthodes standardisées d'analyses des aliments, des laitages, de l'eau et d'autres produits.

Le milieu Mineral Salt Medium (MSM) (Pfennig et Truper, 1992)

K ₂ HPO ₄	1,8g
NH ₄ Cl	4g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2g
NaCl	0,1g
Na ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	0,01g
Agar	20g
Eau distillée (qsp)	1000 mL
pH final 6,8 ± 0,2	

Préparation du milieu

Dissoudre tous les minéraux dans 1 litre d'eau distillé. Ajuster le pH et stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Application

C'est un milieu minéral minimum sans aucune source de carbone. Pour l'isolement, la croissance ou enrichissement d'un groupe spécifique de bactéries. Une source de carbone peut être rajouté au milieu avant l'utilisation en fonction du but de l'étude.

Le milieu Hektoen (Kings et Metzger, 1968)

Protéose peptone	12g
Extrait de levure	3g
Chlorure de sodium	5g
Thiosulfate de sodium	5g
Sels biliaries	9g
Citrate de fer ammoniacal	1,5g
Salicine	2g
Lactose	12g
Saccharose	12g
Fuchsine acide	0,1g
Bleu de bromothymol	0,065g
Agar	14g
Eau distillée (qsp)	1000 mL
pH final 7,5 ± 0,2	

Préparation du milieu :

Homogénéiser la poudre contenue dans le flacon. Mettre 75 grammes de milieu déshydraté dans un litre d'eau fraîchement distillée. Chauffer lentement, en agitant fréquemment, puis porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Laisser refroidir à 50°C avant répartition en boîtes de Petri ou en flacon.

Précaution d'utilisation : Ne pas autoclaver.

Application

La gélose Hektoen est un milieu sélectif pour l'isolement et la différenciation des bacilles Gram (-) entéropathogènes, en particulier les *Salmonell*sp. et les *Shigell*sp.

Principe

La sélectivité de ce milieu est basée sur la présence de sels biliaires, de bleu de bromothymol et de fuchsine acide (inhibition des bactéries à Gram (+), des *E. coli* et dans une moindre mesure, des *Proteus* et des *Citrobacter*).

La qualité nutritive des peptones et des sucres neutralise l'effet inhibiteur des sels biliaires vis à vis de certaines bactéries délicates et permet une bonne culture des *Shigella*.

La différenciation des entérobactéries est basée sur leur capacité à fermenter différents sucres : le lactose, le saccharose, la salicine. Deux indicateurs permettent de visualiser la réaction : le bleu de bromothymol qui vire au jaune en présence d'acide et la fuchsine qui se colore en rouge en présence d'aldéhyde. Une différenciation supplémentaire reposant sur la production d'hydrogène sulfuré est possible grâce à la présence de thiosulfate de sodium et de citrate de fer. Elle se traduit par des colonies à centre noir, coloration due à la formation de sulfure de fer.

Lecture :

La fermentation d'au moins un des sucres se traduit par une coloration "saumon" des colonies.

L'absence de fermentation se traduit par une coloration bleue ou verte des colonies.

La production d'hydrogène sulfuré (H₂S) est caractérisée par des colonies à centre noir.

- Colonies "saumon" : *Escherichia*, *Levinea*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Yersinia*.
- Colonies "saumon" à centre noir : *Proteus vulgaris*.
- Colonies bleues-vertes ou vertes : suspicion de *Shigella* ou de *Salmonella* à différencier de *Proteus morgani* ou *rettgeride Providencia*, *Hafnia*, *Levinea*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas* (le test de l'oxydase permet de différencier les *Pseudomonas*).
- Colonies bleues-vertes ou vertes à centre noir : suspicion de *Salmonella* ou de *Proteus mirabilis* (la recherche de l'uréase permet de différencier *P. mirabilis*).

Gélose Xylose Lysine Désoxycholate (XLD) (Taylor, 1965)

Extrait autolytique de levure	3g
L-Lysine	5g
Lactose	7,5g
Saccharose	7,5g
Xylose :	3,5g
Désoxycholate de sodium	2,5 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Thiosulfate de sodium	6,8 g
Citrate ferrique ammoniacal	0,8 g
Rouge de phénol	80 mg
Agar	13,5 g
Eau distillée (qsp)	1000 mL

pH final $7,4 \pm 0,2$

Préparation

Mettre en suspension 55,2 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée. Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.

Refroidir rapidement jusqu'à 44-47 °C. Ne pas surchauffer - ne pas autoclaver.

Couler en boîtes de Petri stériles rapidement et laisser solidifier sur une surface froide.

Faire sécher les boîtes à l'étuve, couvercle entrouvert.

Application

La gélose Xylose Lysine Désoxycholate (XLD) est un milieu sélectif des entérobactéries et particulièrement de *Salmonella* et de *Shigella*.

Principe

Elle permet une orientation de l'identification des entérobactéries basée sur 3 critères : fermentation des sucres, décarboxylation de la lysine et production d'H₂S.

Lecture

Les *Salmonella* (H₂S +) et certains *Proteus* donnent des colonies rouges à centre noir et entourées d'une zone de précipitation biliaire. Les *Salmonella* (H₂S -), les *Shigella* et les *Pseudomonas* sont rouges, les autres entérobactéries sont généralement jaunes.

Gélose au Cétrimide (King *et al.*, 1954)

Digestion pancréatique de gélatine	20g
Chlorure de magnésium	1,4g
Sulfate de potassium	10g
Glycérol	10mL
Cétrimide	0,3 g
Agar	13,6g
Eau distillée (qsp)	1000 mL
pH final 7,2 ± 0,2	

Préparation du milieu :

Mettre en suspension 48,6 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.

- Ajouter 10 mL de glycérol.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et le maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir et maintenir à 44-47 °C.

Application

La gélose au cétrimide (également appelé Pseudosel Agar ou Pseudomonas Cetrimide Agar) est utilisée pour l'isolement et l'identification présomptive de *Pseudomonas aeruginosa*.

Principe

Le cétrimide est un ammonium quaternaire qui inhibe la croissance de la plupart des autres espèces bactériennes. *Pseudomonas aeruginosa* colore ce milieu en bleu-vert par production de pyocyanine. Cependant, *Serratia*, *Klebsiella* et *Acinetobacter* peuvent y cultiver.

Lecture

Les colonies produisant une pigmentation bleu vert (pyocyanine) seront comptées comme *Pseudomonas aeruginosa* confirmés.

Sont considérées comme *Pseudomonas aeruginosa* présumés :

- Les colonies ne produisant pas de pyocyanine, mais présentant une fluorescence sous rayonnement ultraviolet à 360 nm.
- Les colonies montrant une pigmentation brun rougeâtre sans présenter de fluorescence.

Les colonies présumées devront être soumises à des tests de confirmation tels que production d'ammoniaque à partir d'acétamide, production d'oxydase, fluorescence sur milieu de King B.

Géloses King A et King B (King *et al.*, 1954)

Gélose King A:

Peptone	20g
K ₂ SO ₄ (anhydre)	10g
MgCl ₂ (anhydre)	1,4g
Agar purifié	12g
Eau distillée (qsp)	1000 mL
pH _{final} 7,2 ± 0,2	

Gélose King B:

Peptone	20g
K ₂ HPO ₄ (anhydre)	1,5g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O (anhydre)	1,5g
Agar purifié	12g
Eau distillée (qsp)	1000 mL
pH final 7,2 ± 0,2	

Préparation des milieux

Dissoudre 44,4 grammes du milieu King A déshydraté (ou 35g du milieu King B) dans 1 litre d'eau pure.

Chauffer sous agitation fréquente et laisser bouillir 1 minute pour dissoudre complètement la suspension.

Répartir en tubes.

Autoclaver 15 minutes à 121°C. Laisser refroidir avec une pente égale au culot.

Application

Le milieu de King A permet la détection de la synthèse de pyocyanine, pigment élaboré spécifiquement par *Pseudomonas aeruginosa* (bacille pyocyanique). Utilisé en parallèle avec le milieu de King B (détection de la pyoverdine), il permet d'orienter l'identification de *Pseudomonas aeruginosa*.

Principe

La production de pyocyanine se manifeste en colorant le milieu King A de culture en bleu. Si les deux pigments – pyocyanine et pyoverdine - sont synthétisés en même temps, le milieu se colore en vert.

La présence de sulfate de magnésium, dans la gélose King B, fournit les actions nécessaires à l'activation de la pyoverdine qui se manifeste en colorant le milieu de culture en vert-jaune

fluorescent. La présence de phosphate permet d'inhiber la production de pyocyanine, pigment spécifique de *Pseudomonas aeruginosa*.

Lecture

Gélose King A : Une synthèse de pyocyanine se traduit par une coloration bleue. Une synthèse de pyoverdine et de pyocyanine associée provoque une coloration verte. En cas de doute, il suffit de verser 0,5 ml de chloroforme et de le laisser pendant quelques minutes au contact de la gélose en position inclinée : la pyocyanine, très soluble dans le chloroforme, colore celui-ci en bleu (virage au rouge en ajoutant quelques gouttes d'un acide fort). Le milieu n'a pas besoin d'être examiné au-delà du 4^e jour de culture.

Gélose King B : Une synthèse de pyoverdine se traduit par une coloration verte fluorescente.

Milieu bouillon Nitraté (Joffin et Leyral, 1997).

Infusion cœur-cerveille.	25g
Nitrate de sodium	10g
Eau distillée (qsp)	1000 mL
pH final 7,2 ± 0,2	

Préparation du milieu

Dissoudre 35g du milieu déshydraté dans un litre d'eau distillé. Ajuster le pH et stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Application

Le bouillon au nitrate est recommandé pour aider à l'identification des micro-organismes aérobies et anaérobies facultatifs à Gram négatif au moyen du test de réduction des nitrates.

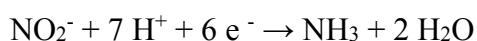
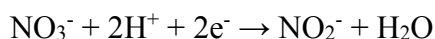
Principe

Les bactéries peuvent utiliser les nitrates de deux façons :

- ❖ Réduction des nitrates en azote : respiration nitrates en anaérobiose



- ❖ Réduction des nitrates en nitrites puis NH₃ : réduction assimilatrice



Lecture

Après incubation de 30°C/24h, quelques gouttes des réactifs Nitrates 1 et 2 (ou du réactif de Griess) sont ajouté aux cultures. Une coloration rouge signe la présence de nitrites : la

bactérie est nitrate réductase +, stade nitrites. En cas où le milieu reste incolore, ajouter du zinc (réducteur des nitrates). Attendre quelques minutes.

Une coloration rouge montre la présence de nitrites : la bactérie est Nitrate réductase - (il y avait des nitrates dans le milieu, ils ont été réduits par le zinc). Une absence de coloration montre l'absence de nitrates : la bactérie est Nitrate réductase +, stade diazote (N₂).

Milieu gélose Viande-foie(Joffin et Leyral, 1997).

Base viande foie	30g
Glucose	2g
Agar	6g
Eau distillée (qsp)	1000 mL
pH final	7,4 ± 0,2

Préparation du milieu

Dissoudre 38g du milieu déshydraté dans un litre d'eau distillé. Répartir en tubes profonds. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Application

Milieu utilisé pour la recherche du mode respiratoire des bactéries, ainsi pour l'isolement des bactéries anaérobies.

Principes

- La peptone viande-foie favorise la croissance de la plupart des microorganismes et plus spécialement celle des germes anaérobies.
- Le glucose constitue la source énergétique du développement.
- la hauteur de la culture permet de déterminer le type respiratoire.

Lecture :

La croissance bactérienne est en surface, la bactérie est aérobie stricte.

La croissance est au fond de tube, la bactérie est dite anaérobie stricte.

La croissance est toute au long du tube, la bactérie est aéro-anaérobie facultatif.

La croissance est limitée entre 0,5 et 1,5 cm du haut de la gélose, la bactérie est micro-aérophile.

Milieu Møller (Møller, 1955)

Peptone pepsique de viande	5g
Extrait de viande	5g
Pourpre de bromocrésol	0,01g

Rouge de crésol	0,005g
Glucose	0,50g
Pyridoxal-5-phosphate	0,05 g
Lysine HCl ou OrnithineHCl ou ArginineHCl	10g
Eau distillée (qsp)	1000ml
pH final 6,8± 0,2	

Préparation du milieu :

Dissoudre 20,565g du milieu déshydraté dans un litre d'eau distillé. Répartir en petits tubes fins ce qui favorise l'anaérobiose. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Application

Le diagnostic différentiel des espèces appartenant aux familles des *Enterobacteriaceae*, des *Pseudomonadaceae*... est souvent facilité par la recherche de la lysine-décarboxylase (L.D.C.), de l'ornithine-décarboxylase (O.D.C.) et de l'arginine-dihydrolase(A.D.H.).

Principes

Les bacilles à gram (-) aéro-anaérobies facultatifs à métabolisme fermentatif (*Enterobacteriaceae* et *Vibrionaceae*) fermentent le glucose ce qui entraîne une acidification du milieu et une coloration jaune du milieu en présence de pourpre de bromocrésol (indicateur de pH). A pH acide les décarboxylases et les dihydrolases présentent une activité maximale. Si les bactéries étudiées possèdent la décarboxylase ou la dihydrolase appropriée, l'activité enzymatique sera alors mise en évidence par la formation de métabolites aminés qui alcaliniseront le milieu, et entraîneront un nouveau changement de coloration du milieu en mauve. Au contraire, les bacilles à gram (-) aérobies stricts à métabolisme oxydatif (*Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*) dégradent les glucides par voie oxydative en ne produisant que peu de catabolites acides : il s'ensuit que la coloration des trois milieux demeure pratiquement inchangée, mauve pâle à violet foncé après 24 à 48 heures d'incubation.

Lecture :

Pour les bacilles à métabolisme fermentatif :

La lecture est limitée à 4 jours. Coloration jaune du milieu (virage acide) : résultat négatif. Coloration violette du milieu (virage alcalin) : résultat positif.

Pour les bacilles à métabolisme oxydatif :

Il est possible de mettre en évidence une décarboxylase ou une dihydrolase chez ces bacilles en versant goutte à goutte une solution de tampon pH 4 dans chacun des trois tubes de milieu. Agiter quelques secondes après l'addition de chaque goutte. Chaque tube reçoit le même

nombre de gouttes de tampon pH 4 jusqu'à ce que l'un des trois tubes se colore en jaune. Ajouter alors dans les tubes restés alcalins (coloration mauve) trois gouttes supplémentaires de tampon pH 4. Agiter. L'absence de virage acide correspond à la présence d'une décarboxylase ou d'une dihydrolase.

Milieu UREA INDOLE (Bio-Rad)www.bio-rad.com

L-Tryptophane	3g
KH ₂ PO ₄	1g
K ₂ HPO ₄	1g
Chlorure de sodium	5g
Urée	20g
Alcool à 95°	10 ml
Rouge de phénol	0,05ml
Eau distillée (qsp)	1000ml
pH final 6,8 ± 0,2	

Préparation du milieu :

Distribuer stérilement de 0,25 à 0,50 ml de milieu Urea Indole dans des tubes à hémolyse, chacun devant servir à l'étude de souches différentes et/ou à la réalisation de différents tests :

- Un premier tube peut, pour une souche donnée, être utilisé pour la mise en évidence de l'uréase et pour la production d'indole.
- Un second tube est, pour cette même souche, réservé à la recherche de la T.D.A.

Application

Le milieu Urea Indole permet la mise en évidence de l'uréase, de la tryptophane désaminase et de la production d'indole (le milieu contribue à la mise en évidence des caractères d'identification des Entérobactéries).

Principe

Les bactéries possédant une uréase transforment l'urée en carbonate d'ammonium entraînant une alcalinisation qui provoque une coloration rouge violacé du milieu en présence de rouge de phénol (indicateur de pH). La production d'indole est mise en évidence par l'addition de réactif de Kovacs qui agit avec l'indole en donnant une coloration rouge dans la partie supérieure du milieu en cas de réaction positive. La présence de tryptophane désaminase (TDA) est mise en évidence par addition de perchlorure de fer qui provoque une coloration brun rouge du milieu en cas de réaction positive.

Lecture :

Présence d'une uréase : le milieu vire au rouge violacé:

- en 5 à 10 minutes pour *Proteus morganii* et *Yersinia enterocolitica*
- en 2 à 4 heures pour les autres *Proteus*
- en 12 à 18 heures pour les *Klebsiella* et quelques *Citrobacter*.

En absence d'uréase, la coloration du milieu reste inchangée.

Recherche de la production d'indole : après 24 heures d'incubation, verser 4 à 5 gouttes de réactif Kovacs dans le tube de milieu Urea Indole ensemencé : la présence d'indole est révélée par l'apparition d'une coloration rouge à la surface du milieu.

Recherche de la T.D.A. : après 24 heures d'incubation, verser dans le tube du milieu Urea Indole 1 à 2 gouttes de Ferric Chloride Solution :

- coloration brun rouge: T.D.A. (+)
- coloration jaune orangée: T.D.A. (-)

Milieu gélose TSI (Triple sugar iron) (Bio-Kar) www.biokar-diagnostics.fr

Tryptone	14g
Extrait autolytique de levure	3g
Extrait de viande	3g
Glucose	1g
Lactose	10g
Saccharose	10g
Chlorure de sodium	5g
Thiosulfate de sodium	0,3g
Citrate ferrique ammoniacal	0,3g
Rouge de phénol	24mg
Agar	13,5g
Eau distillée (qsp)	1000ml
pH final	7,4± 0,2

Préparation du milieu :

Mettre en suspension 60,1 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée. Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution complète.

Répartir en tubes.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Incliner les tubes de manière à obtenir un culot de 3 cm de hauteur et une pente oblique.

Application

La gélose TSI (Triple SugarIron) est utilisée pour la confirmation et l'identification des entérobactéries. Elle permet de déterminer les caractères biochimiques suivants : fermentation du lactose, du glucose et du saccharose ; production de sulfure d'hydrogène.

Principe

Les fermentations sucrées se traduisent par une acidification qui fait virer au jaune le rouge de phénol (indicateur pH).

Pour faciliter la détection des germes qui fermentent uniquement le glucose, la concentration de ce sucre a été abaissée au 1/10ème de celle du lactose ou du saccharose, de telle façon que la faible quantité d'acide produite sur la pente pendant la fermentation s'oxyde rapidement, ce qui entraîne un retour rapide à la coloration rouge ou bien à une ré-alcalinisation plus prononcée. Par contre, la réaction acide (couleur jaune) est maintenue en profondeur dans le culot du tube.

Les germes qui fermentent le lactose ou le saccharose font virer au jaune la pente du tube.

Les microorganismes ne fermentant aucun des trois sucres ne modifient pas la couleur du milieu.

La production de sulfure d'hydrogène se manifeste dans le culot par l'apparition d'une coloration noire de sulfure de fer qui est due à la réduction du thiosulfate en présence de citrate ferrique.

La production de gaz (hydrogène, dioxyde de carbone) résultant des fermentations sucrées se traduit ou bien par l'apparition de bulles ou bien par la fragmentation de la gélose.

Lecture :

L'utilisation de l'un des sucres contenus dans le milieu se traduit par une acidification (virage au jaune du rouge de phénol). Une alcalinisation se révèle par une coloration rouge foncé. La production de sulfure d'hydrogène à partir du thiosulfate est mise en évidence par la formation d'une coloration noire.

Milieu Clark et Lubs(Clark et Lubs, 1915).

Peptone	7g
K ₂ HPO ₄	5g
Glucose	5g
Eau distillée (qsp)	1000ml
pH final 7± 0,2	

Préparation du milieu :

Dissoudre 17g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Répartir en tubes.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Principe

Le milieu de Clark & Lubs permet de différencier les *Enterobacteriaceae* avec les réactions au rouge de méthyle et de Voges-Proskauer. Le rouge de méthyle différencie le processus de fermentation, il est jaune au-dessus d'un pH de 6,3 et rouge en dessous de 4,2. La production d'acétylméthylcarbinol se révèle par l'apparition d'une coloration rouge en surface du milieu.

Lecture :

Réaction au rouge de méthyle : Après incubation, transvaser 2 ml du milieu dans un autre tube et ajouter 1 à 2 gouttes d'une solution à 0,5% de rouge de méthyl dans l'alcool à 60°. Une coloration rouge du milieu, correspondant à un pH inférieur à 4,2, est considérée comme positive. Une coloration jaune du milieu, correspondant à un pH supérieur à 6,3, est considérée comme négative.

Réaction de Voges-Proskauer : Après incubation, transvaser 1 ml du milieu dans un autre tube et ajouter 0,5 ml d'une solution d' α -naphtol à 6% dans l'alcool à 90° et 0,5 ml d'une solution aqueuse de soude à 16%. Agiter fortement et attendre 15 minutes. L'apparition d'une coloration rouge, indiquant la production d'acétylméthylcarbinol, est considérée comme positive.

Milieu citrate de Simmons (Simmons, 1926)

Citrate de sodium	1g
Chlorure de sodium	5g
Sulfate de magnésium	0,2g
Phosphate mono-ammonique	1g
Phosphate dipotassique	1g
Bleu de bromothymol	0,08g
Agar	15g
pH final $6,8 \pm 0,2$	
Eau distillée (qsp)	1000ml

Préparation du milieu :

Homogénéiser la poudre contenue dans le flacon. Mettre 21 grammes de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée stérile. Chauffer lentement en agitant fréquemment, puis porter à ébullition pendant 1 minute. Répartir en tubes ou en flacons. Stériliser à l'autoclave à 121°C

pendant 20 minutes. Refroidir les tubes en position inclinée pour obtenir une pente longue sans culot.

Application

La gélose Simmons citrate (milieu minéral minimum au citrate de sodium) est utilisé pour la différenciation des bacilles Gram négatifs. Il permet la recherche du citrate de sodium comme seule source de carbone et d'énergie pour les bactéries. Ce milieu contribue à la mise en évidence des caractères d'identification des Entérobactéries.

Principe

Les bactéries capables d'utiliser le citrate de sodium comme seule source de carbone pourront se développer sur ce milieu. La fermentation du citrate de sodium entraîne alors une acidification qui provoque une coloration bleue du milieu en présence de bleu de bromothymol (indicateur de pH).

Lecture :

Observer la culture tous les jours.

Les bactéries "citrate positive" bleussent ce milieu en donnant une culture souvent abondante.

Les bactéries "citrate négative" ne donnent ni culture, ni bleuissement du milieu, même après plusieurs jours d'étuve.

Solutions et Reactifs

Préparation de la solution INT

Prendre 3g du sel de tétrazolium dans 1000 ml d'eau distillée, bien les mélanger jusqu'à la dissolution complète du sel. Avec un micro filtre millipore (0,22 μm), filtrer la solution puis la conserver à l'abri de la lumière dans un réfrigérateur.

Réactif du test Voges Proskauer (VP)

Réactif VP1: 6g de α -naphthol dans 100 ml d'alcool éthylique à 90°

Réactif VP2 : de la soude concentrée (ou de potasse).

Réactifs du test Nitrate

Réactif Nitrate 1: 0,8% acidesulfanilique dans l'acideacétique 5N.

Réactif Nitrate 2 : 0,6% N, N-dimethyl-alpha-naphthylamine dans l'acide acétique 5N.

Annexe 2 : Etude statistique de la relation entre les isolats par SPSS

Intervalle d'erreur

1. E

Dependent Variable:

E	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			LowerBound	UpperBound
1	,761	,011	,739	,783
2	,551	,011	,528	,573
3	,572	,011	,550	,594
4	,564	,011	,541	,586
5	,655	,011	,633	,677
6	,502	,011	,479	,524
7	,400	,011	,378	,422
8	,470	,011	,447	,492
9	,761	,011	,739	,783
10	,717	,011	,695	,739

La valeur significative

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	16,248 ^a	69	,235	88,197	,000
Intercept	74,392	1	74,392	27862,942	,000
E	2,929	9	,325	121,875	,000
T	11,764	6	1,961	734,357	,000
E * T	1,555	54	,029	10,789	,000
Error	,374	140	,003		
Total	91,013	210			
Corrected Total	16,622	209			

a. R Squared = ,978 (Adjusted R Squared = ,966)

Multiple Comparisons						
Dependent Variable:						
Tukey HSD						
(I) E		MeanDifference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					LowerBound	UpperBound
1	2	,21*	,016	,000	,16	,26
	3	,19*	,016	,000	,14	,24
	4	,20*	,016	,000	,15	,25
	5	,11*	,016	,000	,05	,16
	6	,26*	,016	,000	,21	,31
	7	,36*	,016	,000	,31	,41
	8	,29*	,016	,000	,24	,34
	9	,00	,016	1,000	-,05	,05
	10	,04	,016	,166	-,01	,10
	2	1	-,21*	,016	,000	-,26
3		-,02	,016	,941	-,07	,03
4		-,01	,016	,998	-,06	,04
5		-,10*	,016	,000	-,16	-,05
6		,05	,016	,074	,00	,10
7		,15*	,016	,000	,10	,20
8		,08*	,016	,000	,03	,13
9		-,21*	,016	,000	-,26	-,16
10		-,17*	,016	,000	-,22	-,11
3		1	-,19*	,016	,000	-,24
	2	,02	,016	,941	-,03	,07
	4	,01	,016	1,000	-,04	,06
	5	-,08*	,016	,000	-,13	-,03
	6	,07*	,016	,001	,02	,12
	7	,17*	,016	,000	,12	,22
	8	,10*	,016	,000	,05	,15
	9	-,19*	,016	,000	-,24	-,14
	10	-,14*	,016	,000	-,20	-,09
	4	1	-,20*	,016	,000	-,25
2		,01	,016	,998	-,04	,06
3		-,01	,016	1,000	-,06	,04
5		-,09*	,016	,000	-,14	-,04
6		,06*	,016	,006	,01	,11
7		,16*	,016	,000	,11	,21
8		,09*	,016	,000	,04	,15
9		-,20*	,016	,000	-,25	-,15
10		-,15*	,016	,000	-,20	-,10
5		1	-,11*	,016	,000	-,16

	2	,10*	,016	,000	,05	,16
	3	,08*	,016	,000	,03	,13
	4	,09*	,016	,000	,04	,14
	6	,15*	,016	,000	,10	,20
	7	,26*	,016	,000	,20	,31
	8	,19*	,016	,000	,13	,24
	9	-,11*	,016	,000	-,16	-,05
	10	-,06*	,016	,006	-,11	-,01
6	1	-,26*	,016	,000	-,31	-,21
	2	-,05	,016	,074	-,10	,00
	3	-,07*	,016	,001	-,12	-,02
	4	-,06*	,016	,006	-,11	-,01
	5	-,15*	,016	,000	-,20	-,10
	7	,10*	,016	,000	,05	,15
	8	,03	,016	,587	-,02	,08
	9	-,26*	,016	,000	-,31	-,21
	10	-,22*	,016	,000	-,27	-,16
7	1	-,36*	,016	,000	-,41	-,31
	2	-,15*	,016	,000	-,20	-,10
	3	-,17*	,016	,000	-,22	-,12
	4	-,16*	,016	,000	-,21	-,11
	5	-,26*	,016	,000	-,31	-,20
	6	-,10*	,016	,000	-,15	-,05
	8	-,07*	,016	,001	-,12	-,02
	9	-,36*	,016	,000	-,41	-,31
	10	-,32*	,016	,000	-,37	-,27
8	1	-,29*	,016	,000	-,34	-,24
	2	-,08*	,016	,000	-,13	-,03
	3	-,10*	,016	,000	-,15	-,05
	4	-,09*	,016	,000	-,15	-,04
	5	-,19*	,016	,000	-,24	-,13
	6	-,03	,016	,587	-,08	,02
	7	,07*	,016	,001	,02	,12
	9	-,29*	,016	,000	-,34	-,24
	10	-,25*	,016	,000	-,30	-,20
9	1	,00	,016	1,000	-,05	,05
	2	,21*	,016	,000	,16	,26
	3	,19*	,016	,000	,14	,24
	4	,20*	,016	,000	,15	,25
	5	,11*	,016	,000	,05	,16
	6	,26*	,016	,000	,21	,31
	7	,36*	,016	,000	,31	,41
	8	,29*	,016	,000	,24	,34

	10	,04	,016	,160	-,01	,10
10	1	-,04	,016	,166	-,10	,01
	2	,17*	,016	,000	,11	,22
	3	,14*	,016	,000	,09	,20
	4	,15*	,016	,000	,10	,20
	5	,06*	,016	,006	,01	,11
	6	,22*	,016	,000	,16	,27
	7	,32*	,016	,000	,27	,37
	8	,25*	,016	,000	,20	,30
	9	-,04	,016	,160	-,10	,01
Based on observed means.						
The error term is Mean Square(Error) = ,003.						
*. The mean difference is significant at the ,05 level.						

Annexe 3 : Identification génotypique

Protocole d'extraction de l'ADN par le kit NucleoSpin® Microbial DNA

NucleoSpin® Microbial DNA

5 Protocols

5.1 Protocol for gram-positive and gram-negative bacteria

Before starting the preparation:

- Check if Buffer B5 was prepared according to section 3.
- Check section 2.4 for lysis and disruption of sample material.

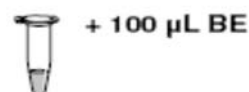
1 Prepare sample

Harvest cells from a culture by centrifugation in a microcentrifuge tube (not provided). Discard supernatant.

Up to approximately 40 mg of wet weight microbial cell culture pellet can be used as sample material.

Add 100 µL Elution Buffer BE and resuspend cells.

Alternatively, high quality grade water (not provided) can be used.



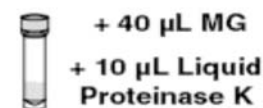
+ 100 µL BE

2 Lyse sample

Transfer the cell suspension into the NucleoSpin® Bead Tube Type B (provided).

Add 40 µL Buffer MG. Then, add 10 µL Liquid Proteinase K and close the tube.

Note: It is not necessary to vortex here.

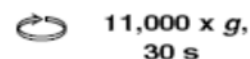
+ 40 µL MG
+ 10 µL Liquid
Proteinase K

Agitate the NucleoSpin® Bead Tube on a swing mill or similar device.

Agitate

Note: Optimal agitation duration, speed/frequency depends on the machine used. On a Retsch® Mixer Mill MM200, MM300, MM400, e.g., 4 min at maximal frequency (30 Hertz) is adequate for E. coli, 12 min for B. subtilis (see section 2.4). On the swing mill, position of the tube in the mill can considerably influence the result. Please consult the instruction manual of the device used.

Centrifuge the NucleoSpin® Bead Tube 30 s at 11,000 x g to clean the lid.

11,000 x g,
30 s

Note: In this step foam is displaced from the screw cap, so that the cap can be removed in a clean way.

NucleoSpin® Microbial DNA

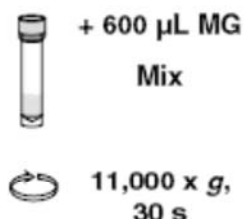
3 Adjust DNA binding conditions

Add **600 µL Buffer MG** and **mix** (e.g, vortex for 3 s).

Note: Glass beads should be resuspended; some residual pellet (cell debris) may remain on the bottom of the tube.

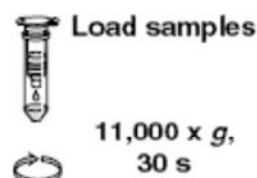
Centrifuge for **30 s** at **11,000 x g**.

Note: This centrifugation step is performed in order to clean the lid and sediment glass beads and cell debris.

**4 Bind DNA**

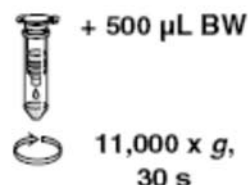
Transfer the supernatant (~500–600 µL) onto the **NucleoSpin® Microbial DNA Column**, placed in a 2 mL Collection Tube (provided).

Centrifuge for **30 s** at **11,000 x g**. Discard collection tube with flow-through. Put column into a fresh Collection Tube (2 mL, provided).

**5 Wash silica membrane**

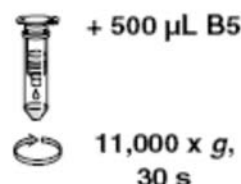
1st wash

Add **500 µL Buffer BW**. Centrifuge for **30 s** at **11,000 x g**. Discard flow-through and place the column back into the Collection Tube.



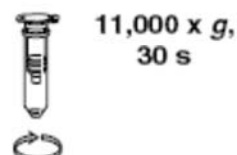
2nd wash

Add **500 µL Buffer B5** to the column and centrifuge for **30 s** at **11,000 x g**. Discard flow-through and place the column back into the Collection Tube.

**6 Dry silica membrane**

Centrifuge the column for **30 s** at **11,000 x g**.

Note: Residual wash buffer is removed in this step.

**7 Elute highly pure DNA**

Place the **NucleoSpin® Microbial DNA Column** into a 1.5 mL nuclease-free tube (not provided) and add **100 µL Buffer BE** onto the column. Incubate at **room temperature** for **1 min**. Centrifuge **30 s** at **11,000 x g**.

For alternative elution procedures see section 2.5.



Les séquences du gène codant la sous unité ribosomale 16s pour les souches étudiées :**>*Serratia marcescens* AIN14**

GGCGCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTG
ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTAGCATTCTGATCTACGA
TTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGA
CATACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATATGCCATTG
TAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACC
TTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGAACCGCTGGCAA
CAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGA
GCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATC
TCTGGAAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAAT
TAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTAAAC
CTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTTCGATTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGC
CTCAAGGGCACAACCTCCAAATCGACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATC
TAATCCTGTTTGCTCACCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTCGTCCAGGG

>*Raoultella* sp. AIN6

TGGTAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCAT
GGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTAGCATTCTGAT
CTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCAAGTTGCAGACTCCAATCCGGA
CTACAACATACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTC

>*Aeromonashydrophila* ARB7

ATCACCGTGGGTAACGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTATCTACTTCTGGTGCACCCAC
TCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAACA
TTCTGATTTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCG
ATCCGGACTACGACGCGCTTTTTGGGATTTCGCTCACTATCGCTAGCTTGCAGCCCTC
TGACGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTG
ACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCCTTGAGTTCCCACCA
TTACGTGCTGGCAACAAAGGACAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAAC
ATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTCTGATTCCCGAA
GGCACTCCCGCATCTCTGCAGGATTCCAGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTC
GCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC
ATTTGAGTTTAAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTTCGATTTAACGCGTTAGCT
CCGGAAGCCACGTCTCAAGGACACAGCCTCCAAATCGACATCGTTTACGGCGTGG

ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGT
CTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCTCCAGATCTCTACGCATTTC
CCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCTGGACAGTTTTAAA
TGCAATTCCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCTAACTTATCCAACCGCCTGCG
TGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCT
GCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGAGTAACGTCAAGTTGATACGTAT
TA

>*Enterobacterxiangfangensis* AIN1

TGATCAAAGTGGTAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGCACCC
ACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGG
CATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCC
AATCCGGACTACGACGCACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTC
TTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTT
GACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGC
CTAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAAC
ATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAA
GGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTC
GCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC
ATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCGACTTAACGCGTTAGC
TCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACTCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTG
GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAG
TCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCTCCAGATCTCTACGCATTTC
ACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCCTGCCAGTTTCGA
ATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCGACTTGACAGACCGCCTGC
GTGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGC
TGCTGGCACGGAGT

>*Aeromonasveroniibv. veronii* ARB6

CTCTCGGGAACGTATTCACCGCAACATTGCTGATTTGCGATTACTAGCGATTCCGAC
TTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGACGCGCTTTTTGGGATTC
GCTCACTATCGCTAGCTTGCAGCCCTCTGTACGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGC
CCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTATCA
CCGGCAGTCTCCCTTGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACAAAGGACAGGGGT
TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCA

TGCAGCACCTGTGTTCTGATTCCCGAAGGGACTCCCGCATCTCTGCAGGATTCCAG
ACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTGAACCACATGCTCC
ACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTTCAGCCTTGCGGCCGTACT
CCCCAGGCGGTTCGATTTTACCGCGTTAGCTCCGGAAGCCGCGTG

>*Stenotrophomonas maltophilia*ARB8

TGGCACCGTGGCAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTGCTTCTGGTGCAACA
AACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCA
GCAATGCTGATCTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGAC
TCCAATCCGGACTGAGATAGGGTTTTCTGGGATTGGCTTACCGTCGCCGGCTTGCAG
CCCTCTGTCCCTACCATTGTAGTACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATG
ACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTTGTCACCGGCGGTCTCCTTAGAGTTC
CCACCATTACGTGCTGGCAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAA
CCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTTCGAGTT
CCCGAAGGCACCCATCCATCTCTGGAAAGTTCTCGACATGTCAAGGCCAGGTAAG
GTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCG
TCAATTCCTTTGAGTTTTAGTCTTTCGACCGTACTCCCCAGGCGGGCGAACTTAACG
CGTTAGCTTCGATACTGCGTGCCAAATTGCACCCAACATCCAGTTCGCATCGTTTAG
GGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCCTCAG
TGTC AATGTTGGTCCAGGTAGCTGCCTTCGCCATGGATGTTCCCTCCTGATCTCTACG
CATTTCACTGCTACACCAGGAATTCCGCTACCCTCTACCACATTCTAGTCGCCAGT
ATCCACTGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCAGGGCTTTCACAACGGACTTAAACGACC
ACCTACGCACGCTTTACGCCAGTAATTCAGGTAACGCTTGCACCCTTCGTATTAC
CGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTTGGGTACCGTCATCCCAA
CCAGGTATAGCCGG

>*Aeromonaseucrenophil*ARB3

CTGATCACCGTGGTAACGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTATCTACTTCTGGTGCAAC
CCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGC
AACATTCTGATTTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGTCGAGTTGCAGA
CTCCGATCCGGACTACGACGCGCTTTTTGGGATTCGCTCACTATCGCTAGCTTGCA
GCCCTCTGTACGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGA
TGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCCTTGAGT
TCCCACCATTACGTGCTGGCAACAAAGGACAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTT
AACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTCTGA

TTCCCGAAGGCACTCCCGCATCTCTGCAGGATTCCAGACATGTCAAGGCCAGGTA
AGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCC
CCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTA CTCCCCAGGCGGTTCGATTTA
ACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGTCTCAAGGACACAGCCTCCAAATCGACATCGT
TTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACC
TGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCCTCCAGATCT
CTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCTG
GACAGTTTTAAATGCAATTCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCTAACTTATC
CAACCGCCTGCGTGCGCTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCG
TATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAAGTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGAGAA

>*Stenotrophomonas maltophilia*ARA7

TCCCGAAGGTTAAGCTACCTGCTTCTGGTGCACAAACTCCCATGGTGTGACGGGC
GGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACT
AGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTGAGATAGG
GTTTCTGGGATTGGCTTACCGTCGCCGGCTTGCAGCCCTCTGTCCCTACCATTGTAG
TACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTC
CTCCGGTTTGTACCGGCGGTCTCCTTAGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACT
AAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGC
TGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTTCGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCT
GGAAAGTTCTCGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAA
ACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTT
GCGACCGTACTCCCCAGGCGGCGAACTTAACGCGTTAGCTTCGATACTGCGTGCCA
AATTGCACCCAACATCCAGTTCGCATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTA
ATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCCTCAGTGTCAGTGTTGGTCCAGGTAGCT
GCCTTCGCCATGGATGTTCTCCTGATCTCTACGCATTTCACTGCTACACCAGGAAT
TCCGCTACCCTCTACCAAAC

>*Pseudomonas aeruginosa*AIN7

TGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGACATTCTG
ATTCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCC
GGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCTACCCTTTGT
ACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGAC
GTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCCACCCG
AGGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACAT

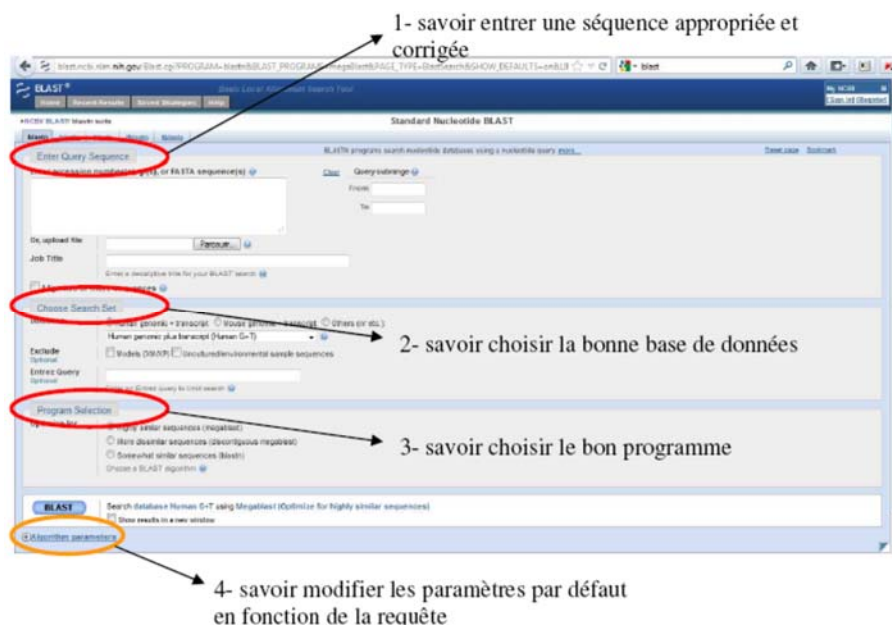
CTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCTGAGTTCCTCGAAGG
CACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCAGCATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCG
CGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCA
TTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTTCGACTTATCGCGTTAGCT
GCGCCACTAAGATCTCAAGGATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGG
ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCACGCTTTCGCACCT

>*Enterobacter* sp. ARA6

sequenceGCCCTGAACAAAGTGGTAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTC
TGTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGT
ATTCACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCG
AGTTGCAGACTGCAATCCGGACTACGACGGACTTTATGAGGTCAGCTTGCTCTCG
CGAGGTGGCTTCTCTTTGTATGCACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTAGTCGTAA
GGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCT
CCTTAGAGTGCCCGGCCTAACCGGTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGGGCTCGTTG
CGGGAATTAACCAACATTTCAAAAACGAGCTGAAGAAAGCCATGGAGCACCT
GGCGCAAATTCCTCGAAGGGACCAAACCATCTCTGGGAAGTTCTCTGGATGGCA
AGAGTATGTAAGGGTCTTCCCGTTGGATCCAATTAACCACATGGTCCACCGCTT
GGGGGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAATTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGG
GGGTCGACTTAACGGGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGAACAACCTCCA
AGTCTAAATCGTTTACGGCGTGGACTACCAAGGTATCTAATCCTGGTTGCTCCCC
AAGCTTTCGCAACTGAGCGGCAGTCTTTGTCCAAGGTGCCGCCTTCCCCAACTGT
ATTCCTCTAGATCTCTACGCATTTACACCGCTACACCTGGAAATCTACCCCCCTCTA
CAAGACTCTATACCTGCCAGTTTCTAAAGCAATTCAGGGTGAACCCGGGGATT
TTACATCCGACTTGACAGAACGACTGAGTGCGCTTTACGCCAGTAATTCCAATA
ACGCTTGCCCTCCGGATTACCCGGCTGCTGGACGAAATTAGCCGGTGCTCTTCT
GGGGTAACGTCATCGCAAAGGGTATTAACCTTATCGCCTTCTCCCACTAAAGACT
TTAAAACCGAAGACTTCTTCAACCCCCGCATGGTGGATCGGGTTGGCCCTTTGGC
AAATTCCCACGGGGCCCCCAAGAAATGGGCAGGGTCCCATTCCGGGGGGTGGG
TTCCCCCA

Utiliser de l'outil BLAST pour trouver des similarités de séquences sur la base de données Genbank1.

Page d'accueil BLASTn



2. Les résultats bruts ou « hit list »

Chaque ligne du résultat obtenu des séquences introduites dans le BLAST contient

1. Le numéro d'accèsion de la séquence et son nom,
2. La description associée à l'annotation de la séquence,
3. Le score qui est une mesure de la signification statistique de l'alignement ; plus il est élevé, plus les séquences sont similaires,
4. Le pourcentage de couverture entre les deux séquences,
5. La « E-value » ou « expectation value » qui donne la meilleure mesure de la signification statistique de l'alignement, en estimant le nombre de fois où on aurait pu obtenir un si bon alignement par le seul fruit du hasard ; plus cette valeur est basse, plus les séquences sont similaires,
6. Le pourcentage de similarité arrondi à l'unité, et les liens vers d'éventuels génomes

Accession	Description	Max.score	Total.score	Query.coverage	E.value	Max.ident	Links
NR_041802.1	Robisoniella peioransis strain FPC31 16S ribosomal RNA, complete sequence >gbl	2710	2710	100%	0.0	99%	
AF345783.2	Robisoniella peioransis strain FPC44 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2706	2706	100%	0.0	99%	
AF345782.2	Robisoniella peioransis strain FPC100 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2706	2706	100%	0.0	99%	
AF345781.2	Robisoniella peioransis strain FPC47 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2704	2704	100%	0.0	99%	
DQ561327.1	Robisoniella peioransis strain CCUG 32335 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	2692	2692	100%	0.0	99%	
EU322828.1	Robisoniella peioransis strain HRJF-09/9434 16S ribosomal RNA gene, partial seq	2626	2626	92%	0.0	99%	
EF292931.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_02_05 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2270	2270	90%	0.0	94%	
EF401202.1	Uncultured bacterium clone SITU_D_07_10 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2270	2270	90%	0.0	94%	
EF301027.1	Uncultured bacterium clone SITU_D_05_39 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2270	2270	99%	0.0	94%	
EF408663.1	Uncultured bacterium clone SITU_D_02_03 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2270	2270	99%	0.0	94%	
EF298564.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_08_02 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2270	2270	99%	0.0	94%	
EF298565.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_15_58 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2270	2270	90%	0.0	94%	
EF292928.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_13_26 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2270	2270	90%	0.0	94%	
EF292929.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_14_25 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2270	2270	99%	0.0	94%	
EF292930.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_14_22 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2270	2270	99%	0.0	94%	
EF298273.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_13_21 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2270	2270	99%	0.0	94%	
EF298272.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_12_21 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2270	2270	99%	0.0	94%	
EF299124.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_12_06 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2270	2270	90%	0.0	94%	
EF299125.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_11_02 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2270	2270	99%	0.0	94%	
EF292932.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_16_37 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2270	2270	99%	0.0	94%	
EF292933.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_16_20 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2270	2270	99%	0.0	94%	
EF292934.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_09_57 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2270	2270	90%	0.0	94%	
EF292935.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_09_56 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2270	2270	99%	0.0	94%	
EF292936.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_08_27 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2270	2270	99%	0.0	94%	
EF292937.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_07_23 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2270	2270	99%	0.0	94%	
EF298864.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_05_39 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2270	2270	99%	0.0	94%	
EF298865.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_02_28 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2270	2270	90%	0.0	94%	
EF292938.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_03_32 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2270	2270	99%	0.0	94%	
EF292939.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_03_06 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2270	2270	99%	0.0	94%	
EF298423.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_02_01 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2270	2270	99%	0.0	94%	
EF298424.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_01_23 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2270	2270	99%	0.0	94%	
EF292940.1	Uncultured bacterium clone SITU_D_10_12 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2265	2265	90%	0.0	94%	
EF292941.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_11_37 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2265	2265	99%	0.0	94%	
EF292942.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_15_27 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2265	2265	99%	0.0	94%	
EF292943.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_14_32 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2265	2265	90%	0.0	94%	
EF292944.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_13_03 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2265	2265	99%	0.0	94%	
EF292945.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_14_06 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2265	2265	99%	0.0	94%	
EF292946.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_14_38 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2265	2265	99%	0.0	94%	
EF292947.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_11_51 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2265	2265	99%	0.0	94%	
EF292948.1	Uncultured bacterium clone SITU_F_16_06 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2265	2265	99%	0.0	94%	

3. Les résultats détaillés

L'alignement séquence par séquence

1. Le numéro d'accèsion, le nom et la longueur de la séquence « subject » ; on peut avoir plusieurs propositions si plusieurs séquences ont été alignées de manière identique la notre «query » (exemple ci-dessous)
2. Le score mentionné plus haut,
3. La « E-value » ou Expect pour Expectation value,
4. Le nombre de nucléotides identiques et le nombre d'indels,
5. Alignement tel quel avec l'orientation des brins des séquences« query » et « subject ».

```

>[ref|NR_041882.1| Robinsoniella peoriensis strain PPC31 16S ribosomal RNA, complete
sequence
gb|AF445285.2| Robinsoniella peoriensis strain PPC31 16S ribosomal RNA gene,
complete sequence
Length=1525

Score = 2710 bits (1467), Expect = 0.0
Identities = 1486/1497 (99%), Gaps = 2/1497 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1   AGATTTCGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAG 60
          |||
Sbjct 2   AGAT-7TTGATCCTGGCTCRGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAG 60

Query 61   CGAAGCATTAAACCAGATTTCCTTCGGATGAAGTTTTAATGACTGAGCGGCGGACGGGT 120
          |||
Sbjct 61   CGAAGCATTAAACCAGATTTC-TTCGGATTGAAGTTTTTGTGACTGAGCGGCGGACGGGT 119

Query 121  GAGTAACCGCTGGGTGACCTGCCICATACAGGGGGATACAGACAGAAATGCTGCTAAT 180
          |||
Sbjct 120  GAGTAACCGCTGGGTGACCTGCCICATACAGGGGGATACAGACAGAAATGCTGCTAAT 179

Query 181  ACCGCATAAGCCACAGTGTCTGCATGGCACAGTGTGAAAAACTCCGGTGGTATGAGATGG 240
          |||
Sbjct 180  ACCGCATAAGCCACAGTGTCTGCATGGCACAGTGTGAAAAACTCCGGTGGTATGAGATGG 239

Query 241  ACCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATCAGTAGCC 300
          |||
Sbjct 240  ACCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATCAGTAGCC 299

Query 301  GGCTTGAGAGGGTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAACTCCACGGGAGG 360
          |||
Sbjct 300  GGCTTGAGAGGGTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAACTCCACGGGAGG 359

Query 361  CAGCAGTGGGGAATAITGCACAAITGGGGGAACCCCTGATGCAGCGACCGCGGTGAGGA 420
          |||
Sbjct 360  CAGCAGTGGGGAATAITGCACAAITGGGGGAACCCCTGATGCAGCGACCGCGGTGAGGA 419

Query 421  AGAAGTATTTCCGTATGTAARACTTCIATCAGCAGGGAAGAAAATGACGGTACCTGACTAA 480
          |||
Sbjct 420  AGAAGTATTTCCGTATGTAARACTTCIATCAGCAGGGAAGAAAATGACGGTACCTGACTAA 479

Query 481  GAAGCCCGGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGGCAAGCGTTATCC 540
          |||
Sbjct 480  GAAGCCCGGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGGCAAGCGTTATCC 539

Query 541  GGATTIACCTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGCATGGCAAGTCTGGTGTGAAGGSCAGGG 600
          |||
Sbjct 540  GGATTIACCTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGCATGGCAAGTCTGGTGTGAAGGSCAGGG 599

Query 601  GCTCAACCCCTGGACTGCAITGGAACTGTGAGGCTGGAGTGCAGGAGAGGTAAGTGGAA 660
          |||
Sbjct 600  GCTCAACCCCTGGACTGCAITGGAACTGTGAGGCTGGAGTGCAGGAGAGGTAAGTGGAA 659

Query 661  TTCTAGTGIACCGGTGAAATGCCTAGATATTAGGAGGAACCCAGTGGCGAAGGCGACT 720
          |||
Sbjct 660  TTCTAGTGIACCGGTGAAATGCCTAGATATTAGGAGGAACCCAGTGGCGAAGGCGACT 719

Query 721  TACTGGACTGTAAGTACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACC 780
  
```

Publication

**REGULAR ARTICLE**

Molecular identification of crude oil-degrading bacteria isolated from polluted sites in Algeria

Nahla Bekenniche^{a*}, Ait Abdeslam Arezki^b, Nemmiche Saïd^c, Ait Saada Djamal^a, Cheriguenen Abderrahim^c, Bekada Ahmed Mohammed Ali^d

^aLaboratory of Food Technology and nutrition, Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, University Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, 27000, Algeria

^bDepartment of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Mustapha Stambouli Mascara -29000, Algeria

^cDepartment of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Mostaganem, 27000, Algeria

^dAgronomy and Environment laboratory, University center of Tissemsilt, Algeria

ARTICLE INFO**Article History:**

Received: 1 Dec 2020

Revised: 15 Mar 2021

Accepted: 17 Mar 2021

***Corresponding Author:**

Email: bekennichenahla@hotmail.fr

Telephone: 00 (213) 551061013

Keywords: Pollutants, biodegradation, soil bacteria, Crude oil, screening, 16S rRNA

ABSTRACT

The petroleum industry in Algeria takes a predominant place in the economy. This industry amplifies the environmental contamination and affects microbial diversity of soils. Bioremediation is a cost-effective and efficient process for removing hydrocarbon pollutants. The aim of the study was to isolate cultivable telluric bacteria and to assess their potential as bioremediation agents against the contamination of petroleum hydrocarbons. Crude oil polluted soil samples were taken from different oil refinery in Algeria. Elemental analysis was determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ECP-OES). The screening of bacteria degrading hydrocarbons was studied with oil spreading technique on mineral salt medium (MSM agar) supplemented with crude oil as the only carbon source and energy for direct visualization of clear zones on agar plates. Among the isolates, ten were selected for their degradation potential based on their large clear zone (from 0.5 to 3.2 Cm) for phenotypic and genotypic characterization. Molecular identification was performed by sequencing the gene encoding 16s rRNA. The comparison of sequences with GenBank database showed similarity with different strains *Aeromonas hydrophila*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterobacter xiangfangensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, and *Raoultella* sp. These results are significant for the application of these isolates at the environmental scale in bioremediation of polluted soils.

1. Introduction

Crude oil exploitation in Algeria continues to grow, ranked third in Africa behind Nigeria and Angola. Algeria covers all aspects of production: exploration, extraction, transport, and refining of crude oil for several years. However, the harmful effects of

this industrialization are noted on the environment. The consequences of this ecological pollution can have a direct or indirect impact on human health and the balance of ecosystems. Crude oil is made up of thousands of compounds mixed, 50 % to 98 % of crude oil consists of petroleum hydro-

carbons (Al-Dhabaan, 2019). Hydrocarbon compounds are characterized by low bioavailability due to their environmental solubility, which negatively affects their biodegradation. Therefore, it is necessary to provide solutions to minimize the accumulation of hydrocarbons in the terrestrial and marine environment. In addition to the physical and chemical factors used, there is a process of bioremediation. Biodegradation is a very complex chemical process that occurs under aerobic conditions, it is faster and more effective for most of the substances in crude oil (Zdarta et al., 2017). This process can be carried out by different kinds of bacteria which can transform potentially toxic components to non-toxic components to obtain energy and nutrients (Ting Adeline et al., 2009). *Serratia marcescens*, *Raouletella ornithinolytica* (Bidja Abena et al., 2020), *Stenotrophomonas maltophilia* (Fang et al., 2018), *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp. (Syakti et al., 2019) and many other species can use petroleum as a source of carbon and energy. The growth of these microorganisms depends on a source of carbon but other nutrients such as nitrogen, phosphorus and trace elements (Li et al., 2020). Several studies have been carried out in the field of bioremediation by indigenous microorganisms in different petroleum producing countries like: Indonesia (Syakti et al., 2019), Oman (Al-Bahrya et al., 2013), Nigeria (John et al., 2012), Saudi Arabia (Fahad and Al-Dhabaan, 2019), Iran (Koolivand et al., 2019), and Iraq (Abdulla et al., 2019).

The objective traced in this study is to isolate bacteria with potential for biodegradation of crude oil. Soil samples collected from polluted sites in Algeria are analysed and used as a source of the novel indigenous bacterial strains. Degrading isolates were selected on mineral salt medium supplemented with crude oil. The molecular identification was done by sequencing of the gene coding for ribosomal ribonucleic acid (16S rRNA).

2. Materiel and Methods

2.1. Sample collection

The samples were collected from different sites polluted by hydrocarbons: In Amenas wilaya of Illizi located in the southeast of Algeria, Arzew and Bethioua wilaya of Oran located in north-west of Algeria. Soil sampling was carried out at a depth of about 10 to 20 cm. Samples were collected in boxes respecting aseptic conditions and transported at 4 °C to the laboratory for analysis.

2.2. Elemental analysis of soils by inductively coupled plasma optical emission spectrometry

The applications of inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-OES) are diverse and can analyze all petroleum products. The total Al, Ba, Ca, Cr, Cu, Fe, K Li, Mg, Mn, Na, Ni, Sr and Zn concentrations were determined in the four soils according to EPA 3050 (USEPA, 1996). Quantification was performed by Inductively Coupled Plasma Optical Emission (ICP-OES, Optima 7000 DV).

Sediments were carefully screened for determining the presence of animals and detritus, put in polyethylene containers and stored at 4°C. Before analysis, samples were lyophilized, homogenized and sieved with a plastic sieve to select the sediment fraction with particle diameter less than 63 µm. As known, metals are concentrated in this sediment fraction.

Samples were digested by the USEPA 3050B method and elements were quantified directly on solution digestion by ICP-OES.

Approximately 1 g sample was accurately weighed in a 250 ml, Pyrex Erlenmeyer flask and 10 ml of 8.5 M HNO₃ were added. The solution was heated on a hot plate to ~95 °C without boiling and this temperature was maintained for 15 min. After cooling to less than 70°C, 5 mL of 17 M HNO₃ were added and the sample was refluxed for 30 min at ~95 °C without boiling. This step was repeated a second time. Thereafter, the sample was evaporated to ~5 mL without boiling. After cooling to less than 70°C, 2 mL of water was added, followed by the slow addition of 3 mL of 8.8 M H₂O₂. The solution was then heated until effervescence subsided. Later, 8 mL more of 8.8 M H₂O₂ in 1-mL aliquots were added and the solution refluxed. After cooling to less than 70°C, 10 mL of 12 M HCl was added and the sample was refluxed for 15 min without boiling. After cooling to room temperature, the sample was filtered and diluted to 100 mL with double distilled water.

2.3. Isolation and conservation of bacteria

Ten grams of each sample were added to 90 ml of sterile nutrient broth solution. A series of dilutions was made to decrease the microbial mass and the bacteria were isolated by streaking the samples on nutrient medium. Several colonies of different aspects were purified on nutrient agar and stored at -20 °C (Hassanshahian et al., 2014).

2.4. Determination of biodegradation potential

2.4.1. Screening of bacteria degrading crude oil

The bacteria degrading crude oil were screened by oil spreading technique on mineral salt medium (MSM) containing in gram per liter of distilled water : K₂HPO₄ (Merck) (1.8 g / L); NH₄Cl (Merck) (4 g / L); MgSO₄·7H₂O (Merck) (0.2 g / L); NaCl (sigma) (0.1 g / L); Na₂SO₄·7H₂O (Merck) (0.01 g / L); agar (20 g / L); the pH was adjusted to 6.8. Medium was supplemented with 40 µl of crude oil as a single carbon source (crude oil was offered by the Arzew refinery (Algeria) and sterilized by filtration with a Millipore filter 0.45 µm). The inoculated plates were incubated in the dark at 30 °C for 10 days in aerobic condition (Jyothi et al., 2012). The highest biodegradation activity was indicated by the largest diameter of the clear zone. The experience was done in triplicate.

2.4.2. Determination of biodegradation potential

Ten strains that give the best clear zones with oil spreading technique were selected to test their growth capacity. The selected isolates were inoculated into an Erlenmeyer flask with 50 mL liquid MSM media with 2% (v/v) of crude oil as the only carbon source. The incubation was carried out at 30°C for 12 days with shaking (150 rpm). The degradation potential of crude oil was indicated by monitoring the turbidity of the medium measured at 600 nm at regular intervals of 2 days using a UV spectrophotometer. The control flask contained the same components without bacterial isolates (Syakti et al., 2019). The experiments were done in triplicate.

2.5. Phenotypic characterization

For an identifying approach, the 10 selected isolates were performed by using different biochemical tests: Gram staining, catalase, oxidase, motility, spore formation, nitrate reduction, indol production, Voges Proskauer test and capacity of growth at 10°C for 5 incubation days and 45 °C for 48h of incubation on nutrient agar.

2.6. Genomic DNA extraction, amplification, sequencing and analysis of the 16S rRNA gene Extraction of Genomic DNA

Bacterial genomic DNA extraction was done with commercial kit NucleoSpin® Microbial DNA (Macherey-nagel, Düren, Germany) following the manufacturer recommendation. The cells were harvested from fresh microbial cultures by sedimenta-

tion via centrifugation and the supernatant removed by aspiration. The quantity and the quality of DNA extracts are monitored by the NanoDrop spectrophotometer (thermo scientific, USA).

2.6.1. PCR amplification

The PCR amplicons of approximately 1.5 kb, corresponding to the size of the full 16S rRNA gene were amplified by universal primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT -3' (Arulazhagan et al., 2016). The amplification reaction was performed in a total volume of 25 µL consisting template (1 µL), 10× buffer (with Mg²⁺) (2.5 µL), 2.5mM each dNTP (1 µL), 10 µM F (0.5 µL), 10 µM R (0.5 µL) and enzyme (0.2 µL). The MilliQwater was added for remaining of reaction, and then performed in Biorad thermal cycler (Biorad, USA). PCR amplification reactions were carried out with an initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 45 s and extension at 72 °C for 90s. The procedure was completed with a final elongation step at 72 °C for 10 min (Wang et al., 2019).

2.6.2. Phylogenetic analysis

The BLAST was used to find the identical sequence in the NCBI nucleotide sequence database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). For construction of a phylogenetic tree, the sequences were aligned with known bacterial 16s rRNA obtained using MEGA-X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Kumar et al., 2018), available at <https://www.megasoftware.net/>. The distances were calculated using the Neighbor-Joining method with the Jukes-Cantor correction (Saitou and Nei, 1987). The representative sequence of each species was selected and submitted to the NCBI (www.submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs) web site to obtain the GenBank accession numbers.

2.7. Statistical analysis

The difference between the growths of the strains was analyzed by unidirectional parametric ANOVA (analysis of variance). Significant differences (P value ≤ 0.05) were detected by a multiple comparison test, Tukey. All statistical tests were carried out using the commercial software: Statistical Package for the Social Sciences (SPSS version 23.0). The data has been transferred to an Excel sheet for further processing.

Soil samples	Elements ($\mu\text{g} / \text{kg}$)													
	Al	Ba	Ca	Cr	Cu	Fe	K	Li	Mg	Mn	Na	Ni	Sr	Zn
E1	8.4	0.2	8.0	0.1	2.4	25.9	4.1	0.0	1.6	0.1	68.5	0.1	0.0	11.3
E2	17.0	0.3	69.8	0.0	0.1	24.8	5.3	0.0	4.7	0.3	2.9	0.0	0.2	0.4
E3	3.0	0.0	8.7	0.0	0.1	1.4	0.8	0.0	0.8	0.0	0.9	0.0	0.0	0.2
E4	8.0	22.3	30.3	0.2	0.2	153.1	5.6	0.1	3.0	0.3	41.6	0.1	0.7	0.7

Table 1: Elements concentrations of soil samples measured by ICP-OES.

E1 : Sludge from In Amenas, E2 : Sand from In Amenas, E3 : Sludge from Arzew, E4 : soil from Betioua

3. Results and Discussion

The results of concentration elements quantified in different soil samples using ICP-OES are illustrated in the Table 1. The basic composition of the four soils polluted by crude oil has shown the presence of different metals at varying levels of concentration. Fourteen elements were detected and measured (Al, Ba, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Sr and Zn). Some of these metals are necessary for microbial survival, such as Fe, Cu, Zn, Ca, and K. Others are toxic and accumulate in the soil such as Cr, Ba, Sr, and Ni (Chettri and Singh, 2019).

3.1. Elemental analysis in soils

The results of concentration elements quantified in different soil samples using ICP-OES are illustrated in the Table 1. The basic composition of the four soils polluted by crude oil has shown the presence of different metals at varying levels of concentration. Fourteen elements were detected and measured (Al, Ba, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Sr and Zn). Some of these metals are necessary for microbial survival, such as Fe, Cu, Zn, Ca, and K. Others are toxic and accumulate in the soil such as Cr, Ba, Sr, and Ni (Chettri and Singh, 2019).

3.2. Screening of bacteria degrading hydrocarbons

The biodegradation activity of the hydrocarbons was recorded by the appearance of clear zones on the thin layer of petroleum (figure 1). Among the 42 isolates tested, 10 showed clear zones greater than 0.5 cm in diameter.

Figure 2 illustrates the clear zones of isolates ARB3, ARB6, ARB7, ARB8, ARA6, ARA7, AIN1, AIN6, AIN7 and AIN14 which were tested in triplicate on MSM supplemented with petroleum as the sole carbon source. Clear zones vary between 0.5 to 3.2 cm.

The appearance of these clear zones can be explained by the production of secondary metabolites such as biosurfactants which widen the degradation zone (Syakti et al., 2019). The layer of biosurfactants reduces the viscosity of the trapped petro-

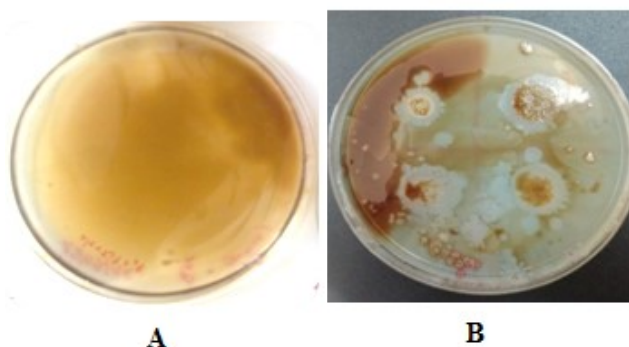


Figure 1: Results of biodegradation activity of bacterial isolates on MSM agar medium supplemented with 40 μl crude oil.

A: (Negative control) MSM agar + Crude oil without bacteria inoculation.

B: MSM agar + Crude oil with bacteria inoculation, appearance of clear zones resulting from degradation of crude oil by isolates.

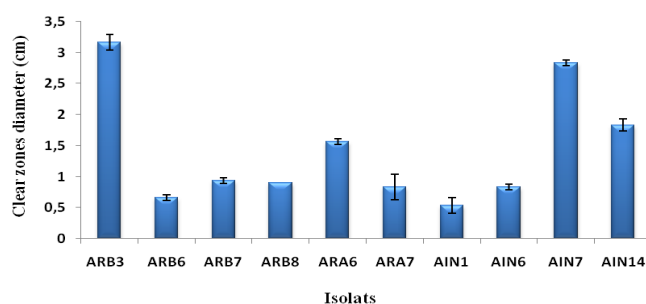


Figure 2: Clear zone diameter of bacteria on MSM agar supplemented with 40 μL of crude oil.

leum in the medium (Deepika et al., 2016). Therefore, the surfactant functions as an emulsion which expands contact between bacteria and petroleum in the water for more dispersion of hydrocarbons (Thavasi et al., 2011).

3.3. Growth activity of degrading bacteria

The cell growth of the isolates in MSM medium liquid supplemented with petroleum was represented in Figure 3. The survival of inoculated strains is one of the most difficult questions because many endogenous microorganisms generally decrease after inoculation in the medium (Bidja Abena et al., 2020). On the first day, the thin layer of crude oil floated on the liquid medium. With continual shaking, the layer turned into oil droplets

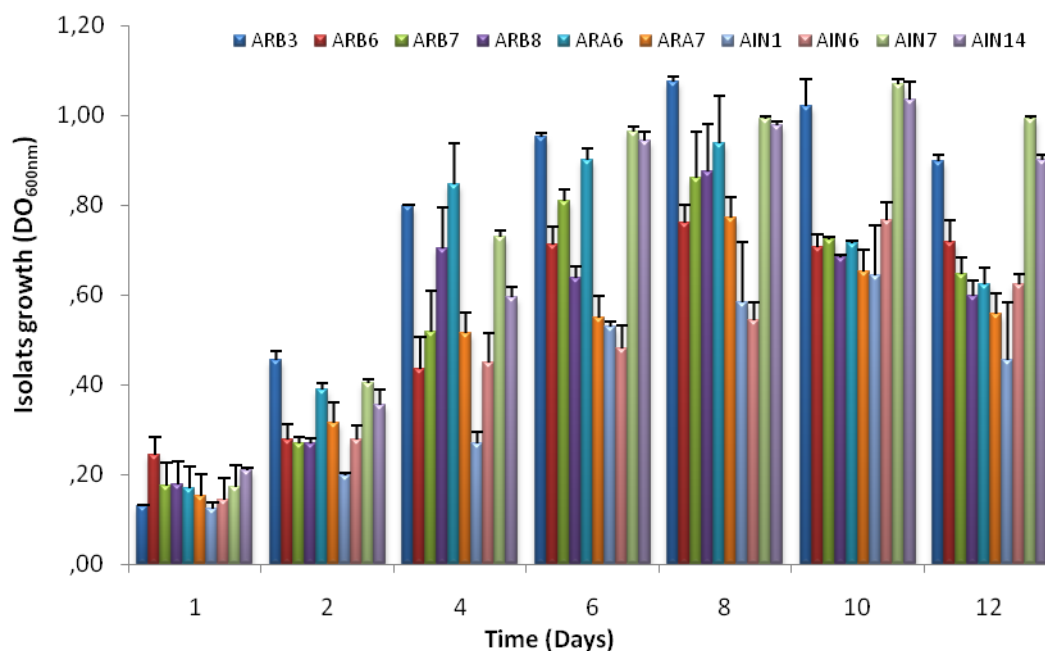


Figure 3: Bacterial growth of isolates adapted to 2% of crude oil in liquid medium. Tukey's test indicated significant difference between data ($p < 0.05$).

Tests	Isolates									
	ARB3	ARB6	ARB7	ARB8	ARA6	ARA7	AIN1	AIN6	AIN7	AIN14
Cell form	Bacilli	Bacilli	Bacilli	Bacilli	Bacilli	Bacilli	Bacilli	Bacilli	Bacilli	Bacilli
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spore formation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 10 °C	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Growth at 45°C	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
Voges-Proskauer	+	+	+	-	+	-	ND	+	+	+
Indol	+	+	+	-	-	-	ND	ND	-	-
Nitrate	+	+	+	+	+	+	ND	+	+	+

Table 2: Morphological and biochemical characteristics of bacteria isolated from crude oil polluted soils. ND: not done, +: positive reaction, -: negative reaction

stuck to the wall of the tube. The results showed that the cells were able to growth within the first 3 days of study, which indicates that they were able to adapt to 2 % crude oil as the only source of carbon and energy. The isolates ARB3, ARB6, ARB7, ARB8, ARA6 and ARA7 showed an increase in cell density of up to 8 days. While the isolates AIN1, AIN6, AIN7 and AIN14 marked their greatest growth potential on the 10th day. A gradual drop in the broth concentration suggests a decrease in the bacterial population and that the hydrocarbon has been degraded. Similar results have been found in previous studies on petroleum biodegradation (Morales-Guzmán et al., 2017).

The microbial growth during the first 7 days of incubation was no significant ($P > 0.05$), but a very significant microbial growth ($p < 0.001$) was observed

between the 8th and 10th day of incubation, giving the highest growth for all the isolates. The ARB3 with AIN7 and ARB7 with ARB8 isolates did not show significant differences ($P > 0.05$) during their growth.

3.4. Phenotypic characterization

The morphological and biochemical characteristics are as given in Table 2. The results show that all isolates are gram-negative rods, catalase and nitrate positive, non-spore-forming. Oxidase and indole production, motility, Voges-Proskauer test, growth at 10 °C and at 45°C are variables.

3.5. Genotypic identification

The PCR amplification gel is shown in the Figure 4 and the expected size is 1500 pb. The sequences

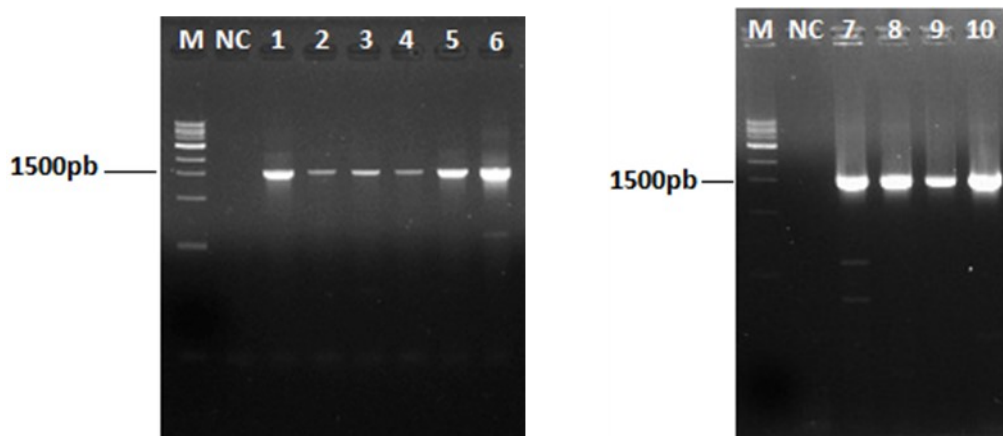


Figure 4: Gel picture of the PCR amplification for isolates (1) : ARB3, (2): ARB6, (3): ARB7, (4): ARB8, (5): ARA6, (6): ARA7, (7): AIN1, (8): AIN6, (9): AIN7, and (10): AIN14, (M) : molecular marker, (NC): negative control.

Isolates	Identification	Homology (%)	GenBank Accession Number
ARB3	<i>Aeromonas hydrophila</i>	99.70	MT572504
ARB6	<i>Aeromonas</i> sp.	98.53	MT572502
ARB7	<i>Aeromonas hydrophila</i>	99.72	MT572500
ARB8	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99.90	MT572503
ARA6	<i>Enterobacter</i> sp.	92	MT572507
ARA7	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99.88	MT572505
AIN1	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	99.79	MT572501
AIN6	<i>Raoultella</i> sp.	99.52	MT572499
AIN7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.69	MT572506
AIN14	<i>Serratia marcescens</i>	99.86	MT572498

Table 3: Results of identification by 16S rRNA of strains degrading crude oil.

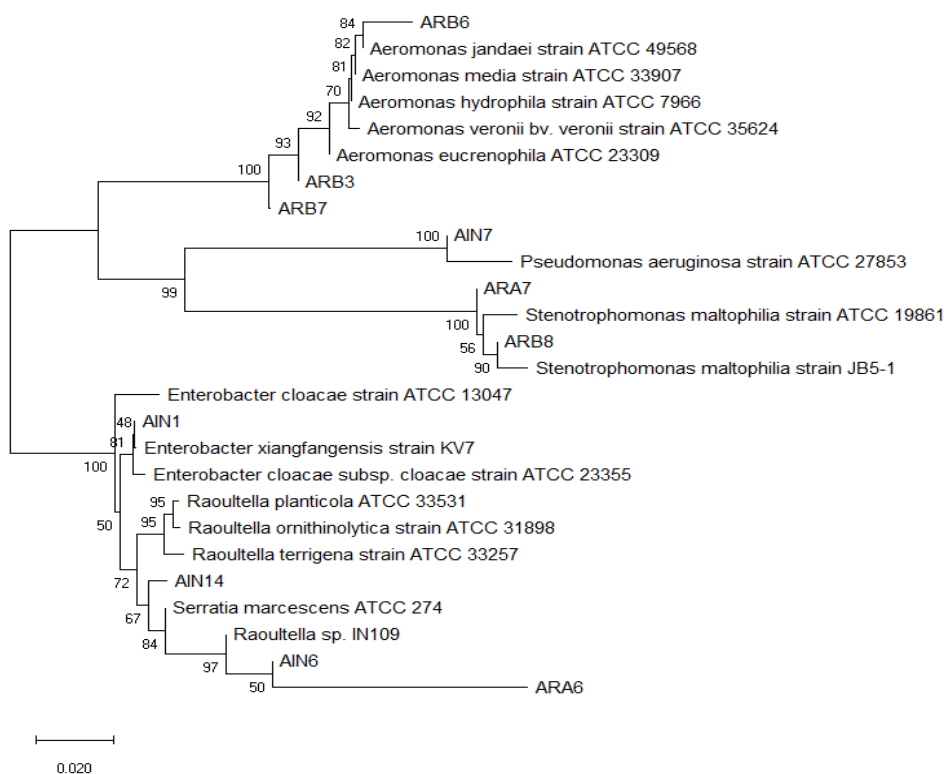


Fig. 5: Dendrogram based on the 16S rRNA gene sequences showing relationships ARB3, ARB6, ARB7, ARB8, ARA6, ARA7, AIN1, AIN6, AIN7, AIN14 isolates and their positions with representatives of other related taxa from the NCBI database. The sequences were aligned using the Neighbor-joining method.

obtained were analyzed by the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. BLAST results identified isolates from six genera and six species and nucleotide homology is shown in Table 3.

The phylogenetic analysis showed in the Figure 5 indicated three species of the genus *Aeromonas*, two species of the two genus *Stenotrophomonas* and *Enterobacter* and one species of each genus of *Pseudomonas*, *Raouletella* and *Serratia*.

The isolates ARB3 and ARB7 showed 99.70 % and 99.72 % homology respectively with *Aeromonas hydrophila*. This strain excels in the biodegradation of polyaromatic hydrocarbons such as those with 5 benzene rings as well as crude oil and degradation of Diesel oil by a degrading enzyme, alkane hydroxylase (Chikere et al., 2011).

The two isolates, ARB8 and ARA7 showed a similarity of 99.90 % and 99.88 % respectively to *Stenotrophomonas maltophilia*. The closeness of this species to the genus *Pseudomonas* on the phylogenetic tree is explained by a reclassification of many species of the genus *Pseudomonas* such as *P. betchi*, *P. geniculat* and *P. hibiscicolat* which have been included in the cluster of the genus *Stenotrophomonas maltophilia* (Anzai et al., 2000). Its plasmid-borne genes for dioxygenases can degrade pyrene (Chikere et al., 2011).

The isolate AIN1 has been classified in the database as *Enterobacter xiangfengensis* at 99.79% of homology. Its enzymatic activity can easily degrade alkanes (Chikere et al., 2011).

The isolate AIN7 has been identified at 99.69% as *Pseudomonas aeruginosa*, this species is predominant in the majority of polluted sites. This bacterium has been tested in the field of resistance to heavy metals, organic solvents and ultimately in biodegradation of hydrocarbons (Edward Raja, 2018). *Pseudomonas aeruginosa* is a typical strain in the production of rhamnolipid and the digestion of crude oil as the sole source of carbon by their alkane hydroxylases activity and plasmid-borne genes for dioxygenase (Chikere et al., 2011).

The isolate AIN14 identified as *Serratia marcescens* (99.86%) known in the health field, has proven itself in degradation of crude oil by alkane hydroxylases (Chikere et al., 2011). Several authors have studied it for the degradation of pesticides in soil, it can also reduce molybdenum and absorb radioac-

tive materials, uranium and radium (Zakeri et al., 2010).

The isolate AIN6 has been assimilated to the genus *Raouletella sp.* with a percentage of similarity of 99.52%. *Raouletella* is at the origin of a reclassification by Drancourt in 2001 of three species of *Klebsiella*, *K. planticola*, *K. ornithinolytica* and *K. terrigena* as *R. planticola*, *R. ornithinolytica* and *R. terrigena*, respectively. For many authors, the sequence comparison of the 16S rRNA gene used alone is not a powerful enough tool in the discrimination of species of a genus when the percentage of homology is too high (> 97%) (Leroy, 2015).

For the isolate ARB6, BLAST gave the same percentage of similarity (98.53%) with different reference strains: *Aeromonas veronii* bv *veronni*, *A. jandaei*, *A. media* and *A. hydrophila*. In such a case, the strain is assimilated to the genus, which is *Aeromonas* (Drancourt et al., 2000).

The isolate ARA6 had a similarity of 92% to the genus *Enterobacter sp.* According to Drancourt et al. (2000) and Agogué et al. (2005), a percentage of homology greater than 97% indicates the same species; the homology at 93% to 97% indicates the same genus but a different species, and the homology less than 93% more likely indicates a new species.

For isolates assimilated to the genus, the sequence comparison of the 16S rRNA gene used alone is not sufficient to attribute them to the species. This is why other identification tools should be used.

4. Conclusions

The overall results show that biodegradation of crude oil reach its maximum during the first 10 days of inoculation. After, the biodegrading process decelerates over time. This preliminary research gave encouraging results for more complementary studies, like the identification of specific genes of hydrocarbons degradation present in these bacteria, and their applications in different polluted sites in Algeria. A further investigation to quantify degrading crude oil by bacteria will be challenged to improve the efficiency of the bioremediation process in polluted soils.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Abdulla KJ, S A Ali IH Gatea NA Hameed and Maied SK (2019) Biodegradation of crude oil using local bacterial isolates. *Earth and Environmental Science* 388: 012-081
- Agogué H, Casamayor EO, Bourrain M., Obernosterer I, Joux F, Herndl GJ, Lebaron P (2005) A survey on bacteria inhabiting the sea surface microlayer of coastal ecosystems. *FEMS Microbiology Ecology* 54: 269–280
- Al-Bahrya SN, Elshafiea A, Al-Wahaibib YM, Al-Bemanib AS, Joshia SJ, Al-Lawatia A (2013) Isolation and characterization of biosurfactant/biopolymer producing spore forming bacteria from oil contaminated sites and oil field of Oman. *APCBEE Procedia* 5: 242 – 246.
- Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H, Oyaizu H (2000) Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1563–1589
- Arulazhagan P, Al-Shekri K, Huda Q, Godon JJ, M. Basahi J, Jeyakumar D (2017) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by an acidophilic *Stenotrophomonas maltophilia* strain AJH1 isolated from a mineral mining site in Saudi Arabia. *Extremophiles* 21:163–174.
- Bidja Abena MT, Chen G, Chen Z, Zheng X, Li S, Li T, Zhong W (2020) Microbial diversity changes and enrichment of potential petroleum hydrocarbon degraders in crude oil, diesel, and gasoline contaminated soil. *3 Biotech* 10: 42.
- Chekroud Z, Khamees Gouda M, Houhamdi M (2011) Biodegradation of Crude Oil in Marine Medium. *Journal of Proteomics & Bioinformatics* 04(10).
- Chettri B., Singh AK., 2019 Kinetics of hydrocarbon degradation by a newly isolated heavy metal tolerant bacterium *Novosphingobium panipatense* P5: ABC. *Bioresource Technology* 294:122-190
- Chikere CB, Okpokwasili GC, Chikere BO (2011) Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. *Biotech* 1:117–138. Deepika KV, Kalam S, Ramu Sridhar P, Podile AR, Bramhachari PV (2016) Optimization of rhamnolipid biosurfactant production by mangrove sediment bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KVD-HR42 using response surface methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* . 5: 38–47.
- Drancourt M, Bollet C, Carliz A, Martelin R, Gayral J.P, Raoult D (2000) 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 38 : 3623–3630.
- Edward Raja C (2018). Cadmium (heavy metals) bioremediation by *Pseudomonas aeruginosa*: A mini review. *Applied Water Science* 8:154
- Fahad A. Al-Dhabaan (2019) Morphological, biochemical and molecular identification of petroleum hydrocarbons biodegradation bacteria isolated from oil polluted soil in Dhahran, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences* 26:1247–1252
- Fang H, Deng Y, Ge Q, Mei J, Zhang H, Wang H, Yu Y (2018) Biodegradability and ecological safety assessment of *Stenotrophomonas* sp. DDT-1 in the DDT-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 158:145-153
- Hassanshahian M, Zeynalipour MS, Musa FH (2014) Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr provenance). *Marine Pollution Bulletin* 82:39–44
- John RC, Essien JP, Akpan SB, Okpokwasili GC (2012) Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-degrading Bacteria from Aviation Fuel Spill Site at Ibeno, Nigeria. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 88:1014–1019.
- Jyothi K, Surendra Babu K, Nancy Clara K, Amita Kashyap (2012) Identification and Isolation of Hydrocarbon Degrading Bacteria by Molecular Characterization. *Helix* 2:105-111
- Koolivand A, Abtahi H, Parhamfar M, Didehdar M, Saeedi R, Fahimirad S (2019) Biodegradation of high concentrations of petroleum compounds by using indigenous bacteria isolated from petroleum hydrocarbons-rich sludge: Effective scale-up from liquid medium to composting process. *Journal of Environmental Management* 248:109-228.
- Kumar S, Stecher G, Li, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
- Leroy J (2015) Evaluation De La Spectrometrie De Masse Maldi-Tof Et Du Sequençage Multi-Genique Pour L'identification Des *Raoultella* En Bacteriologie Medicale.
- Li H, Lai R, Jin Y, Fang X, Cui K, Sun S, Gong Y, Li H, Zhang Z, Zhang G, Zhang G (2020) Directional culture of petroleum hydrocarbon degrading bacteria for enhancing crude oil recovery. *Journal of Hazardous Materials* 390:122-160
- Morales-Guzmán G, Ferrera-Cerrato R, Torres-Bustillos LG, Arteaga-Garibay RI, Mendoza-López MR, Esquivel-Cote R, Alarcón A (2017) Diesel degradation by emulsifying bacteria isolated from soils polluted with weathered petroleum hydrocarbons. *Applied Soil Ecology* 121: 127–134
- Saitou N, Nei M, (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Syakti AD, Lestari P, Simanora S, Sari LK, Lestari F, Idris F, Agustidi T, Akhlus S, Hidayati NV, Riyanti (2019) Culturable hydrocarbonoclastic marine bacterial isolates from Indonesian seawater in the Lombok Strait and Indian Ocean. *Heliyon* 5:e01594
- Thavasi R, Jayalakshmi S, Banat IM (2011) Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresource Technology* 102: 772–778.
- Ting Adeline SY, Carol H, Tan C, Aw CS (2009) Hydrocarbon-degradation by isolate *Pseudomonas lundensis* UTAR FPE2. *Malaysian Journal of Microbiology* 2:104-108
- USEPA Method 3050 (1996) Acid digestion of sediments, sludges, and soils. Available from: <www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/3050b.pdf>. Revise Don December, 1996.
- Wang M, Deng B, Fu X, Sun H, Xu Z (2019). Characterizations of microbial diversity and machine oil degrading microbes in machine oil contaminated soil. *Environmental Pollution* 255:113190.
- Zakeri H, Jowkar B, Razmjoe M (2010) Parenting styles and resilience. *Procedia Social and Behavioral Sciences* 5:1067–1070
- Zdarta A, Dudzińska-Bajorek B, Nowak A, Guzik U, Kaczorek E (2017) Impact of potent bioremediation enhancing plant extracts on *Raoultella ornithinolytica* properties. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 145:274-282.