



Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée
Option : Interactions Micro-organismes, Hôtes et Environnements



THESE

PRESENTÉE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT 3^{ème} cycle
LMD

Par

Mme. BENGUENAB Asma

Bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures avec des champignons telluriques

Soutenue publiquement le : **03/02/2022** devant le jury de soutenance suivant :

Président	DJIBAOUI Rachid	Pr Université de Mostaganem
Directeur de thèse	CHIBANI Abdelwaheb	Pr Université de Mostaganem
Examineur	MEKHALDI Abdelkader	Pr Université de Mostaganem
Examineur	BEKADA Ahmed Med Ali	Pr Centre Universitaire de Tissemsilet

Dédicaces

Je dédie ce travail, tout d'abord à ma mère, source de la lumière dans ma vie, pour son soutien, son dévouement et son abnégation.

À celui qui a fait de moi une femme, mon père.

À mon très cher mari Abdelkader qui m'a toujours soutenu et encouragé, ce travail n'aurait jamais vu le jour sans ton aide, merci pour ta compréhension et tes sacrifices.

À mon adorable enfant Anes, source de joie et d'espoir dans ma vie, que dieu te protège.

À mes très cher frères Bilal et mohamed et ma chère sœur Khaoula, que dieu vous protège et vous donne le bonheur et la réussite dans votre vie.

À tous ceux que j'aime et qui m'aiment.

Remerciements

"الحمد لله الذي بنعمته تتم الصالحات"

Avant tout, je remercie « Allah » le tout puissant de m'avoir donné la force, la volonté, le courage et la patience pour mener ce travail à terme.

Je tiens tout d'abord, à exprimer mes vifs remerciements à mon directeur de thèse, Mr. CHIBANI Abdelwaheb, pour ses conseils, ses corrections, sa disponibilité, sa compréhension et sa confiance tout au long de ce travail.

Je remercie chaleureusement le Pr. Djibaoui Rachid, de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ma thèse mais aussi, pour tout ce qu'il m'a apporté tout au long de mes études, pour son écoute, sa gentillesse, et sa disponibilité. Qu'il soit assuré de ma respectueuse considération.

Je tiens à exprimer mon entière gratitude à Mr. MEKHALDI Abdelkader, professeur à l'université de Mostaganem et directeur du laboratoire de Microbiologie et Biologie Végétale et Mr. BEKADA Ahmed Mohamed Ali Professeur à Centre Universitaire de Tissemsilt, d'avoir accepté de juger ce travail de thèse et d'en être les rapporteurs.

Mes remerciements les plus chaleureux sont orientés à Mr. BENCHEHIDA Abdelkader pour le soutien informatique et statistique et le soutien moral durant toutes les années de cette étude.

Mes remerciements les plus distingués sont orientés éventuellement aux techniciens de laboratoires: Djahira HAMED et Amina TAHLAITI pour leur grande aide, leur disponibilité, leur gentillesse et leur patience et sans qui, je n'aurais pu avancer dans mes travaux de recherches. Aussi, un grand merci aux ingénieures de laboratoire Fatima et Nassima pour leur aide et leur gentillesse.

Un énorme merci à ma chère collègue Sabria BENSLIMANE, pour le grand soutien moral qu'elle m'a donné. Vous étiez un vrai ami.

Je tiens à remercier également Mme. DILMI. F et son mari pour leur aide dans la partie génétique.

Je remercie tous les professeurs de mon cursus universitaire à l'université de Mostaganem qui ont contribué à ce que je suis aujourd'hui, ainsi qu'à toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

المخلص

يشكل التلوث النفطي للتربة مشكلة بيئية مقلقة نظرا لسمية الهيدروكربونات النفطية ، بقائها الطويل في الطبيعة وتراكمها في السلاسل الغذائية. من بين التقنيات المختلفة لمعالجة التربة الملوثة، تعتبر المعالجة الحيوية بديلاً مهماً للطرق الأخرى بفضل انعكاساتها البيئية المتدنية وتكلفتها المنخفضة. وبالتالي فإن هذا العمل يهدف الى دراسة قدرة الفطريات الخيطية على تحليل النفط الخام والديزل وزيت المحركات المستخدم من أجل استغلالها في المعالجة الحيوية للتربة الملوثة بالهيدروكربونات النفطية.

يقترح هذا العمل قياس إمكانيات التحلل الحيوي لدى 35 عزلة فطرية تم عزلها من التربة الملوثة بالهيدروكربونات النفطية اصطناعيا بالمختبر، ومن التربة الملوثة على مستوى مصفاة أرزيو بالجزائر. تم تحديد العزلات الفطرية عن طريق خصائصها المورفولوجية. وكانت ستة عزلات فطرية قد تم انتقاؤها بعد الاختبارات الأولية للقدرة على أكسدة واستخدام الهيدروكربونات النفطية كمصدر للطاقة موضوع التوصيف الجزيئي، وذلك وفقا لطريقة التسلسل الجيني لمورثة الحمض النووي الريبوزي ARNr، وقد وصفت هذه العزلات على أنها الأنواع التالية: *Aspergillus terreus* ، *A. Purpureocillium lilacinum* ، *P. glabrum* ، *Penicillium chrysogenum* ، *A. fumigatus* ، *ustus*

أظهر القياس الكتلّي للتحلل الحيوي للهيدروكربونات في الوسط المعدني السائل أن النفط الخام كان الأكثر تحللاً بواسطة السلالات الفطرية بنسب تحلل تراوحت بين 30.43% إلى 55.98%، و أقصى نسبة تحلل للديزل كانت 54.61%. أما زيت المحركات المستخدم فهو الأقل تحللاً بواسطة السلالات المختارة. كما تمت دراسة حركية التحلل الحيوي للهيدروكربونات النفطية على فترات زمنية قدرها 10 أيام. وقد تم أيضا البحث عن درجة حرارة الحضان ودرجة حموضة الوسط الأولية المثاليان للتحلل الحيوي للهيدروكربونات، حيث أظهرت النتائج أنهما تختلفان باختلاف نوع السلالات الفطرية والزيوت النفطية المستعملة.

ومن جانب آخر كشفت التجارب المصغرة للمعالجة الفطرية للتربة الملوثة أن السلالات الفطرية (منفردة أو مجتمعة) فعالة في تطهير التربة من الملوثات وأظهرت السلالات المجتمعة فاعلية أكبر في المعالجة الحيوية للتربة الملوثة.

وبهدف تحسين قدرة الفطريات على التحلل الحيوي للهيدروكربونات أجرينا طفرات بالأشعة فوق البنفسجية على سلالتين مختلفتين حيث أشارت النتائج أن للطفرات تأثيرا ايجابيا أو سلبيا على قدرة التحلل الحيوي للهيدروكربونات النفطية.

إن هذه الدراسة تفتح آفاقاً جديدة لإدراج فطريات التربة في تطوير طرق جديدة للمعالجة الحيوية للتربة الملوثة.

الكلمات المفتاحية: المعالجة الحيوية ، الهيدروكربونات النفطية ، فطريات التربة ، التربة ، إحداث الطفرات .

Résumé

La contamination des sols par les hydrocarbures pétroliers constituent un problème préoccupant pour l'environnement du fait de leur toxicité, leur grande persistance et leur bioaccumulation dans les chaînes alimentaires. Parmi les différentes techniques de dépollution des sols, la bioremédiation est une alternative intéressante aux autres procédés grâce à son impact environnemental réduit et son faible coût. Ce travail repose ainsi sur l'étude des capacités des champignons filamenteux à dégrader le pétrole, le diesel et l'huile moteur usagée pour les utiliser dans la bioremédiation des sols pollués aux hydrocarbures pétroliers.

Notre travail propose de mesurer le potentiel de biodégradation de 35 isolats fongiques issus de sols contaminés aux laboratoires par les hydrocarbures pétroliers et de sols pollués provenant de la raffinerie d'Arzew (Algérie). Les isolats fongiques ont été identifiés morphologiquement puis six isolats, sélectionnés suite à des tests préliminaires pour la capacité d'oxyder et d'utiliser les hydrocarbures pétroliers comme source d'énergie, ont fait l'objet d'une caractérisation moléculaire par séquençage des zones ITS de l'ADN ribosomal. Ces isolats ont été identifiés comme *Aspergillus terreus*, *A. ustus*, *A. fumigatus*, *Penicillium chrysogenum*, *P. glabrum* et *Purpureocillium lilacinum*.

Les analyses gravimétriques de biodégradation en milieu minéral liquide ont montré que le pétrole brut a été le plus dégradé par les souches fongiques par des taux de dégradation de 30.43 % à 55.98 %. Le taux maximal de dégradation de diesel était 54.61%. L'huile usagée a été la moins dégradée par les souches sélectionnées. La cinétique de biodégradation des hydrocarbures pétroliers a été étudiée à des intervalles de 10 jours. La température d'incubation et le pH initial optimaux pour la biodégradation ont été recherchés et les résultats montrent qu'ils varient selon les souches fongiques et les huiles pétroliers dégradées.

Les essais de mycoremédiation en microcosmes de sols révèlent que les souches fongiques sont capables de décontaminer les sols pollués et que le consortium de trois souches est plus efficace dans la bioremédiation des sols pollués. La mutagénèse par les rayons Ultra-violet a été effectuée sur deux souches afin d'améliorer leur pouvoir de dégradation. Les résultats indiquent que les mutations ont apporté des capacités plus importantes ou réduites de dégradation des hydrocarbures pétroliers.

Cette étude ouvre ainsi de nouvelles perspectives pour l'utilisation des champignons telluriques dans le développement de nouveaux protocoles de bioremédiation des sols.

Mots clés : bioremédiation, hydrocarbures pétroliers, champignons telluriques, sol pollué, mutagénèse.

Abstract

Soils contamination by petroleum hydrocarbons is a crucial environmental problem because of their toxicity, their great persistence and their bioaccumulation within food chains. Among several soil cleaning techniques, bioremediation is an interesting alternative to other processes thanks to its reduced environmental impact and low cost. Thus this work is based on the study of filamentous fungi abilities to degrade crude oil, diesel and used motor oil for application in bioremediation of petroleum hydrocarbons polluted soils.

Our work aims to evaluate the biodegradation potential of 35 fungi isolated from artificially petroleum hydrocarbons contaminated soils and hydrocarbons polluted soils from Arzew refinery (Algeria). The fungal isolates were morphologically identified then six isolates selected following preliminary tests for their ability to oxidize and to use petroleum hydrocarbons as an energy source were the subject of molecular identification by sequencing ITS region of the Ribosomal DNA. These isolates were identified as *Aspergillus terreus*, *A. ustus*, *A. fumigatus*, *Penicillium chrysogenum*, *P. glabrum* and *Purpureocillium lilacinum*.

Gravimetric analysis for biodegradation in liquid mineral medium showed that crude oil was the most degraded by fungal strains with degradation rates in the range of 30.43% to 55.98%. The maximum diesel degradation rate was 54.61%. Used oil was the least degraded by the selected strains. The degradation kinetic of petroleum hydrocarbons was studied at a time interval of 10 days. The optimum incubation temperature and initial pH for biodegradation were investigated. It appears that they vary according to the fungal strains and petroleum oils.

Mycoremediation experiments in soil microcosms reveal that fungal strains were efficient in polluted soils decontamination and the consortium of three strains was more effective in bioremediation of polluted soils. Ultraviolet ray mutagenesis was performed on two selected strains in order to improve their degradation potential. The results indicate that mutations brought greater or reduced capacities for degradation of petroleum hydrocarbons.

This study draws new perspectives for application of telluric fungi in the development of new soil bioremediation protocols.

Key words: bioremediation, petroleum hydrocarbons, telluric fungi, soil, mutagenesis.

Table des Matières

<i>Dédicaces</i>	i
<i>Remerciements</i>	ii
المخلص.....	iii
Résumé	iv
Abstract.....	v
Table des Matières.....	vi
Liste des Tableaux	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des abréviations	xv
Introduction	1
Chapitre I : Les hydrocarbures pétroliers	4
I.1 Définitions.....	4
I.1.1 Hydrocarbure	4
I.1.2 Pétrole brut	4
I.1.3 Hydrocarbures pétroliers	4
I.1.4 Hydrocarbures pétroliers totaux (TPH)	4
I.2 Origine	5
I.3 Composition chimique	5
I.4 Composition pétrolière.....	6
I.4.1 Les hydrocarbures saturés	7
I.4.1.1 Les alcanes linéaires.....	8
I.4.1.2 Les alcanes ramifiés	8
I.4.1.3 Les cycloalcanes.....	8
I.4.2 Les hydrocarbures aromatiques	8
I.4.2.1 Les hydrocarbures aromatiques monocycliques (HAM)	8
I.4.2.2 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).....	9
I.4.3 Les composés polaires non-hydrocarbonés	10
I.4.4 Les asphaltènes	10
I.4.5 Les résines	11
I.4.6 Composés soufrés	11
I.4.7 Composés oxygénés	11
I.4.8 Composés azotés.....	12
I.4.9 Les métaux.....	12
I.5 Le raffinage du pétrole brut	12
I.6 Les produits pétroliers.....	13
I.6.1 Les produits énergétiques (carburants-combustibles)	13

I.6.2	Les produits non énergétiques	15
I.7	Propriétés physiques du pétrole et des produits pétroliers.....	16
I.7.1	Densité (specific gravity).....	16
I.7.2	Point d'écoulement (pour point).....	17
I.7.3	Viscosité	17
I.7.4	Point d'éclair (flash point).....	17
I.7.5	La tension interfaciale	18
I.8	Les hydrocarbures en Algérie	18
I.8.1	Aperçu sur la raffinerie d'Arzew	18
I.8.2	Les problèmes liés aux hydrocarbures en Algérie	20
Chapitre II : Pollution des sols par les hydrocarbures pétroliers		22
II.1	Systèmes dynamiques du sol	22
II.1.1	Phénomènes chimiques.....	22
II.1.2	Phénomènes physiques	23
II.1.3	Phénomènes physico-chimiques.....	23
II.2	Devenir des hydrocarbures pétroliers dans le sol	23
II.2.1	Evaporation.....	24
II.2.2	Adsorption	24
II.2.3	Photo-oxydation.....	25
II.2.4	Biodégradation.....	25
II.3	Mouvement du pétrole sur la surface terrestre.....	25
II.4	La toxicité des hydrocarbures pétroliers	26
II.5	Impact de la pollution pétrolière sur l'environnement.....	27
II.5.1	Écosystème terrestre	27
II.5.2	Écosystèmes marins.....	29
Chapitre III : Bioremédiation des sols pollués aux hydrocarbures pétroliers.....		30
III.1	Les techniques de bioremédiation	30
III.1.1	Bioremédiation <i>in-situ</i>	30
III.1.1.1	La biostimulation.....	31
III.1.1.2	La bioaugmentation.....	31
III.1.2	Bioremédiation <i>ex-situ</i>	32
III.1.2.1	Land farming	32
III.1.2.2	Biopiling.....	32
III.1.2.3	Compostage.....	32
III.1.2.4	Bioréacteurs.....	32
III.2	La biodégradation microbienne des hydrocarbures pétroliers	33
III.3	La biodégradation des hydrocarbures par les champignons (mycodégradation) ...	33
III.3.1	Description morphologique générale des champignons.....	34

III.3.2	Phylogénie des champignons.....	36
III.3.3	Mécanismes de biodégradation des hydrocarbures pétroliers par les champignons.....	37
III.3.3.1	Dégradation des hydrocarbures aliphatiques.....	38
III.3.3.2	Dégradation des hydrocarbures aromatiques	39
III.3.4	Les facteurs affectant la biodégradation des hydrocarbures.....	40
III.3.4.1	Composition chimique des hydrocarbures	41
III.3.4.2	Etat physique des hydrocarbures.....	41
III.3.4.3	Température	41
III.3.4.4	pH.....	42
III.3.4.5	Oxygène	42
III.3.4.6	Eléments nutritifs	42
III.3.4.7	Facteurs biologiques.....	43
III.4	Cinétiques de biodégradation des hydrocarbures pétroliers dans le sol.....	43
Chapitre IV : Matériel et méthodes		45
IV.1	Produits pétroliers utilisés	45
IV.2	Echantillonnage du sol	45
IV.2.1	Sites de prélèvement des échantillons de sol.....	45
IV.2.2	Conditions d'échantillonnage	46
IV.2.3	Caractérisation du sol et de la pollution	46
IV.2.3.1	Dosage des hydrocarbures totaux dans le sol pollué.....	46
IV.2.3.2	Analyses physico-chimiques des échantillons de sol.....	47
IV.2.4	Contamination du sol par les produits pétroliers	49
IV.3	Isolement de souches fongiques saprotrophes	49
IV.3.1	La méthode des suspensions-dilutions	49
IV.3.2	La méthode d'inoculation directe	50
IV.4	Identification morphologiques des champignons.....	51
IV.4.1	Observations macroscopiques	51
IV.4.2	Observations microscopiques.....	52
IV.4.3	Conservation des champignons	53
IV.5	Identification moléculaire des isolats sélectionnés	53
IV.5.1	Extraction d'ADN fongique	53
IV.5.2	Amplification d'ADN.....	54
IV.5.3	Séquençage	55
IV.5.4	Analyse phylogénétique	55
IV.6	Tests préliminaire pour la biodégradation des hydrocarbures pétroliers	56
IV.6.1	Test de l'indicateur redox 2,6-dichlorophénol indophénol (DCPIP)	56
IV.6.2	Test de dégradation utilisant un milieu spécifique	56

IV.7	Etude quantitative de la biodégradation des hydrocarbures.....	57
IV.7.1	Test de biodégradation des hydrocarbures en milieu liquide	57
IV.7.1.1	Extraction des hydrocarbures et analyse gravimétrique.....	57
IV.7.1.2	Détermination de la biomasse fongique	58
IV.7.1.3	Détermination du pH final de la culture.....	58
IV.7.2	Etude de la cinétique de biodégradation.....	60
IV.8	Optimisation de biodégradation des hydrocarbures pétroliers.....	60
IV.8.1	pH optimal	60
IV.8.2	Température optimale.....	61
IV.9	Essais de mycoremédiation en microcosmes de sol.....	61
IV.9.1	Préparation de l'échantillon de sol	61
IV.9.1.1	Site d'échantillonnage	61
IV.9.1.2	Prétraitement du sol.....	62
IV.9.1.3	Contamination du sol par les hydrocarbures	62
IV.9.2	Préparation de l'inoculum	62
IV.9.2.1	Sélection et préparation du consortium.....	62
IV.9.3	Préparation du Bulking agent (agent gonflant).....	63
IV.9.4	Description de l'expérimentation (développement des microcosmes).....	64
IV.9.5	Extraction et dosage des hydrocarbures totaux résiduels	64
IV.10	Amélioration du pouvoir de dégradation des hydrocarbures par mutagénèse	65
IV.10.1	Préparation de l'inoculum.....	66
IV.10.2	Traitement par les rayons Ultra-violet	66
IV.10.3	Estimation du nombre de spores vivante après irradiation par UV	67
IV.10.4	Sélection des mutants.....	67
IV.10.5	Biodégradation des hydrocarbures par les mutants sélectionnés (analyse gravimétrique)	67
IV.11	Analyses statistiques.....	68
Chapitre V : Résultats et discussion		69
V.1	Caractérisation des échantillons du sol	69
V.1.1	Dosage des hydrocarbures totaux dans le sol pollué	69
V.1.2	Caractéristiques physico-chimiques du sol non contaminé.....	69
V.2	Isolement des champignons filamenteux saprotrophes.....	70
V.2.1	Population fongique totale.....	70
V.2.2	Isolats fongiques purifiés.....	71
V.3	Identification génotypique des isolats fongiques.....	76
V.4	Tests préliminaires pour la biodégradation des hydrocarbures pétroliers	79
V.4.1	Test de l'indicateur redox 2,6-dichlorophénol indophénol (DCPIP)	80
V.4.2	Test de dégradation utilisant le milieu spécifique HAF	82

V.5	Etude quantitative de la biodégradation des hydrocarbures pétroliers	84
V.5.1	Biodégradation de pétrole par les isolats sélectionnés	84
V.5.2	Biodégradation du diesel par les isolats sélectionnés	88
V.5.3	Biodégradation de l'huile usagée	91
V.6	Etude de la cinétique de biodégradation des hydrocarbures en milieu liquide.....	93
V.7	Conditions optimales de biodégradation des hydrocarbures pétroliers	96
V.7.1	Détermination du pH optimal	96
V.7.2	Détermination de la température optimale	101
V.8	Mycoremédiation en microcosmes de sol pollué par les hydrocarbures pétroliers .	105
V.8.1	Caractéristiques physico-chimiques du sol.....	106
V.8.2	Sélection d'un consortium – Test d'antagonisme.....	106
V.8.3	Evaluation de la mycoremédiation en microcosmes de sol.....	108
V.8.3.1	Mycoremédiation du sol pollué par le pétrole.....	108
V.8.3.2	Mycoremédiation du sol pollué par le diesel	110
V.8.3.3	Mycoremédiation du sol pollué par l'huile usagée	112
V.9	Amélioration du pouvoir de dégradation des hydrocarbures par mutagenèse	114
V.9.1	Effets des rayons UV sur les souches étudiées.....	114
V.9.2	Sélection des mutants	115
V.9.3	Biodégradation des hydrocarbures par les mutants sélectionnés (la méthode gravimétrique)	116
Conclusion & perspectives		119
Références Bibliographiques		123

Liste des Tableaux

Tableau 1. Composition élémentaire du pétrole brut	7
Tableau 2. Catégories des pétroles bruts	17
Tableau 3. Mixture réactionnelle pour amplification PCR	54
Tableau 4. Conditions des cycles de la température PCR	55
Tableau 5. Propriétés physico-chimiques du sol (site de Kharrouba)	70
Tableau 6. Description macroscopiques et identification morphologique des isolats fongiques	75
Tableau 7. Présentation des souches les plus proches, le pourcentage de similarité, numéros d'accession et l'identité des isolats sélectionnés pour l'identification génotypique	77
Tableau 8. Intensité de décolorisation de l'indicateur 2,6-DCPIP et la croissance mycélienne observée après 14 jours d'incubation	81
Tableau 9. Croissance des champignons isolés dans le milieu spécifique HAF en présence de pétrole, diesel ou l'huile usagée comme source de carbone, après 28 jours d'incubation	83
Tableau 10. Valeurs de pH final dans les milieux contenant le pétrole, après 40 jours d'incubation	88
Tableau 11. Valeurs de pH final dans les milieux contenant le diesel après 40 jours d'incubation	91
Tableau 12. Valeurs du pH final dans les milieux contenant l'huile usagée après 40 jours d'incubation	93
Tableau 13. Les paramètres du modèle cinétique du premier ordre de biodégradation de pétrole, diesel et l'huile usagée par les isolats fongiques en milieu liquide	95
Tableau 14. Propriétés physico-chimiques du sol utilisé pour la bioremédiation en microcosmes	106
Tableau 15. Activité inhibitrice entre les champignons par test d'antagonisme	107
Tableau 16. Les paramètres de la cinétique de biodégradation du pétrole dans les microcosmes de sol	110
Tableau 17. Les paramètres de la cinétique de biodégradation du diesel dans les microcosmes de sol	112
Tableau 18. Les paramètres de la cinétique de biodégradation de l'huile usagée dans les microcosmes de sol	113

Liste des figures

Figure 1. Principaux hydrocarbures pétroliers.....	6
Figure 2. Représentation schématique des principales familles d'hydrocarbures et autres composés d'un pétrole	7
Figure 3. Structures chimiques des BTEX	9
Figure 4. Formule développée, nom et masse moléculaire des 16 HAP de la liste prioritaire de l'agence pour la protection de l'environnement des Etats-Unis (US-EPA)	10
Figure 5. Exemples de la structure moléculaire des : a) asphaltènes, b) résines et c) acides naphténiques	12
Figure 6. Schéma général de la raffinerie d'Arzew	20
Figure 7. Devenir d'un polluant organique au niveau du sol	24
Figure 8. Pénétration du pétrole dans le sol.....	26
Figure 9. Ultrastructure de la cellule fongique et catégories d'hyphes présentes chez les espèces filamenteuses	35
Figure 10. Schématisation de la structure de la paroi fongique.....	35
Figure 11. Les grandes divisions des Eumycètes	36
Figure 12. Dégradation aérobie des hydrocarbures aliphatiques par les champignons. Les voies terminales, diterminales et subterminales possibles pour la dégradation des n-alcane sont illustrées	39
Figure 13. Différentes voies de dégradation aérobie d'un HAP par des champignons.....	40
Figure 14. Situation géographique du site de prélèvement du sol non contaminé (région de Kharrouba).....	45
Figure 15. Carte de l'Algérie, région d'échantillonnage du sol contaminé par les hydrocarbures pétroliers (raffinerie d'Arzew-Oran).....	46
Figure 16. Montage d'extraction des hydrocarbures totaux par l'extracteur de Soxhlet.....	47
Figure 17. Isolement des souches fongiques par la méthode d'inoculation directe et la méthode des suspensions dilutions	51
Figure 18. La technique de la culture sur lame. (a) montage de la culture sur lame. (b) les spores sur la culture après incubation. (c) examen microscopique de la lamelle posé sur un colorant. (d) examen microscopique du bloc de gélose sporulé.....	53
Figure 19. Test de dégradation des hydrocarbures par l'indicateur redox DCPIP	56
Figure 20. Protocole de dégradation des hydrocarbures en milieu HAF.....	57
Figure 21. Les étapes de l'étude quantitative de la dégradation du pétrole.....	59
Figure 22. Localisation géographique du site d'échantillonnage	61
Figure 23. Site d'échantillonnage du sol	62
Figure 24. Schéma de l'expérience d'antagonisme sur boîte de pétrie (milieu PDA)	63
Figure 25. Déroulement du test de mycoremédiation en microcosme de sol.....	65
Figure 26. (a) la chambre à UV. (b) irradiation de la solution de spores	67
Figure 27. Densités de la population fongique dans les échantillons de sol : (a) contaminés artificiellement par les hydrocarbures pétroliers, (b) prélevés de la raffinerie d'Arzew.....	71
Figure 28. Aspects macroscopiques et microscopiques des champignons isolés du sol pollué au l'huile usagée	72
Figure 29. Aspects macroscopiques et microscopiques des champignons isolés du sol pollué par le pétrole	73
Figure 30. Aspects macroscopiques et microscopiques de quelques champignons isolés du sol pollué par le diesel.....	73
Figure 31. Aspects macroscopiques et microscopiques de quelques champignons isolés du sol pollué de la raffinerie d'Arzew.....	74

Figure 32. Arbres phylogénétiques basé sur les séquences ITS de l'ADNr des isolats du même genre et des espèces apparentées trouvées sur GenBank. A : relations phylogénétiques entre isolats du genre <i>Aspergillus</i> , B : <i>Purpureocillium</i> et C : <i>Penicillium</i>	79
Figure 33. Changement de couleur de l'indicateur DCPIP par le témoin et quelque isolats en présence de (a) pétrole, (b) diesel et (c) l'huile usagée, après 14 jours.....	80
Figure 34. Croissance de quelque isolats fongiques en milieu HAF en présence de (a) pétrole, (b) diesel et (c) l'huile usagée, après 28 jours d'incubation.....	84
Figure 35. Taux de biodégradation de pétrole par les isolats fongiques après 40 jours d'incubation en milieu liquide.....	85
Figure 36. Quantité de biomasse fongique accumulée dans le milieu contenant du pétrole et les témoins correspondants, après 40 jours d'incubation.	87
Figure 37. Taux de biodégradation de diesel par les isolats fongiques après 40 jours d'incubation en milieu liquide.....	88
Figure 38. Quantité de biomasse fongique accumulée dans le milieu contenant le diesel et les témoins correspondants, après 40 jours d'incubation.....	89
Figure 39. Taux de biodégradation de l'huile usagée par les isolats fongiques après 40 jours d'incubation en milieu liquide.....	91
Figure 40. Quantité de biomasse fongique accumulée dans le milieu contenant l'huile usagée et les témoins correspondants, après 40 jours d'incubation.	92
Figure 41. Concentration de pétrole et biomasse fongique accumulée dans le milieu BH pendant la période d'incubation	93
Figure 42. Concentration de diesel et biomasse fongique accumulée dans le milieu BH pendant la période d'incubation	94
Figure 43. Concentration de l'huile usagée et biomasse fongique accumulée dans le milieu BH pendant la période d'incubation	94
Figure 44. Effets de différents pH sur le pourcentage de dégradation de pétrole par les isolats PB2, HM3 et HM4.....	97
Figure 45. Effets de différents pH sur la quantité de biomasse récoltée par les isolats fongiques en présence de pétrole.....	98
Figure 46. Effets de différents pH sur le pourcentage de dégradation de diesel par les isolats HM1, HM3 et DSL1.....	98
Figure 47. Effets de différents pH sur la quantité de biomasse accumulée par les isolats fongiques en présence de diesel.....	99
Figure 48. Effets de différents pH sur le pourcentage de dégradation de l'huile usagée par les isolats PB2 et HM3.....	100
Figure 49. Effets de différents pH sur la quantité de biomasse accumulée par les isolats fongiques en présence de l'huile usagée.....	101
Figure 50. Effets de différentes température d'incubation sur le pourcentage de dégradation de pétrole par les isolats PB2, HM3 et HM4.....	101
Figure 51. Effets de différentes températures d'incubation sur la quantité de biomasse accumulée par les isolats fongiques en présence de pétrole.....	102
Figure 52. Effets de différentes température d'incubation sur le pourcentage de dégradation de diesel par les isolats HM1, HM3 et DSL1.....	103
Figure 53. Effets de différentes températures d'incubation sur la quantité de biomasse accumulée par les isolats fongiques en présence de diesel.....	104
Figure 54. Effets de différentes température d'incubation sur le pourcentage de dégradation de l'huile usagée par les isolats HM1, HM3 et DSL1.....	105
Figure 55. Effets de différentes températures d'incubation sur la quantité de biomasse accumulée par les isolats fongiques en présence de l'huile usagée.....	105
Figure 56. Effets antagonistes entre les champignons par inhibition directe sur milieu PDA	107

Figure 57. Biodégradation des hydrocarbures pétroliers totaux dans les microcosmes de sols pollués au pétrole.....	108
Figure 58. Biodégradation des hydrocarbures totaux dans les microcosmes de sols pollués par le diesel.....	111
Figure 59. Biodégradation des hydrocarbures totaux dans les microcosmes de sols pollués par l'huile usagée.....	112
Figure 60. La courbe de survie des souches PB1 et HM3 après exposition au UV	115
Figure 61. Aspect macroscopique des souches mères HM3 et PB1 et quelques souches mutantes sélectionnées	116
Figure 62. Pourcentage de dégradation des hydrocarbures pétroliers par la souche mère PB1 et ses mutantes.....	116
Figure 63. Pourcentage de dégradation des hydrocarbures pétroliers par la souche mère HM3 et ses mutantes.....	117

Liste des abréviations

°C	: Degré Celsius
°F	: Degré Fahrenheit
µl	: microlitre
ADN	: Acide désoxyribonucléique
API	: American Petroleum Institute
ARN_r	: Acide ribonucléique ribosomal
BH	: Bushnell-Haas
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
BTEX	: Benzène, Toluène, Ethylbenzène, Xylènes
CFU	: Colony forming unit
CH₄	: Méthane
CO₂	: Dioxyde de carbone
DCPIP	: Dichlorophénol indophénol
dS	: deciSiemens
DSL	: Diesel
h	: heure
H₂O	: monoxyde de dihydrogène / Eau
HAF	: hydrocarbon-adapted fungi
HAM	: Hydrocarbures aromatiques monocycliques
HAP	: Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HM	: Huile moteur
ITS	: internally transcribed spacer
nm	: nanomètre
N-P-K	: Azote, Phosphore et Potassium
p/p	: poids/poids
PB	: Pétrole brut
PCR	: Polymerase Chain Reaction
pH	: Potentiel Hydrogène
ppm	: Partie par millions
TM	: Tonne métrique
TPH	: Total petroleum hydrocarbons
UV	: Ultraviolet
v/v	: volume/volume
µS	: micro siemens

Introduction

Introduction

La demande mondiale ininterrompue des produits pétroliers comme sources d'énergie a augmenté les activités de production, de raffinage et de distribution de pétrole, ce qui a entraîné le déversement d'énormes quantités d'hydrocarbures pétroliers dans l'environnement. La pollution du sol par les hydrocarbures pétroliers est un problème préoccupant dans le monde entier, car plus que 90% de la charge environnementale des hydrocarbures pétroliers est simplement stockée dans le sol, ce qui indique que le sol est le principal puits de ces hydrocarbures dans l'environnement terrestre (**Kuppusamy et al., 2020**).

Les déversements accidentels des hydrocarbures peuvent contenir du pétrole brut ou des produits pétroliers raffinés tels que le diesel, le mazout ou les huiles lubrifiantes. Les composés toxiques dans le pétrole brut consistent en une large gamme d'hydrocarbures, de composés azotés, oxygénés, soufrés et de métaux lourds, qui peuvent avoir des effets aigus et chroniques sur la flore et la faune (**Yavari et al., 2015**). Les produits pétroliers, par leur nature persistante, affectent la qualité du sol en modifiant ses propriétés physiques, physiologiques, biochimiques et la diversité microbienne hétérogène intrinsèque (**Roy et al., 2014**). En général, la santé humaine et la sécurité des écosystèmes sont directement influencées par l'accumulation de produits pétroliers dans l'environnement (**Hussain et al., 2019**).

Devant la toxicité des polluants et la complexité de prise en charge, de nombreuses techniques de dépollution ont été développées. Ces techniques peuvent utiliser un procédé physico-chimique et/ou biologique, être mises en œuvre *in situ* ou bien *ex situ*. Les méthodes physico-chimiques sont le plus souvent coûteuses et présentent parfois des effets indésirables. D'autre part, l'efficacité et le faible impact écologique qu'offrent certaines méthodes biologiques, basées sur les capacités "épuratrices" de certains organismes dont les microorganismes, soutiennent leur développement pour la prise en charge des sites et sols pollués (**Quentin, 2019**).

La bioremédiation est une alternative respectueuse de l'environnement et économique pour la conversion efficace de composés toxiques et récalcitrants en produits non toxiques en appliquant des processus biologiques naturels. Cette technique fait intervenir différents types d'organismes (bactéries, champignons, plantes) qui sont appliqués dans le système pollué afin d'entraîner la dégradation et l'élimination des polluants en effectuant diverses réactions physiques et chimiques comme une partie de leur métabolisme (**Deshmukh et al., 2016**).

La mycoremédiation est une forme de bioremédiation dans laquelle des champignons sont utilisés pour décontaminer les zones polluées. Les champignons sont des organismes eucaryotes présentant un potentiel important dans le domaine de la biodégradation des polluants organiques (**Ceci et al., 2019**). En effet, les champignons présentent plusieurs avantages physiologiques et métaboliques, ils sécrètent une large variété d'enzymes capables de dégrader des substances polymériques divers, et ils ne se lient pas uniquement, dans leur mode de nutrition, aux matières organiques solubles prêt à l'absorption (**Harms et al., 2011**). Par ailleurs, les champignons présentent une adaptation physiologique distincte pendant la croissance par leur thalle filamenteux (hyphes), un mode végétatif qui permet la translocation interne des nutriments sur des matériaux solides tels que les particules de sol et le bois sans avoir besoin d'une phase liquide (**Prenafeta-Boldú et al., 2018**). Il constitue un immense réseau cellulaire interconnecté en trois dimensions qui explore le sol et qui peut atteindre des tailles impressionnantes (**Quentin, 2019**). De plus, de nombreux champignons tolèrent une disponibilité limitée en eau et en nutriments. Ces caractéristiques font des champignons des organismes capables de s'adapter et d'explorer tous les environnements.

De nombreuses études ont été concentrées sur la capacité des souches fongiques telluriques à dégrader les hydrocarbures pétroliers (**Husaini et al., 2008; Zafra et al., 2014; Maddela et al., 2015**). Ces souches sont en effet plus adaptées aux conditions environnementales du sol, ce qui les rend théoriquement plus à même de subir la compétition des autres organismes présents. En particulier les souches saprotrophes qui décomposent la matière organique contenant des molécules complexes telles que la lignine et ont donc un potentiel d'utilisation dans le processus de bioremédiation (**Fayeulle, 2013**). L'isolement de champignons cultivables à partir de sols pollués par les hydrocarbures fournit des souches fongiques plus adaptées aux conditions polluées que les souches directement obtenues à partir des collections de cultures (**Godoy et al., 2016**).

La bioremédiation des sols pollués aux hydrocarbures peut être achevée par deux stratégies : la stimulation des micro-organismes indigènes en optimisant les nutriments, la température, le pH et les conditions d'alimentation en oxygène (biostimulation), ou en ajoutant un consortium microbien enrichi à la population microbienne existante (bioaugmentation). Une exigence importante est la présence de micro-organismes dotés des capacités métaboliques appropriées. Si ces micro-organismes sont présents, des taux optimaux de croissance et de biodégradation des hydrocarbures peuvent être maintenus en s'assurant

que des concentrations adéquates de nutriments et d'oxygène sont présentes et que le pH et la température sont convenables (**Das et Chandran, 2011**).

Il est ainsi intéressant d'isoler des champignons telluriques à partir de sols contaminés pour leurs potentialités de résistance aux toxicités des polluants, et de biodégradation des hydrocarbures pétroliers.

Les objectifs de ce travail de thèse sont d'isoler, identifier et de tester des isolats fongiques d'origine tellurique vis-à-vis la biodégradation de trois hydrocarbures pétroliers : pétrole brut, diesel et l'huile moteur usagée, dans le but de leur utilisation dans la remédiation des sols contaminés par ces polluants pétroliers.

Pour remplir ces objectifs, plusieurs volets ont été développés. Le premier décrit l'isolement et l'identification morphologique des champignons filamenteux des sols pollués aux hydrocarbures pétroliers. Ensuite, des tests préliminaires ont été effectués, pour sélectionner les isolats fongiques dégradants le pétrole, le diesel et/ou l'huile moteur usagée. Par la suite, des isolats sélectionnés ont subi une identification moléculaire.

Le deuxième volet concerne l'étude quantitative des capacités de biodégradation des hydrocarbures pétroliers, en milieux minéral, par les isolats sélectionnés. L'analyse gravimétrique est appliquée dans cette étape.

Le troisième volet consiste en une optimisation des conditions de culture pour améliorer le pouvoir de dégradation en cherchant la température et le pH optimaux.

La quatrième partie correspond à une démarche de bioaugmentation conduite en microcosmes de sols au laboratoire. Des isolats fongiques sélectionnés ont été utilisés pour la bioremédiation des échantillons de sols artificiellement contaminés au pétrole, diesel ou l'huile usagée.

Dans le dernier volet, une approche génétique a été développée pour améliorer le potentiel de biodégradation de deux champignons sélectionnés en appliquant des mutations aléatoires par les rayons ultra-violets (Mutagénèse).

Partie bibliographique

Chapitre I:

**Les hydrocarbures
pétroliers**

Chapitre I : Les hydrocarbures pétroliers

Les hydrocarbures pétroliers sont parmi les contaminants les plus courants dans l'environnement. Ils comprennent une large famille de plusieurs composés d'hydrocarbures qui proviennent à l'origine du pétrole brut utilisé pour fabriquer des produits pétroliers. Le rejet d'hydrocarbures dans l'environnement, accidentellement ou suite à des activités humaines, est la principale cause de pollution des sols, de l'eau et de l'air (**Bardi et al., 2000**).

Le traitement du pétrole brut et l'utilisation généralisée de différents hydrocarbures pétroliers pour le transport, le chauffage, l'industrie, etc, entraînent la libération d'hydrocarbures dans l'environnement par des défaillances opérationnelles, des fuites à long terme ou des déversements accidentels (**Kuppusamy et al., 2020**).

I.1 Définitions

I.1.1 Hydrocarbure

Un hydrocarbure est tout composé chimique constitué uniquement d'atomes de carbone (C) et hydrogène (H). Ils contiennent tous une chaîne carbonée et ont des atomes H attachés à la chaîne. La plupart des hydrocarbures sont combustibles (**Kuppusamy et al., 2020**).

I.1.2 Pétrole brut

Le pétrole brut est un produit naturel non raffiné composé d'un mélange complexe d'hydrocarbures et d'autres matières organiques. Il s'agit d'un fluide visqueux foncé naturellement présent dans certaines formations rocheuses. Le pétrole brut, un type de combustible fossile, peut être raffiné pour produire des produits utilisables tels que l'essence, le diesel et diverses autres formes de produits pétrochimiques. Il est hautement inflammable et génère de l'énergie (**Kumar et al., 2011**).

I.1.3 Hydrocarbures pétroliers

Les hydrocarbures pétroliers sont des constituants du pétrole qui se composent presque entièrement des éléments de C et H. Ce ne sont pas des entités distinctes mais représentent plutôt une continuation sur une large gamme par le poids moléculaire des hydrocarbures individuels. L'essence, le diesel et les produits liés contiennent des centaines et parfois des milliers d'hydrocarbures pétroliers différents (**Kuppusamy et al. 2020**).

I.1.4 Hydrocarbures pétroliers totaux (TPH)

Les hydrocarbures pétroliers totaux (TPH) est un terme utilisé pour décrire une large famille de plusieurs centaines de composés chimiques qui proviennent à l'origine du pétrole brut. En ce sens, les TPH sont un mélange de produits chimiques. La définition des TPH dépend de la méthode analytique utilisée, car les TPH se réfèrent à la concentration totale des hydrocarbures pétroliers extraits et mesuré par une méthode. Les TPH peuvent être simplement indiqués comme étant la quantité totale récupérable des hydrocarbures pétroliers (Todd *et al.*, 1999). Généralement, le dosage des TPH fournissent un moyen de quantifier l'ampleur (en termes relatifs) de la contamination pétrolière qui reste dans l'environnement, c'est-à-dire de déterminer si la contamination pétrolière est présente dans l'environnement qui pourrait poser un risque de contact direct (Kuppusamy *et al.*, 2020).

I.2 Origine

Les hydrocarbures pétroliers se présentent sous plusieurs formes et combinaisons. Il existe des pétroles légers et des pétroles lourds, du gaz humide et du gaz sec. Cependant, ce qu'ils ont tous en commun est une origine de matière organique; ce sont les plantes et les petits animaux qui étaient autrefois vivants et qui ont créé la «roche mère».

Les roches mères qui produisent des hydrocarbures sont riches en certains types de matières organiques. Les changements chimiques après l'enterrement convertissent les tissus végétaux et animaux en molécules complexes qui finissent par produire du pétrole ou du gaz naturel par les effets de la chaleur et de la pression sur les sédiments piégés sous la surface de la terre pendant des millions d'années. Des mini-pores dans la roche permettent au pétrole de s'infiltrer. Ces roches réservoirs retiennent le pétrole comme une éponge, confinée par d'autres couches à faible perméabilité qui forment des pièges. Les progrès technologiques ont régulièrement amélioré la capacité de trouver et d'extraire du pétrole et du gaz pour les convertir en carburants, lubrifiants et autres produits de consommation utiles (Aminzadeh et Dasgupta, 2013).

I.3 Composition chimique

Les hydrocarbures pétroliers sont constitués de nombreux composés organiques naturels à faible solubilité dans l'eau (Speight et Arjoon, 2012). Ils contiennent principalement des molécules composées d'atomes de carbone et d'hydrogène. Ils peuvent être divisés en quatre classes : les alcanes non cycliques (ou paraffines), les cycloalcanes (ou naphènes), les alcènes (ou oléfines) et les hydrocarbures aromatiques (Kuppusamy *et al.*, 2020).

Selon la structure chimique générale de leur constituant chimique, les hydrocarbures sont divisés en deux catégories principales, les aliphatiques et les aromatiques (**figure 1**). Les aliphatiques contiennent des chaînes d'atomes de carbone liés ensemble, tandis que les aromatiques contiennent un ou plusieurs cycles benzéniques liés ensemble (**Van Epps, 2006**).

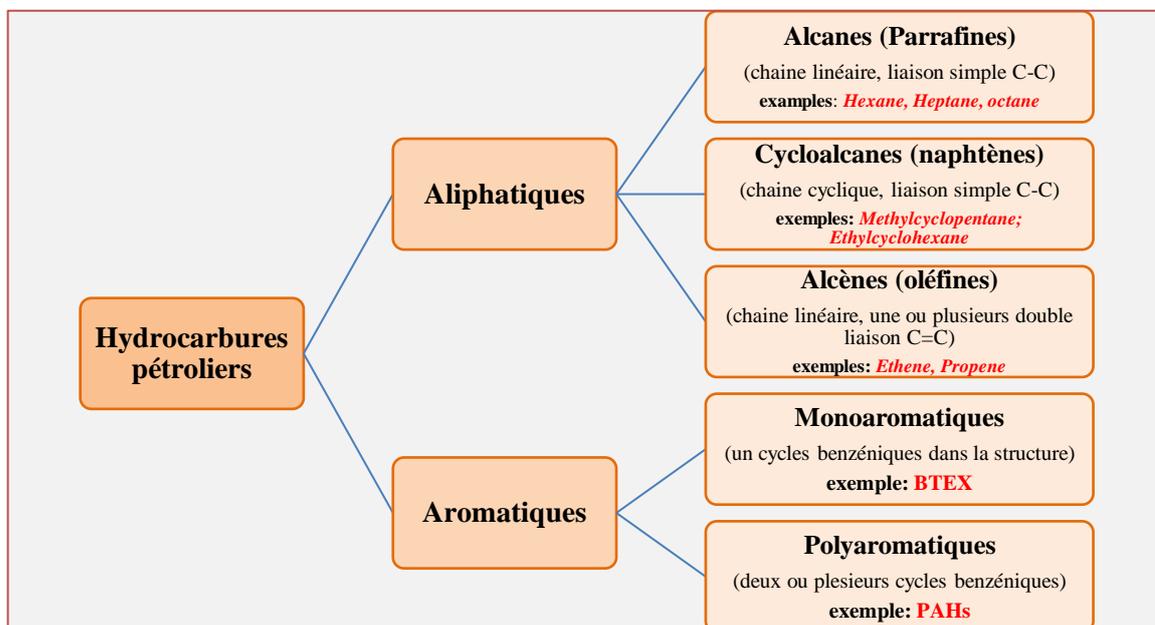


Figure 1. Principaux hydrocarbures pétroliers (**Kuppusamy et al., 2020**)

I.4 Composition pétrolière

Le pétrole brut est parmi les mélanges les plus complexes des composés organiques qui existent sur la terre. Les progrès récents de la spectrométrie de masse à ultra-haute résolution ont permis d'identifier plus de 17 000 composants chimiques distincts, et le terme « pétroléomique » a été inventé pour exprimer cette complexité nouvellement découverte (**Head et al., 2006**).

La composition chimique et physique (fractionnelle) du pétrole peut varier considérablement selon l'emplacement et l'âge des champs pétroliers, et aussi selon la profondeur de chaque puits. En effet, deux puits adjacents peuvent produire du pétrole aux caractéristiques nettement différentes (**Speight, 2014**).

Quatre groupes chimiques opérationnels constituant le pétrole brut ont été définis : les hydrocarbures saturés, les hydrocarbures aromatiques, et les composants polaires et non hydrocarbonés : les résines et les asphaltènes (**Head et al., 2006**). D'autres constituants mineurs sont également présents dans les hydrocarbures pétroliers, comme des métaux et les composés polaires qui contiennent de l'azote, du soufre et de l'oxygène (**figure 2**).

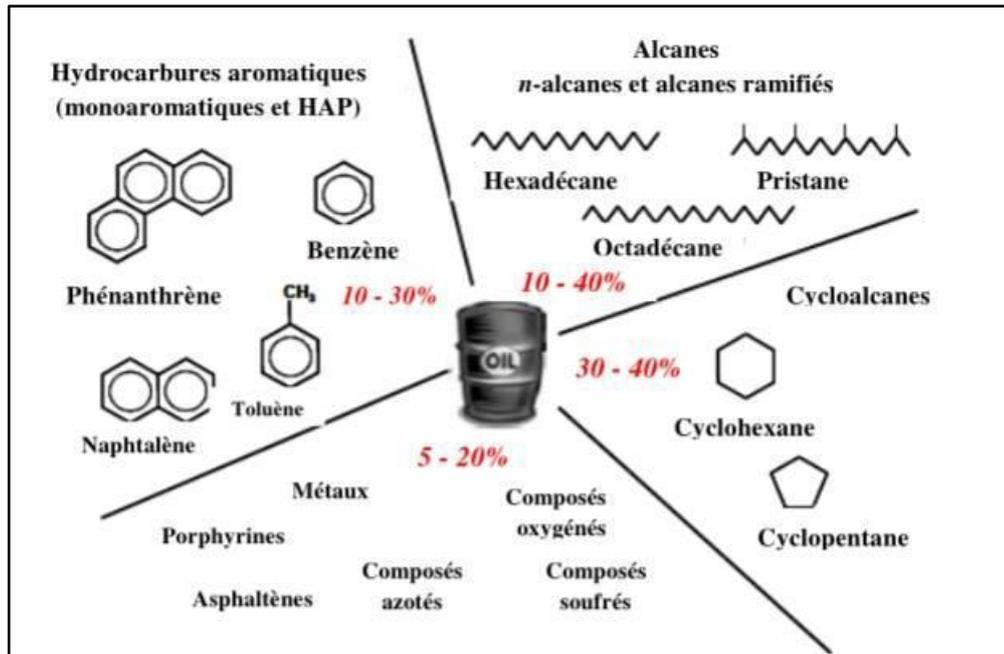


Figure 2. Représentation schématique des principales familles d'hydrocarbures et autres composés d'un pétrole (Syakti, 2004)

Les proportions des éléments (carbone, hydrogène, azote, oxygène, soufre et métaux) dans le pétrole (quelle que soit la source) varient dans des limites assez étroites (**tableau 1**):

Tableau 1. Composition élémentaire du pétrole brut (Speight, 2014)

Eléments	Pourcentage (%)
Carbone	83.0 - 87.0
Hydrogène	10.0 - 14.0
Azote	0.1 - 2.0
Oxygène	0.05 - 1.5
Soufre	0.05 - 6.0
Métaux (Ni et V)	<1000 ppm

I.4.1 Les hydrocarbures saturés

Les hydrocarbures saturés, appelés également « paraffines », sont des hydrocarbures dont les atomes de carbone sont liés par des liaisons simples. Ils sont beaucoup plus légers que les autres hydrocarbures et en général, ils représentent entre 30 et 50% des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut (**Hentati, 2018**). Parmi lesquelles, on distingue :

I.4.1.1 Les alcanes linéaires

Les alcanes linéaires (n-alcanes, C_nH_{2n+2}), dont la longueur de leur chaîne (n) varie de 7 à 40 atomes de carbone. Ils constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40% des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier) (**Hentati, 2018**).

I.4.1.2 Les alcanes ramifiés

Les alcanes ramifiés les plus abondants sont les *iso-alcanes* (groupement méthyle en position 2). Les autres composés ramifiés *antéiso-alcanes* (groupement méthyle en position 3) ou polyramifiés tels que les *isoprénoïdes* (exemple: pristane ($C_{19}H_{40}$), phytane ($C_{20}H_{42}$)) qui sont beaucoup moins nombreux. Ces composés se trouvent dans le pétrole brut à des proportions sensiblement égales à celles des n-alcanes (**Soltani, 2004**).

I.4.1.3 Les cycloalcanes

Les cycloalcanes sont également connus sous le nom de naphènes, ils sont similaires aux alcanes linéaires et ramifiés, sauf que le squelette carboné renferme des atomes de carbone disposés en cercle (cinq, six ou sept atomes de carbones). Ces composés sont parfois appelés cycloparaffines et ont une formule empirique de C_nH_{2n} (**Kostecki et al., 2005**). Cette famille peut représenter entre 30 et 50 % des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut. Quelques dérivés polycycliques sont aussi présents et certains d'entre eux, tels les stéranes et les terpanes sont caractéristiques d'un pétrole brut. Ils sont généralement stables et relativement insolubles dans l'eau. Des exemples sont le cyclohexane et le méthylcyclohexane (**Speight et Arjoon, 2012**).

I.4.2 Les hydrocarbures aromatiques

De formule générale C_nH_{2n-6} , ils sont caractérisés par la présence d'au moins un cycle benzénique à six atomes de carbone, avec des liaisons simple et doubles alternées (**Van Epps, 2006**). En général, les hydrocarbures aromatiques sont moins abondants que les alcanes, et ne représentent que 10 à 30% des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier (**Soltani, 2004**). Les hydrocarbures aromatiques sont répartis en deux familles d'hydrocarbures insaturés : les hydrocarbures aromatiques monocycliques (HAM) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

I.4.2.1 Les hydrocarbures aromatiques monocycliques (HAM)

Les HAM sont constitués d'un seul noyau aromatique, ce sont des molécules ubiquistes dans l'environnement, tels que les BTEX (Benzène, Toluène, Ethylbenzène et *o*, *m*, *p*-

Xylènes) (**figure 3**). Ils se trouvent surtout dans l'essence et les carburants des avions et sont largement répandus dans les synthèses industrielles (**Paralovo et al., 2016**).

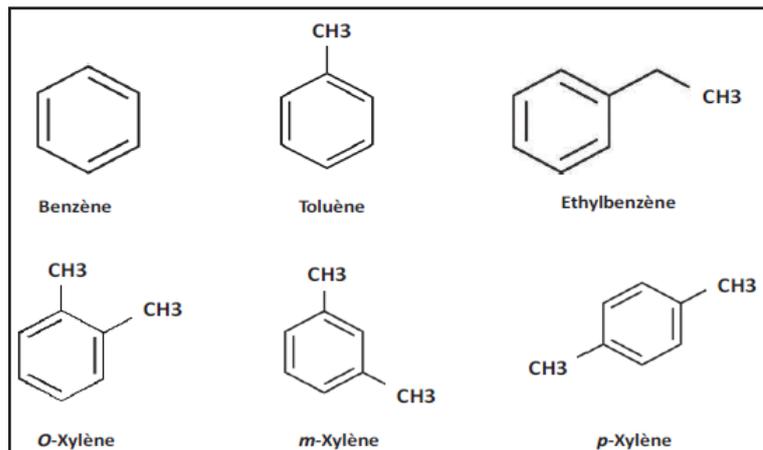


Figure 3. Structures chimiques des BTEX (**Hentati, 2018**)

I.4.2.2 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

Les HAP sont des composés organiques neutres apolaires, constitués de noyaux benzéniques (deux ou plus) fusionnés par des arrangements linéaires (anthracène), angulaires (phénanthrène) ou groupé (pyrène). Le plus simple d'entre eux est le naphthalène, composé de 2 cycles et le plus complexe est le coronène (7 cycles). Ils diffèrent par leurs propriétés physico-chimiques: les HAP de faible poids moléculaire sont plus volatils, plus solubles dans l'eau et moins lipophiles que les HAP de fort poids moléculaire (**Bidaud, 1998**). Par exemple, le naphthalène et les composés de faibles masses moléculaires, étant plus solubles et plus volatils, sont peu persistants et donc peu bioaccumulables. En revanche, les composés de masses moléculaires élevées sont très persistants et par conséquent bioaccumulables.

Les HAP sont hydrophobes, les composés plus gros sont moins solubles dans l'eau et moins volatils. Ces propriétés donnent aux HAP leur place dans l'environnement, principalement dans le sol, les sédiments et les substances huileuses. Cependant, ils constituent également un élément préoccupant pour les particules en suspension dans l'air (**Kumar et al., 2011**).

La présence de HAP dans le sol et les sédiments contaminés pose un risque important pour le sol, car de nombreux composés des HAP sont connus ou suspectés d'être toxiques, mutagènes et, dans certains cas, cancérigènes (**Peng et al., 2008**).

Sur la base de leur abondance et de leur toxicité, 16 HAP ont été inclus dans la liste des polluants prioritaires de l'U.S. Environmental Protection Agency (US-EPA) (**figure 4**) (**Keith et Telliard, 1979**).

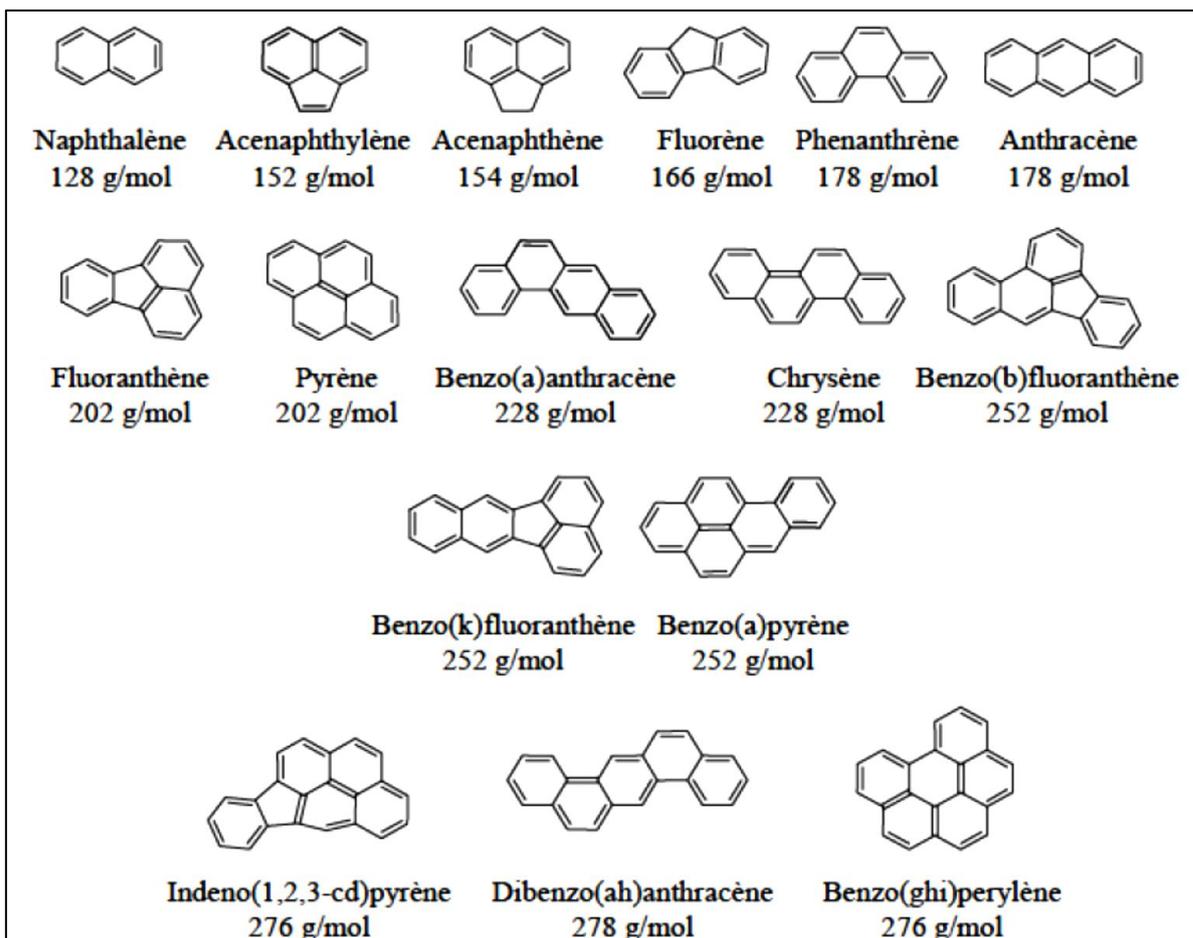


Figure 4. Formule développée, nom et masse moléculaire des 16 HAP de la liste prioritaire de l'agence pour la protection de l'environnement des Etats-Unis (US-EPA) (Jeanneau, 2007)

I.4.3 Les composés polaires non-hydrocarbonés

Les pétroles bruts contiennent des quantités appréciables de constituants organiques non hydrocarbonés, principalement des composés contenant du soufre, de l'azote et de l'oxygène et, en plus petites quantités, des composés organométalliques en solution et des sels inorganiques en suspension colloïdale (Speight, 2014).

I.4.4 Les asphaltènes

Les asphaltènes correspondent à une classe de composés de hautes masses moléculaires, insolubles dans un solvant paraffinique comme le *n*-pentane ou le *n*-heptane, et sont solubles dans les solvants aromatiques tels que le toluène ou le benzène. La structure de ces composés est mal connue du fait que les asphaltènes contiennent entre 105 et 106 molécules de différentes formes et tailles, et que, par conséquent, il n'est pas possible de décrire simplement leur structure chimique. Les asphaltènes sont ainsi constitués de plusieurs centaines de composés qui ont des solubilités similaires, mais qui peuvent avoir des structures, tailles et formes différentes (Tharanivasan, 2012). Ce sont des hydrocarbures

aromatiques polynucléaires qui contiennent, en plus des chaînes n-alcanes, des alcanes cycliques et des hétéroatomes, tels que le soufre, l'azote et l'oxygène, et des traces de métaux comme le nickel et le Vanadium et le fer (**figure 5a**). Ils représentent la fraction des hydrocarbures la plus stable et jouent un rôle important dans la stabilisation de l'émulsion des hydrocarbures (**McLean et Kilpatrick, 1997**).

La présence d'asphaltène entraîne une augmentation marquée de la viscosité du pétrole brut, ce qui rend son transport et son traitement difficiles. En raison de leur haute résistance au craquage, les molécules d'asphaltènes sont généralement tenues responsables de la diminution du rendement des distillats de pétrole (**Yen et Chilingarian, 2000**).

I.4.5 Les résines

Les résines sont les composés polaires les plus petits et constituent un groupe hétérogène de composés aromatiques qui comprend les acides naphthéniques, les cétones, les quinones et les phénols (**figure 5b**). Ils sont caractérisés par leur polarité élevée, qui les rend solubles dans l'eau, ce qui est à l'origine de leur biodisponibilité et de leur toxicité vis-à-vis des organismes en cas de déversement d'hydrocarbures en milieu aquatique (**Melbye et al., 2009**). Par ailleurs, les résines peuvent également contenir des produits issus de l'altération des hydrocarbures pétroliers, comme des composés polycycliques oxydés dont les concentrations sont souvent plus importantes dans des hydrocarbures altérés que dans des hydrocarbures frais (**Ehrhardt et Douabul, 1989**).

I.4.6 Composés soufrés

Le soufre est principalement retrouvé dans les hydrocarbures pétroliers sous forme de composés organiques soufrés. Les composés soufrés forment le groupe le plus grand des composés non-hydrocarbonés d'un brut pétrolier. La teneur en soufre du pétrole brut peut varier de 0,04% (p/p) pour le pétrole brut léger à environ 5,0% pour le pétrole brut lourd et le sable bitumineux. Ils sont généralement associés aux résines et aux asphaltènes (**Speight, 2014**).

I.4.7 Composés oxygénés

La teneur totale en oxygène du pétrole brut est généralement inférieure à 2% (**Speight, 2014**). Les composés oxygénés présentent des structures chimiques plus complexes que les composés soufrés. Un grand nombre de ces composés sont faiblement acides. Il s'agit principalement des acides naphthéniques, une famille complexe d'acides carboxyliques saturés, acycliques ou cycliques (**Figure 5c**) (**Grewer et al., 2010**).

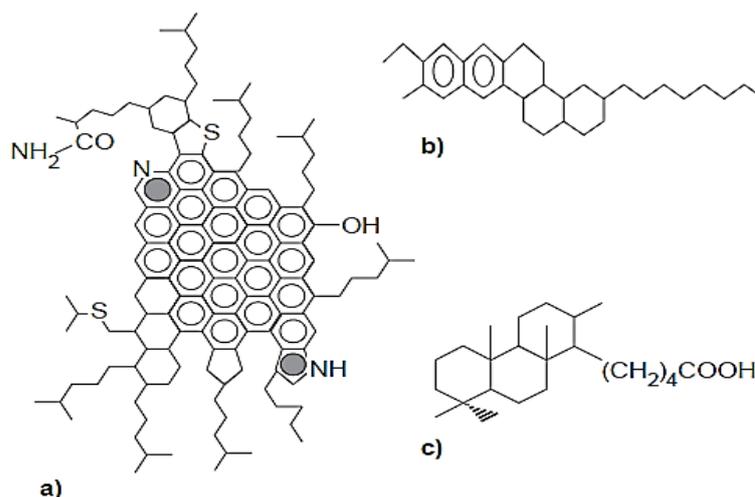


Figure 5. Exemples de la structure moléculaire des : a) asphaltènes, b) résines et c) acides naphthéniques (Langevin *et al.*, 2004)

I.4.8 Composés azotés

La teneur en azote du pétrole brut est faible et se varie généralement entre 0,1% à 0,9%, bien que des travaux précédents indiquent que certains pétroles bruts peuvent contenir jusqu'à 2% d'azote. Les composés azotés organiques se retrouvent dans les pétroles bruts sous une forme simple hétérocyclique, comme la pyridine (C₅H₅N) et le pyrrole (C₄H₅N), ou dans une structure plus complexe comme les porphyrines (Speight, 2014).

I.4.9 Les métaux

Les métaux sont présents dans les pétroles bruts à l'état de traces. Les métaux lourds dans le pétrole proviennent de processus géochimiques impliqués dans la génération, la migration (vers le réservoir) et la maturation du pétrole (Mejha, 2016). Le nickel et le vanadium sont les métaux traces les plus abondants dans le pétrole brut mais le fer, le cuivre et l'uranium sont également détectés (Bertrand et Mille, 1989).

I.5 Le raffinage du pétrole brut

Le pétrole brut produit, après le traitement sur le terrain et les opérations de surface nécessaires, est transféré dans une raffinerie où il est traité et converti en divers produits utiles. Le processus de raffinage a évolué de la simple distillation discontinue à la fin du XIXe siècle aux processus complexes d'aujourd'hui dans les raffineries modernes. Les processus de raffinage peuvent généralement être divisés en trois opérations principales: (1) séparation, (2) conversion et (3) finition (Riazi, 2005) :

- a. **La séparation :** est un processus physique où les composés sont séparés par différentes techniques. Le processus de séparation le plus important est la distillation

qui se produit dans une colonne de distillation; les composés sont séparés en fonction de la différence de leurs points d'ébullition. Les hydrocarbures dans un brut pétrolier ont des points d'ébullition allant de -160 °C (point d'ébullition du méthane) à plus de 600 °C qui est le point d'ébullition des composés lourds dans le pétrole. D'autres processus importants de séparation physique sont l'absorption, le décapage et l'extraction.

- b. La conversion :** un processus qui consiste en des changements chimiques qui se produisent avec les hydrocarbures dans les réacteurs. Le but de ces réactions est de convertir les composés hydrocarbonés d'un type à un autre. La réaction la plus importante dans les raffineries modernes est le craquage dans lequel les hydrocarbures lourds sont convertis en hydrocarbures plus légers et plus précieux. Le craquage catalytique et le craquage thermique sont couramment utilisés à cet effet. D'autres types de réactions telles que l'isomérisation ou l'alkylation sont utilisées pour produire de l'essence à indice d'octane élevé.
- c. La finition :** est la purification de divers flux de produits par des procédés tels que la désulfuration ou le traitement acide des fractions pétrolières pour éliminer les impuretés du produit ou le stabiliser.

I.6 Les produits pétroliers

En général, les produits pétroliers peuvent être divisés en deux groupes: les produits pétroliers énergétiques (carburants-combustibles) et les produits non énergétiques.

I.6.1 Les produits énergétiques (carburants-combustibles)

Les carburants sont des composés chimiques, liquides ou gazeux, dont la combustion en présence d'air permet le fonctionnement des moteurs thermiques. Le mot combustible est réservé aux produits utilisés pour la production d'énergie thermique dans les chaudières, les fours, les centrales...etc (**Wauquier, 1994**). Les principaux produits pétroliers énergétiques sont :

a. Gaz de pétrole liquéfié (GPL)

Le GPL est essentiellement un mélange de propane et de butane. Il est principalement utilisé pour le chauffage et la cuisson domestiques (50%), le carburant industriel (besoins en carburant propre) (15%), la matière première de vapocraquage (25%) et comme carburant pour les moteurs à allumage commandé (10%).

b. Essence

L'essence est l'un des produits les plus importants d'une raffinerie. Il contient des hydrocarbures de C₄ à C₁₁. Il est utilisé comme carburant pour les voitures. Ses principales caractéristiques sont l'antidétonant (indice d'octane), la volatilité, la stabilité et la densité. La principale évolution de la production d'essence a été l'utilisation d'essence sans plomb dans le monde et l'utilisation d'essence reformulée (RFG) aux États-Unis. Le RFG a moins de butane, moins d'aromatiques et plus d'oxygènes. La teneur en soufre de l'essence ne doit pas dépasser 0,03% en poids (**Riazi, 2005**).

c. Kérosène

La composition chimique du kérosène est complexe et elle dépend de sa source. Il est généralement composé d'hydrocarbures en C₁₀-C₁₆, dont 55,2% de paraffines, 40,9% de naphthalènes et 3,9% d'hydrocarbures aromatiques. Comparé à l'essence, le kérosène est moins volatil avec un point d'éclair plus élevé (38 °C) et donc un carburant relativement plus sûr à stocker et à manipuler. Il est utilisé pour allumer les chauffages domestiques, des lampes ou des fournaies et également utilisé comme composant de carburant pour les moteurs diesel et les moteurs des tracteurs, les réacteurs (d'avion) et les fusées et comme solvant pour les graisses et les insecticides. Il est utilisé comme l'un des combustibles de cuisson courants (**Dioha et al., 2012**).

d. Diesel (gasoil)

Le diesel est obtenu à partir de la distillation fractionnée du pétrole brut. C'est, en général, un mélange d'hydrocarbures en C₁₀ à C₁₉ avec des points d'ébullition compris entre 150 et 380 °C et est moins volatil et plus lourd avec une densité d'énergie plus élevée que les essences (**Song et al., 2000**). La composition type des hydrocarbures du diesel (volume) comprend 64% d'hydrocarbures aliphatiques, 1 à 2% d'hydrocarbures oléfiniques et 35% d'hydrocarbures aromatiques (**Kuppusamy et al., 2020**). Ce carburant est destiné à l'alimentation des moteurs diesel équipant des voitures particulières et des véhicules utilitaires, depuis la camionnette légère jusqu'au poids lourd. D'autres types de moteurs diesels non routiers comme les bateaux de pêche, engins de travaux publics, tracteurs agricoles et les gros navires, utilisent des carburants distincts du gazole (diesel marine, fuel domestique, fuel lourd) (**Wauquier, 1994**).

e. Mazout (Fuel oil)

Le mazout résiduel est utilisé comme carburant industriel, pour la production thermique d'électricité et comme carburant des moteurs (moteurs diesel à basse vitesse). Ses principales caractéristiques sont la viscosité, la teneur en soufre (corrosion), la stabilité (pas de séparation par décantation), la résistance au froid et le point d'éclair pour la sécurité (**Riazi, 2005**).

I.6.2 Les produits non énergétiques

a. Les solvants hydrocarbonés

Les solvants hydrocarbonés sont des coupes pétrolières relativement légères, qui se situent dans la gamme des hydrocarbures de C₄ à C₁₄, et dont les applications sont nombreuses dans l'industrie comme dans l'agriculture. Leur emploi est souvent conditionné par leur rapidité d'évaporation, de sorte qu'ils sont classés en fonction de leurs gammes de températures d'ébullition (**Wauquier, 1994**). Un exemple des solvants, les white-spirits dont le point d'ébullition s'étend entre 135 et 205 °C, sont utilisées comme diluants de peinture (**Riazi, 2005**).

b. Les naphthas

Les naphthas constituent une catégorie particulière de solvants hydrocarbonés, dont les caractéristiques d'ébullition correspondent à la classe des white-spirits. Il s'agit en effet de produits de base pour la pétrochimie. Ils servent en particulier à alimenter les vapocraqueurs. Les naphthas sont donc des intermédiaires industriels et n'ont aucune utilisation pour le consommateur final (**Wauquier, 1994**).

c. Les huiles lubrifiantes

Les huiles lubrifiantes sont constituées d'un composant principal appelé "base", auquel sont ajoutés des additifs qui confèrent au lubrifiant les propriétés spécifiques requises pour une application donnée. Les bases pour lubrifiants peuvent être minérales (d'origine pétrolière) ou synthétiques. L'une des caractéristiques les plus importantes des lubrifiants est leur viscosité et l'indice de viscosité (variation de la viscosité en fonction de la température).

Habituellement, les aromatiques sont éliminés des lubrifiants pour améliorer leur indice de viscosité. Les lubrifiants ont une structure similaire aux composés isoparaffiniques. Les additifs utilisés pour les lubrifiants sont les additifs améliorant l'indice de viscosité tels que les polyacrylates et les polymères d'oléfines, les additifs anti-usures (esters phosphoriques, produits soufrés ou chlorés), les antioxydants (amines aromatiques alkylées), les inhibiteurs de corrosion (acides gras, phosphates d'amine) et les agents anti-mousses (polydiméthylsiloxanes, acrylates). Les graisses lubrifiantes sont une autre classe de

lubrifiants sous forme semi-solide. Les propriétés des lubrifiants à connaître sont l'indice de viscosité, le point d'aniline (indication du contenu aromatique), la volatilité et les résidus de carbone (Wauquier, 1994 ; Riazi, 2005).

d. L'asphalte

L'asphalte est un autre produit pétrolier majeur qui est produit à partir de résidus de distillation sous vide. Les asphaltes contiennent des composés aromatiques polaires non volatils de poids moléculaire élevé, tels que les asphaltènes et ne peuvent pas être distillés même dans des conditions de vide très élevé. Dans certains pays, l'asphalte est appelé 'bitume', bien que certains suggèrent qu'il s'agit de produits pétroliers différents. L'asphalte et le bitume appartiennent à une catégorie de produits appelés « liants hydrocarbonés ». L'asphalte est utilisé en voirie, en particulier en milieu urbain, ainsi que pour couvrir les trottoirs (Riazi, 2005).

I.7 Propriétés physiques du pétrole et des produits pétroliers

Les propriétés physiques des variétés presque illimitées de pétrole brut sont généralement corrélées avec des aspects de la composition chimique. Certaines de ces propriétés clés pour déterminer le devenir et le comportement du pétrole et des produits pétroliers dans l'environnement sont la viscosité, la densité, la gravité spécifique (densité par rapport à l'eau), le point d'éclair, le point d'écoulement et la tension interfaciale (Fingas, 2015). Certaines propriétés typiques des huiles sont décrites au suivant :

I.7.1 Densité (specific gravity)

La densité des hydrocarbures correspond à la masse par unité de volume. Cette propriété est utilisée par l'industrie pétrolière pour distinguer les hydrocarbures légers et lourds. Elle est aussi importante pour indiquer la flottabilité des hydrocarbures dans l'eau en cas de déversement. L'échelle des masses volumiques de l'*American Petroleum Institute* (API) est couramment utilisée pour décrire la densité des hydrocarbures pétroliers, qui est alors exprimée en degré API. La densité des bruts se situent généralement entre 0,8 (45.3 API) et 1,000 (<10 API), bien qu'il existe des bruts ayant des densités se situant en dehors de cet intervalle (Wauquier, 1994). Généralement, on class les pétroles bruts en fonction de la densité API en 4 catégories comme illustré dans le **tableau 2**:

Tableau 2. Catégories des pétroles bruts (Fahim *et al.*, 2009)

Type de pétrole brut	Densité API
bruts légers	API > 38
bruts moyens	29 < API < 38
bruts lourds	8.5 < API < 29
bruts extra lourds	API < 8.5

Notons que ces bornes varient selon les pays.

I.7.2 Point d'écoulement (pour point)

Le point d'écoulement est défini comme la température la plus basse à laquelle l'échantillon s'écoulera. Il indique à quel point il est facile ou difficile de pomper l'huile, surtout dans les temps froids. Il indique également la nature aromatique ou paraffinique du pétrole brut ou de la fraction. Un point d'écoulement inférieur signifie que la teneur en paraffine est faible. Les points d'écoulement pour le brut entier et les fractions dont le point d'ébullition est supérieur à 232 °C (450 °F) sont déterminés par des tests standard comme ASTM D97 (Fahim *et al.*, 2009).

I.7.3 Viscosité

La viscosité est une autre propriété utile dans la production, le raffinage et le transport du pétrole (Riazi, 2005). La viscosité peut être définie comme la résistance à l'écoulement d'un liquide. La mesure de la viscosité des pétroles bruts à différentes températures est importante pour le calcul des pertes de charge dans les pipelines, les tuyauteries et les conduites de raffinerie (Wauquier, 1994). Des hydrocarbures pétroliers ayant une faible viscosité sont très fluides et se propagent rapidement, rendant leur confinement difficile. Notons que la viscosité est influencée par la température. En effet, plus la température est faible, plus la viscosité est élevée. Enfin, la viscosité influence les processus d'évaporation et d'émulsification des hydrocarbures (Fingas, 2016). La viscosité est mesurée à 37,8 °C (100 °F) par ASTM D445 et par ASTM D446 à 99 °C (210 °F) (Fahim *et al.*, 2009).

I.7.4 Point d'éclair (flash point)

Le point d'éclair d'un hydrocarbure liquide est la température la plus basse à laquelle suffisamment de vapeurs sont émis au-dessus du liquide de telle sorte qu'une inflammation spontanée se produira en cas d'étincelle. Il s'agit d'une spécification importante pour l'essence et le naphta liée à la sécurité du stockage et du transport dans des environnements à haute température. Le point d'éclair indique le potentiel d'incendie et d'explosion d'un carburant. Un

carburant à point d'éclair bas présente un risque d'incendie plus élevé. L'un des tests standard est ASTM D1711, D09 et D1695 (Fahim *et al.*, 2009).

I.7.5 La tension interfaciale

La tension interfaciale correspond à la force d'attraction ou de répulsion qui s'exerce à l'interface entre les hydrocarbures et l'eau. C'est une donnée qui doit être considérée avec la viscosité pour évaluer la rapidité de la propagation des hydrocarbures sur l'eau. Plus la tension interfaciale est faible, plus les hydrocarbures se répandront facilement sur l'eau (Fingas, 2012).

I.8 Les hydrocarbures en Algérie

L'Algérie est un exportateur important de pétrole et de gaz naturel et est un membre de "Organization of the Petroleum Exporting Countries" (OPEC). Le secteur des hydrocarbures constitue la colonne vertébrale de l'économie algérienne, avec des réserves de 12,2 milliards de barils de pétrole et 4,5 billions de mètres cubes de gaz. L'Algérie détient les 16^{ème} plus grandes réserves de pétrole et les 10^{ème} plus grande réserve de gaz naturel au monde, et elle représente le 6^{ème} plus grand exportateur de gaz (Dilmi, 2019). L'Algérie occupe le troisième rang parmi les pays producteurs de pétrole en Afrique, et le 12^{ème} rang dans le monde (Attar et Hammat, 2009).

Les réserves conventionnelles d'hydrocarbures découvertes en Algérie à ce jour sont contenues dans un peu plus de 200 gisements de pétrole et de gaz, dont 73 sont situés dans le bassin d'Illizi, 57 dans les bassins du Sahara central, 34 dans les bassins Ghadames-Rhourde Nouss et 31 dans le Bassin d'Oued Maya (Abada and Bouharkat, 2018).

L'Algérie constitue un centre important de raffinage avec 5 raffineries; Skikda, Alger, Arzew, Hassi Messaoud et Adrar. Avec une capacité totale du traitement du pétrole brut de 25,565 millions tonnes/an (Ministère de l'énergie et des mines).

Le pétrole algérien est très apprécié dans le monde, parce que c'est un pétrole léger (sa densité est entre 43 et 47° API), à moindre teneur en soufre (0,1%). Il est de ce fait apprécié des raffineurs. La variété du brut algérien est appelée *Sahara Blend*.

I.8.1 Aperçu sur la raffinerie d'Arzew

La raffinerie d'Arzew est considérée parmi les complexes pétroliers les plus importants dans le nord d'Afrique, 3^{ème} raffinerie du pays après celles d'Alger et de Hassi-Messaoud. Elle est située dans la zone industrielle sur le plateau d'El Mahgoune à 2 km de la ville d'Arzew et environ 40 km de la ville d'Oran. Elle se situe au voisinage du port d'Arzew qui

lui permettant les enlèvements par bateau des produits finis et semi-finis (**Guermouche, 2014**).

La raffinerie est alimentée directement par du pétrole brut de la zone de stockage de Haoud-El-Hamra (Hassi Messaoud) par un pipeline. Elle a la capacité de traiter 3,75 millions tonnes/an de pétrole brut. La raffinerie est conçue pour le traitement de pétrole brut de Hassi Messaoud, satisfaction des besoins de consommation du marché national en carburant, lubrifiants et bitumes, et l'exploitation de produits excédentaires (naphta, kérosène, fuel, gas-oil et huile, GPL (Gaz de Pétrole Liquéfié), essences, lubrifiants et bitumes (**Benchouk, 2017**).

La raffinerie est composée de plusieurs unités complémentaires et successives qui déterminent le cheminement du flux produit (**figure 6**) :

- a. **Les utilités** : Deux unités d'utilités produisent et assurent la distribution, pour les besoins de fonctionnement des différentes installations: eau distillée, électricité, air service et instrument, eau de refroidissement traitée, fuel gaz et vapeur. Ces unités ne reçoivent pas de matière première, elles ne produisent que les besoins des autres unités.
- b. **Les carburants**
 - **L'Unité de distillation atmosphérique (U.11)** : est l'unité principale du complexe qui traite le pétrole brut algérien. Les produits obtenus au niveau de cette unité sont: gaz de pétrole liquéfié, naphta lourd, naphta léger, kérosène, gas-oil et le brut réduit, qui constitue la charge des unités de distillation sous-vide pour la production des huiles de base.
 - **L'Unité reforming catalytique (U.12)** : Le Naphta lourd de l'unité de distillation atmosphérique est traité dans cette unité dont le but est de produire une base à indice d'octane élevé, des GPL et un gaz riche en hydrogène.
 - **L'Unité de traitement de gaz (U.13)** : Les gaz de pétrole liquéfiés obtenus dans les unités de distillation atmosphérique et de reforming catalytique sont traités dans cette unité et séparés en produits suivants: propane, butane.
- c. **Les bitumes**
 - **L'Unité de flash sous-vide (U.14)**: Le brut réduit importé et fractionné en gas-oil sous vide et en produit visqueux obtenu en fond de colonne lequel est traité dans la section de soufflage à l'air pour obtenir du bitume pur (direct) communément appelé bitume routier.

- **L'Unité de bitume oxydé (U.IS):** Du bitume direct mélangé avec du gazole sous vide constitue la charge de cette unité ou blown stock. Le bitume oxydé est obtenu par oxydation poussée avec de l'air.

d. Les lubrifiants : La raffinerie d'Arzew dispose de:

- deux chaînes de production d'huile de base de capacités annuelles respectives de 48 000 TM et 120 000 TM.
- deux unités de fabrication, de mélange et de conditionnement des huiles finies.
- deux unités de production et de conditionnement des graisses.
- une unité de traitement et de deux unités de moulage de la paraffine **(Benchouk, 2017)**.

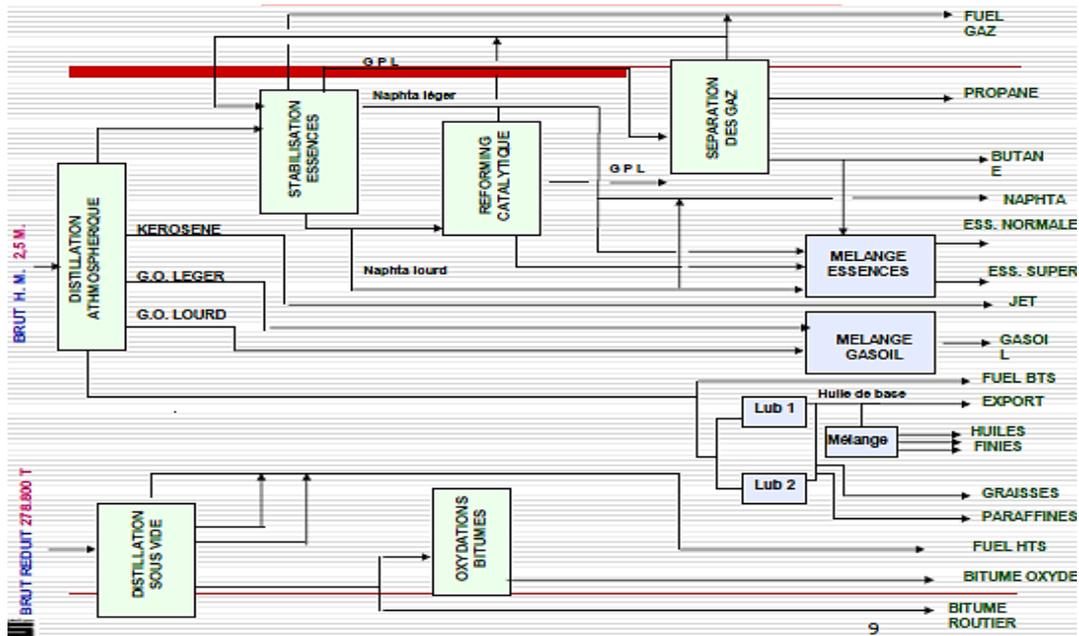


Figure 6. Schéma général de la raffinerie d'Arzew (Boudjillouli, 2001)

I.8.2 Les problèmes liés aux hydrocarbures en Algérie

Au cours de différentes activités liées à l'extraction du pétrole, à son transport et à l'utilisation de ces produits finis, des accidents peuvent avoir lieu et résultent à une contamination de l'environnement par plusieurs types d'hydrocarbures pétroliers. En effet, 21% des accidents enregistrés dans l'industrie algérienne du raffinage du pétrole ont des conséquences environnementales (Chettouh et Hamzi, 2014).

De plus, la pollution par les hydrocarbures en Algérie a attiré l'attention de plusieurs chercheurs, parmi lesquelles on cite les travaux de Talbi *et al.* (2009) et Ghouas *et al.* (2010) qui adaptent des techniques physico-chimiques pour l'élimination des carburants des effluents industriels. Ladji (2010) a étudié la composition organique du sable du Sahara pollué par les hydrocarbures des différentes régions d'Algérie, Hassi-Messaoud, Hassi-Bahbah, Laghouat,

Touggourt et Ghardaia, la plus grande pollution est détectée en *n*-alcanes à Hassi-Bahbah avec 66% (C16 à C35). Laghouat était la ville la plus polluée en HAPs avec 21.8% entre aromatiques légers et lourds. **Boutenfouchet *et al.*** en **2005** a réalisé une évaluation de la pollution industrielle par les hydrocarbures totaux au niveau de la plateforme industrielle de Skikda.

Chapitre II :

**Pollution des sols par
les hydrocarbures**

Chapitre II : Pollution des sols par les hydrocarbures pétroliers

Le pétrole est une nécessité dans notre société industrielle et une composante majeure de notre mode de vie. Selon les tendances de l'utilisation du pétrole, cela ne serait pas beaucoup diminuer à la future. L'industrie utilise le pétrole et les dérivés pétroliers pour fabriquer des produits vitaux tels que les plastiques, les engrais et les matières premières chimiques, qui restent encore nécessaires à l'avenir. En fait, la production et la consommation de pétrole et de produits pétroliers augmentent dans le monde et la menace de pollution par les hydrocarbures augmente en conséquence. Le mouvement du pétrole des champs pétroliers vers le consommateur implique jusqu'à 10 à 15 transferts entre de nombreux modes de transport différents, y compris les pétroliers, les pipelines, les wagons et les camions citernes. Le pétrole est stocké aux points de transfert, aux terminaux et aux raffineries le long du parcours. Des accidents peuvent survenir au cours de l'une de ces étapes de transport ou de ces périodes de stockage (**Fingas, 2013**).

II.1 Systèmes dynamiques du sol

Un sol est un système hétérogène et dynamique, composé principalement de particules minérales, de matières organiques, d'eau, d'air et d'organismes vivants (**Paul, 2014**).

C'est un système complexe constitué de trois phases : la phase aqueuse, gazeuse, et solide. Le gaz et l'eau, que l'on trouve dans les pores du sol, représentent environ 50% (en volume) d'un sol typique. Un constituant organique pourra se trouver dans ces deux phases en proportions variables selon sa solubilité et sa tension de vapeur (**Bidaud, 1998**).

Le sol constitue un milieu biologique où vivent des êtres microscopiques, mais également où se déroulent des phénomènes chimiques, physiques et physico-chimiques, etc. Ces phénomènes sont qualifiés de systèmes dynamiques et ont lieu essentiellement dans la phase liquide du sol et à son interface avec la phase solide. La connaissance scientifique d'un tel écosystème, pour le moins complexe, constitue un pas important à la compréhension du devenir des polluants organiques et de leur processus de biodégradation (**Fokou Mbogne, 2017**).

II.1.1 Phénomènes chimiques

Les composés organiques et inorganiques du sol sont très variés et leurs nombreuses propriétés sont à l'origine de leur participation aux nombreuses transformations chimiques (l'ionisation, l'oxydo-réduction, l'hydrolyse, etc.). Elles ont lieu principalement, dans la phase liquide et à son interface avec la phase solide. Il existe deux grandes catégories de transformation chimiques:

- Les transformations de dégradation des composés organiques et d'altération des minéraux.
- Les transformations de synthèse : néogenèse des minéraux, organisation microbienne et végétale (Calvet, 2003).

II.1.2 Phénomènes physiques

Le sol est le siège de plusieurs phénomènes physiques tels que la rétention ou la circulation de l'eau dans le sol, le transport des gaz et l'aération du sol, l'évolution de la structure du sol et sa mécanisation, le transport des espèces par diffusion moléculaire ou par convection ou dispersion, la pollution des eaux souterraines par le mécanisme de transport de la matière, etc. De plus, ils sont responsables de la cinétique de nombreuses transformations chimiques et de l'adsorption des substances en solution et en phase gazeuse.

II.1.3 Phénomènes physico-chimiques

Ces phénomènes déroulent aux interfaces des phases solides, liquides et gazeuses, et conduisent à des modifications d'état des molécules, sans altération de leur structure. Par exemple, ils expliquent comment une molécule organique peut passer de l'état neutre à l'état polaire ou de l'état hydrophobe à l'état hydrophile (Fokou Mbogne, 2017).

II.2 Devenir des hydrocarbures pétroliers dans le sol

À la suite d'un déversement des hydrocarbures au niveau du sol, différents processus d'altération physique, chimique et biologique vont déterminer leur devenir dans le milieu (Fingas, 2013). Ceci étant, il n'est pas toujours évident de prédire avec certitude le comportement d'un polluant au niveau du sol, car celui-ci est un grand système dynamique, complexe, hétérogène et évolutif dans le temps. Ce dynamisme vivant, le plus souvent caractérisé par des phénomènes abiotiques (évaporation, etc.) et biotiques (biodégradation, etc.) dépendent beaucoup des propriétés intrinsèques du sol, des conditions environnementales, de la composition chimique et des propriétés physiques des hydrocarbures. Les phénomènes biotiques sont ceux qui participent majoritairement à la dégradation des hydrocarbures lourds tandis que les phénomènes abiotiques agissent plutôt sur les plus légers. Les différents processus naturels d'altération des hydrocarbures sont l'évaporation, la biodégradation, l'adsorption, etc. (figure 7) (Fokou Mbogne, 2017).

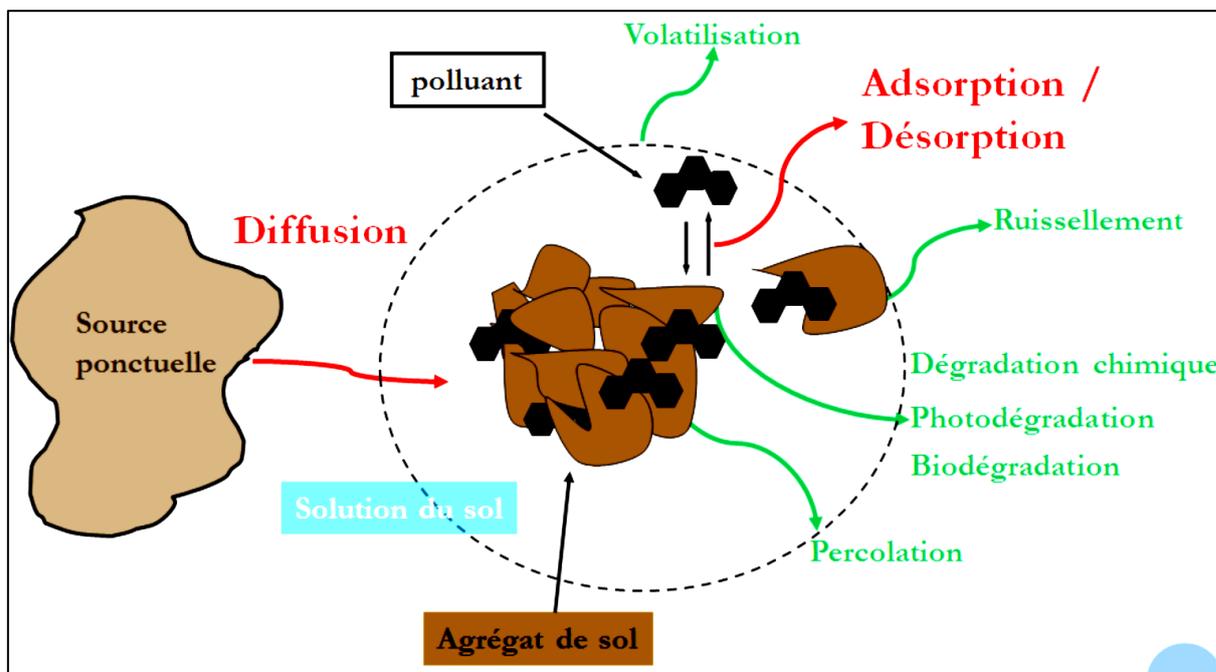


Figure 7. Devenir d'un polluant organique au niveau du sol (Pernot *et al.*, 2012)

II.2.1 Evaporation

L'évaporation est un processus qui débute immédiatement après un déversement d'hydrocarbures et peut se poursuivre pendant quelques jours. Elle correspond au transfert des composés volatils plus légers, comme les aliphatiques, les BTEX et les HAP de faible masse moléculaire, vers l'atmosphère. Cette perte des composés volatils entraîne la modification de certaines propriétés physiques des hydrocarbures, telles que la densité et la viscosité (Neff *et al.*, 2000).

De façon générale, lors de déversements d'hydrocarbures pétroliers, l'évaporation est le processus qui induit la plus grande perte de masse pour les hydrocarbures légers. Ainsi, quelques jours après un déversement, les pétroles bruts légers peuvent perdre jusqu'à 75 % de leur volume initial et les bruts moyens, jusqu'à 40 %. En revanche, les hydrocarbures lourds ne perdent pas plus de 10 % de leur volume dans les premiers jours suivant un déversement (Fingas, 2013).

II.2.2 Adsorption

Les hydrocarbures pétroliers peuvent être séquestrés par les molécules du sol ou du compost. L'adsorption est un procédé physico-chimique, naturel et passif d'accumulation des matières organiques, mettant en jeu des forces d'interactions qui retiennent l'adsorbat sur la surface de l'adsorbant. La formation de tels résidus nécessite la présence de groupes réactifs sur le contaminant et sur la matrice organique du sol (Bollag et Loll, 1983). C'est un phénomène qui peut être réversible (si adsorption physique) ou irréversible (si adsorption

chimique) et dépend des conditions environnementales (température, pH, taux d'humidité, etc.), des caractéristiques du polluant (solubilité, masse moléculaire, âge du polluant, etc.), de la nature du sol (granulométrie, minéralogie, taux de matière organique, etc.) mais aussi de la synergie des phénomènes dynamiques du sol.

Les hydrocarbures pétroliers peuvent former avec la matière organique des complexes qui deviennent non extractibles et non disponibles. Ce phénomène de séquestration du polluant organique par le sol met en jeu les coefficients de partage sur la matière humique liée à la surface des particules de sol ou la diffusion à travers les micropores tridimensionnels. Cette présence de matières humiques dans le sol reste bénéfique dans la solubilisation, le transport et la sorption des hydrocarbures les plus hydrophobes (**Fokou Mbogne, 2017**).

II.2.3 Photo-oxydation

La photo-oxydation, ou oxydation photochimique, est un processus d'altération des hydrocarbures qui est modulé par différents facteurs, notamment le spectre et l'intensité lumineuse du rayonnement solaire et la composition chimique des hydrocarbures déversés (**Prince et al., 2003**). Dans le cas des sols, ce phénomène n'a lieu que dans les premiers centimètres de la surface (**Park et al., 2001**). Ainsi, les composés aromatiques sont particulièrement plus photosensibles que les composés aliphatiques. La photo-oxydation conduit à la formation de composés plus solubles (acides, alcools, cétones, peroxydes et sulfoxides) que les composés initiaux et certains travaux de recherche ont montré leur toxicité pour les communautés microbiennes (**Payne et Phillips, 1985; Larson et al., 1979; Maki et al., 2001**).

II.2.4 Biodégradation

Les hydrocarbures dans le sol sont principalement dégradés par les micro-organismes. Plusieurs espèces de bactéries, de champignons et de levures métabolisent les hydrocarbures pétroliers comme source d'énergie. Les bactéries ainsi qu'autres organismes dégradants sont les plus abondants dans les zones où il y a eu des déversements de pétrole, bien que ces micro-organismes se trouvent partout dans l'environnement. Les hydrocarbures métabolisés par les micro-organismes sont généralement convertis en un composé oxydé, qui peut être encore dégradé, être soluble ou s'accumuler dans l'huile résiduelle (**Fingas, 2013**).

II.3 Mouvement du pétrole sur la surface terrestre

Les propriétés du pétrole et la nature du sol affectent la vitesse de pénétration de l'huile dans le sol et la quantité qui s'adhère à celui-ci. Par exemple, une huile de faible viscosité pénètre rapidement dans un sol poreux sec tel que du sable grossier et, par conséquent, sa

vitesse de propagation sur la surface est réduite. Lorsque du pétrole est déversé sur la terre, il s'écoule de la surface dans la même direction et de la même manière que l'eau. La majeure partie du pétrole descend vers le bas à travers un matériau perméable sous l'influence de la gravité jusqu'à ce que l'eau souterraine ou une couche imperméable l'arrête (**figure 8**). Il se déplace, ensuite, le long de la surface de la couche imperméable ou de l'eau souterraine jusqu'à ce qu'il rencontre une autre barrière imperméable ou que tout le produit soit absorbé dans le sol. Une fois en contact avec un matériau soluble dans l'eau, l'huile s'y dissout et est transportée avec les eaux souterraines. Les huiles peuvent s'écouler le long de la partie supérieure des eaux souterraines et réapparaître beaucoup plus tard dans les sources ou les rivières.

Lorsque le pétrole se déplace dans le sol, il laisse derrière lui des matières qui s'adhèrent au sol. Cela dépend des propriétés d'adhérence du produit déversé et de la nature du sol. Une plus grande partie de l'huile adhérente est déplacée vers le bas par l'infiltration dans le sol. L'eau de pluie transporte des composants dissous avec elle jusqu'à la nappe phréatique. Le mouvement de l'huile sera plus important là où le drainage de l'eau est bon (**Fingas, 2013**).

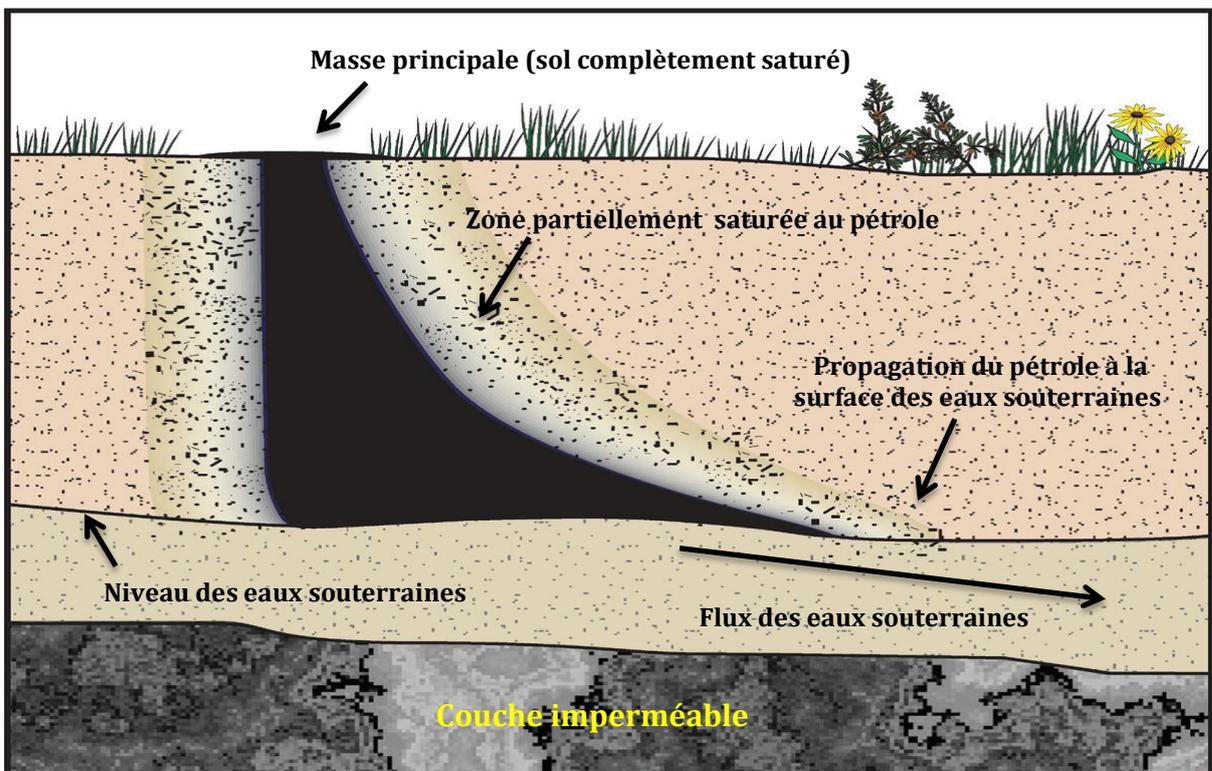


Figure 8. Pénétration du pétrole dans le sol (**Fingas, 2013**)

II.4 La toxicité des hydrocarbures pétroliers

La toxicité est la capacité d'une substance chimique à endommager et modifier certaines fonctions des systèmes biologiques. Il existe deux critères de toxicité pour les systèmes

naturels. La toxicité aiguë est produite par des rejets importants et à court terme d'agents polluants accidentels, bien qu'elle puisse avoir des effets à long terme. En revanche, la toxicité chronique s'exprime par des effets constatés à long terme en raison de quantités relativement faibles d'un composé toxique présentes dans l'air, l'eau ou le sol (**Vázquez-Luna, 2012**).

La toxicité des hydrocarbures pétroliers est une préoccupation importante dans la gestion et le contrôle des risques environnementaux. Pour les plantes et les animaux, la toxicité des hydrocarbures pétroliers est dans l'ordre croissant suivant : alcanes <cycloalcanes <alcènes <aromatiques. Dans chaque classe, la toxicité augmente à mesure que le poids moléculaire diminue. Par exemple, le diesel est plus toxique que d'autres produits pétroliers tels que le kérosène, en raison de sa plus grande concentration d'aromatiques (**Hou, 2000**).

Les effets toxiques des hydrocarbures sur les plantes terrestres supérieures et leur utilisation comme herbicides ont été attribués à l'huile qui dissout la partie lipidique de la membrane, permettant ainsi au contenu cellulaire de s'échapper (**Bossert et Bartha, 1984**). Les alcanes à chaîne courte (inférieurs à C10) sont généralement toxiques pour les micro-organismes en raison de leur grande solubilité dans l'eau et de leur interaction avec les lipides membranaires (**Hou, 2000**).

Les composants mono-aromatiques (benzène) et diaromatiques (naphtalène) du pétrole brut sont considérés comme les composés les plus toxiques et les plus abondants pendant les phases initiales des déversements de pétrole (**Cockerham et Shane, 1994**). Il est reconnu depuis de nombreuses années que certains constituants d'hydrocarbures que l'on trouve couramment dans le pétrole brut, les produits pétroliers raffinés, le goudron et les dérivés de combustibles fossiles ont un certain potentiel cancérigène et mutagène (**Bingham et al., 1979**).

La persistance environnementale et la génotoxicité des HAP augmentent à mesure que la taille moléculaire augmente jusqu'à quatre ou cinq cycles benzéniques, et les préoccupations toxicologiques se tournent vers la toxicité chronique, principalement la cancérogenèse (**Miller et Miller, 1981**).

II.5 Impact de la pollution pétrolière sur l'environnement

II.5.1 Écosystème terrestre

Le sol est un composant essentiel de l'écosystème terrestre. Il fournit un environnement pour la croissance des plantes, le cycle des nutriments ainsi qu'une base de vie pour les microorganismes, les insectes, les animaux et les humains (**Hou, 2000**). Les effets négatifs de la pollution pétrolière dépendent du type de déversement, des caractéristiques écologiques de

la zone, de la quantité et du type de pétrole déversé, ainsi que du temps passé sur le sol et le degré d'altération (Vázquez-Luna, 2012).

Le pétrole bloque l'échange des gaz avec l'atmosphère (étant donné ses propriétés anoxiques) (Leitgi *et al.*, 2008), et change les propriétés physiques et chimiques des sols diminuant ainsi considérablement les communautés microbiennes bénéfiques pour le sol (Labud *et al.*, 2007). Ces variables microbiologiques sont en effet un bon indicateur de l'impact d'un polluant sur le sol (Eibes *et al.*, 2006). Les effets toxiques des hydrocarbures sur les sols ne se limitent pas aux micro-organismes, car ils incluent également les plantes qui souffrent de stress hydrique en raison du manque d'eau et de nutriments (Vázquez-Luna, 2012).

a. Les microorganismes

Les concentrations toxiques du pétrole sur le sol inhibent le développement de différentes espèces de nématodes, protozoaires, rotifères, algues, champignons, bactéries et actinomycètes (Chaîneau *et al.*, 2003; Ilarionov *et al.*, 2003). De même, elle induit la perte de biodiversité des communautés microbiennes, qui sont significativement pertinentes dans les cycles biogéochimiques de l'écosystème affectant, par conséquent, sa productivité et la disponibilité des nutriments.

b. Les plantes

Le pétrole forme une couche hydrophobe qui diminue la capacité de rétention d'eau des plantes, affectant directement l'émergence et la germination des graines (Quiñones *et al.*, 2003). Des concentrations élevées d'hydrocarbures endommagent la croissance et le développement des plantes en diminuant l'allongement des racines et la croissance végétative (Vázquez-Luna, 2012). Les effets létaux du pétrole brut ou des produits pétroliers sur les plantes sont causés par le contact avec le pétrole ou le pétrole dissous, l'absorption de composés pétroliers, le blocage des échanges d'air à travers les pores de la surface et par l'altération physique ou chimique du sol (Albers, 1995).

c. Les eaux souterraines

L'eau souterraine constitue une source importante d'eau potable ainsi que pour l'irrigation et l'utilisation industrielle. Si un volume important d'hydrocarbures liquides est rejeté dans le sol, les hydrocarbures migrent vers le bas généralement sous l'influence de la gravité et des forces capillaires subordonnées jusqu'à ce qu'ils atteignent les eaux souterraines. Une fois contaminé par des hydrocarbures pétroliers, il est très difficile et coûteux d'y remédier (Hou, 2000). Certains constituants des pétroles comme les BTEX ont une solubilité

élevée dans l'eau et constituent donc une menace sérieuse pour la santé humaine comme ils sont liés à la mutation et au cancer (**Adebusoye *et al.*, 2006**).

II.5.2 Écosystèmes marins

Le pétrole est rejeté dans le milieu marin de façon routinière ou accidentelle. La pollution marine par les produits pétroliers est principalement attribuée au forage, à la fabrication industrielle, au stockage et à la gestion des déchets (**Kuppusamy *et al.*, 2020**).

En milieu marin, tous les niveaux trophiques sont vulnérables à la contamination par les hydrocarbures commençant des planctons aux mammifères marins. Les organismes planctoniques sont en particulier relativement sensibles aux fractions solubles dans l'eau et aux petites gouttelettes d'hydrocarbures. Les mollusques et les crustacés de mer (moule, crabe, crevette, huître) sont les plus susceptibles d'accumuler les hydrocarbures à cause de leur mode de vie. Les crustacés qui se nourrissent de débris ou de particules en suspension seront affectés par perturbation de leur taux de reproduction (réduction du taux d'éclosion) ou leurs habitudes alimentaires (**Hentati, 2018**). Les marées noires sont présentées comme responsables de conséquences terribles pour la survie de la faune et la flore marines (**Soltani, 2004**).

Chapitre III :

**Bioremédiation des sols pollués aux
hydrocarbures pétroliers**

Chapitre III : Bioremédiation des sols pollués aux hydrocarbures pétroliers

Des quantités énormes de pétrole et de produits pétroliers pénètrent chaque année dans les environnements marins et terrestres, causant de graves préoccupations à long terme concernant toutes les formes de vie et les ressources naturelles. La décontamination des sols pollués est aujourd'hui devenue une nécessité croissante.

Plusieurs technologies de remédiation des sols pollués ont été développées, la plupart d'entre elles sont des techniques chimiques, thermiques et physico-chimiques comme elles peuvent être une solution rapide et simple pour éliminer les contaminants pétroliers. Cependant, de nombreux inconvénients sont associés à ces techniques qui nécessitent des méthodes mécaniques laborieuses. De plus, ces méthodes mécaniques sont fastidieuses, prennent du temps et ne sont capables d'éliminer les contaminants pétroliers que dans une certaine limite, laissant derrière elles une grande quantité d'huile adsorbée dans le sol (**Lim et al., 2016**).

La bioremédiation est un moyen de nettoyer les environnements contaminés en exploitant les diverses capacités métaboliques des micro-organismes pour convertir les contaminants en produits moins nocifs par minéralisation, génération d'oxyde de carbone et d'eau, ou par conversion en biomasse microbienne (**Sardrood et al., 2013**). La bioremédiation est appliquée sur des sites contaminés en utilisant des technologies pour améliorer les processus de biodégradation (**Horel, 2009**).

III.1 Les techniques de bioremédiation

La bioremédiation est un ensemble de techniques consistant à utiliser les capacités enzymatiques des micro-organismes (bactéries, algues, champignons) pour dégrader les polluants organiques. Elle peut se faire *in-situ* en introduisant dans le sol les éléments nécessaires au développement de la biomasse ou bien *ex-situ* en traitant le sol excavé (**Fokou Mbogne, 2017**).

III.1.1 Bioremédiation *in-situ*

Cette méthode est utile en présence d'une contamination profonde du sol par des polluants, souvent volatils. Elle peut également être adaptée à une contamination de grande surface (**Mougin et al., 2009**). Deux techniques principales sont adoptées pour la bioremédiation *in-situ* des sols pollués : la biostimulation et la bioaugmentation.

III.1.1.1 La biostimulation

La biostimulation implique généralement l'ajout de nutriments ou de substrats notamment l'azote et le phosphate et l'oxygène au site contaminé pour stimuler l'activité des populations microbiennes autochtones du sol (**Shahsavari et al., 2017**). Des stratégies sont généralement adoptées :

- a. Bioventing :** La bioventilation améliore l'activité des bactéries indigènes et stimule naturellement la biodégradation en induisant un flux d'air ou d'oxygène dans la zone non saturée et, si nécessaire, en ajoutant des nutriments. L'oxygène peut être fourni par injection directe d'air dans le sol.
- b. Biosparging :** Dans le biosparging, de l'air (ou de l'oxygène) et des nutriments (si nécessaire) sont injectés dans la zone saturée pour augmenter l'activité biologique des micro-organismes indigènes (**Coste et al., 2013**).
- c. Bioslurping :** C'est une stratégie de bioremédiation *in-situ* relativement nouvelle qui combine la bioventing avec un système de récupération des produits libres de la nappe phréatique et du sol (**Macaulay et Rees, 2014**).

III.1.1.2 La bioaugmentation

La bioaugmentation nécessite l'ajout de cultures microbiennes à la matrice contaminée, généralement en combinaison avec la biostimulation. En effet, une source externe de bactéries dégradant le pétrole est ajoutée à la population microbienne existante pour augmenter le taux de dégradation des hydrocarbures. Les critères de choix des microorganismes sont la physiologie et la capacité métabolique de ces microbes à dégrader les contaminants du sol (**Boopathy, 2000**).

Il existe plusieurs possibilités pour introduire des souches exogènes, isolément ou sous forme de consortiums, dans un environnement pollué prévu pour la bioremédiation. Les options les plus courantes, testées principalement en laboratoire, sont: l'ajout d'une souche bactérienne pure pré-adaptée; l'addition de consortiums pré-adaptés, l'introduction de bactéries génétiquement modifiées et l'ajout de gènes liés à la biodégradation conditionnés dans un vecteur à transférer par conjugaison dans des micro-organismes indigènes du site en cours de remédiation (**El Fantroussi et Agathos, 2005**).

Comme il n'existe pas une seule souche de bactéries qui a la capacité métabolique suffisante pour dégrader efficacement tous les composants de pétrole, de nombreuses études

ont concentrées sur différents types de bactéries et de champignons pour la remédiation des sols pollués aux hydrocarbures (**Lim et al., 2016**).

III.1.2 Bioremédiation *ex-situ*

Les processus *ex-situ* commencent par l'excavation ou le grattage du sol pollué, qui peut être transféré dans une usine de traitement (traitement hors site) ou traité sur site. Seuls les processus *ex-situ* permettent une optimisation efficace des paramètres d'incubation (pH, aération, agitation, humidité,...) (**Mougin et al., 2009**). Les processus *ex-situ* comprennent le biopiling, le compostage, les bioréacteurs et land farming (**Macaulay et Rees 2014**).

III.1.2.1 Land farming

Dans cette technique, le sol contaminé est excavé et dispersé sur un lit préparé et périodiquement labouré jusqu'à ce que les polluants soient dégradés. Le but est de stimuler les micro-organismes biodégradables indigènes et de faciliter leur dégradation aérobie des contaminants (**Basak et Dey, 2016**).

III.1.2.2 Biopiling

Il s'agit d'une technologie à grande échelle dans laquelle les sols excavés sont mélangés avec des amendements du sol, placés sur une zone de traitement et remédiés à l'aide d'une aération forcée. Les contaminants sont réduits en dioxyde de carbone et en eau. Le système de base de biopile comprend un lit de traitement, un système d'aération, un système d'irrigation / nutriments et un système de collecte par lessivage. L'humidité, la chaleur, les nutriments, l'oxygène et le pH sont contrôlés pour améliorer la biodégradation (**Basak et Dey, 2016**).

III.1.2.3 Compostage

C'est une technique qui utilise des amendements organiques (fumier, résidus de plantes, les boues d'épuration et autres déchets agricoles) pour la dégradation aérobie des polluants, généralement à des températures élevées (**Macaulay et Rees 2014**). Les températures typiques du compost se situent entre 55 et 65 °C. L'augmentation des températures résulte de la chaleur produite par les micro-organismes lors de la dégradation de la matière organique dans les déchets (**Basak et Dey, 2016**).

III.1.2.4 Bioréacteurs

Un bioréacteur comprend une chambre de réaction équipée d'un mécanisme de mixage, un système qui fournit l'oxygène et les nutriments et des pompes. Cette technologie offre un contrôle direct des facteurs environnementaux et nutritionnels (tels que l'oxygène, l'humidité, les nutriments, le pH et même la population microbienne) qui influencent la biodégradation.

Dans les bioréacteurs en phase liquide, la chambre de réaction est remplie par le sol excavé pollué par les hydrocarbures mélangés à des déchets liquides saturés de micro-organismes pour former une suspension, puis agité mécaniquement pour encourager la biodégradation aérobie (**Macaulay et Rees 2014**).

III.2 La biodégradation microbienne des hydrocarbures pétroliers

La biodégradation est la transformation d'un composé par une activité biologique. C'est la décomposition des contaminants organiques (hydrocarbures) par les microorganismes en composés plus petits à travers des processus métaboliques ou enzymatiques (**Horel, 2009**). La biodégradation implique la décomposition des composés organiques soit par biotransformation en métabolites moins complexes, soit par minéralisation en minéraux inorganiques, H₂O, CO₂ (aérobie) ou CH₄ (anaérobie). Les bactéries et les champignons ont été largement étudiés pour leur capacité à dégrader une gamme de polluants environnementaux, y compris les hydrocarbures aromatiques polycycliques récalcitrants, les hydrocarbures halogénés et les composés nitro-aromatiques (**Singh et Ward, 2004**).

Les communautés bactériennes sont les microorganismes les plus dynamiques dans la dégradation des hydrocarbures pétroliers et sont considérées comme les plus grands dégradants des déversements de pétrole dans l'environnement (pouvant se nourrir exclusivement d'hydrocarbures); ses gènes spécifiques liés à la désintégration des hydrocarbures jouent un rôle essentiel dans le processus de dégradation des contaminants pétroliers (**Mahmoud et Bagy, 2018**).

Si les applications dans le domaine de la bioremédiation se sont jusqu'à présent majoritairement focalisées sur les bactéries et la diversité métabolique qu'elles offrent, la bioremédiation fongique (mycoremédiation) se révèle également prometteuse grâce à la présence de diverses enzymes non spécifiques qui augmentent le processus de dégradation en raison de non spécificité des substrats (**Fayeulle, 2013**).

III.3 La biodégradation des hydrocarbures par les champignons (mycodégradation)

Les champignons constituent un groupe diversifié d'organismes et sont ubiquistes dans l'environnement. Ils jouent un rôle vital dans tous les écosystèmes et sont capables de contrôler le flux de nutriments et d'énergie à travers leurs réseaux mycéliens.

Les champignons sont connus pour dégrader ou provoquer la détérioration d'une grande variété de matériaux et de composés, processus connus sous le nom de mycodégradation (**Singh, 2006**).

Les champignons constituent une partie importante de la biomasse du sol. En plus de jouer un rôle clé dans le cycle des nutriments et les interactions biotiques, ils sont également intimement impliqués dans la dynamique structurale du sol. La forme filamenteuse de croissance des champignons est une structure de remplissage d'espace très efficace bien adaptée à la vie dans un environnement spatialement hétérogène tel que le sol, mais le réseau de pores labyrinthique régit finalement la façon dont les mycéliums fongiques se développent et fonctionnent dans le sol (**Ritz et Young, 2004**).

Les champignons sont équipés d'un système enzymatique bien développé qui leur donne la possibilité de se développer sur une large gamme de substrats naturels et synthétiques. Ils sécrètent différentes enzymes extracellulaires dans leur environnement périphérique et dégradent divers substrats en petites molécules qui peuvent être absorbées et métabolisées dans leurs cellules (**Sardrood et al., 2013**).

La structure mycélienne de ces micro-organismes est un autre avantage de la bioremédiation avec sa nature invasive qui permet l'exploitation d'un grand volume de sites contaminés avec une très grande surface d'échange (**Bennett et al., 2002**).

III.3.1 Description morphologique générale des champignons

La morphologie des champignons peut être unicellulaire ronde (formes levuroïdes) ou correspondre à des filaments appelés hyphes constitués d'une ou plusieurs cellules. Les cellules fongiques présentent une organisation cellulaire caractéristique des Eucaryotes. Les particularités principales des cellules fongiques sont les vacuoles, les réserves d'ergostérol, et la structure et la composition de la paroi. Les cellules apicales des hyphes ont également la propriété d'être le siège de la croissance polarisée et présentent ainsi de nombreuses vésicules servant principalement à l'exocytose des constituants pariétaux au niveau de l'apex. L'ensemble des hyphes des champignons filamenteux constituent la partie végétative appelée "mycélium" (**Fayeulle, 2013**).

Les hyphes sont diffus, tubulaires et fins avec un diamètre compris entre 2 et 15 μm et sont plus ou moins ramifiés. Chez certaines moisissures, comme par exemple *Mucor*, les cellules ne sont pas séparées par une cloison transversale, le thalle est alors dit cœnocytique ou « siphonné » alors que chez d'autres, comme par exemple *Aspergillus*, le thalle est cloisonné ou « septé » (**figure 9**). Les cloisons, appelées septa possèdent des perforations assurant la communication entre les cellules. Les caractéristiques morphologiques de ces microorganismes sont liées à leur substrat nutritif. La colonisation du substrat est réalisée par extension et ramification des hyphes (**Lecellier, 2013**).

La structure mycélienne de ces microorganismes est un avantage pour la bioremédiation par son caractère invasif qui permet la prospection d'un grand volume du milieu contaminé avec une très grande surface d'échange (Bennett *et al.*, 2002). Des réseaux d'hyphes de 1 000 à 10 000 m de long peuvent en effet être trouvés par gramme de sol en surface (Ritz et Young, 2004).

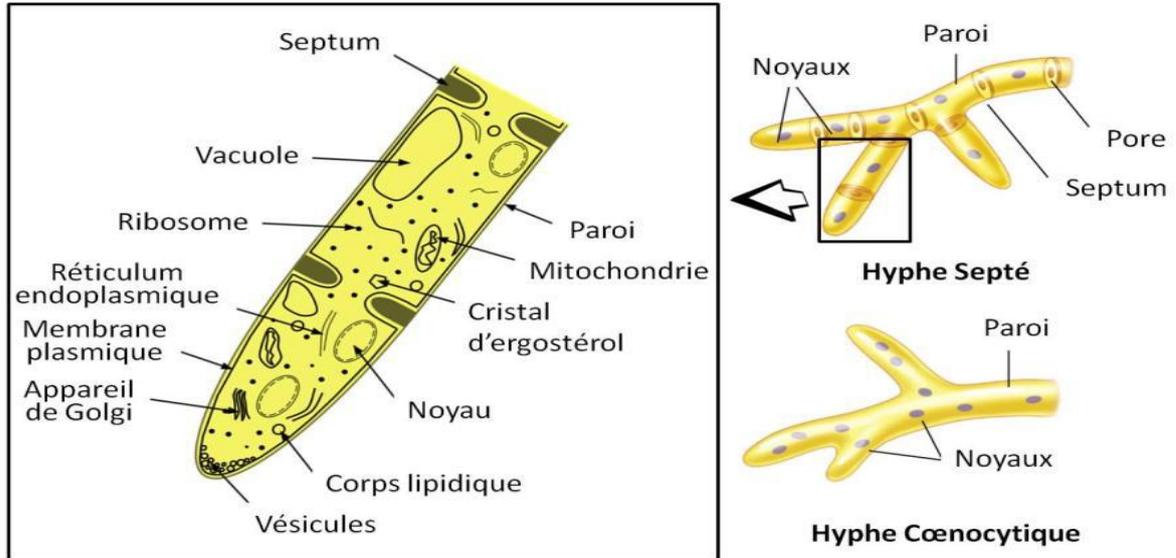


Figure 9. Ultrastructure de la cellule fongique et catégories d'hyphes présentes chez les espèces filamenteuses (Fayeulle, 2013)

Les champignons filamenteux possèdent une paroi structurellement unique, constituée essentiellement de glycoprotéines, de polysaccharides et de mannoprotéines (figure 10).

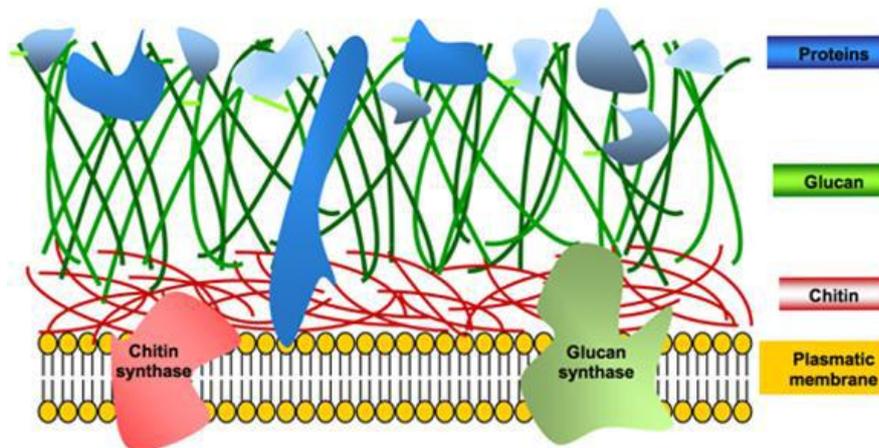


Figure 10. Schématisation de la structure de la paroi fongique (Lecellier, 2013)

Les polysaccharides sont principalement la chitine et le glucane. Les glucanes, polymères de molécules de D-glucose liées entre elles par des liaisons β -1,3 (ou parfois β -1,4) à laquelle sont liées des chaînes latérales avec des liaisons β -1,6. La chitine est un polymère de molécules de N-acétylglucosamine liées entre elles par une liaison de type β -1,4 et est généralement moins abondante que les portions de glycoprotéine ou de glucane de la

paroi (**Bowman et Free, 2006**). La fonction de ces deux polysaccharides est d'assurer la protection des moisissures vis-à-vis des agressions du milieu extérieur. La chitine joue un rôle dans la rigidité de la paroi cellulaire, les glycoprotéines jouent un rôle dans l'adhérence et les mannoprotéines forment une matrice autour de la paroi (**Lecellier, 2013**).

La composition de la paroi cellulaire est susceptible de changer et peut varier au sein d'un seul isolat fongique en fonction des conditions et du stade de croissance (**Bowman et Free, 2006**).

III.3.2 Phylogénie des champignons

La classification phylogénétique actuelle, qui base sur des analyses phylogénétiques moléculaires récentes, a permis de classer les champignons dans un règne à part au sein des Eucaryotes, le règne des Eumycota (vrais champignons, fungi ou eumycètes). Le règne des Eumycètes comprend actuellement 1 sous-règne, 7 divisions (ou embranchements) et 10 sous-divisions (**Hibbett et al, 2007**). La **figure 11** représente les divisions du règne des Eumycètes :

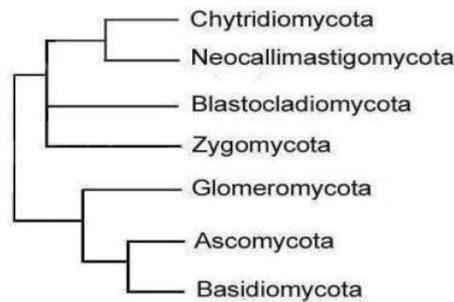


Figure 11. Les grandes divisions des Eumycètes (**Hibbett et al, 2007**)

On y trouve les quatre divisions principales :

- **Les chytridiomycètes** représentent les champignons archaïques qui auraient gardés un stade flagellé.
- L'ensemble, anciennement connu sous le nom des **Zygomycètes**, correspond à des champignons inférieurs aux formes les plus primitives avec des hyphes cœnocytiqes non cloisonnés.
- **Les Ascomycètes**, constituent le plus grand embranchement du règne fongique avec plus de 64 000 espèces décrites (**Moore et al, 2011**). La dénomination résulte de leur reproduction sexuée impliquant des sporocystes appelés "asques" qui contiennent les méiospores appelées "ascospores". Mais la reproduction asexuée par la production de "conidies" est prédominante chez cette division et a permis leur expansion (**Fayeulle, 2013**).

- **Les Basidiomycètes** constituent le second plus grand phylum du règne fongique avec 31 515 espèces environ (**Moore et al., 2011**). Ces champignons constituent la plupart des espèces macroscopiques connues mais incluent également des micromycètes filamenteux. Le nom de cet embranchement provient de leur reproduction sexuée qui fait intervenir des "basidiospores" portées à l'extérieur du méiosporocyste ou "baside" (**Fayeulle, 2013**).

Les deux dernières divisions (Ascomycètes et Basidiomycètes) sont regroupées aujourd'hui dans le sous-règne des *Dikarya*, représentant ainsi les champignons les plus évolués (**Hibbett et al., 2007**).

La distinction entre les différentes classes des champignons repose également sur le mode de reproduction sexuée. Les champignons appartenant au règne des *Eumycota* sont des champignons pour lesquels le mode de reproduction sexuée est connu. On parle alors de champignons téléomorphes. Pour certains champignons appelés anamorphes, le mode de reproduction sexuée est inconnu et seule une multiplication asexuée ou végétative est observée. L'ensemble de ces champignons sont regroupés au sein de la division des *Deuteromycota*, que l'on appelle aussi « champignons imparfaits » ou *Fungi imperfecti*. Le développement des méthodes moléculaires a permis de classer certains d'entre eux dans le règne des *Eumycota* et plus particulièrement dans les *Ascomycota* en les rattachant à une forme sexuée connue (**Lecellier, 2013**).

Nous nous intéressons dans cette étude aux champignons filamenteux saprotrophes telluriques.

III.3.3 Mécanismes de biodégradation des hydrocarbures pétroliers par les champignons

Les champignons dégradant les hydrocarbures sont connus depuis plus de cinq décennies, mais notre compréhension des mécanismes impliqués dans la dégradation catabolique des hydrocarbures est encore incomplète.

Les hydrocarbures sont dégradés par les champignons principalement dans des conditions aérobies; en fait, les champignons agissent par le biais d'enzymes qui oxydent les hydrocarbures pour former de l'eau et des résidus non toxiques ou moins toxiques (**Daccò et al., 2020**).

Les composés d'hydrocarbures diffèrent par leur sensibilité aux attaques microbiennes et ils sont généralement classés dans l'ordre décroissant suivant: n-alcanes> alcanes ramifiés>

aromatiques de faible poids moléculaire> alcanes cycliques> aromatiques de haut poids moléculaire et composés aromatiques polycycliques (**Varjani et al., 2017**).

Les alcanes et les alkylbenzènes sont généralement métabolisés par des voies métaboliques spécialisées qui commencent par l'oxydation du substrat via les mono-oxygénases du cytochrome P450 (CYP450).

Les alcènes et les alcynes insaturés, ainsi que les alicycliques, sont plus récalcitrants à la dégradation fongique et sont souvent convertis en métabolites partiellement oxydés.

Les hydrocarbures aromatiques monocycliques et polycycliques sont généralement dégradés via un ou plus de trois systèmes enzymatiques indépendants.

Les mono-oxygénases (CYP450) intracellulaires sont des enzymes qui appartiennent à la superfamille des hémoprotéines et jouent un rôle central dans le métabolisme oxydatif des métabolites endogènes dans tous les domaines de la vie (**Lamb et al., 2009**). Les CYP sont universellement présentes dans les microsomes des cellules eucaryotes. Les champignons dégradant la lignine produisent spécifiquement des peroxydases extracellulaires et des laccases qui biodégradent les hydrocarbures aromatiques. La faible spécificité fonctionnelle et le potentiel redox élevé des peroxydases et des laccases permettent l'oxydation d'une large gamme d'hydrocarbures aromatiques et d'autres contaminants récalcitrants (**Prenafeta-Boldú et al., 2018**).

III.3.3.1 Dégradation des hydrocarbures aliphatiques

La première étape de la dégradation des hydrocarbures aliphatique implique une hydroxylation, introduisant un atome d'oxygène à l'intérieur du groupe méthyle terminal pour former un alcool (**Daccò et al., 2020**). Ensuite, l'alcool est oxydé en aldéhyde correspondant puis en acide gras correspondant. L'acide gras résultant est incorporé dans les voies cataboliques centrales via *p*-oxydation, impliquant l'activation initiale de l'acide gras pour former un ester acyl-CoA. Ce dernier est souvent encore catabolisé dans le cycle de l'acide citrique conjointement avec la production d'électrons dans les chaînes de transport d'électrons (**Prenafeta-Boldu et al., 2018**).

C'est le mécanisme le plus fréquemment rencontré, mais deux variantes ont été décrites par **Boulton et Ratledge (1984)**: l'oxydation diterminale et subterminale (**figure 12**).

- Dans la voie diterminale, la molécule est oxydée en acide dicarboxylique et traitée par β -oxydation (**Abbasian et al., 2015**).
- Dans l'oxydation subterminale, l'hydrocarbure aliphatique est oxydé en un alcool secondaire puis en cétone et ester correspondants.

Par ailleurs, les aliphatiques à chaîne ramifiée et insaturés, ainsi que les alcanes cycliques, peuvent être oxydés par des champignons via plusieurs voies produisant des époxydes, des alcools, des diols et des unités d'acide carboxylique (**Prenafeta-Boldu et al., 2018**).

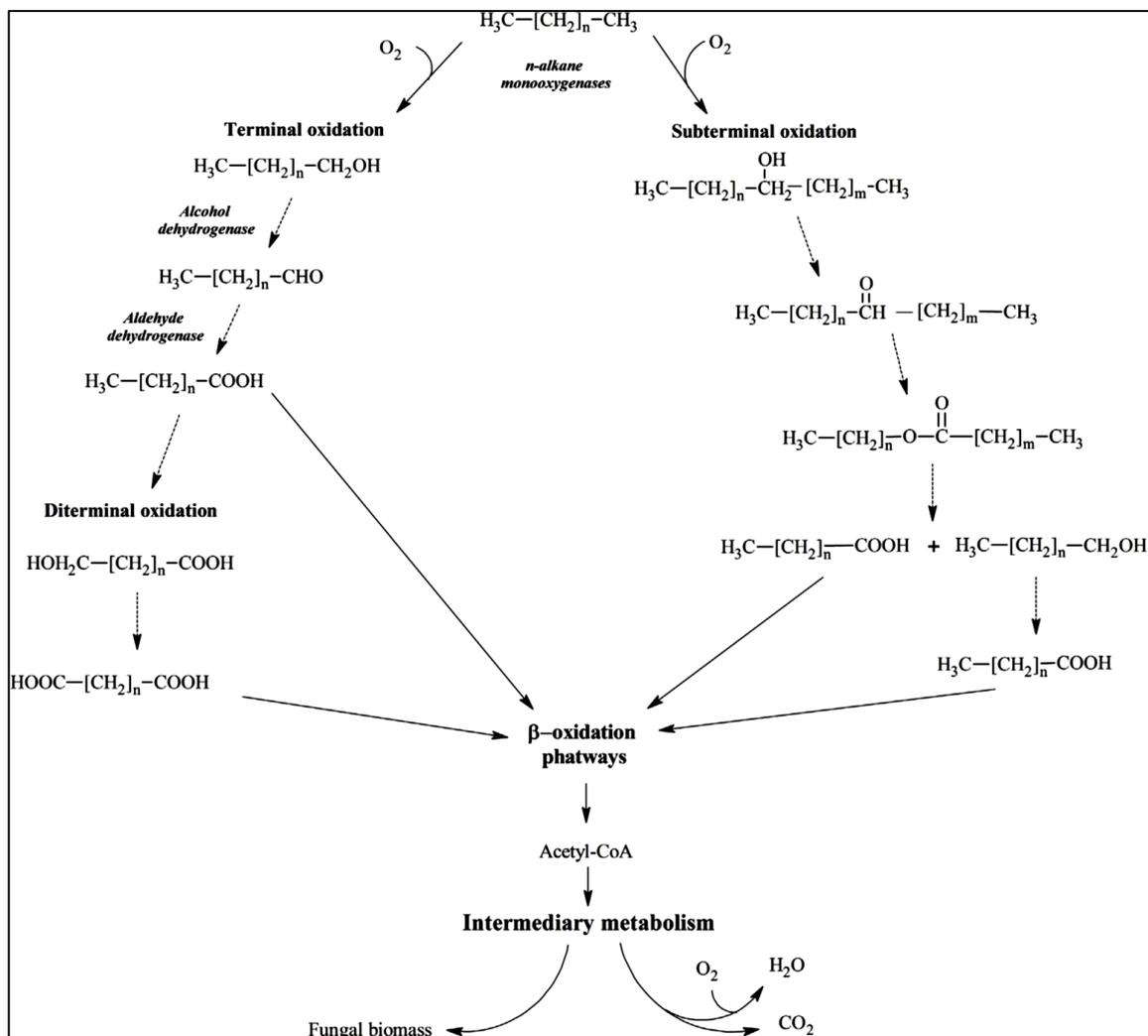


Figure 12. Dégradation aérobie des hydrocarbures aliphatiques par les champignons. Les voies terminales, diterminales et subterminales possibles pour la dégradation des n-alcane sont illustrées (**Daccò et al., 2020**)

III.3.3.2 Dégradation des hydrocarbures aromatiques

Les voies de dégradation des HAPs chez les champignons non lignolytiques (généralement majoritaires) et les champignons lignolytiques (connus sous le terme de pourriture blanche) sont différentes. Au moins deux mécanismes enzymatiques très différents sont généralement proposés pour la dégradation des hydrocarbures aromatiques: l'oxydation du cycle aromatique par les monoxygénases du cytochrome P450 intracellulaires ou l'excrétion des enzymes solubles extracellulaires du catabolisme de la lignine (les laccases et les peroxydases) l'autre utilise les enzymes extracellulaires solubles du catabolisme de la

lignine, y compris la lignine peroxydase, la manganèse peroxydase et la laccase (Tortella *et al.*, 2005).

Les produits comprennent des trans-dihydrodiols, des phénols, des quinones, des époxydes de dihydrodiol et des tétraols, qui peuvent être conjugués pour former des glucuronides, des glucosides, des xylosides et des sulfates (figure 13). Les métabolites fongiques sont généralement moins toxiques que les hydrocarbures parents (Cerniglia *et Sutherland*, 2010).

Tous ces processus métaboliques sont majoritairement de nature co-métabolique, ce qui signifie que les hydrocarbures aromatiques ne soutiennent pas la croissance fongique et sont généralement convertis en intermédiaires partiellement oxydés (Prenafeta-Boldu *et al.*, 2018).

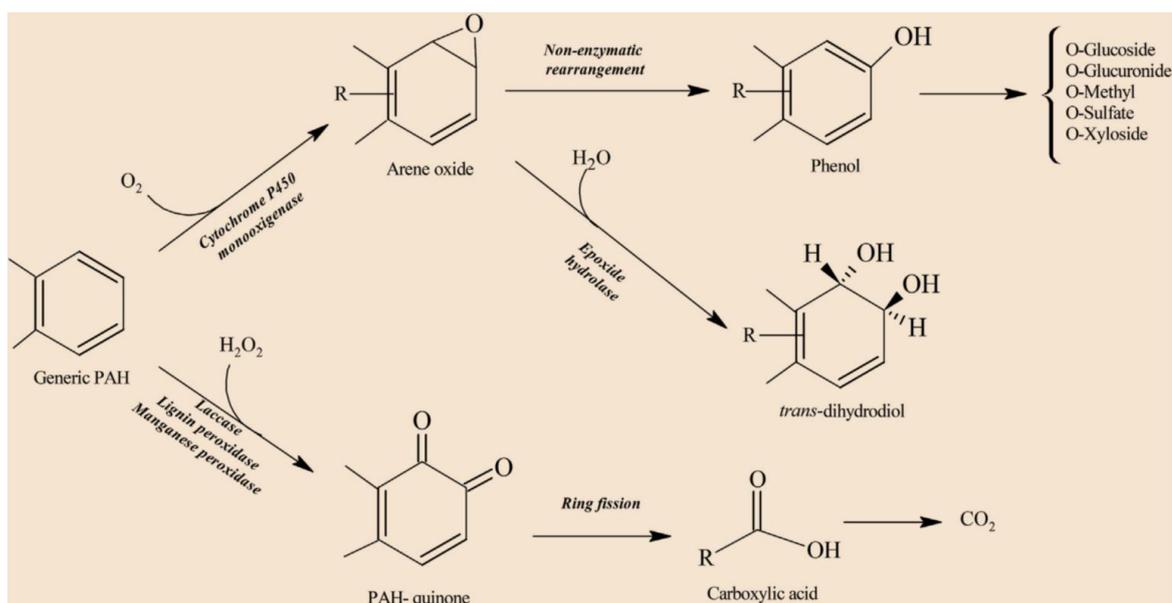


Figure 13. Différentes voies de dégradation aérobie d'un HAP par des champignons (Daccò *et al.*, 2020)

III.3.4 Les facteurs affectant la biodégradation des hydrocarbures

La biodégradation des hydrocarbures pétroliers dans l'environnement est largement affectée par des facteurs abiotiques. Les champignons peuvent résister à des fluctuations assez importantes des conditions environnementales. Les divers facteurs qui influencent les taux de croissance et les activités enzymatiques des champignons affectent également les taux de dégradation du pétrole. Plusieurs facteurs influençant la dégradation fongique des hydrocarbures pétroliers ont été reconnus (Singh, 2006). Ces facteurs sont divisés en trois catégories:

- **Facteurs physico-chimiques** (nature physique, solubilité, concentration, interface huile-eau, volatilité, etc.);

- **Facteurs environnementaux** (température, pH, lumière, salinité, niveau d'oxygène, nutriments, type de sol / sédiment, etc.);
- **Facteurs biologiques** (distribution des microorganismes dans une zone, adaptation de la population fongique, absorption, composition génétique, interactions microbiennes, etc.).

Des facteurs importants affectant le métabolisme fongique des hydrocarbures pétroliers sont résumés ci-après.

III.3.4.1 Composition chimique des hydrocarbures

Le taux de dégradation des hydrocarbures par les microorganismes dépend de la structure chimique des hydrocarbures pétroliers et de la concentration du polluant. La vitesse de biodégradation est plus élevée pour les saturés, viennent ensuite les aromatiques légers, les 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). Leur accessibilité à la biodégradation est généralement classé dans l'ordre d'accessibilité décroissant suivant : n-alcanes > alcanes ramifiés > cycloalcanes (**Leahy et Colwell, 1990**).

III.3.4.2 Etat physique des hydrocarbures

Les champignons dégradant les hydrocarbures agissent principalement à l'interface huile-eau. Cependant, des champignons peuvent se développer sur toute la surface d'une gouttelette d'huile, et la croissance ne se produit pas dans les gouttelettes d'huile en l'absence d'eau entraînée. Le mouvement des gouttelettes d'émulsion à travers une colonne d'eau permet l'absorption d'oxygène, de nutriments et d'huile pétroliers aux champignons (**Singh, 2006**).

III.3.4.3 Température

En fonction de la température, la dégradation des hydrocarbures peut se produire dans trois conditions: psychrophile, mésophile et thermophile. En général, la plupart des champignons sont mésophiles en termes d'isolement, de croissance et de reproduction. La température est essentielle pour les besoins de croissance de certains champignons avec le pétrole comme substrat. Les basses températures retardent généralement les taux de volatilisation des hydrocarbures de faible poids moléculaire, dont certains sont toxiques pour les champignons (**Singh, 2006**). Des températures plus élevées ont pour effet d'augmenter la vitesse de biodégradation. Le maximum de l'activité métabolique des microorganismes est

généralement observé à une température comprise entre 30 et 40 °C (**Bossard et Bartha, 1984**).

III.3.4.4 pH

Un autre facteur majeur de la biodégradation des hydrocarbures est l'acidité du sol car le pH influence les activités enzymatiques, le transport membranaire cellulaire et l'équilibre de la réaction catalytique (**Bonomo et al., 2001**). Plusieurs champignons poussent bien à des pH de 4 à 5 et sont plus tolérants aux conditions acides, où il est difficile pour les bactéries de se développer (**Singh, 2006**).

III.3.4.5 Oxygène

Les champignons sont à la fois des aérobies et des anaérobies mais se développent bien dans des conditions aérobies. La dégradation des hydrocarbures par les champignons se produit principalement sous forme de processus aérobie, la concentration en oxygène est l'un des facteurs limitant de la vitesse de dégradation (**Daccò et al., 2020**). Les hydrocarbures persistent dans les sédiments réduits pendant des périodes plus longues que dans les couches superficielles aérées. Les premières étapes du catabolisme des hydrocarbures aliphatiques, cycliques et aromatiques par les champignons impliquent l'oxydation du substrat par les oxygénases et l'oxygène moléculaire. Ainsi, des conditions aérobies sont nécessaires à l'oxydation des hydrocarbures dans l'environnement. Des taux négligeables de biodégradation des hydrocarbures se produisent dans des environnements anaérobies (**Singh, 2006**).

Une dégradation substantiellement plus grande de tous les composés BTEX se produit en conditions statique que dans les cultures liquides agitées (**Yadav et Reddy, 1993**).

III.3.4.6 Eléments nutritifs

L'un des autres facteurs limitants de la biodégradation est la teneur en éléments nutritifs, en particulier l'azote, le phosphore et, dans certains cas, le fer.

Les composants azotés et phosphorés sont essentiels à l'incorporation dans la biomasse fongique, la disponibilité de ces nutriments dans les zones polluées aux hydrocarbures est importante. La dégradation des hydrocarbures peut être accélérée par l'ajout du phosphate d'urée spécifique, d'engrais N-P-K, etc., pour la croissance fongique. Les cellules fongiques contiennent généralement moins d'azote que les cellules bactériennes et les champignons peuvent donc agir favorablement dans les écosystèmes qui ont une faible teneur en azote (**Singh, 2006**).

III.3.4.7 Facteurs biologiques

L'utilisation des micro-organismes appropriés pour une bioremédiation efficace d'un site pollué en conditions favorable est l'un des facteurs cruciaux. Le nombre d'organismes dégradant les hydrocarbures dans le sol contaminé détermine le taux de dégradation; un manque de ces microbes conduit à une vitesse de dégradation des hydrocarbures réduite (**Koshlaf et Ball, 2017**).

L'exposition préalable d'une population microbienne aux hydrocarbures est importante pour déterminer la rapidité avec laquelle les apports d'hydrocarbures ultérieurs peuvent être biodégradés. Ce phénomène, qui résulte de l'augmentation du potentiel d'oxydation des hydrocarbures de la population, est appelé adaptation. Les trois mécanismes interdépendants par lesquels l'adaptation peut se produire sont (1) l'induction et / ou la dépression d'enzymes spécifiques, (2) les changements génétiques qui se traduisent par de nouvelles capacités métaboliques et (3) l'enrichissement sélectif des organismes capables de transformer le ou les composés d'intérêt (**Leahy et Colwell, 1990**).

III.4 Cinétiques de biodégradation des hydrocarbures pétroliers dans le sol

Les informations sur la cinétique de la biodégradation sont extrêmement importantes car elles caractérisent la concentration du contaminant restant à tout moment et permettent de prédire les niveaux susceptibles d'être présents à un moment futur (**Yudono et al., 2013**).

L'étude de la cinétique du processus de bioremédiation se déroulent dans deux directions: (1) l'une s'intéresse aux facteurs influençant la quantité de composés transformés avec le temps, et (2) l'autre cherche le type de courbes décrivant la transformation et détermine laquelle d'entre elles correspond à la dégradation des composés donnés par la culture microbienne dans le microcosme du laboratoire et, parfois, sur le terrain (**Rončević et al., 2005**). Ceci aboutit à plusieurs types de cinétiques de dégradation dans les environnements naturels, souvent basés sur une approche empirique, et ne reflétant que des niveaux rudimentaires de connaissances sur la population microbienne et de leurs activités dans ces écosystèmes.

Les cinétiques du 1^{er} ordre (First-order kinetics) sont couramment utilisées pour décrire la cinétique de biodégradation en raison de la facilité de présentation et d'analyse des données, la simplicité du tracé du logarithme du contaminant restant en fonction du temps en ligne droite et la facilité de prédiction des concentrations futures (**Yudono et al., 2013**). Cette approche est décrite par l'équation :

$$\frac{-dC}{dt} = kC^n$$

Où C : la concentration du substrat, t : le temps, k : la constante de disparition du composé et n = 1 pour 1^{er} ordre (**Maletic et al., 2009**). Dans différents environnements, les constantes de 1^{er} ordre et le nombre de cellules capables de métaboliser le substrat seraient différents (**Greene et al., 2000**).

Partie
Expérimentale

Chapitre IV :

Matériels et Méthodes



Figure 15. Carte de l'Algérie, région d'échantillonnage du sol contaminé par les hydrocarbures pétroliers (raffinerie d'Arzew-Oran)

IV.2.2 Conditions d'échantillonnage

Les échantillons de sol ont été prélevés de chaque site à partir de la couche superficielle (0-15 cm) de manière aseptique. Chaque échantillon est placé dans un sac en plastique dont l'air est chassé avant fermeture puis ramené au laboratoire pour l'analyse.

IV.2.3 Caractérisation du sol et de la pollution

Le taux de pollution dans le sol prélevé de la raffinerie d'Arzew a été déterminé par l'extraction et le dosage des hydrocarbures totaux. La caractérisation physico-chimique totale n'ayant été menée que sur le sol non pollué prélevé de la région de Kharrouba.

IV.2.3.1 Dosage des hydrocarbures totaux dans le sol pollué

L'échantillon du sol prélevé sur le site pollué est d'abord séché pendant 48 heures, à température ambiante, il est ensuite broyé manuellement à l'aide d'un mortier, puis tamisé à 2 mm pour obtenir un échantillon homogène (Crone, 2001 ; Wu *et al.*, 2016).

L'extraction au soxhlet a été réalisée selon la méthode EPA 3540c, une quantité de 10 g du sol a été mélangée avec 10 g de sulfate de sodium anhydre pour éliminer toute trace d'eau dans l'échantillon, puis placée dans une cartouche d'extraction (Whatman). 150 ml de solvant d'extraction chloroforme ont été placés dans un ballon d'extraction de 250 ml. Le ballon a été fixé à l'extracteur de Soxhlet et l'extraction sous reflux a été menée pendant 16 heures (**figure 16**) (Bidaud, 1998). L'extrait obtenu est séparé du solvant d'extraction par évaporation sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif dont la température du bain ne dépasse pas 40 °C. Après évaporation complète du solvant, l'extrait hydrocarboné est pesé et le taux des hydrocarbures pétroliers totaux dans le sol est ainsi déterminé (Chaîneau *et al.*, 2005).



Figure 16. Montage d'extraction des hydrocarbures totaux par l'extracteur de Soxhlet

IV.2.3.2 Analyses physico-chimiques des échantillons de sol

La préparation des échantillons de sol non contaminé pour les analyses physico-chimiques a été faite après leur prélèvement. Les échantillons du sol sont séchés à l'air libre ensuite broyés et tamisés à 2 mm (**Baize, 2018**).

L'analyse des paramètres pédologiques des échantillons de sol a été réalisée par le Laboratoire Régional de l'analyse de sol et de l'eau d'irrigation INSID (Matmar -Relizane).

a) Analyse de la texture : Granulométrie

L'analyse granulométrique permet la détermination du pourcentage des matériaux constitutifs d'un sol : Argile ($<2\mu\text{m}$), limon (2 - $50\mu\text{m}$), et sable ($50\mu\text{m}$ - 2mm) (**Clément et Francoise, 1998**). La texture du sol a été déterminée par la méthode internationale de la pipette de Robinson. Après l'élimination de la matière organique et le traitement de la terre fine par un réactif dispersant les agrégats (**Schvartz et al., 2005**), on procède après un temps de sédimentation variable avec la température au fractionnement des argiles et des limons à l'aide de la pipette de Robinson (**Bonneau et Souchier, 1994**).

b) Mesure du pH

Un échantillon de 10 g de sol est mis en suspension dans 25 ml d'eau distillée. La suspension est agitée avec un barreau magnétique pendant 60 minutes à une température proche de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, et la lecture au pH-mètre est faite après stabilisation (**Bonneau et Souchier, 1994**).

c) Conductivité électrique (CE)

La conductivité électrique de l'échantillon de sol a été déterminée avec un conductimètre électrique numérique où 20 g de sol ont été mis en suspension dans 100 ml d'eau distillée (dans un rapport 1: 5 sol / eau). La suspension a été agitée par intermittence pendant une 30 minute et maintenue pendant une autre 30 minute sans aucune perturbation pour une dissolution complète des sels solubles. Après la stabilisation du sol, une cellule de conductivité a été insérée dans la solution pour prendre la lecture à 20 °C. Les valeurs ont été exprimées en $\mu\text{S} / \text{cm}$ (Baize, 1988; Zaiad, 2010).

d) Carbone organique

Le carbone organique est mesuré par la méthode de Walkley et Black (1934). Il s'agit d'une oxydation par voie humide de la matière organique, sans chauffage externe, par le mélange bichromate de potassium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) / acide sulfurique (H_2SO_4). L'excès de bichromate de potassium est ensuite dosé par une solution de fer ferreux, le sel de Mohr. La quantité de sel de Mohr versée dans la solution à doser permet de calculer la quantité de carbone organique présente dans le sol.

e) Azote totale

L'analyse de l'azote total dans l'échantillon du sol a été réalisée par la méthode de Dumas (1831), dans un système complètement automatisé. Cette méthode consiste en une combustion totale du sol broyé sous oxygène et à température élevée. Puis, par l'intermédiaire de tubes d'oxydation et de réduction, l'azote est quantitativement converti en N_2 . Les autres produits volatils issus de la combustion sont soit piégés soit isolés. Un détecteur à conductivité thermique mesure l'azote gazeux. Les résultats sont communiqués en % ou en mg d'azote.

f) Phosphore

Le phosphore est extrait par la méthode Olsen (1954). Cette méthode utilise comme extractif du bicarbonate de sodium 0.5 N à pH = 8,5.

g) Dosage des cations échangeables (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+)

Les teneurs en cations échangeables sont mesurées après extraction avec une solution d'acétate d'ammonium normale et neutre (AFNOR X 31-108), par spectrométrie d'absorption atomique.

h) Calcaire actif

Le dosage de CaCO_3 actif est réalisé par la méthode Drouineau-Galet (1951) en utilisant l'oxalate d'ammonium qui se combine au calcium du calcaire facile à dissoudre (calcaire actif)

pour former des oxalates de calcium insolubles. L'excès d'oxalate d'ammonium est ensuite dosé par une solution de permanganate de potassium en milieu sulfurique.

IV.2.4 Contamination du sol par les produits pétroliers

Afin de construire une collection fongique ou mycothèque contenant plusieurs souches fongiques telluriques avec un pouvoir de dégradation des hydrocarbures pétroliers élevé, on a réalisé une contamination artificielle du sol par les huiles pétrolières utilisées dans cette étude (pétrole, diesel et huile moteur usagée).

Le sol utilisé pour cette expérimentation est celui prélevé de la région de kharouba. Après le séchage à l'air libre, le broyage et le tamisage à 2 mm, 4kg de sol sont placés dans des pots d'environ 3000 cm³ de volume. Le sol dans chaque pot est mélangé avec 250 ml de pétrole ou de diesel ou 100 ml de l'huile de vidange. Le contenu de chaque pot est bien mélangé afin d'obtenir une contamination homogène. Les pots sont incubés à température ambiante dans un endroit exposé à l'air libre pendant 90 jours (**Jensen, 1975 ; Labud *et al.*, 2007**).

La quantité de l'huile moteur utilisé pour contaminer le sol était inférieur à celle des autres huiles pétrolières car cette huile est plus complexe, plus dense et plus toxique (**Degranges *et al.*, 1977 ; Achuba et Peretiemo-Clarke, 2008**). Après la période d'incubation, les champignons hétérotrophes présents dans chaque sol traité ont été isolés.

IV.3 Isolement de souches fongiques saprotrophes

Il est bien établi que la méthode d'isolement influence la composition des populations fongiques isolées (**Chesters et Thornton, 1956**). De ce fait, deux techniques sont utilisées dans notre étude pour l'isolement des champignons à partir des sols pollués. L'isolement concerne le sol pollué aux hydrocarbures pétroliers qui provient de la raffinerie d'Arzew ainsi que les sols artificiellement contaminés aux hydrocarbures après la période d'incubation.

L'objectif principale de ces isolements est de constituer une collection de souches fongiques afin d'étudier leur potentiel de biodégradation des hydrocarbures pétroliers et non d'effectuer un inventaire exhaustif de la diversité des micromycètes dans les sols pollués.

IV.3.1 La méthode des suspensions-dilutions

La méthode des suspensions / dilutions est décrite pour favoriser l'isolement des souches sporulantes et permet de mieux estimer la microflore à croissance lente (**Chesters et Thornton, 1956**). Le principe consiste à mettre le sol en suspension dans de l'eau stérile, puis à incorporer les différentes dilutions de cette suspension dans le milieu d'isolement (**Davet et**

Rouxel 1997). Deux milieux de culture sont utilisés pour l'isolement des champignons : Potato Dextrose Agar (PDA) et Malt Extract Agar (MEA) (**Routien, 1957 ; Collins, 1967**).

Une masse de 1 g de sol a été ajoutée au 9 ml d'eau distillée stérile, ce qui constitue la première dilution à 10^{-1} . A partir de cette dernière, des dilutions successives au dixième sont réalisées jusqu'à la dilution 10^{-6} . A partir de chaque dilution, 1 ml est prélevé et déposé dans des boîtes de pétrie puis le milieu gélosé maintenu en surfusion est versé par-dessus. L'homogénéisation est réalisée en agitant manuellement les boîtes d'un mouvement circulaire dans le plan horizontal (**Davet et Rouxel, 1997**). Le Chloramphenicol (250 mg/L) est ajouté au milieu d'isolement après son stérilisation afin d'inhiber le développement de la flore bactérienne.

Les boîtes sont incubées à 25°C puis observées quotidiennement et chaque colonie issue de chaque dilution est purifiée en vue d'être identifiée. La densité de la population fongique est mesurée par comptage des colonies après 6 jours d'incubation (**figure 17**).

IV.3.2 La méthode d'inoculation directe

La méthode d'inoculation directe décrite par **Waksman (1916)** permet d'isoler des souches métaboliquement actives dans le sol. Elle consiste à placer des particules de sol sur un milieu gélosé (MEA a été utilisé dans cette étude), incubé les boîtes à 25°C puis de repérer sous loupe binoculaire les hyphes qui émergent 24 h plus tard. Les hyphes repérés sont ensuite prélevés au micro-scalpel 48h après le début de l'incubation pour être transplantés sur un nouveau milieu (**figure 17**).

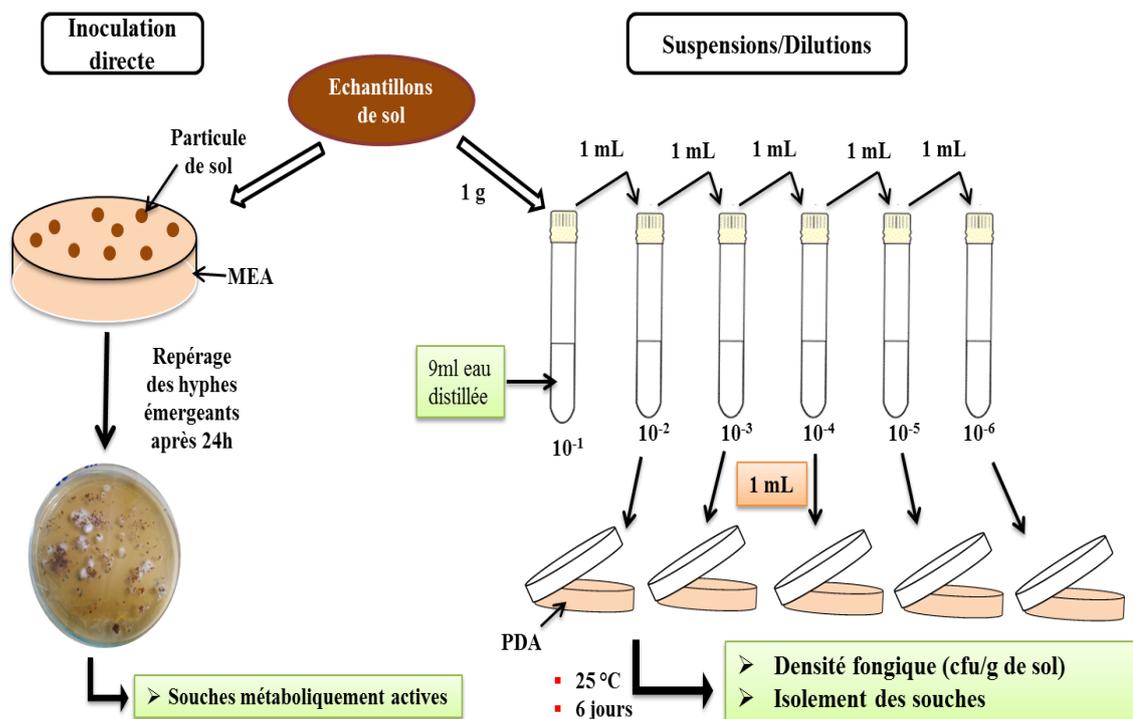


Figure 17. Isolement des souches fongiques par la méthode d'inoculation directe et la méthode des suspensions dilutions

IV.4 Identification morphologiques des champignons

L'identification des isolats fongiques a été réalisée sur la base d'arguments morphologiques en réalisant des observations macroscopiques et microscopiques à partir des cultures pures des champignons isolés.

L'identification morphologique se base sur différents manuels de morphologie mycologiques: **Gilman (1957)**; **Barnett et Hunter (1998)**; **Watanabe (2002)**; **Webster et Weber (2007)**; **Moore et al. (2011)** ; **Samson et al. (2014)** ; **Visagie et al. (2014)**; **Carmen and Sciortino (2017)**.

IV.4.1 Observations macroscopiques

La caractérisation morphologique consiste en l'observation macroscopique de l'apparence et de la vitesse de croissance des colonies sur le milieu de culture. Les caractères des colonies étudiés comprennent le taux de croissance des colonies, la texture, l'aspect des colonies, de leur revers, la couleur des mycéliums, le degré de sporulation, les pigments solubles, les structures de fructification sexuée (cléistothèces) ou asexuée (pycnides) ainsi que des amas mycéliens ou mèches (corémies) (**Samson et al., 2014**). Trois milieux de culture ont été utilisés pour la caractérisation des colonies des champignons isolés : PDA, MEA et Czapek Yeast Autolysate agar (CYA).

Les cultures sont préparées en versant 20 ml de milieu de culture dans des boîtes de pétrie de 90 mm de diamètre. Le centre du milieu est inoculé par une masse d'une culture fongique contenant des filaments ou des spores. Les boîtes sont incubées renversées à 25°C et à 30°C. Les boîtes doivent être conservées dans l'obscurité et pour permettre une aération suffisante, elles ne doivent pas être enveloppées de Parafilm (**Okuda et al., 2000**).

IV.4.2 Observations microscopiques

L'analyse microscopique d'une colonie fongique permet de déterminer l'aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conodiophores...etc. L'examen microscopique a été fait par microscope optique (Primo Star - Zeiss, grossissement x40 et x100), après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle et coloration de la préparation au rouge Congo ou le Bleu de méthylène.

La technique de culture sur lame a été également réalisée pour une bonne visualisation des organes de fructification (**Harris, 1986**). Cette technique consiste à déposer une tige de verre en U dans le fond d'une boîte de pétrie. Sur ce chevalet, une lame porte objet stérile est placée, puis un carré de gélose Sabouraud (15x15 mm) d'environ 5 mm d'épaisseur est fixé au-dessus. Les côtés du bloc de gélose sont ensuite inoculés avec de petits fragments de la culture à examiner. L'ensemble est recouvert d'une lamelle stérile et déposé dans une boîte de pétrie contenant un peu d'eau distillée stérile (**figure 18.a**). La boîte est incubée à 25°C, puis examinée après l'apparition de spores sur la culture (**figure 18.b**) en déposant la lamelle sur une goutte de colorant posée sur une lame propre (**figure 18.c**). Le carré de gélose a été aussi examiné sous microscope (grossissement x10 et x40) (**figure 18.d**).

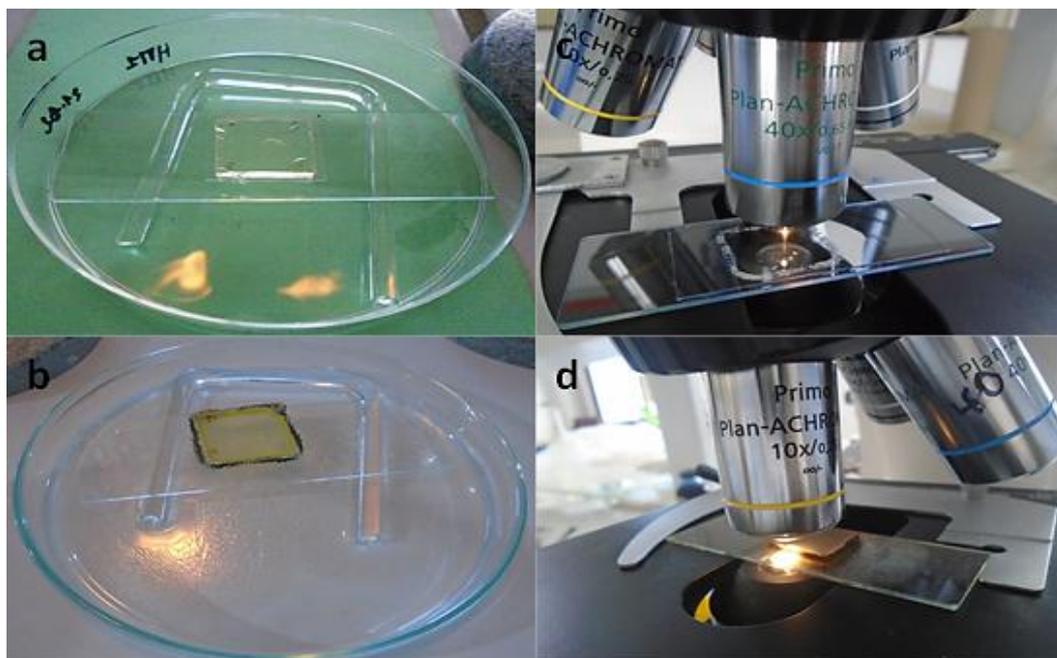


Figure 18. La technique de la culture sur lame. (a) montage de la culture sur lame. (b) les spores sur la culture après incubation. (c) examen microscopique de la lamelle posé sur un colorant. (d) examen microscopique du bloc de gélose sporulé

IV.4.3 Conservation des champignons

Les isolats fongiques purs sont conservés pour une courte durée à 4°C sur gélose PDA incliné, les cultures sont repiquées tous les 6 mois dans des milieux neufs.

Pour une conservation de longue durée, la souche est cultivée dans un culot de gélose en tube. Lorsque le champignon est suffisamment développé, il est recouvert de quelques millilitres d'huile de paraffine stérile. Les souches peuvent être conservé jusqu'à 5 ans à température ambiante. Un repiquage préalable est nécessaire avant la réutilisation de la souche.

IV.5 Identification moléculaire des isolats sélectionnés

Six isolats fongiques ont été sélectionnés pour l'analyse moléculaire. L'identification moléculaire des souches fongiques a été réalisée au niveau du laboratoire de DIAG-GENE (Angers, France).

IV.5.1 Extraction d'ADN fongique

L'ADN a été extrait des mycéliums fongiques par l'utilisation du kit Qiagen Dneasy mini Plant en suivant le protocole du fabricant (QIAGEN, Hilden, Germany). Les étapes du protocole sont détaillées dans l'annexe 2.

La quantité et la qualité des extraits d'ADN est contrôlée par Spectrophotomètre NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Etats-Unis) et stockées à -20 °C pour la prochaine utilisation.

IV.5.2 Amplification d'ADN

Les régions ITS (internally transcribed spacer) de l'ADNr nucléaire ont été amplifiées par PCR à l'aide du couple d'amorces spécifique des champignons ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990 ; Gardes et Bruns, 1993).

Les essais d'amplifications PCR ont été réalisés avec un thermocycleur d'iCycler de Biorad (Biorad, USA) avec les amorces universelles de la région d'ITS synthétisées par Eurofins Genomique, (France).

ITS 1 (5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3')

ITS 4 (5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

Ces amorces permettent d'amplifier un fragment ITS d'une taille d'environ 700 paires de bases. 2µl d'ADN génomique sont amplifiés dans un volume final de 25µl de mixture réactionnelle contenant tous les réactifs nécessaires pour l'amplification PCR résumés dans le **tableau 3** ci-dessous.

Tableau 3. Mixture réactionnelle pour amplification PCR

Réactifs	Concentrations initiales	Concentrations Finales	Volume à prélever
Eau ultra pure			15,1 µl
Tampon de Taq Promega	5X	1X	5,0 µl
MgCl ₂	25mM	1,5 mM	1,5 µl
dNTP	25mM	0,2mM	0,2 µl
ITS1	10 µM	0,20	0,5 µl
ITS4	10 µM	0,20	0,5 µl
Taq polymérase Promega	5U	1U	0,2 µl
ADN génomique			2 µl
Volume final			25 µl

Les cycles de réactions de PCR se composent de 3 phases principales : la dénaturation de l'ADN, l'hybridation et l'élongation. Les cycles sont programmés dans le thermocycleur comme indiqué dans le **tableau 4**.

Tableau 4. Conditions des cycles de la température PCR

Dénaturation initiale	95°C pendant 5min
35cycles	
Dénaturation	95°C
Hybridation	55°C
Elongation	72°C
Elongation finale	72°C pendant 7min
Stockage avant révélation	10°C jusqu'à utilisation

Les produits d'amplification ont été révélés après une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% d'un dépôt de 10µl de produit de PCR suivie d'une coloration dans un bain de bromure d'éthidium (0,5 µg/ml). Après migration, l'ADN a été visualisé et photographié sous UV.

IV.5.3 Séquençage

Le séquençage automatisé du fragment ITS de l'ADN ribosomale est réalisé selon la technique de Sanger (GATC biotech, Germany).

L'identification des souches étudiées a été effectuée par la comparaison des séquences obtenus aux séquences homologues contenues dans la banque de données Gene Bank à travers le portail NCBI (National Center for Biotechnology Information) en utilisant le programme Blast (Basic Local Search Tools <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Les résultats sont exprimés en pourcentage de similarité de la souche à identifier avec les espèces les plus proches.

IV.5.4 Analyse phylogénétique

Les séquences ont été alignées en utilisant le software disponible MUSCLE. L'histoire évolutive a été déduite en utilisant la méthode de Maximum Likelihood et Tamura 3-parameter model. L'approche du Maximum Composite Likelihood (MCL) est adoptée pour faire des regroupements entre espèces par une matrice de distances par paires. L'arbre phylogénétique est construit par MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

IV.6 Tests préliminaire pour la biodégradation des hydrocarbures pétroliers

Dans une première étape expérimentale, les isolats fongiques purifiés sont soumis à une sélection selon leurs capacités à oxyder, tolérer et utiliser les hydrocarbures pétroliers comme source de carbone.

IV.6.1 Test de l'indicateur redox 2,6-dichlorophénol indophénol (DCPIP)

La capacité des champignons isolés à dégrader le pétrole, le diesel et l'huile de moteur usagée a été initialement examinée selon la technique modifiée de **Hanson *et al.* (1993)**, basé sur l'indicateur redox 2,6 dichlorophénol indophénol (DCPIP). Le milieu minéral Bushnell-Haas (BH) a été utilisé pour le test de sélection qui consiste en: $MgSO_4$ (0,2 g/l), $CaCl_2$ (0,02 g/l), KH_2PO_4 (1 g/l), K_2HPO_4 (1 g/l), NH_4NO_3 (1 g/l) et $FeCl_2$ (0,05 g/l), eau distillée (1000 ml), pH 7,0 (**Bushnell et Haas, 1941**). Deux explants de mycélium prélevés à l'emporte-pièce (\varnothing 8 mm) sur les bords d'une jeune culture fongique sur milieu PDA sont utilisés pour inoculer 50 ml de milieu BH liquide dans des flacons de 250 ml. 1% (v/v) du pétrole, diesel ou l'huile usagée et 0,016 mg/ml de l'indicateur redox ont été ajoutés au milieu BH. Un contrôle sans inoculum a été également préparé. Tous les flacons ont été incubés pendant 2 semaines à 30°C sous agitation rotative constante à 120 tr/min (**figure 19**). Le changement de couleur de l'indicateur (DCPIP) du bleu (forme oxydée) à incolore (forme réduite) indique la capacité des champignons à dégrader le pétrole (**Souza *et al.*, 2016**).

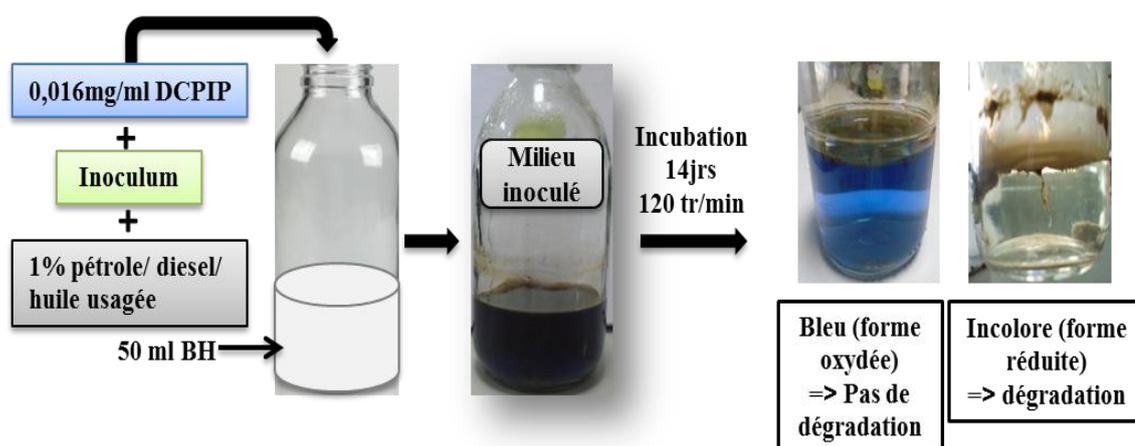


Figure 19. Test de dégradation des hydrocarbures par l'indicateur redox DCPIP

IV.6.2 Test de dégradation utilisant un milieu spécifique

Les isolats fongiques sont transférés dans un milieu spécifique pour la croissance des champignons adaptés aux hydrocarbures (hydrocarbon-adapted fungi « HAF ») selon **Oudot *et al.* (1993)**. Le milieu est composé de : KCl (0,25 g/l); NaH_2PO_4 (1 g/l); $MgSO_4$ (0,5 g/l); NO_3NH_4 (1 g/l); eau distillée (1000 ml). Chaque isolat est cultivé dans des tubes (20x200 mm) qui contiennent 20 ml du milieu HAF et 0.1 ml de pétrole, diesel ou l'huile usagée. Les

tubes sont incubés sans agitation à 28 ± 1 °C pendant 21 jours (**figure 20**). Les isolats fongiques qui montrent une croissance visible de mycélium ou d'hyphes et/ou une sporulation sont évalués comme potentiellement capables d'utiliser les hydrocarbures pétroliers comme source de carbone et d'énergie (**Elshafie et al., 2007**).

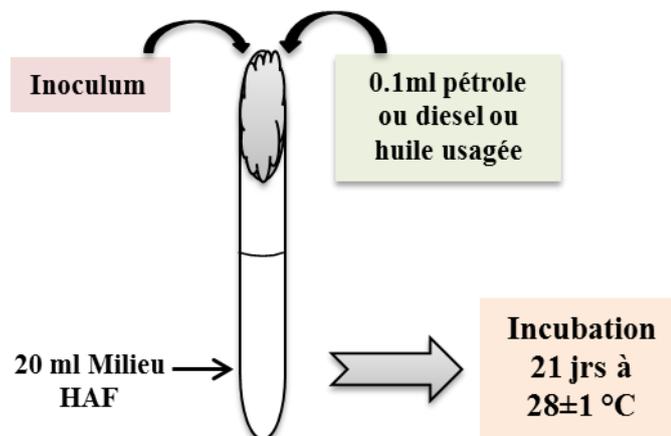


Figure 20. Protocole de dégradation des hydrocarbures en milieu HAF

IV.7 Etude quantitative de la biodégradation des hydrocarbures

IV.7.1 Test de biodégradation des hydrocarbures en milieu liquide

La mesure du pourcentage de dégradation de chacun des trois huiles pétrolières a été réalisée en milieu BH liquide. L'expérimentation est faite dans des flacons de 250ml contenant 100 ml de milieu BH liquide (pH = 7) et 2% (v/v) de pétrole brut ou de diesel, et 50 ml de BH avec 1% (v/v) d'huile usagée comme seule source de carbone, séparément. Des explants de mycélium (trois disques de 8 mm Ø) prélevés sur les bords d'une culture active sur PDA ont été inoculés dans chaque fiole. Ensuite, les cultures ont été incubées à 30 °C pendant 40 jours. Des fioles du milieu BH contenant chaque hydrocarbure sans inoculum sont préparées comme témoins qui permettent de quantifier l'évaporation et de mesurer la biodégradation. Tous les tests ont été réalisés en triplicata (**Maddela et al., 2015**).

Les flacons ont été secoués manuellement à des intervalles réguliers pendant toute la durée de l'expérience pour faciliter le contact de la phase huile-cellule (**Davies et Westlake, 1979; Chaillan et al., 2004**).

IV.7.1.1 Extraction des hydrocarbures et analyse gravimétrique

En fin de culture, les produits pétroliers résiduels sont récupérés par extraction liquide-liquide. Le pétrole et le diesel ont été extraits séquentiellement avec des aliquotes de 40 ml d'éther de pétrole: acétone (1:1) dans une ampoule à décanter et agités vigoureusement pour séparer les hydrocarbures adsorbés sur les mycéliums. Ensuite, le mélange d'extraction est laissé reposer pour se décanter. La phase organique contenant le solvant avec l'hydrocarbure

extrait a été récupérée et le solvant a été évaporé sous pression dans un évaporateur rotatif dont la température du bain ne dépasse pas 40 °C (Al-Jawhari, 2014). L'huile de moteur usagée résiduelle a été récupérée par la même procédure précédente en utilisant le toluène comme solvant d'extraction (Adesodun et Mbagwu, 2008). Après évaporation complète du solvant, le résidu hydrocarboné est pesé puis le taux de dégradation est quantifié par gravimétrie. Le pourcentage des hydrocarbures totaux dégradés a été déterminé à partir de la formule suivante (Chaillan *et al.*, 2004 ; Hock *et al.*, 2018):

$$\% \text{ dégradation} = \frac{a - b}{a} \times 100$$

a : poids du pétrole, diesel ou l'huile usagée résiduel dans le témoin,

b : poids du pétrole, diesel ou l'huile usagée résiduel dans la culture.

IV.7.1.2 Détermination de la biomasse fongique

Après l'extraction des hydrocarbures résiduels, la phase aqueuse contenant la biomasse fongique a été filtrée par un papier filtre (Whatman N °1). La masse fongique récupérée est séchée à 70 °C jusqu'à un poids constant. Le gain en biomasse sous chaque traitement et le contrôle correspondant a été enregistré; et la différence entre le gain dans le traitement et le contrôle a été considérée comme étant due à l'activité de biodégradation des hydrocarbures par le champignon (Ameen *et al.*, 2016).

IV.7.1.3 Détermination du pH final de la culture

Le pH du milieu de culture est mesuré à la fin du temps de l'expérience pour l'ensemble des répétitions et pour les témoins par une sonde de pH-mètre (figure 21).

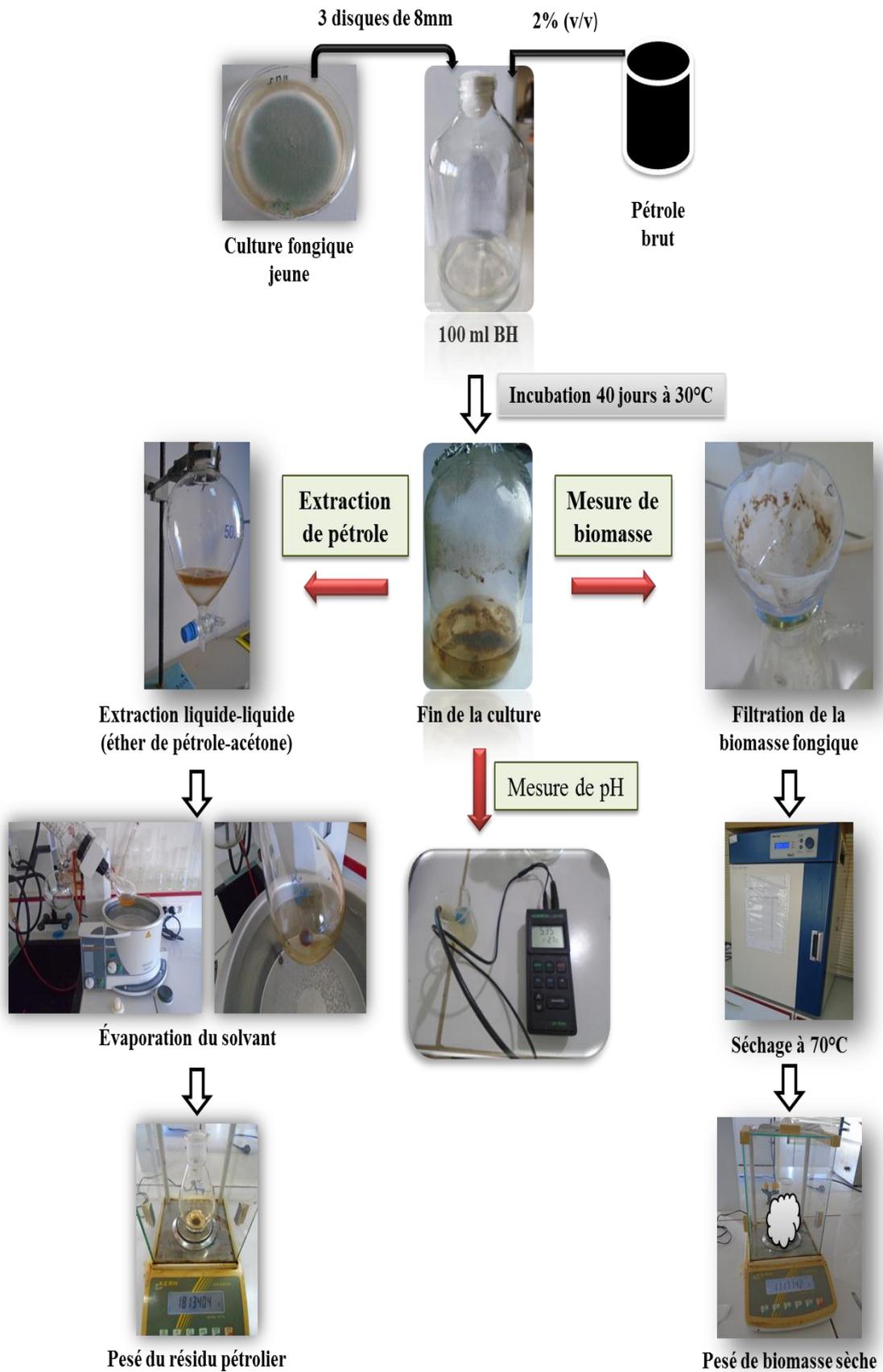


Figure 21. Les étapes de l'étude quantitative de la dégradation du pétrole

IV.7.2 Etude de la cinétique de biodégradation

L'étude de la cinétique de biodégradation peut nous aider à mieux comprendre le mécanisme de la dégradation fongique des hydrocarbures pétroliers. Une estimation de la biodégradation des hydrocarbures au fil du temps a été réalisée, des flacons contenant 100 ml de milieu BH et 2% (v/v) de pétrole ou de diesel ou 1% (v/v) de l'huile usagée ont été inoculés avec les souches sélectionnées et incubés à 30 °C pendant 40 jours. À des intervalles de 10 jours, des flacons inoculés ont été sacrifiés et la quantité d'huile pétrolière restante et la biomasse mycélienne accumulée ont été mesurées.

Les paramètres de la cinétique de biodégradation des hydrocarbures ont été calculés en appliquant le modèle cinétique du premier ordre (Aggary *et al.*, 2013 ; Al-Hawash *et al.*, 2018b) :

$$C_t = C_0 e^{-kt}$$

Où

C_t : la concentration (g / l) d'hydrocarbures résiduelle au temps t,

C_0 : la concentration initiale d'hydrocarbures,

k : la constante de biodégradation (jour⁻¹)

t : le temps (jour).

Le temps de demi-vie de la biodégradation ($t_{1/2}$) des hydrocarbures est calculé comme suit:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

IV.8 Optimisation de biodégradation des hydrocarbures pétroliers

Les isolats fongiques les plus puissants ont été sélectionnés pour la recherche des conditions de culture optimales pour la biodégradation des hydrocarbures pétroliers. Deux paramètres physico-chimiques ont été étudiés : la température d'incubation et le pH initial du milieu de culture.

IV.8.1 pH optimal

L'effet du pH initial sur la biodégradation du pétrole, diesel et l'huile usagée a été étudié. Les milieux BH ont été préparés à pH 5, 6, 7, 8 et 9 en utilisant le HCl 1N et le NaOH 1N. Les flacons ont été préparé comme dans la partie de l'étude quantitative de dégradation des hydrocarbures (paragraphe 7.1) puis incubés pendant 40 jours à 30° C (**Khan *et al.*, 2015**).

Tous les tests sont réalisés en trois répétitions. À la fin de la période d'incubation, le taux de dégradation, la biomasse accumulée et le pH final du milieu ont été mesurés.

IV.8.2 Température optimale

L'effet de la température d'incubation sur la biodégradation de chaque huile pétrolière a été étudié à 20, 25, 30, 35 et 40 °C. Les flacons ont été préparés et inoculés par les isolats fongiques comme cité ci-dessus, puis incubés pendant 40 jours. Le pH du milieu est ajusté à 7. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque traitement. Le pourcentage de dégradation et la biomasse accumulée sont mesurés à la fin de l'expérimentation.

IV.9 Essais de mycoremédiation en microcosmes de sol

Suite aux expériences en milieu minéral, cinq isolats fongiques sont sélectionnées pour une étude de dégradation des hydrocarbures pétroliers en échantillons de sols contaminés au pétrole, diesel ou l'huile de moteur usagée. Les expériences sont menées en laboratoire dans des microcosmes de sol contrôlés.

Les cinq isolats ont été appliqués aux sols contaminés séparément et un consortium contenant 3 isolats sélectionnés a été aussi utilisé pour la bioremédiation des sols pollués.

Pour développer notre protocole, nous nous sommes inspirés de tests existants pour la bioremédiation des sols pollués aux hydrocarbures pétroliers.

IV.9.1 Préparation de l'échantillon de sol

IV.9.1.1 Site d'échantillonnage

L'échantillon du sol utilisé pour l'expérimentation est un sol agricole prélevé d'une ferme situé à la commune de Bled Touahria au sud de la wilaya de Mostaganem, Algérie (**figure 22-23**). Le prélèvement correspond à la couche superficielle du sol (0 – 25 cm). Environ 10 kg du sol ont été prélevés du site et amenés au laboratoire dans des sacs en plastique.

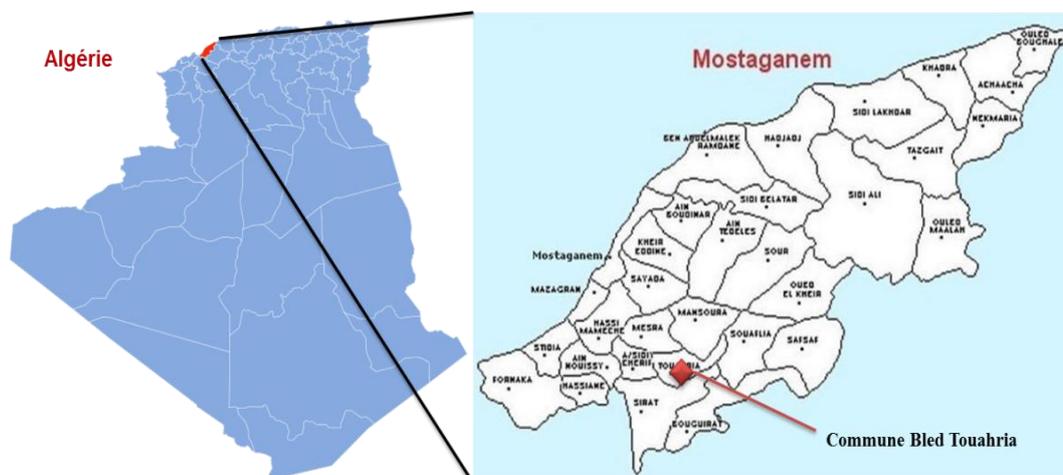


Figure 22. Localisation géographique du site d'échantillonnage



Figure 23. Site d'échantillonnage du sol

IV.9.1.2 Prétraitement du sol

L'échantillon du sol est d'abord séché à l'air libre pendant une semaine, broyé et tamisé à 2 mm pour éliminer la fraction supérieure à cette taille. Une partie du sol a été utilisée pour faire les analyses physico-chimiques (protocoles cités auparavant) ; et le reste a été stérilisé pour éliminer la population microbienne indigène du sol qui peut affecter la croissance et l'effet de nos isolats au cours de la période d'incubation.

Le sol a été stérilisé par autoclave pendant 1 heure à 120 °C, trois fois successive avec un intervalle de 24 heures (Trevors, 1996).

IV.9.1.3 Contamination du sol par les hydrocarbures

Le sol a été pollué par chacun des trois hydrocarbures pétroliers à une concentration finale de 10 % (v/p) (Abioye *et al.*, 2010 ; Agarry et Latinwo, 2015). Les huiles ont été bien mélangées avec le sol à l'aide d'une spatule stérile, puis laissées 7 jours pour permettre aux hydrocarbures d'être bien absorbés par le sol.

IV.9.2 Préparation de l'inoculum

Les champignons sélectionnés pour cette essai ont été cultivé sur une gélose PDA dans des boites de pétrie. Après la croissance, les spores ont été récoltées en imbibant la surface de la culture fongique par l'eau distillée stérile contenant 0.05 % Tween 80. La solution de spores est ensuite filtrée pour éliminer les filaments du mycélium. La solution des spores est mélangée au vortex à haute vitesse pour séparer les spores en agrégat puis la concentration des spores est déterminée en comptant le nombre de spores par un Hématimètre de Malassez (Potin *et al.*, 2004).

IV.9.2.1 Sélection et préparation du consortium

Afin de sélectionner trois isolats pour construire le consortium, un test d'antagonisme entre les cinq champignons sélectionnés précédemment a été réalisé (Zafra *et al.*, 2017).

Les isolats fongiques ont été testés pour leur activité antagoniste deux par deux en utilisant la méthode d'opposition directe (**Dennis et Webster, 1971**). Un disque de mycélium de 5 mm de l'isolat fongique a été placé à environ 1 cm de la paroi d'une boîte de pétrie contenant la gélose PDA et du côté opposé, un disque de taille similaire d'un autre isolat a été placé également (**figure 24**). Les boîtes ont été incubées à 25 ± 2 °C (**Landum et al., 2016**).

Le rayon de la colonie de chaque champignon ainsi que la distance entre les deux colonies sont mesurés chaque jour et à la fin de la croissance. Le pourcentage d'inhibition est calculé par la formule suivante (**Royse et Ries, 1978**):

$$I(\text{pourcentage d'inhibition}) = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$$

Où R_1 : le rayon de la colonie dans le control

R_2 : le rayon de la colonie dans le test

Les champignons qui ont montré un pourcentage d'inhibition faible ont été sélectionnés pour préparer le consortium. L'inoculum de consortium est préparé en mélangeant des volumes égaux de l'inoculum de chaque isolat.

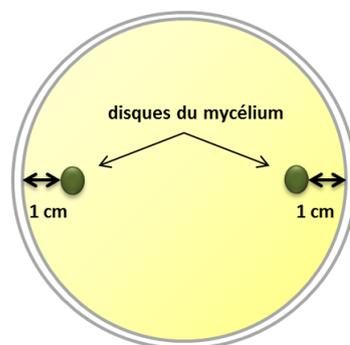


Figure 24. Schéma de l'expérience d'antagonisme sur boîte de pétrie (milieu PDA)

IV.9.3 Préparation du Bulking agent (agent gonflant)

Bulking agents (agents gonflant) sont des matériaux de faible densité qui, lorsqu'ils sont ajoutés aux sols, abaissent la densité apparente du sol, augmentent la porosité et peuvent contribuer à augmenter la diffusion de l'oxygène (**Vasudevan et Rajaram, 2001**). De tels changements dans un sol augmentent l'aération et stimulent l'activité microbienne. Bulking agents sont aussi utilisés dans la mycoremédiation pour servir comme support pour la croissance des champignons dans le sol (**Atagana et al., 2006 ; Zafra et al., 2017**). Bulking agents utilisés pour la bioremédiation sont généralement des déchets issus de biomasse bon marchés comme le foin, la sciure, la balle de riz, bagasse de canne à sucre, tiges de maïs, paille et son de blé...etc.

Pour cette expérimentation, le son de blé a été choisis comme bulking agent pour le processus de bioremédiation (**Vasudevan et Rajaram, 2001 ; Meysami et Baheri, 2003**). Le son de blé est peu couteux, facile à obtenir et présente une teneur élevée en azote et phosphore servant ainsi comme une source de nutriments additionnelle pendant la dégradation des hydrocarbures (**Barathi et Vasudevan, 2003**). Le son de blé a été rempli dans des flacons en verre et stérilisé par autoclave à 121 °C pendant 20 minutes (**Obuekwe et Al- Muttawa, 2001**).

IV.9.4 Description de l'expérimentation (développement des microcosmes)

Les microcosmes sont réalisés dans des boites en plastique rectangulaires (20x15x10 cm³) préalablement stérilisé par des rayons Ultra-violet (UV) germicide. Chaque boite est remplie par 300 g de sol stérilisé et artificiellement contaminé par les hydrocarbures (pétrole, diesel et l'huile usagée, à 10 %). Le rapport C:N:P du sol a été maintenu à 100:10:1 par l'addition de NH₄NO₃ comme source d'azote et le KH₂PO₄ comme source de phosphore (**Mancera-López et al., 2008**). Le sol a été humidifié par l'eau distillée à 60% de sa capacité de rétention d'eau (29% pour notre sol) (**Azin et al., 2018**).

Le son de blé (bulking agent) a été ajouté au sol à raison de 6% (**Meysami et Baheri, 2003**). Avant addition aux microcosmes, le son de blé stérilisé a été humidifié par 30 % (v/p) d'une solution de BH et inoculé par la solution de spores de chaque isolat testé d'une manière à ce que la concentration initial de l'inoculum soit 10⁴ spores par gramme de sol (**Potin et al., 2004**). Le son de blé inoculé a été ensuite versé sur la surface du sol dans les microcosmes puis incubé à 30°C jusqu'à ce que le mycélium fongique ait poussé et recouvre complètement la surface de l'agent gonflant (**Meysami et Baheri, 2003 ; Kota et al., 2014**). Le contenu des microcosmes est complètement mixé puis incubé à 30 °C pendant 90 jours. L'humidité a été maintenue à 60% par l'ajout de l'eau distillée stérile chaque semaine. Des microcosmes témoins contenant le sol stérilisé et contaminé par chaque hydrocarbure ont été également préparés. Deux répétitions ont été préparées pour chaque traitement ainsi que les témoins (**figure 25**).

IV.9.5 Extraction et dosage des hydrocarbures totaux résiduels

La bioremédiation a été évaluée par dosage des hydrocarbures pétroliers totaux résiduels dans chaque microcosme et comparé au témoin. 10g de sol ont été prélevés des microcosmes au temps 0, après 45 jours et à la fin de d'incubation (90 jours). Les échantillons du sol ont été utilisés pour l'extraction des hydrocarbures résiduels par Soxhlet comme cité précédemment dans l'étape de dosage des hydrocarbures totaux dans le sol pollué. Les

pourcentages de dégradation ont été calculés par rapport aux contrôles et les paramètres de la cinétique de biodégradation ont été déduits.

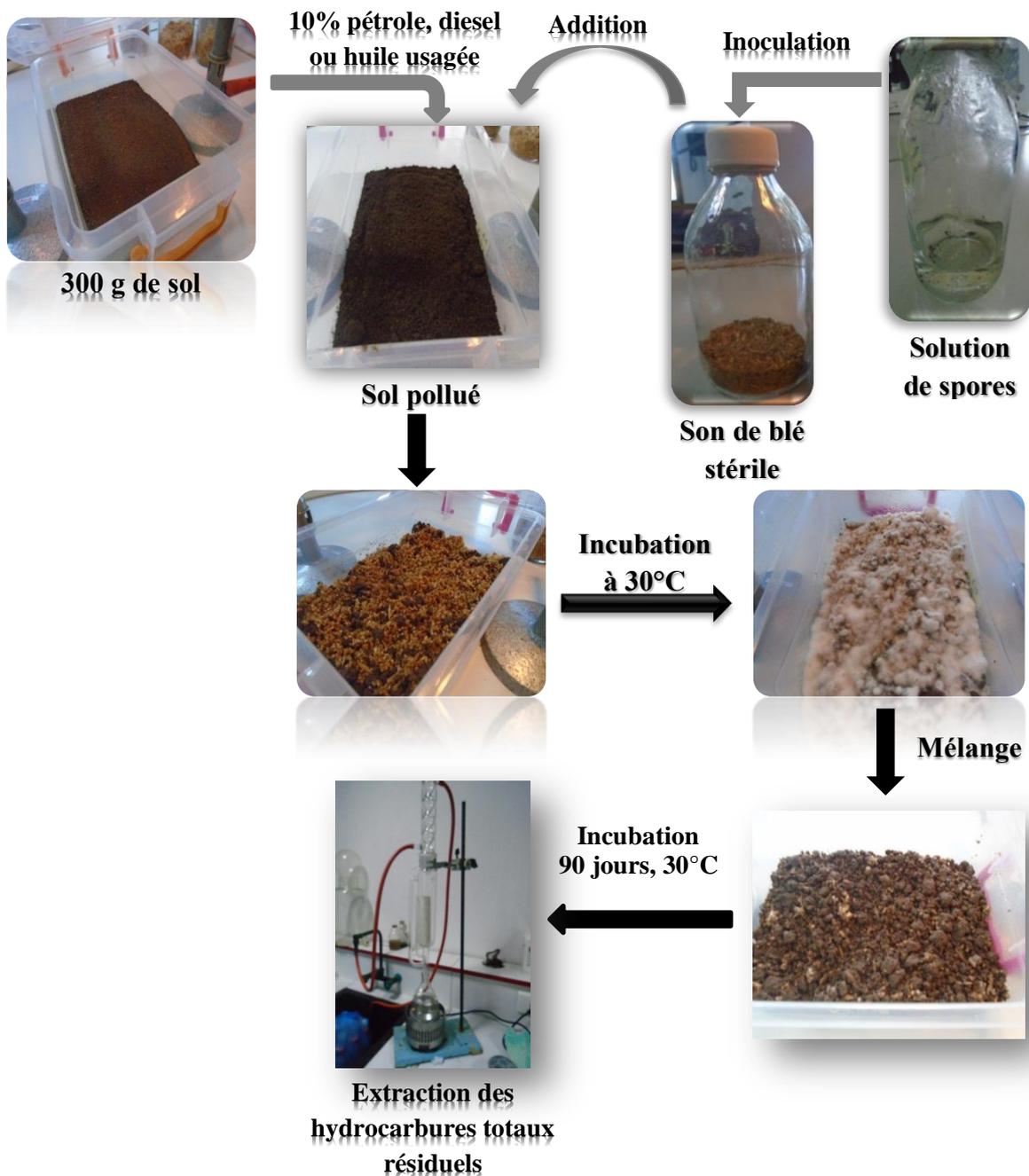


Figure 25. Déroulement du test de mycoremédiation en microcosme de sol

IV.10 Amélioration du pouvoir de dégradation des hydrocarbures par mutagénèse

Plusieurs procédures sont utilisées pour améliorer les souches microbiennes, qui entraînent toutes des changements dans la séquence d'ADN. La mutation est parmi les évènements qui conduisent à ces changements.

La mutation est l'altération permanente d'un ou plusieurs nucléotides à un site spécifique le long du brin d'ADN. Dans de nombreux cas, les mutations sont nocives, mais certaines mutations qui surviennent rendent l'organisme mieux adapté à son environnement et améliorent ses performances biocatalytiques. La capacité de mutation d'un microorganisme est une propriété importante de l'ADN car elle crée une nouvelle variation dans le pool génétique.

La modification et l'amélioration de la souche par mutation sont généralement obtenues en soumettant le matériel génétique (*in-vivo* ou *in-vitro*) à une variété d'agents physiques ou chimiques appelés mutagènes (**Parekh et al., 2000**).

Le rayonnement ultraviolet (UV) est un agent mutagène physique qui a montré son efficacité dans les processus de mutagénèse pour améliorer les souches microbiennes (**Jafari et al., 2017**). Ce sont des rayons électromagnétiques divisés en trois types en fonction de leurs fréquences : UV-A (315-380 nm), UV-B (280-315 nm) et UV-C (100-280 nm) qui sont les plus énergétiques (**García-Cela et al., 2015**). Les mutations induites par les rayons UV peuvent être des transversions, délétions, frameshift ou transitions (**Parekh et al., 2000**).

La mutagénèse par les rayons UV a été appliquée sur deux isolats sélectionnés dans le but d'améliorer génétiquement leur pouvoir de biodégradation des hydrocarbures pétroliers. Les champignons sélectionnés pour cette expérience représentent un isolat qui possède un potentiel de dégradation des trois hydrocarbures pétroliers testés et un isolat qui n'a montré aucun pouvoir de dégradation dans les tests préliminaires.

IV.10.1 Préparation de l'inoculum

Une solution de spore a été préparée à partir d'une jeune culture de chaque isolat sur gélose PDA. Les spores ont été suspendues dans un flacon contenant de l'eau distillée stérile additionnée de 0.05% Tween 80. La solution a été filtrée vers un papier filtre pour éliminer les filaments mycéliens puis la concentration des spores a été calculée par un hématimètre de Malassez. La concentration finale des spores dans la solution est menée à 10^6 spores/ml (**Hoffman et Wood, 1985**). Enfin, des tubes à essais stériles ont été remplis par 10 ml de la solution des spores et conservés à 4 °C jusqu'à leur utilisation.

IV.10.2 Traitement par les rayons Ultra-violet

L'irradiation des isolats fongiques a été réalisée dans une chambre fermée contenant une lampe à UV (GE G15T8, Germicidal UVC, 15 Watt, 254 nm) (**figure 26.a**). Avant chaque irradiation, la lampe UV a été allumée au minimum 30 minutes pour assurer l'asepsie de la chambre. La solution des spores dans chaque tube a été versée dans des boîtes de pétrie.

Chaque boîte est placée dans la chambre à une distance de 10 cm de la lampe UV (**Kumar et al., 2015**) (**figure 26.b**), puis irradiée à un temps fixé : 0 ; 1 ; 2 ; 4 ; 16 ; 24 et 32 minutes. Les boîtes sont récupérées immédiatement après l'irradiation et placées dans l'obscurité pour éviter la photo-réactivation.

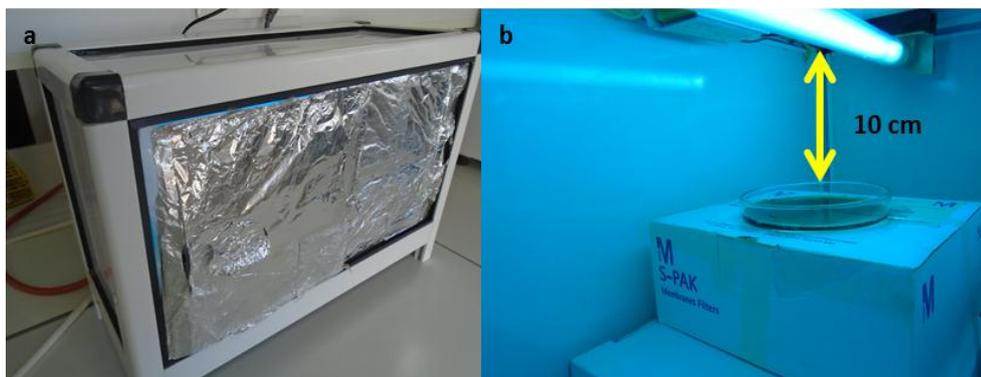


Figure 26. (a) la chambre à UV. (b) irradiation de la solution de spores

IV.10.3 Estimation du nombre de spores vivante après irradiation par UV

Les solutions de spores irradiées ont été diluées au dixième jusqu'à 10^{-4} puis 100 μ l de la dernière dilution ont été étalés sur la surface d'une gélose PDA contenant 0.05 g/l Rose Bengale. Les cultures ont été incubées à 30 °C pendant 2 jours puis le nombre de colonies apparus dans chaque boîte a été dénombré et la concentration des spores dans les solutions correspondantes et calculé. Enfin la courbe de survie a été établie et utilisé pour déterminer la dose létale qui permet de tuer 95% des spores initiales.

IV.10.4 Sélection des mutants

Les mutants ont été sélectionnés à partir de la boîte représentant la dose létale selon une analyse macroscopique des colonies (taille, forme et couleur différente). Ils sont ensuite purifiés sur milieu PDA puis utilisés pour tester leur pouvoir de dégradation des trois huiles pétrolières.

IV.10.5 Biodégradation des hydrocarbures par les mutants sélectionnés (analyse gravimétrique)

Le potentiel de biodégradation de pétrole, diesel et l'huile usagée par les souches mutantes sélectionnées a été analysé en milieu minéral BH par le protocole décrit auparavant (Etude quantitative de la biodégradation des hydrocarbures).

Le pourcentage de dégradation a été déterminé à la fin de l'expérimentation par la méthode gravimétrique et comparé avec celui avant mutation pour détecter l'existence de tout changement dans le pouvoir de dégradation des hydrocarbures chez les souches mutantes.

IV.11 Analyses statistiques

Dans chaque expérimentation réalisée en triplicata, les résultats sont exprimés sous forme de moyennes et de leurs écarts types.

L'analyse ANOVA à un facteur suivie par le test post-hoc de Tukey a été réalisée pour comparer les moyennes des pourcentages de dégradations des hydrocarbures calculés dans les différentes conditions durant cette étude. Des lettres permettent de distinguer les groupes statistiquement différents au sein des représentations graphiques.

Les quantités de biomasse fongique accumulées dans chaque traitement et le témoin correspondant ont été comparées par le test de Student-T.

Les analyses statistiques des résultats ont été réalisées à l'aide de logiciels IBM SPSS Statistics 25. Pour tous les tests, la signification statistique a été définie au seuil de probabilité de 5% ($p < 0.05$).

Chapitre V :

Résultats et discussion

Chapitre V : Résultats et discussion

V.1 Caractérisation des échantillons du sol

V.1.1 Dosage des hydrocarbures totaux dans le sol pollué

La détermination des hydrocarbures pétroliers totaux (TPH) constitue une des approches les plus largement utilisées pour évaluer les polluants pétroliers et établir les niveaux de nettoyage cibles pour le sol (Yang *et al.*, 2013).

Le taux de contamination par les hydrocarbures pétroliers dans les deux échantillons du sol pollué provenant de la raffinerie d'Arzew a été estimé par le dosage des hydrocarbures totaux (TPH), le résultat en TPH est de 182.44 g/kg du sol pour l'échantillon du site S1, et de 191.94 g/kg pour l'échantillon du site S2. Le pourcentage d'hydrocarbures dans ces échantillons du sol est de 18.2% et 19.2 % pour S1 et S2, respectivement.

Ces résultats montrent un niveau de pollution très élevé dans les deux échantillons du sol analysés. La concentration des TPH dans les deux échantillons étudiés est supérieur à ceux obtenus auparavant par **Benchouk (2017)** et **Dilmi (2019)** qui ont enregistré 82 g/kg et 86 g/kg des hydrocarbures totaux, respectivement, pour des échantillons de sol contaminés prélevés depuis la même raffinerie. Cette pollution peut être attribuée aux déversements accidentels des huiles pétrolières suite au processus de transport, de raffinage et de stockage des hydrocarbures pétroliers dans la raffinerie.

V.1.2 Caractéristiques physico-chimiques du sol non contaminé

Nous avons caractérisé, après tamisage à 2 mm, le sol prélevé depuis la zone non contaminé du site de Kharrouba en termes de pH, de la conductivité électrique CE, du carbone organique, d'azote totale, de phosphore, calcaire actif et le dosage des cations échangeables (Ca^{2+} , Mg^{2+} , k^+ , Na^+). La texture du sol est décrite suite à une analyse granulométrique. Les résultats obtenus sont illustrés dans **le tableau 5**.

L'analyse granulométrique montre que le sable est la fraction prédominante. Ainsi, l'échantillon est un sable limoneux. Le pH est neutre (**Soltner, 1989**), le sol est légèrement salé (CE = 0.560 ds/m) d'après l'échelle de la salinité (**Durand, 1983**). L'échantillon du sol est limité en matière organique en raison de la faible teneur en carbone organique (0.69%). Des teneurs faibles en azote ont été également observées.

Le dosage des cations échangeables présents dans le sol est important pour l'évaluation de la disponibilité des nutriments dans le sol (**Fayeulle, 2013**). Notre échantillon comporte des concentrations faibles en cations mais présente une dominance de Ca^{++} (22.74

meq/100g). Un faible taux de carbonate de calcium actif a été enregistré ce qui donne un sol non calcaire.

Tableau 5. Propriétés physico-chimiques du sol (site de Kharrouba)

Propriétés du sol	Valeurs
Sable (%)	84.2
Limon (%)	5.0
Argile (%)	10.8
pH	7.35
CE (dS/m)	0.56
Matière organique (%)	1.19
Carbone organique (%)	0.69
Azote total (%)	0.05
P (mg/kg)	39.7
Ca ⁺⁺ (meq/100g)	22.74
Mg ⁺⁺ (meq/100g)	1.12
Na ⁺ (meq/100g)	1.17
K ⁺ (meq/100g)	0.25
Calcaire actif (%)	1.75

V.2 Isolement des champignons filamenteux saprotrophes

V.2.1 Population fongique totale

La méthode des suspensions/dilutions a été utilisée afin de réaliser un comptage des populations fongiques cultivables totales dans les échantillons du sol contaminés aux hydrocarbures pétroliers. **La figure 27** présente les résultats de ces comptages après 7 jours d'incubation.

Les résultats obtenus ont montré une augmentation importante de la population fongique totale dans les échantillons du sol contaminés par les hydrocarbures pétroliers après 3 mois d'incubation par rapport au sol témoin non contaminé (**figure 27.a**). La plus grande densité des champignons a été enregistrée dans le sol qui a subi une contamination par l'huile de moteur usagée ($4,1 \cdot 10^6$ CFU/g), suivit par le sol pollué au pétrole ($2,0 \cdot 10^5$ CFU/g) ensuite le sol pollué au diesel ($6,0 \cdot 10^4$ CFU/g). La densité de la population fongique dans le sol témoin a été la plus faible ($3,0 \cdot 10^3$ CFU/g).

Le but de polluer les échantillons de sol par les trois hydrocarbures pétroliers était d'augmenter le nombre des champignons saprotrophes tolérant les hydrocarbures et de favoriser l'apparition d'espèces fongiques capables de dégrader les hydrocarbures pétroliers.

Il a été établi que peu de temps après un impact pétrolier, la population microbienne hétérotrophe totale augmente très sensiblement, dans le sol comme dans les sédiments marins

(Oudot *et al.*, 1987). Atlas (1995) a rapporté que la présence d'une pollution pétrolière augmente la population des microorganismes dégradant les hydrocarbures dans le sol de 1% à typiquement 10% de la population totale. La densité fongique observée dans le sol pollué prélevé du site S1 de la raffinerie d'Arzew était très grande par rapport à celui du site S2 (figure 27.b). L'échantillon du site S2 a montré une concentration très élevée des hydrocarbures totaux ce qui a probablement affecté la flore fongique de cet échantillon.

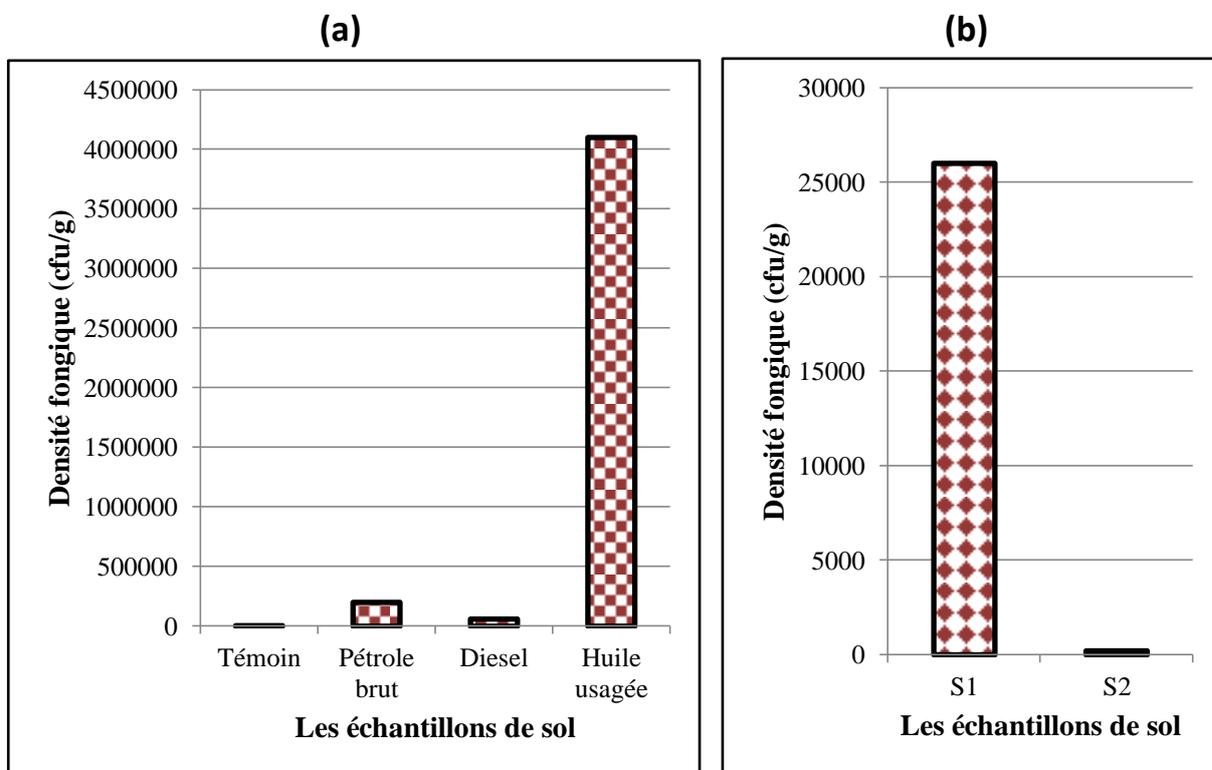


Figure 27. Densités de la population fongique dans les échantillons de sol : (a) contaminés artificiellement par les hydrocarbures pétroliers, (b) prélevés de la raffinerie d'Arzew

V.2.2 Isolats fongiques purifiés

La méthode des suspensions-dilutions et la méthode d'inoculation directe ont permis d'isoler et de purifier 35 isolats fongiques qui ont été identifiés morphologiquement puis intégrés dans l'étude de biodégradation. Les figures 28 ; 29 ; 30 et 31 permettent de voir la diversité morphologique très importante des cultures des isolats fongiques obtenues sur les milieux PDA, CYA et MEA.

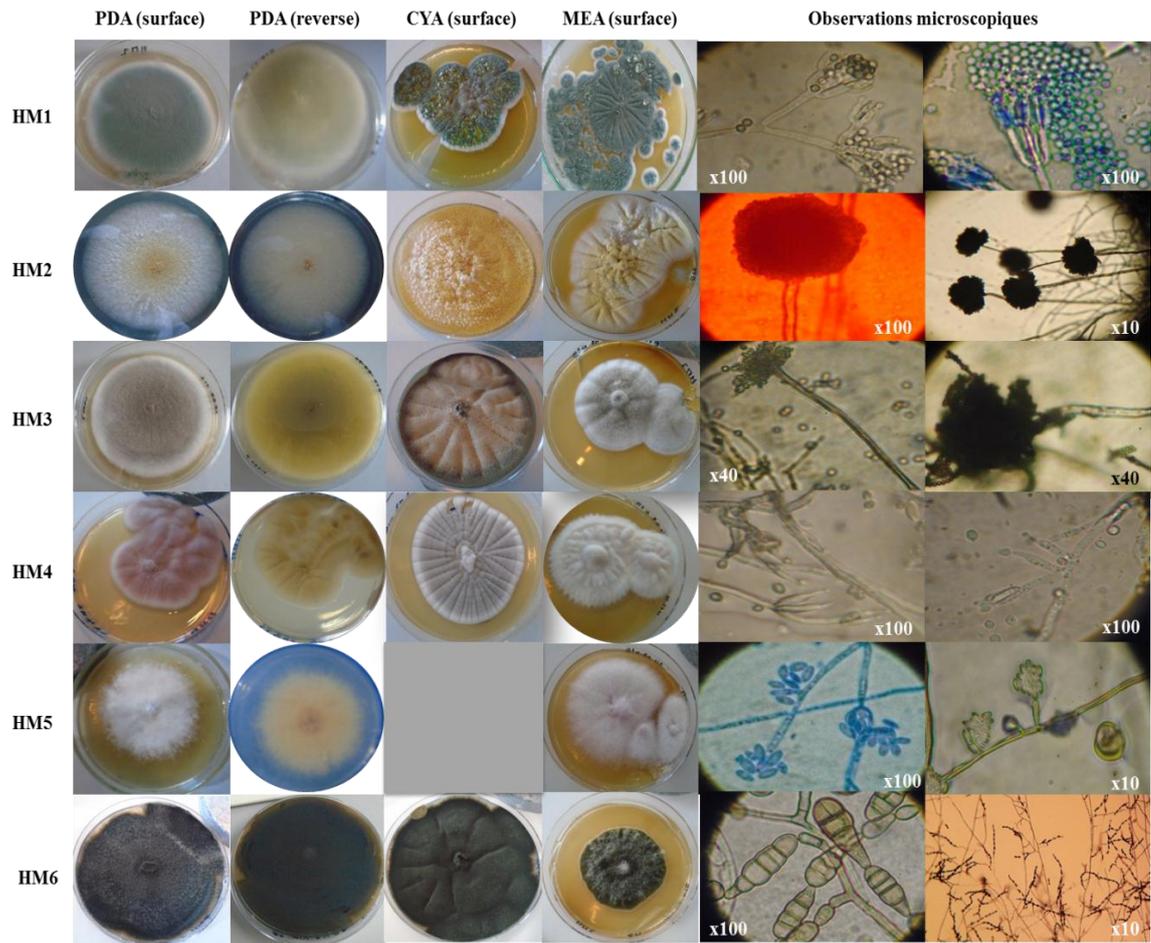


Figure 28. Aspects macroscopiques et microscopiques des champignons isolés du sol pollué au l'huile usagée (HM : huile moteur)

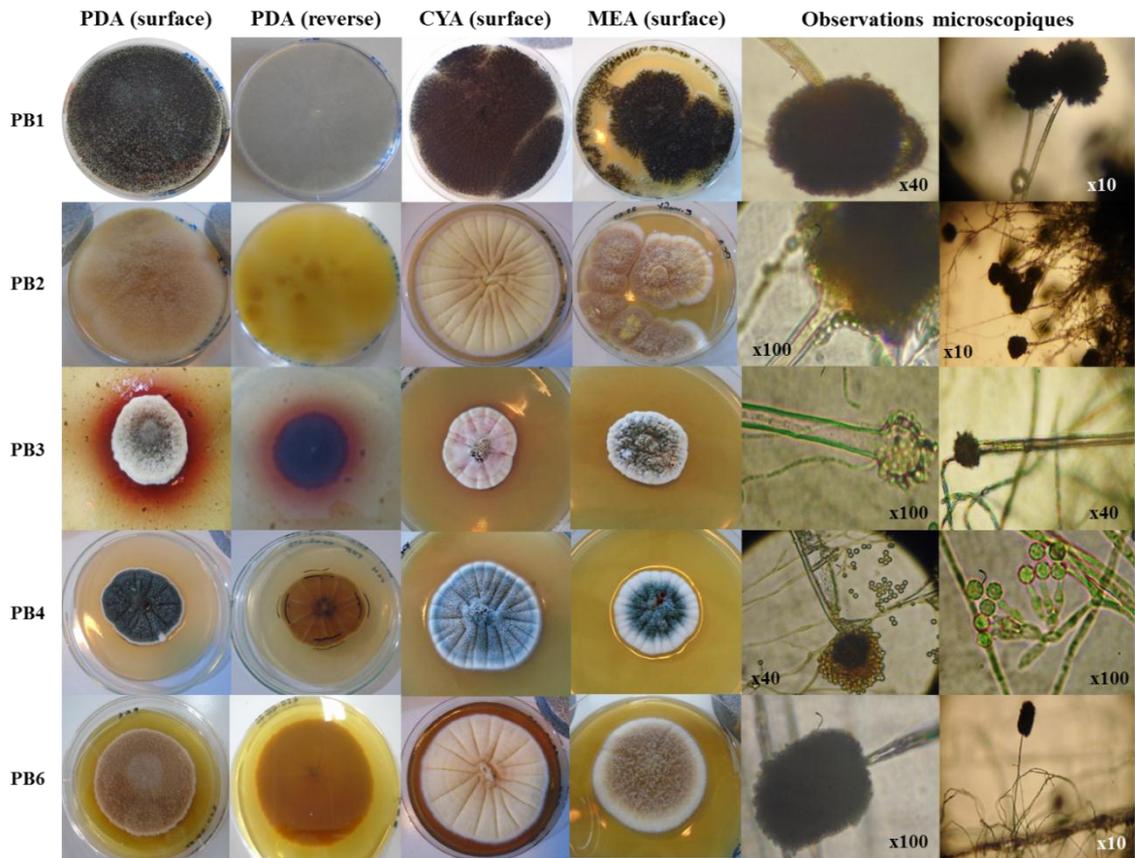


Figure 29. Aspects macroscopiques et microscopiques des champignons isolés du sol pollué par le pétrole (PB : pétrole brut)

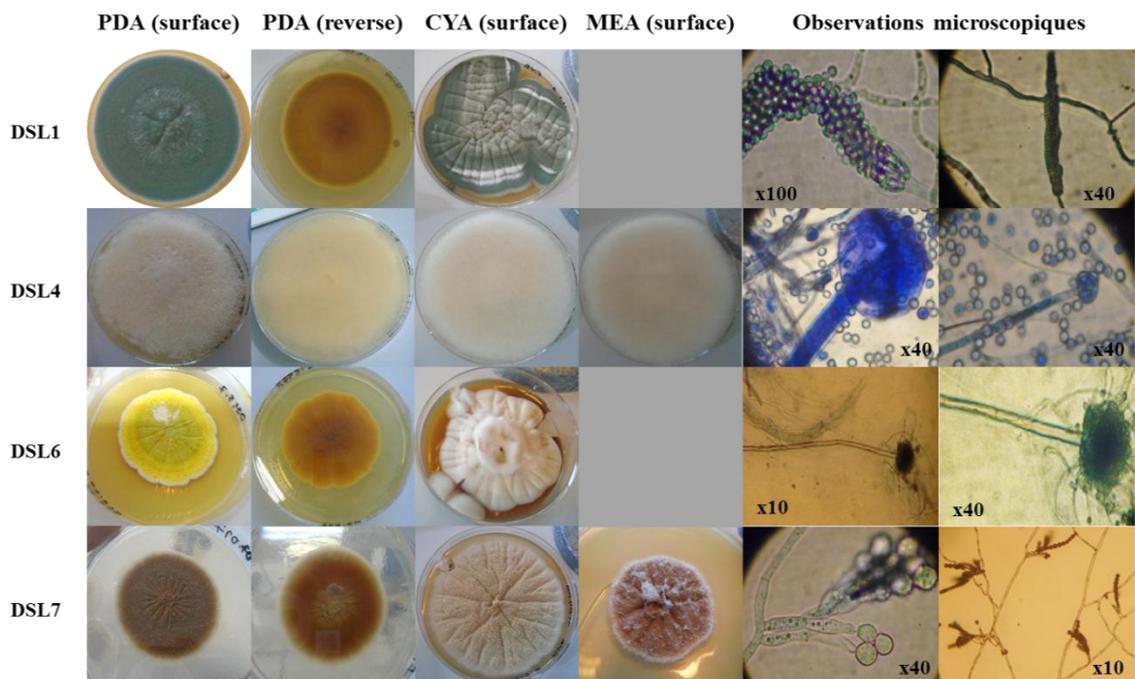


Figure 30. Aspects macroscopiques et microscopiques de quelques champignons isolés du sol pollué par le diesel (DSL : diesel)

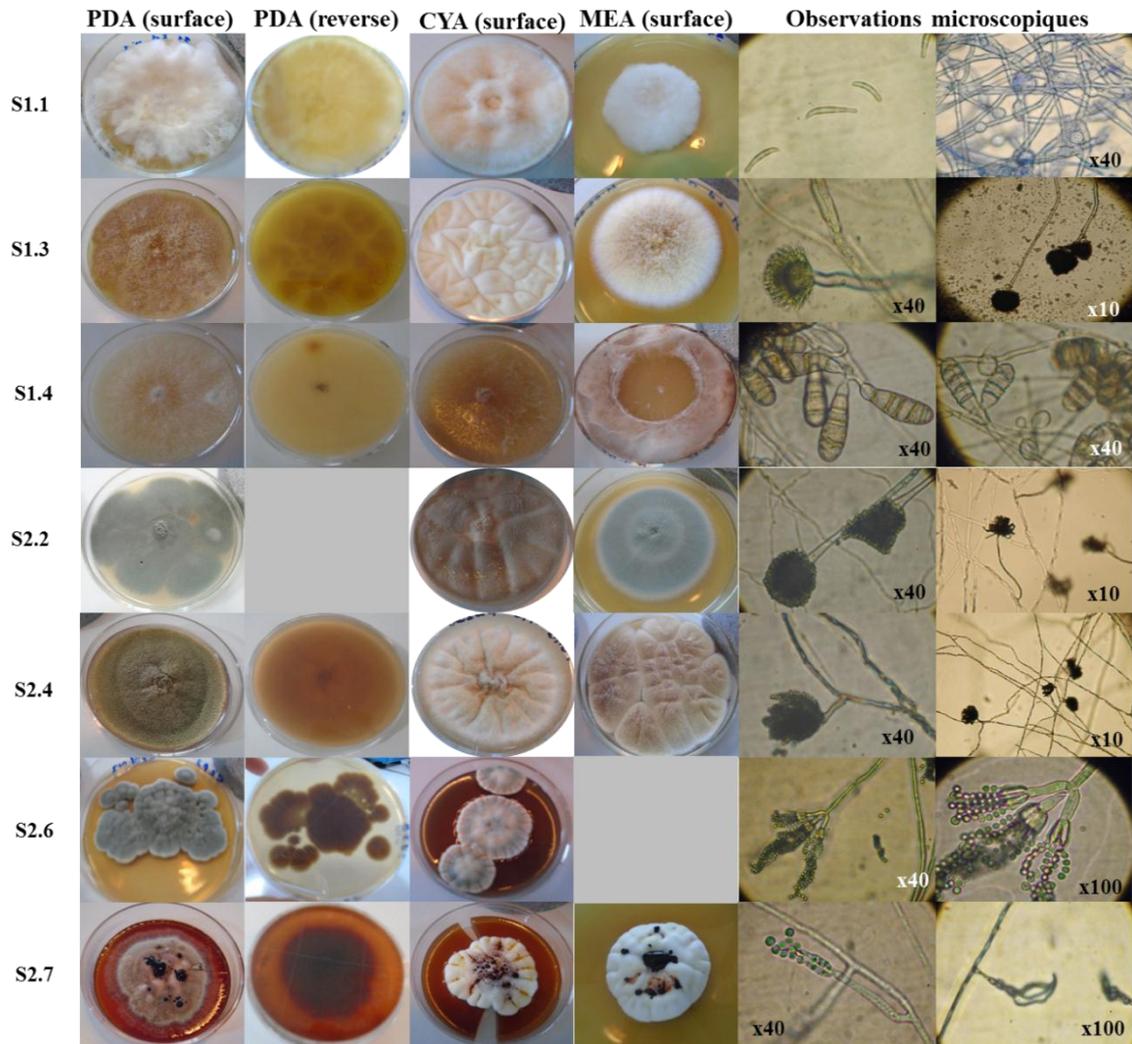


Figure 31. Aspects macroscopiques et microscopiques de quelques champignons isolés du sol pollué de la raffinerie d’Arzew (S1 : site n°1 ; S2 : site n°2)

Le **tableau 6** résume les caractéristiques morphologiques des colonies sur milieu PDA d’un point de vue macroscopique. Ces résultats confirment la diversité morphologique obtenue au sein de la mycothèque. Les observations microscopiques des organes de fructification ont permis de distinguer 11 genres différents. La quasi-totalité des souches identifiées appartient aux embranchements des Ascomycètes et des Deutéromycètes (anamorphes d’Ascomycètes). Seule la souche DSL4 appartient aux Zygomycètes. Ces proportions sont en adéquation avec les résultats obtenus par **Fayeulle (2013)** où des isolements effectués à partir des échantillons de sol présentant des contaminations historiques en HAP ont permis l’isolement de 30 souches fongiques dont une souche appartient aux Zygomycètes et le reste sont des Ascomycètes. Une autre étude a présenté l’isolement de 21 souches fongiques à partir d’échantillon de sols contaminés au pétrole brut lourd dont 20 appartiennent aux Ascomycètes et aux Zygomycètes (**Zafra et al., 2014**).

Tableau 6. Description macroscopiques et identification morphologique des isolats fongiques

Sol d'origine	Code de l'isolat	Texture de la surface	Marge de la colonie	Couleur de la surface	Couleur du revers	Vitesse de croissance	Taille de la colonie	Identité de l'isolat
Sol pollué à l'huile de moteur usagée	HM1	veloutée	Lisse	Vert foncé	Verdâtre	Rapide	Etendu	<i>Penicillium sp</i>
	HM2	granuleuse	Lisse	beige	Blanc	Rapide	Etendu	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>
	HM3	cotonneuse	Lisse	Gris	Vert jaunâtre	Rapide	Etendu	<i>Aspergillus sp</i>
	HM4	cotonneuse	Lisse	Violet clair	Jaune pâle	Lent	Etendu	<i>Peacilomyces sp</i>
	HM5	duveteuse	Irrégulière	blanc	incolore	Rapide	Envahissante	<i>Fusarium sp</i>
	HM6	laineuse	Lisse	noire	Noire	Rapide	Envahissante	<i>Alternaria sp</i>
Sol pollué au pétrole brut	PB1	granuleuse	Irrégulière	noire	Jaune pâle	Très rapide	Envahissante	<i>Aspergillus niger</i>
	PB2	duveteuse	Lisse	Brun cannelle	Orange	Rapide	Etendu	<i>Aspergillus terreus</i>
	PB3	floconneuse	Lisse	marron, beige	Rouge brun	Très lent	Petite	<i>Aspergillus</i>
	PB4	veloutée	Lisse	Bleu vert foncé	Orangé	Lent	Petite	<i>Aspergillus</i>
	PB5	duveteuse	Lisse	vert	Noir beige	Très lent	Petite	<i>Aspergillus</i>
	PB6	duveteuse	Lisse	marron	Brun	Rapide	Etendu	<i>Aspergillus</i>
	PB7	Glabre	Lisse	Rose clair	Rosé	Lent	Petite	Inconnue
Sol pollué au diesel	DSL1	poudreuse	Lisse	Vert foncé	Jaune verdâtre	Lent	Etendu	<i>Penicillium sp</i>
	DSL2	floconneuse	lisse	Blanc beige	Beige	Très lent	Petite	Inconnu
	DSL3	duveteuse	lisse	Rose clair	Rosâtre	Très lent	Petite	<i>Acremonium sp</i>
	DSL4	laineuse	lisse	blanc	incolore	Très rapide	Envahissante	<i>Mucor sp</i>
	DSL5	velouté	lisse	Bleu vert	Marron	Très lent	Petite	<i>Aspergillus sp</i>
	DSL6	glabre	irrégulière	jaune	Orange	Très lent	Petite	<i>Aspergillus sp</i>
	DSL7	velouté	lisse	marron	Brun	Rapide	Petite	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
Sol de la raffinerie d'Arzew Site 1	S1.1	laineuse	irrégulière	blanc	jaunâtre	Rapide	Envahissante	<i>Fusarium sp</i>
	S1.2	laineuse	irrégulière	Blanc beige	jaunâtre	Rapide	Etendu	<i>Blastomyces sp</i>
	S1.3	Cotonneuse	lisse	marron	Orangé	Très rapide	Etendu	<i>Aspergillus</i>
	S1.4	laineuse	En expansion	Blanc doré	Beige	Très rapide	Envahissante	<i>Cephalophora tropica</i>
	S1.5	cotonneuse	lisse	vert olive	Noirâtre	Rapide	Etendu	Inconnu
	S1.6	velouté	lisse	vert	Orange foncé	Très lent	Petite	<i>Penicillium sp</i>
	S1.7	laineuse	lisse	violette	Brun foncé	Lent	Petite	<i>Peacilomyces sp</i>
	S1.8	glabre	lisse	rouille	Marron foncé	Lent	Petite	<i>Trichophyton sp</i>

Tableau 6. (Suite)

Sol de la raffinerie d'Arzew Site 2	S2.1	granuleuse	lisse	noire	Jaune pâle	Très rapide	envahissante	<i>Aspergillus niger</i>
	S2.2	poudreuse	lisse	Vert foncé	Vert jaunâtre	Très rapide	étendu	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	S2.3	cotonneuse	lisse	marron	Brun orange	Très rapide	étendu	<i>Aspergillus terrus</i>
	S2.4	Granuleuse à poudreuse	lisse	Vert olive	rougeâtre	Très rapide	étendu	<i>Aspergillus nidulans</i>
	S2.5	cotonneuse	lisse	Blanc rosâtre	beige	Lent	petite	<i>Acremonium</i>
	S2.6	floconneuse	irrégulière	Gris vert	Marron foncé	Lent	petite	<i>Penicillium sp</i>
	S2.7	cotonneuse	irrégulière	Rose cannelle	Rouge noirâtre	Très lent	petite	<i>Peacilomyces sp</i>

L'identification microscopique a montré la dominance des espèces appartenant au genre *Aspergillus* avec 15 isolats, suivi par le genre *Penicillium* (4 isolats), *Peacilomyces* (3 isolats), *Fusarium* (2 isolats) et *Acremonium* (2 isolats). Le reste des genres identifiés dans les conditions de notre étude ont été présentés par un seul isolat.

Le genre *Aspergillus* a été déjà rapporté prédominant lors des isolements à partir des sols pollués par les hydrocarbures pétroliers (Chaillan *et al.*, 2004 ; dos Santos *et al.*, 2008, Zafra *et al.*, 2014, Mohammadian *et al.*, 2017). Le genre *Penicillium* a été très souvent isolés à partir de sols contaminés aux hydrocarbures (April *et al.*, 1999 ; Ravelet *et al.*, 2000 ; Fayeulle *et al.*, 2019). Les genres *Peacilomyces*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Alternaria* et *Mucor* ont été également isolés à partir de sols impactés par des hydrocarbures dans d'autres études (April *et al.*, 1999 ; Ravelet *et al.*, 2000 ; Potin *et al.*, 2004 ; Mohammadian *et al.*, 2017).

Cependant, il est à souligner que la majorité de ces genres sont aussi des genres habituels de la flore fongique du sol en général (Watanabe, 2002). L'ensemble des isolats identifiés dans cette étape correspond à des espèces saprotrophes adaptées à la vie dans un environnement tellurique. La présence de ces champignons dans les échantillons de sols contaminés aux différents hydrocarbures pétroliers reflète une résistance aux contaminations qui y sont présentes.

V.3 Identification génotypique des isolats fongiques

Les résultats de l'identification morphologique des champignons isolés ont été confirmés par une identification moléculaire à l'aide des séquences ITS de l'ADN ribosomale amplifiées par PCR qui sont actuellement utilisées comme méthode de détection sensible et spécifique pour les champignons (Raja *et al.*, 2017 ; Yang *et al.*, 2018). Une sélection de 6 isolats a été faite pour cette analyse génétique.

Sur la base du séquençage des fragments ITS de l'ADNr 18S, les isolats ont été identifiés par comparaison avec les espèces les plus proches dans la base de données GenBank avec similarité de 98 à 99% (**tableau 7**).

Tableau 7. Présentation des souches les plus proches, le pourcentage de similarité, numéros d'accèsion et l'identité des isolats sélectionnés pour l'identification génotypique

Code de l'isolat	Souche la plus proche	Similarité (%)	Identification	Numéro d'accèsion
PB2	<i>Aspergillus terreus</i>	99%	<i>Aspergillus terreus</i> strain PB2.aaa	MT797198
HM1	<i>Penicillium chrysogenum</i>	99%	<i>Penicillium chrysogenum</i> strain HM1.aaa	MT797196
HM3	<i>Aspergillus ustus</i>	99%	<i>Aspergillus ustus</i> strain HM3.aaa	MT192486
HM4	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	99%	<i>Purpureocillium lilacinum</i> strain HM4.aaa	MT192485
DSL1	<i>Penicillium glabrum</i>	99%	<i>Penicillium glabrum</i> strain DSL1.aaa	MT797199
S2.2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	98%	<i>Aspergillus fumigatus</i> strain AS2.aaa	MT797197

L'analyse d'affiliation génétique a permis de classer les isolats fongiques dans 3 genres de champignons différents. Cette analyse montre que 3 isolats appartiennent au genre *Aspergillus*, 2 au genre *Penicillium* et 1 isolat au genre *Purpureocillium*.

La souche PB2 présente 99 % de similarité de séquence avec *Aspergillus terreus* strain OUC-MDZ5136, la souche HM3 présente 99 % de similarité avec *Aspergillus ustus* strain UOA/HCPF 9236 et la souche S2.2 présente 98 % de similarité avec *Aspergillus fumigatus* strain CBS 129447. Les isolats HM1 et DSL1 ont été identifiés comme des espèces du *Penicillium*, présentent 99 % de similarité avec *Penicillium chrysogenum* strain F100 et *Penicillium glabrum* isolate 19, respectivement. L'isolat HM4 a montré 99 % de similarité de séquence avec la souche *Purpureocillium lilacinum* strain C. C. Lee AgF3-7.

Tous les isolats identifiés appartiennent à la division des *Ascomycota*. Ceci est en accord avec plusieurs études qui ont montré que les Ascomycètes comme *Penicillium*, *Aspergillus* et *Fusarium* ne sont pas seulement ubiquitaires, mais aussi tolérants et capables d'éliminer les contaminants existant dans les sols pollués notamment par les hydrocarbures (Hofrichter et Scheibner, 1993 ; Elshafie *et al.*, 2007 ; Leitão, 2009 ; Ye *et al.*, 2011).

Les espèces du genre *Aspergillus* identifiées dans cette étude ont été souvent isolées depuis des environnements contaminés par des hydrocarbures pétroliers et ont montré leur

efficacité dans la biodégradation des hydrocarbures dans des travaux précédents (**Oudot et al., 1993 ; Bento et al., 2005 ; Mohsenzadeh et al., 2012 ; Zafra et al., 2014 ; Ameen et al., 2016 ; Hock et al., 2018**).

Penicillium chrysogenum, autrefois nommé *P. notatum*, est l'espèce la plus étudiée du genre *Penicillium* pour la production des antibiotiques, ce champignon est utilisé comme producteur commercial d'antibiotiques β -lactamines (**Guzmán-Chávez et al., 2018**). *P. chrysogenum* a également prouvé son efficacité dans l'élimination des contaminants toxiques tels que les métaux lourds (**Niu et al., 1993 ; Tan et Cheng, 2003**), le phénol (**Leitão et al., 2007**) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques comme le fluorène (**Garon et al., 2002**) et le pyrène (**Ravelet et al., 2000**).

Purpureocillium lilacinum, anciennement nommé *Paecilomyces lilacinus*, est un champignon filamenteux saprotrophe commun du sol (Luangsa-Ard et al., 2011). Ce champignon a été abondamment étudié pour son utilisation comme agent de lutte biologique contre les nématodes parasites des plantes ainsi que pour la production de divers métabolites secondaires actifs menant à de nombreuses découvertes médicales dans la recherche humaine (**Xie et al., 2016**). Cependant, Les rapports qui décrivent l'intervention de cette espèce fongique dans les processus de biodégradation des hydrocarbures pétroliers sont limités.

Les arbres phylogénétiques reflétant la relation entre chaque genre et les souches similaires existant dans les banques de données ont été construits par l'algorithme Maximum Likelihood en utilisant le logiciel MEGA X (**figure 32**).

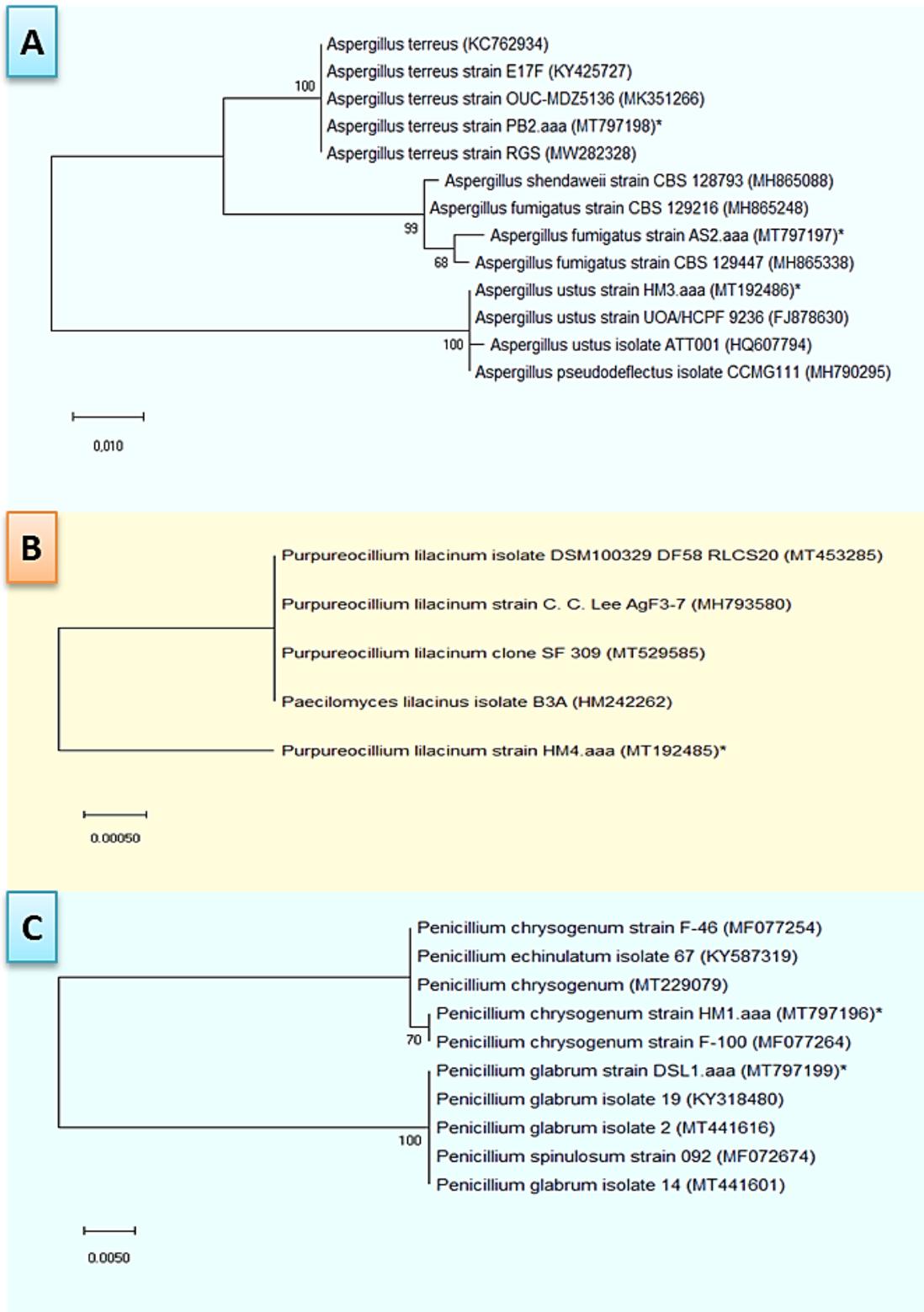


Figure 32. Arbres phylogénétiques basé sur les séquences ITS de l’ADNr des isolats du même genre et des espèces apparentées trouvées sur GenBank. A : relations phylogénétiques entre isolats du genre *Aspergillus*, B : *Purpureocillium* et C : *Penicillium*

V.4 Tests préliminaires pour la biodégradation des hydrocarbures pétroliers

La première étape dans le développement d’un protocole de bioremédiation est la sélection de souches fongiques avec un potentiel élevé de biodégradation des contaminants

pétroliers. Cette démarche consiste en un criblage progressif de la collection des isolats fongiques selon leurs capacités à tolérer et à dégrader le pétrole, le diesel et l'huile usagée.

V.4.1 Test de l'indicateur redox 2,6-dichlorophénol indophénol (DCPIP)

Cette méthode d'analyse permet une sélection rapide des isolats capables à oxyder les hydrocarbures pétroliers utilisés dans cette étude. Elle dépend du changement de couleur des milieux inoculés par les isolats fongiques et traités avec l'indicateur d'oxydoréduction.

Le principe de ce test est que lors de l'oxydation microbienne des hydrocarbures, les électrons sont transférés à des accepteurs d'électrons tels que l'O₂, les nitrates et le sulfate. En incorporant un accepteur d'électrons tel que DCPIP au milieu de culture, il est possible de déterminer l'aptitude du microorganisme à utiliser le substrat hydrocarboné en observant le changement de couleur de DCPIP du bleu (oxydé) à l'incolore (réduit) (Hanson *et al.*, 1993).

Il existe trois indicateurs de la capacité des isolats fongiques à biodégrader les hydrocarbures, le premier est le changement de couleur du milieu de culture du bleu à l'incolore, le second est la diminution de la quantité initiale de l'huile pétrolière dans le milieu et le troisième le développement d'une masse fongique dans le milieu de culture (figure 33) (Al-Nasrawi, 2012).

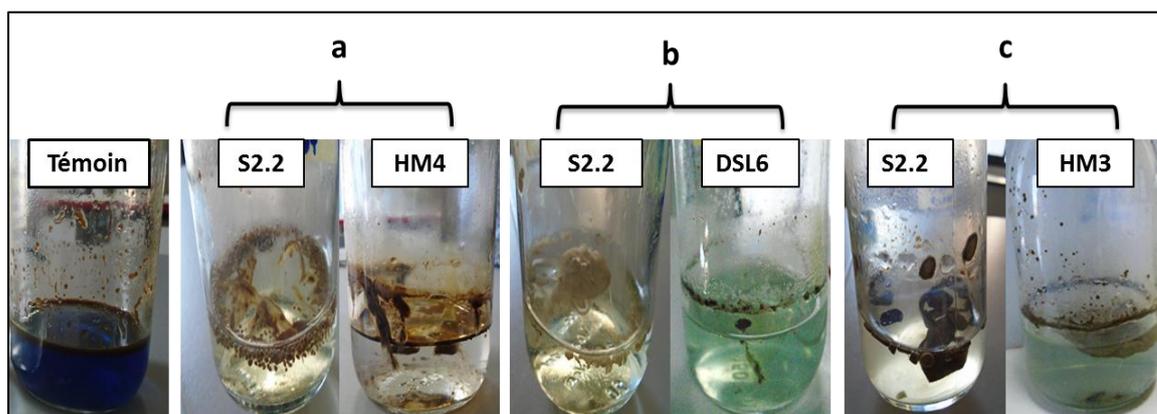


Figure 33. Changement de couleur de l'indicateur DCPIP par le témoin et quelques isolats en présence de (a) pétrole, (b) diesel et (c) l'huile usagée, après 14 jours

Tableau 8. Intensité de décolorisation de l'indicateur 2,6-DCPIP et la croissance mycélienne observée après 14 jours d'incubation

Isolat	Pétrole		Diesel		Huile usagée	
	Décolorisation	Croissance mycélienne	Décolorisation	Croissance mycélienne	Décolorisation	Croissance mycélienne
Témoin	-	-	-	-	-	-
PB1	+	-	-	-	-	-
PB2	+++	++	++	+	+++	++
PB3	+	-	-	-	+	+
PB4	+	+	-	-	+	+
PB5	++	+	-	-	+	+
PB6	+++	+++	+	+	+++	++
PB7	-	-	+	-	+++	++
HM1	++	++	+++	+	-	-
HM2	+++	+	++	++	+++	+++
HM3	+++	+++	++	++	++	+++
HM4	+++	+++	++	++	+++	+++
HM5	+	+	+	-	-	-
HM6	-	-	-	-	-	-
DSL1	++	+	+++	++	+	+
DSL2	+	-	+	+	+++	++
DSL3	+	-	-	-	+++	++
DSL4	++	+	-	-	+++	++
DSL5	++	++	-	-	-	-
DSL6	++	++	++	++	++	++
DSL7	+	+	-	-	+	-
S1.1	-	-	-	-	-	-
S1.2	-	-	-	-	-	-
S1.3	++	+	++	-	++	++
S1.4	++	++	-	-	++	+
S1.5	-	-	-	-	-	-
S1.6	-	-	-	-	-	-
S1.7	+	+	-	-	++	++
S1.8	-	-	-	-	++	+
S2.1	-	-	-	-	++	+
S2.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S2.3	++	++	-	-	++	++
S2.4	-	-	+	+	++	+
S2.5	-	-	-	-	++	+
S2.6	-	-	-	-	+	+
S2.7	-	-	-	-	+	+

Changement du couleur. - : pas de changement, + : faible, ++ : moyen, +++ : complet
 Croissance mycélienne. - : absence, + : faible ; ++ : moyenne, +++ : forte

Le changement de couleur (décolorisation) des milieux inoculés par les 35 isolats fongiques purifiés ainsi que l'intensité de la croissance mycélienne après 14 jours d'incubation sont illustrés dans le **tableau 8**.

En général, La majorité des isolats testés (31 isolats) ont montré un changement de couleur dans le milieu pour au moins un hydrocarbure. Neuf isolats fongiques ont présenté une capacité d'oxyder les trois hydrocarbures pétroliers utilisés dans cette étude au même temps. Ces champignons appartiennent aux genres des *Aspergillus* (HM2, HM3, PB2, PB6, DSL6, S2.2 et S1.3), *Penicillium* (DSL1) et *Purpureocillium* (HM4). Les espèces du genre *Aspergillus* et *Penicillium* ont été enregistrées dans des études antérieures comme étant des dégradants des hydrocarbures pétroliers en montrant une réduction de l'indicateur DCPIP en présence de pétrole comme source unique de carbone (Al-Nasrawi, 2012 ; Moustafa, 2016 ; Al-Hawash *et al.*, 2018a).

Le comportement des isolats sélectionnés vis-à-vis les trois hydrocarbures a été différent par rapport à l'intensité de l'oxydation (décolorisation), la quantité de biomasse formée et la quantité d'huile qui persiste dans le milieu à la fin de l'incubation. L'huile usagée a été la plus oxydée par les isolats testés (28 isolats), suivi par le pétrole (23 isolats) puis le diesel (14 isolats). Cependant, l'intensité de biomasse formé et la quantité d'huile consommé a été plus grande dans les milieux contenant le pétrole comme source de carbone. Cela peut être attribué à la nature de chaque huile vu que le pétrole brut est un produit naturel non raffiné composé d'un mélange complexe d'hydrocarbures (Kumar *et al.*, 2011), alors que l'huile lubrifiante usagée a été soumis à des conditions thermiques et mécaniques sévères, dans lesquelles ils ont été chargés de métaux et de résidus de combustion très toxiques (Speight et Arjoon, 2012).

Une forte diminution de la quantité initiale de pétrole a été observée avec les isolats PB2, PB6, HM1, HM2, HM3, HM4, DSL1, DSL6, S1.4, S2.2, S2.3. Les isolats HM2, HM3 et HM4 obtenus à partir du sol pollué par l'huile usagée ont présenté une forte oxydation et un développement de biomasse pour les trois hydrocarbures testés.

V.4.2 Test de dégradation utilisant le milieu spécifique HAF

Les isolats fongiques ont été inoculés dans un milieu minéral spécifique pour la croissance des champignons adaptés aux hydrocarbures (hydrocarbon-adapted fungi « HAF ») décrits par Oudot *et al.* (1993). Le milieu contient le pétrole, le diesel ou l'huile usagée comme source de carbone et d'énergie. Le **tableau 9** montre que 25 isolats fongiques ont été capables de croître sur le milieu HAF contenant le pétrole, 20 isolats ont poussé sur le diesel et 34 isolats sur l'huile usagée.

Tableau 9. Croissance des champignons isolés dans le milieu spécifique HAF en présence de pétrole, diesel ou l'huile usagée comme source de carbone, après 28 jours d'incubation

Isolat	Pétrole	Diesel	Huile usagée
Témoin	0	0	0
PB1	3	1	1
PB2	3	2	3
PB3	1	0	2
PB4	2	0	1
PB5	0	2	1
PB6	4	3	3
PB7	0	1	1
HM1	3	3	2
HM2	4	2	2
HM3	3	2	2
HM4	4	4	3
HM5	2	0	2
HM6	1	0	2
DSL1	2	4	2
DSL2	2	0	1
DSL3	0	0	1
DSL4	0	3	2
DSL5	1	1	2
DSL6	2	3	2
DSL7	0	0	1
S1.1	0	0	1
S1.2	0	0	0
S1.3	3	1	2
S1.4	0	0	1
S1.5	1	0	1
S1.6	2	1	2
S1.7	2	3	2
S1.8	0	0	1
S2.1	0	0	1
S2.2	4	4	3
S2.3	2	1	2
S2.4	1	0	2
S2.5	1	0	1
S2.6	1	1	1
S2.7	2	2	2

Intensité de croissance du champignon (échelle de 0 à 4 ; 0=pas de croissance et 4=bonne croissance)

Ces champignons ont montré des capacités de biodégradation différentes qui ont été évaluées par un examen visuel de la croissance mycélienne (échelle de 0 à 4 où 0 signifie absence de croissance et 4 bonne croissance) (**figure 34**). Les isolats PB1, PB2, PB6, HM1, HM2, HM3, HM4, S1.3 et S2.2 étaient les dégradateurs de pétrole brut les plus actifs. Les isolats PB6, HM3, HM4, DSL1, DSL6, S1.7 et S2.2 étaient les meilleurs dégradateurs de diesel. Les isolats fongiques PB2, PB6, HM4 et S2.2 ont montré un potentiel élevé de biodégradation de l'huile usagée.

Les résultats obtenus dans les tests préliminaires montrent que les champignons isolés possèdent une diversité et une adaptabilité considérables dans l'utilisation de différents hydrocarbures pétroliers comme source de carbone.

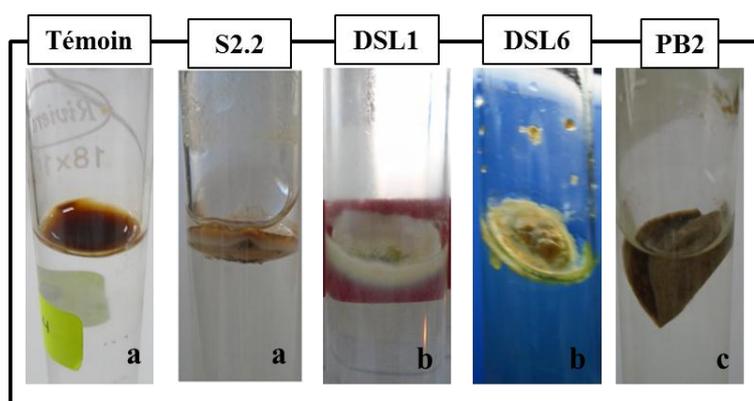


Figure 34. Croissance de quelques isolats fongiques en milieu HAF en présence de (a) pétrole, (b) diesel et (c) l'huile usagée, après 28 jours d'incubation

Le traitement des résultats obtenus dans ce test préliminaire ainsi que le test précédent (test DCPIP) a permis de sélectionner 6 isolats fongiques pour évaluer leurs capacités de dégradation des hydrocarbures dans les tests suivants dans cette étude. Ces isolats ont été sélectionnés pour le bon développement dans les conditions expérimentales choisies et la capacité de diminuer la quantité initiale des hydrocarbures dans le milieu de culture. La capacité d'un isolat à dégrader plusieurs huiles pétrolières au même temps a été prise en considération aussi.

V.5 Etude quantitative de la biodégradation des hydrocarbures pétroliers

V.5.1 Biodégradation de pétrole par les isolats sélectionnés

La **figure 35** présente les taux de biodégradation obtenus par les isolats fongiques sélectionnés après 40 jours d'incubation en présence de 2 % (v/v) de pétrole en milieu BH liquide. Les taux de dégradation obtenus présentent majoritairement une moyenne supérieure à 5%, qui est le taux de biodégradation minimal pour considérer qu'un isolat est active vis-à-

vis du pétrole (Oudot *et al.*, 1987). Les pourcentages de biodégradation s'établissant entre 30.43 % (isolat HM3) et 55.98 % (isolat DSL1).

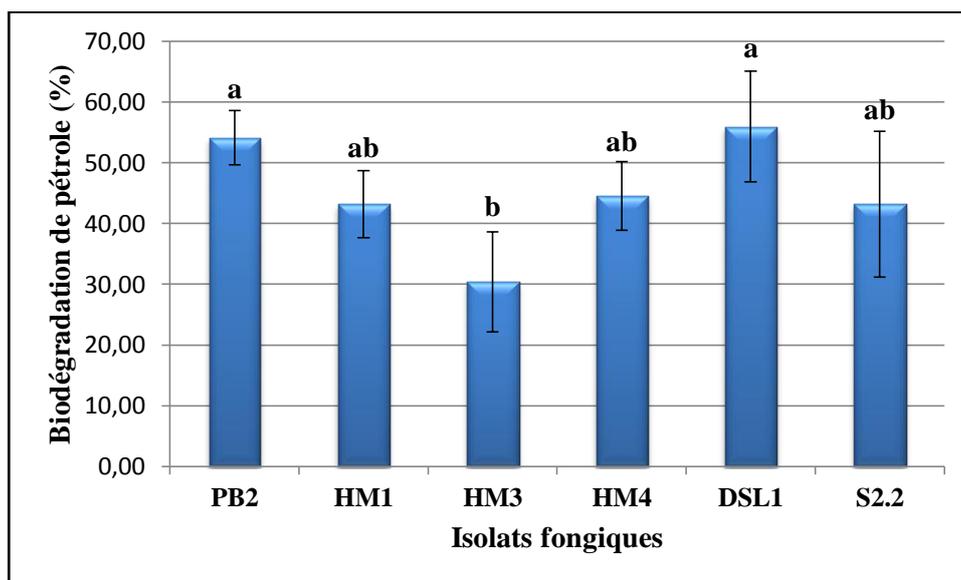


Figure 35. Taux de biodégradation de pétrole par les isolats fongiques après 40 jours d'incubation en milieu liquide. Les barres d'erreur représentent les écarts types de ces moyennes (n=3). Différentes lettres sur les barres indiquent des moyennes significativement différentes selon le test de Tukey ($p < 0,05$)

Les six isolats fongiques ont présenté des moyennes particulièrement élevées de biodégradation de pétrole. L'isolat DSL1 (*P. glabrum*) a entraîné le taux de dégradation de pétrole le plus élevé avec 55,98 %, suivi par l'isolat PB2 (*A. terreus*) qui a dégradé 54,11 % de la quantité initiale de pétrole brut. Les isolats HM1, HM4 et S2.2, ont présenté aussi des taux de dégradation très importants ; HM4 (*P. lilacinum*) a éliminé 44,55 % de la quantité initiale des hydrocarbures, HM1 (*P. chrysogenum*) et S2.2 (*A. fumigatus*) ont montré des taux de dégradation identiques (43,19 %). L'isolat HM3 (*A. ustus*) se révèle également efficace avec une moyenne de 30,43 %.

Les résultats de cette analyse montrent que la quantité de pétrole a été diminuée considérablement dans les milieux de culture en présence des isolats fongiques sélectionnés. Cela justifie la capacité de ces champignons à dégrader le pétrole et l'utiliser comme seule source de carbone et d'énergie pour leur croissance. Le potentiel de biodégradation des hydrocarbures pétroliers variait selon les genres et aussi au sein des espèces. **Barnes *et al.* (2018)** ont rapporté dix champignons telluriques capables de croître et de dégrader le pétrole brut en milieu de culture minéral, le pourcentage de dégradation maximale a été 77 % obtenu par un *Penicillium citrinum*, suivi par un *Aspergillus flavus* dégradant 62% de pétrole. Un isolat identifié comme *A. terreus* a montré un taux de dégradation proche de 45%. Le taux de dégradation minimal enregistré par cette étude était proche de 33% chez l'isolat *A.*

polyporicola. Ces valeurs semblent cohérentes aux résultats de notre étude, bien que la comparaison soit rendue difficile par les différences de conditions d'incubation et l'expression des résultats en pourcentages de dégradation. **EL-Hanafy et al. (2015)** ont rapporté deux isolats fongiques affiliées au *Penicillium* et *Aspergillus* dégradaient le pétrole brut à des taux de 48% et 54%, respectivement. La souche *A. fumigatus* a été employée auparavant dans des expériences de dégradation de pétrole et a montré des taux de dégradation moins importants que celui obtenu par notre souche S2.2 (**Chaîneau et al., 1999 ; Chaillan et al., 2004**). *A. fumigatus* a déjà montré des potentiels importants dans le domaine de biodégradation des contaminants (**Shazia et al., 2013 ; Haritash et Kaushik, 2016 ; Khan et al., 2019**) ; cette souche pose souvent des problèmes dans les réservoirs de carburant (**Oudot et al., 1987**).

Purpureocillium lilacinum, qui était auparavant connue sous le nom de *Paecilomyces lilacinus*, a été décrit dans plusieurs rapports pour son pouvoir de dégradation de composés aromatiques tels que le toluène (**Vigueras et al., 2008**), le benzo (a) pyrène (**Rafin et al., 2013**) ou le biphényle (**Gesell et al., 2001 ; Sietmann et al., 2006**). Hormis *P. lilacinus*, d'autres espèces de *Paecilomyces* telles que *P. variotii* a été décrit comme un dégradeur d'hydrocarbures pétroliers en éliminant 58.15 % d'hydrocarbures totaux dans le pétrole (**Shetaia et al., 2016**). Dans une autre étude, *P. variotii* a montré un taux de biodégradation important des n-alcanes (> 90%) présents dans le pétrole brut BAL 150 (**Chaillan et al., 2004**). Au vu de cela, notre caractérisation de *P. lilacinum* (HM4) en tant qu'une souche dégradante d'hydrocarbures n'est pas si surprenante.

Afin de confirmer la capacité des isolats à dégrader le pétrole, on a mesuré la biomasse accumulée à la fin de l'expérimentation. Le gain en biomasse sous chaque traitement et le contrôle correspondant après 40 jours d'incubation sont présentés dans la **figure 36**.

La majorité des isolats fongiques ont montré une accumulation de biomasse significativement plus élevée par rapport à leurs témoins incubés sans pétrole. DSL1 a gagné le poids maximum de 1,2 g/L qui est fortement corrélée avec le taux de biodégradation de pétrole le plus élevé enregistré par ce champignon précédemment. L'isolat HM1 a également montré une accumulation importante de biomasse (0,94 g/L). Les isolats PB2 et S2.2 ont eu des poids sec de 0,87 et 0,71 g/L, respectivement.

Plusieurs études, qui ont démontré le potentiel de biodégradation des hydrocarbures chez différents champignons, ont également rapporté une accumulation de biomasse dans des conditions similaires. **Elshafie et al. (2007)** a signalé un gain de biomasse important par *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus terreus* et *A. niger* dans un milieu liquide contenant du pétrole comme source unique de carbone. Une autre étude a noté une production de plus de 6

g/L de biomasse par le champignon *Trematophoma sp. UTMC 5003* dans le milieu MSM supplémenté par 1% de pétrole brut (Moghimi *et al.*, 2017). Shetaia *et al.* (2016) ont rapporté une augmentation de la biomasse sèche de deux souches fongiques, *Lipomyces tetrasporus* et *Paecilomyces variotii*, dans un milieu minéral salin additionné de 5 % (p/v) de pétrole après 30 jours d'incubation.

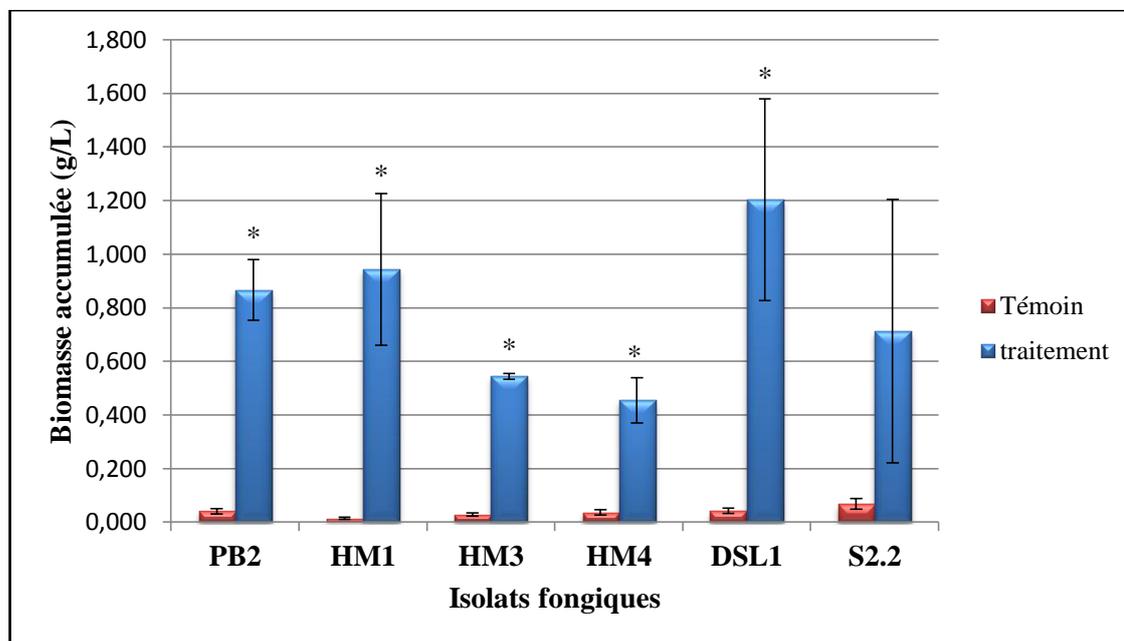


Figure 36. Quantité de biomasse fongique accumulée dans le milieu contenant du pétrole et les témoins correspondants, après 40 jours d'incubation. Les barres d'erreur représentent les écarts types de ces moyennes (n=3). Les astérisques indiquent une différence significative entre la biomasse accumulée par chaque isolat et son témoin selon le test de Student-T ($p < 0,05$)

Le **tableau 10** présente les valeurs de pH du milieu de culture mesurées à la fin de l'expérience. Les résultats montrent une diminution du pH de milieu pour la majorité des isolats testés. Les champignons qui ont montré une forte dégradation de pétrole auparavant ont permis d'enregistrer une diminution remarquable du pH du milieu à la fin de l'incubation notamment les isolats PB2, S2.2 et HM1.

Al Jawhari (2014) a rapporté une réduction dans le pH du milieu de culture liquide, additionné au pétrole, après 28 jours d'incubation par *A. niger* et *A. fumigatus* ; les pH enregistrés par cette étude était 5.6 et 5.7, respectivement. *A. niger* a également montré, dans une autre étude, une diminution du pH du milieu pendant 6 jours d'incubation dans un milieu liquide contenant du pétrole (**Hassaine et Bordjiba, 2018**). La dégradation de pétrole par *Penicillium sp.* a provoqué une diminution de pH dans un milieu MSM de 7 à 6, après 16 jours d'incubation (**Vanishree et al., 2014**).

La réduction du pH dans les milieux de culture au cours de la période d'incubation signifie des changements chimiques des substrats hydrocarbonés qui ont dû être précipités par des enzymes cataboliques microbiennes spécifique (**Prenafeta-Boldu et al., 2018**).

La dégradation microbienne des hydrocarbures conduit souvent à la production d'acides organiques et d'autres produits métaboliques (**Al Jawhari, 2014**). L'acide propanoïque a été identifié, parmi d'autres métabolites (une série d'alcools et de cétones), dans la phase aqueuse suite à la dégradation du diesel par *A. fumigatus* (**Bento et al., 2005**). Ainsi ; les acides organiques produits ont probablement causé la réduction des niveaux de pH.

Tableau 10. Valeurs de pH final dans les milieux contenant le pétrole, après 40 jours d'incubation. Les valeurs sont des moyennes \pm écart type de 3 répétitions

Isolat	PB2	HM1	HM3	HM4	DSL1	S2.2
pH final	5,72 \pm 0,24	6,22 \pm 0,03	6,86 \pm 0,06	6,68 \pm 0,21	6,40 \pm 0,05	6,00 \pm 0,49

V.5.2 Biodégradation du diesel par les isolats sélectionnés

Les isolats fongiques, qui ont montré un potentiel de dégradation de diesel dans les tests préliminaires, ont été sélectionnés pour une analyse quantitative de la biodégradation du diesel. Les taux de dégradation moyens du diesel par les champignons sélectionnés sont illustrés dans la **figure 37**.

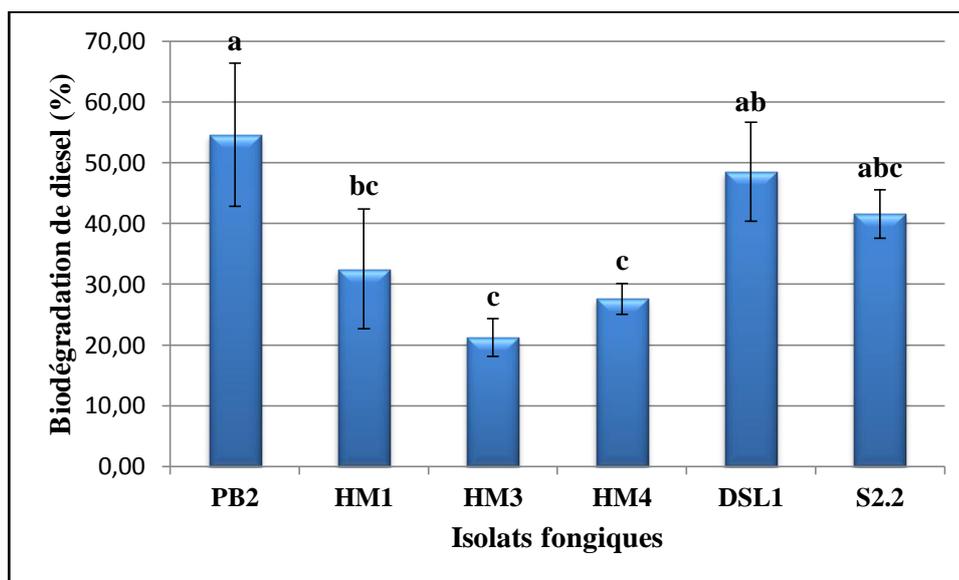


Figure 37. Taux de biodégradation de diesel par les isolats fongiques après 40 jours d'incubation en milieu liquide. Les barres d'erreur représentent les écarts types de ces moyennes (n=3). Différentes lettres sur les barres indiquent des moyennes significativement différentes selon le test de Tukey ($p < 0,05$)

Les pourcentages de biodégradation obtenus s'établissent entre 21,22 % et 54,61 %. L'isolat PB2 a montré le potentiel de dégradation le plus élevé en éliminant plus que la moitié de la quantité initial du diesel dans le milieu ; suivi par l'isolat DSL1 qui a dégradé 48,56 % de diesel. L'isolat S2.2 a également montré un pouvoir de dégradation important en dégradant 41.56 % de l'huile pétrolière. Les isolats HM3 et HM4 ont montré des taux de dégradation comparables qui ne se diffèrent pas significativement.

Le taux élevés de dégradation de diesel enregistré par l'isolat PB2 (*A. terreus*) concorde avec des résultats obtenus par une autre étude où *A. terreus* a éliminé 70 % des TPHs du diesel en dégradant 71 % d'hydrocarbures aliphatiques et 60 % d'hydrocarbures aromatiques présent dans le diesel ajouté au milieu MSM (Khan *et al.*, 2014). La capacité d'une souche d'*A. terreus* à dégrader le diesel a été également confirmée par la mesure de la concentration de CO₂ émis après 4 semaines d'incubation (Ameen *et al.*, 2016). *A. fumigatus*, isolé des boues des réservoirs de stockage de diesel, a été très efficace dans la dégradation du diesel, en particulier les fractions aliphatiques (Bento *et al.*, 2005).

La quantité de biomasse sèche accumulée par les isolats en présence de diesel comme source de carbone et par les témoins correspondants a été mesurée et présentée dans la **figure 38**.

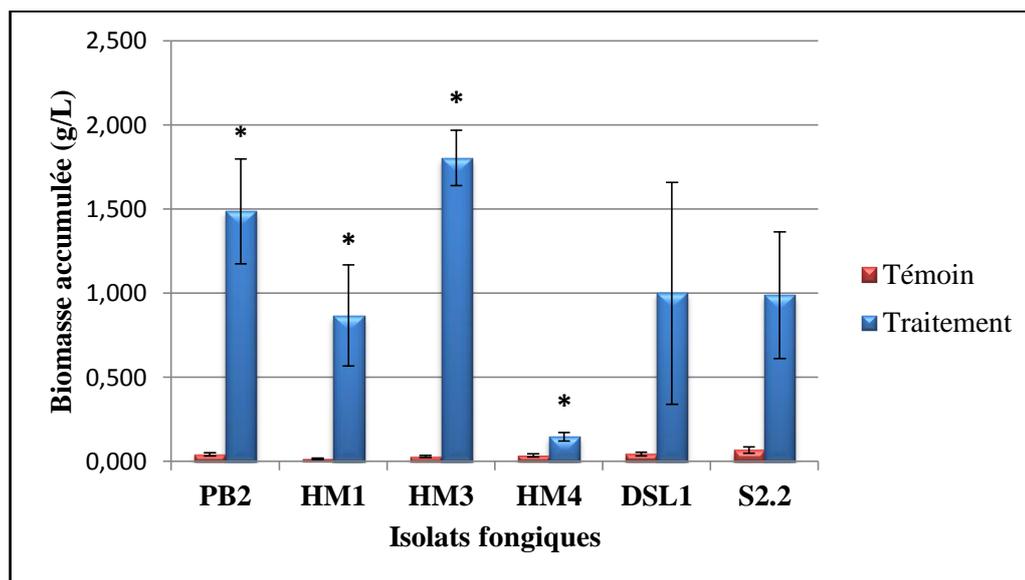


Figure 38. Quantité de biomasse fongique accumulée dans le milieu contenant le diesel et les témoins correspondants, après 40 jours d'incubation. Les barres d'erreur représentent les écarts types de ces moyennes (n=3). Les astérisques indiquent une différence significative entre la biomasse accumulée par chaque isolat et son témoin selon le test de Student-T ($p < 0,05$)

Les résultats de biomasse montrent une accumulation de biomasse très importante par l'isolat HM3, en contradiction avec le taux de dégradation de diesel présenté par cet isolat précédemment qui a été le plus faible par rapport aux autres isolats. Cela est peut-être dû à la

nature des composés hydrocarbonés présents dans le diesel dégradés par cette souche. L'isolat PB2 a montré une accumulation de biomasse importante significativement différente par rapport à son témoin ($p=0.016$). Cette accumulation est en corrélation avec le taux élevé de biodégradation de diesel par cet isolat. Les quantités de biomasse accumulées par les isolats DSL1 et S2.2 ont été comparables, ces résultats sont cohérents avec les taux de de dégradation de diesel importants présentés par les deux isolats dans l'analyse gravimétrique.

La majorité des champignons qui utilisent les hydrocarbures pétroliers comme source de carbone et d'énergie métabolise les molécules en CO_2 et biomasse (**Elshafie et al., 2007**). Les champignons ont montré des comportements différents par rapport à l'utilisation du pétrole et de diesel comme source d'énergie. La composition chimique de chaque huile pétrolière est un facteur important qui détermine la capacité de chaque isolat à l'utiliser comme source de carbone, cette constatation est supportée par les observations de **Davies et Westlake (1979)**, où la croissance d'isolats fongiques individuels sur 7 échantillons de pétrole brut de différentes compositions n'était pas toujours similaire, même sur des pétroles qui ont pratiquement le même profil de n-alcane.

La production de biomasse fongique avec le diesel comme source de carbone a déjà été rapportée pour les espèces d'*Aspergillus*, *A. terreus* a montré la plus grande accumulation de biomasse (0,831 g/l) pendant la dégradation du diesel par rapport au témoin correspondant (**Ameen et al., 2016**). *A. fumigatus* a atteint les poids les plus élevées de biomasse (environ 60 mg) après 60 jours d'incubation dans un milieu minéral avec uniquement du diesel comme source de carbone (**Bento et al., 2005**). *P. lilacinum* a précédemment montré la plus grande augmentation de biomasse en présence d'hexadécane et de toluène (**Poyntner et al., 2018**). **Ameen et al. (2016)** ont rapporté un gain de poids de 30,9 % en biomasse de *P. variotii* via la biodégradation du diesel en milieu liquide.

Les résultats présentés dans **le tableau 11** sont les pH mesurés à la fin de la période d'incubation. Une diminution de la valeur du pH initial a été observée avec tous les isolats testés ; la valeur du pH la plus faible a été enregistrée par l'isolat PB2 (5.27) qui a montré la biodégradation du diesel la plus élevée dans le test gravimétrique. Ces résultats confirment la constatation précédente que la biodégradation des hydrocarbures entraîne une diminution de pH du milieu. **Bento et al. (2005)** ont rapporté également une diminution du pH dans le milieu de culture suite à la biodégradation de diesel par *A. fumigatus*.

Tableau 11. Valeurs de pH final dans les milieux contenant le diesel après 40 jours d'incubation. Les valeurs sont des moyennes \pm écart type de 3 répétitions

Isolats	PB2	HM1	HM3	HM4	DSL1	S2.2
pH final	5,27 \pm 0,28	6,51 \pm 0,09	6,77 \pm 0,04	5,98 \pm 0,04	6,40 \pm 0,15	5,31 \pm 0,28

V.5.3 Biodégradation de l'huile usagée

Les pourcentages de biodégradation de l'huile usagée par 5 isolats fongiques sélectionnés pour ce test sont illustrés dans la **figure 39**.

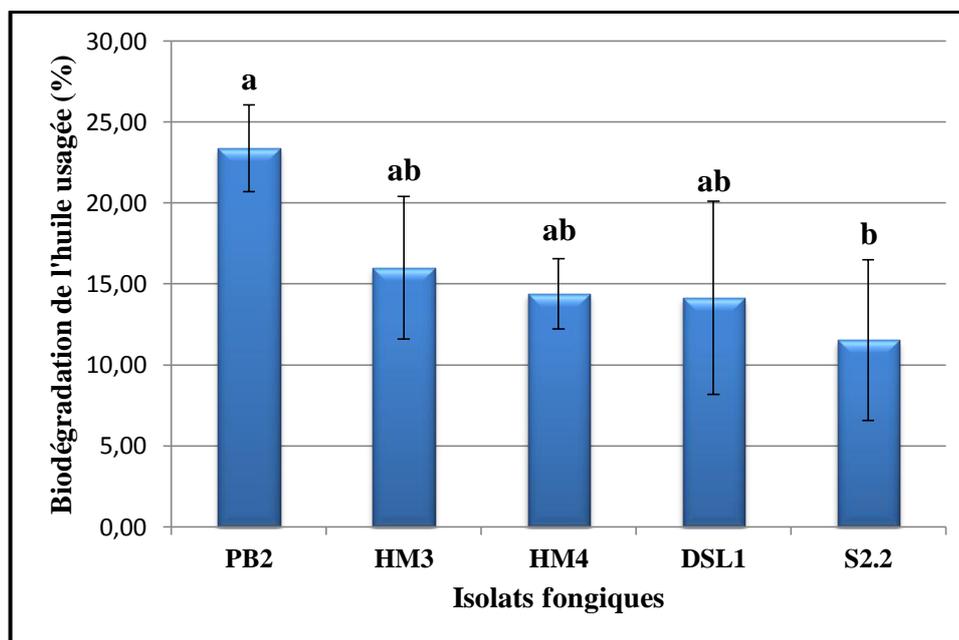


Figure 39. Taux de biodégradation de l'huile usagée par les isolats fongiques après 40 jours d'incubation en milieu liquide. Les barres d'erreur représentent les écarts types de ces moyennes (n=3). Différentes lettres sur les barres indiquent des moyennes significativement différentes selon le test de Tukey ($p < 0,05$)

Les résultats montrent une faible dégradation de l'huile usagée par rapport au pétrole et au diesel, par tous les isolats testés. Cela peut être attribué au fait que l'huile usagée contient des métaux lourds et des hydrocarbures aromatiques polycycliques toxiques qui sont hautement récalcitrants (Abioye *et al.*, 2010). Le taux de dégradation maximum était 23,38% enregistrés par l'isolat PB2. Les isolats DSL1, HM4 et HM3 ont montrés des taux de dégradation très proches allant de 14,16 % (DSL1) jusqu'à 16,00 % (HM3). La plus faible dégradation a été observée chez S2.2.

Hock *et al.* (2018) ont reporté la dégradation d'huile des moteur usagée en milieu BH par 6 isolats fongiques dont 4 appartiennent aux *Aspergillus*. Le meilleur pourcentage de dégradation était 21,11% enregistré par *Penicillium simplicissimum* après seulement 7 jours d'incubation ; un isolat identifié *A. ustus* a dégradé 15,02% d'huile usagée, la concentration initiale d'huile dans le milieu était 20%. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux

recueillie par le même isolat dans les conditions de notre étude. Cette différence dans le potentiel de biodégradation d'huile usagée est peut être liée à la différence dans la composition chimique de chaque huile, car la composition chimique des huiles lubrifiantes varie selon le pétrole brut d'origine, les processus de raffinage et les additifs ajoutés à l'huile. Elle dépend aussi de type de fuel, du temps de travail du moteur et des conditions mécaniques de l'engin (Vazquez-Duhalt, 1989). Néanmoins, les champignons filamenteux ont été reportés effectives dans la biodégradation de l'huile lubrifiante usagée dans des études précédentes (Adekunle et Adebambo, 2007 ; Husaini *et al.*, 2008 ; Ameen *et al.*, 2015).

La figure 40 présente la quantité de biomasse produite par les isolats fongiques dans les milieux contenant l'huile usagée comme source de carbone et les témoins correspondants.

La quantité de biomasse accumulée a été faible pour la majorité des isolats, PB2 a montré une accumulation significativement plus élevée par rapport à son témoin, cette accumulation est la plus élevée par rapport aux autres isolats fongiques en corrélation avec le taux de dégradation de l'huile usagée le plus élevé marqué par le même isolat ci-dessus.

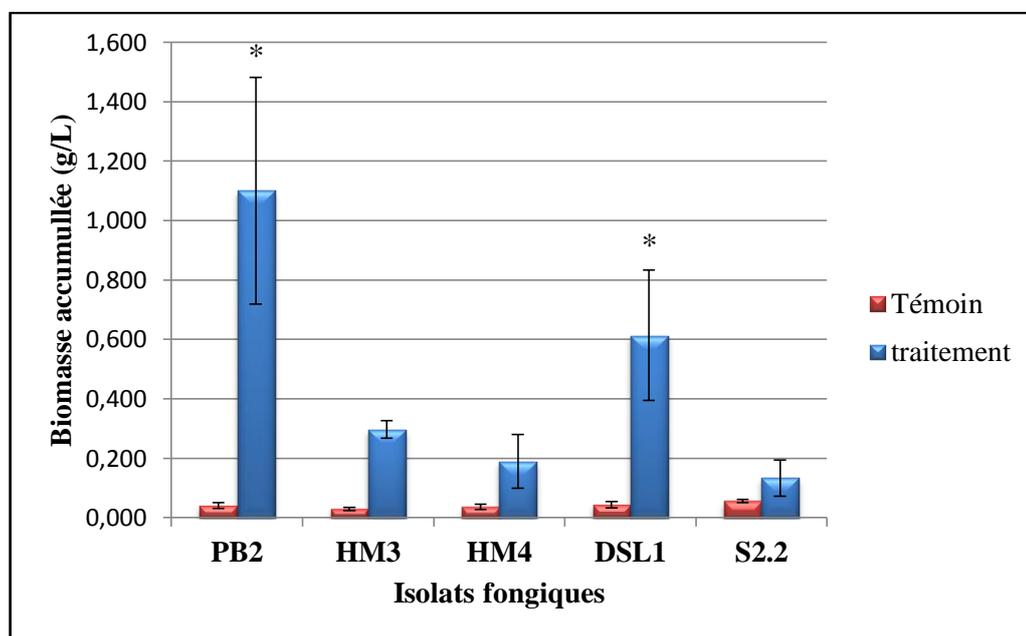


Figure 40. Quantité de biomasse fongique accumulée dans le milieu contenant l'huile usagée et les témoins correspondants, après 40 jours d'incubation. Les barres d'erreur représentent les écarts types de ces moyennes (n=3). Les astérisques indiquent une différence significative entre la biomasse accumulée par chaque isolat et son témoin selon le test de Student-T ($p < 0,05$)

La mesure du pH du milieu de culture à la fin de la période d'incubation a permis d'obtenir les résultats ci-après (tableau 12).

Tableau 12. Valeurs du pH final dans les milieux contenant l'huile usagée après 40 jours d'incubation. Les valeurs sont des moyennes \pm écart type de 3 répétitions

Isolats	PB2	HM3	HM4	DSL1	S2.2
pH final	6,32 \pm 0,06	6,73 \pm 0,02	6,58 \pm 0,08	6,32 \pm 0,06	6,93 \pm 0,05

Les résultats présentent une diminution légère dans le pH des milieux de culture chez toutes les isolats fongiques, cela est conforme avec les taux de dégradation faibles enregistrés par ces isolats en présence d'huile usagée comme seule source de carbone. Les valeurs du pH observées dans ce test confirment que la diminution de pH du milieu de culture est liée à l'intensité de biodégradation des hydrocarbures pétroliers par les microorganismes présents.

V.6 Etude de la cinétique de biodégradation des hydrocarbures en milieu liquide

Afin d'améliorer nos informations sur le mécanisme de dégradation fongique des hydrocarbures pétroliers, une estimation des quantités d'hydrocarbures totaux dégradés et de biomasse accumulée au fil du temps a été réalisée. Les isolats PB2, HM3, HM4 et S2.2 ont été sélectionnés pour le suivi de la biodégradation du pétrole en fonction du temps (**figure 41**). La biodégradation du diesel au fil du temps a été étudiée chez les isolats HM1, HM3, DSL1 et S2.2 (**figure 42**). La cinétique de biodégradation de l'huile usagée a été étudiée chez PB2 et HM3 (**figure 43**).

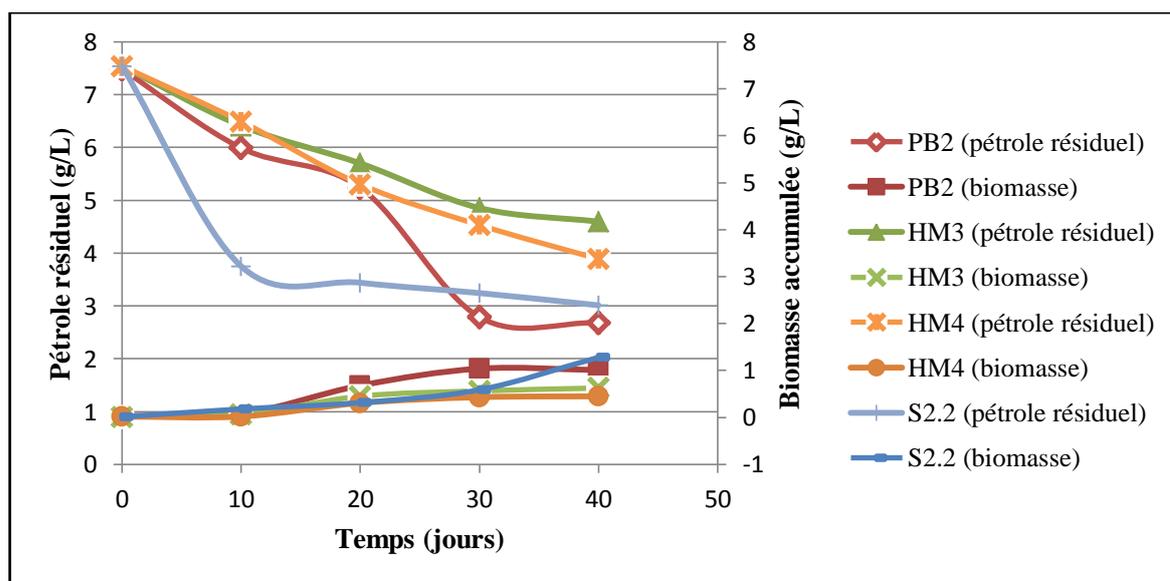


Figure 41. Concentration de pétrole et biomasse fongique accumulée dans le milieu BH pendant la période d'incubation

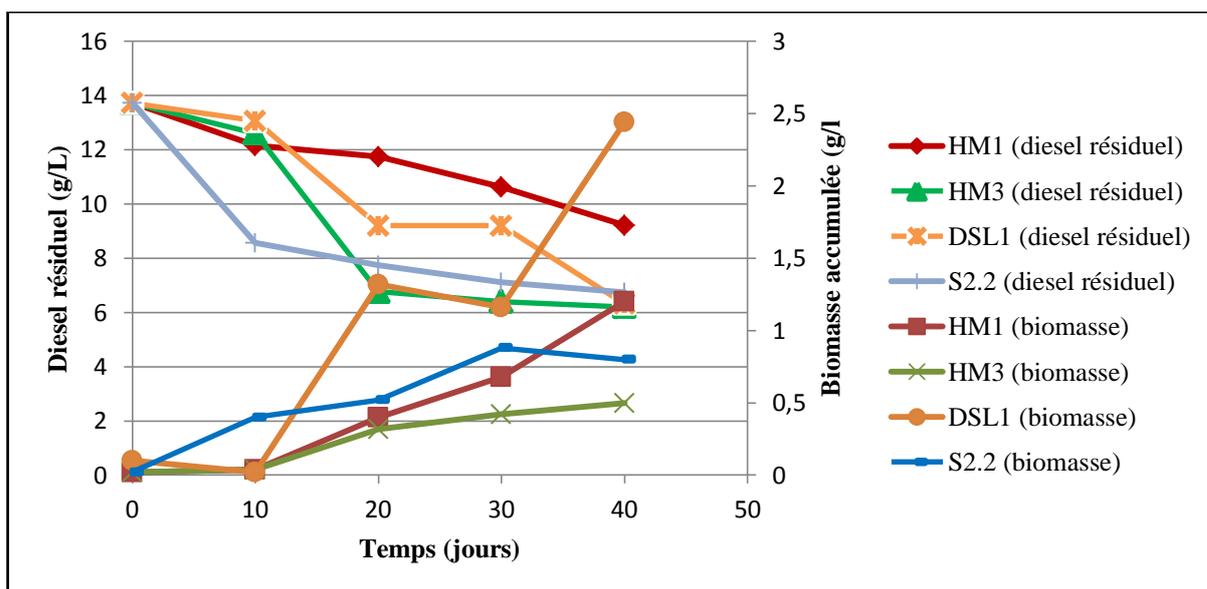


Figure 42. Concentration de diesel et biomasse fongique accumulée dans le milieu BH pendant la période d'incubation

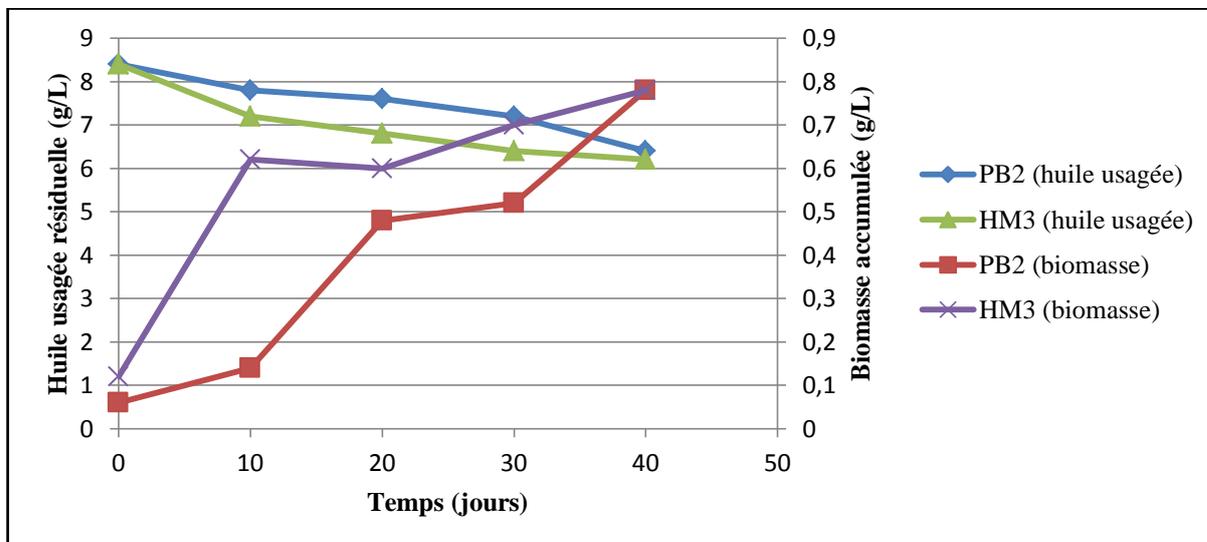


Figure 43. Concentration de l'huile usagée et biomasse fongique accumulée dans le milieu BH pendant la période d'incubation

La constante de biodégradation (k) et le temps de demi-vie ont été déterminés par le modèle cinétique du premier ordre et présentés dans le **tableau 13**.

Tableau 13. Les paramètres du modèle cinétique du premier ordre de biodégradation de pétrole, diesel et l'huile usagée par les isolats fongiques en milieu liquide

Isolats	Pétrole			Diesel			Huile usagée		
	K (jour ⁻¹)	t _{1/2} (jour)	r ²	K (jour ⁻¹)	t _{1/2} (jour)	r ²	K (jour ⁻¹)	t _{1/2} (jour)	r ²
PB2	0,028	24,76	0,92				0,006	115,53	0,95
HM1				0,009	77,02	0,97			
HM3	0,015	46,21	0,98	0,023	30,14	0,83	0,007	99,02	0,92
HM4	0,02	34,66	0,99						
DSL1				0,019	36,48	0,91			
S2.2	0,025	27,73	0,73	0,016	43,32	0,80			

En général, les résultats présentés par les trois figures montrent une diminution progressive dans la quantité des hydrocarbures totaux accompagnée par une augmentation de biomasse fongique dans les milieux de culture liquides. Une réduction rapide du pétrole a été observée au cours des 20 premiers jours d'incubation par les souches testées, la souche S2.2 (*A. fumigatus*) a été la plus rapide dans la dégradation du pétrole en éliminant 43.03 % de pétrole durant les premiers 10 jours d'incubation. PB2 (*A. terreus*), par contre, a montré une dégradation plus rapide de pétrole, pendant 10 jours, après le 20^{ème} jour d'incubation. Les constantes de biodégradation de pétrole (K) par les souches PB2 et S2.2 était 0.028 et 0.025/jour (**tableau 13**) qui sont les plus élevés en accord avec la vitesse de dégradation élevée présenté par ces deux isolats. Le temps de demi-vie (t_{1/2}), qui est le temps nécessaire pour que la moitié de la quantité initiale des hydrocarbures soit dégradé, a été aussi le plus court chez les deux isolats PB2 (24.76 jours) et S2.2 (27,73 jours).

La vitesse de dégradation de diesel par les isolats sélectionnés a été moins rapide que celle de dégradation de pétrole, cela est bien illustré par les constantes de biodégradations enregistrées. Cependant, la réduction de diesel a été aussi plus forte dans les 20 premiers jours d'incubation comme a été observé avec le pétrole. La souche S2.2 a montré un comportement de biodégradation comparable à celui observé auparavant avec le pétrole en éliminant 62,39% de la quantité initial du diesel dans les 10 premiers jours. HM3 a montré une dégradation rapide de diesel dans les 20 premiers jours conformément avec la constante de biodégradation de diesel la plus élevée (k= 0,023 / jour) et le t_{1/2} (30.14 jours) le plus court montré par cette souche. La vitesse de disparition de diesel par HM1 (*P. chrysogenum*) a été faible et presque constante dans la période d'incubation (40 jours) ce que signifie que cette souche est besoin d'une incubation plus lente pour qu'elle dégrade une grande quantité d'huile, cette constatation est confirmé par la constante de biodégradation la plus faible (k=0.009 /jour) et le temps de demi vie le plus grand (t_{1/2}= 77 jours) présentés par cette souche.

De son tour, l'huile usagée a été dégradée d'une façon progressive et avec une vitesse constante et très faible par rapport au pétrole et au diesel par les deux isolats PB2 (*A. terreus*) et HM3 (*A. ustus*). Les constantes de biodégradation de l'huile usagée étaient les plus faibles (0.006 et 0.007/ jour, pour PB2 et HM3, respectivement) et les temps de demi vie enregistrés étaient les plus grand (99 et 115 jours, pour PB2 et HM3, respectivement) ; ceci indique que la dégradation de l'huile usagée nécessite une durée d'incubation plus longue avec ces isolats.

L'étude de la cinétique de dégradation microbienne des polluants sert à connaître et à comprendre la cinétique de la bioremédiation des sols et également à déterminer la quantité de contaminant pétrolier restant à un moment donné (Ojewumi *et al.*, 2019). L'application du modèle cinétique du premier ordre des réactions chimiques pour évaluer la cinétique de biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes a été adoptés par plusieurs études précédentes (Asemoloye *et al.*, 2017; Al-Hawash *et al.*, 2018a ; Samaei *et al.*, 2020). Al-Hawash *et al.* (2018a) ont étudié la cinétique de biodégradation de 1% pétrole en milieu MSM par deux souches de *Penicillium* : RMA1 et RMA2. Ils ont reporté des constantes de biodégradation de 0.807/jour et 0.737/jour de pétrole par RMA1 et RMA2, respectivement. Un isolat identifié *Aspergillus sp.* RFC-1 a permis d'obtenir une constante de dégradation de pétrole brut de 0.074 jour⁻¹ durant 7 jours d'incubation en culture liquide (Al-Hawash *et al.*, 2018b). Dans une autre étude, la constance de dégradation maximale (K= 0.0224 jour⁻¹) des hydrocarbures totaux dans le sol a été obtenue par *A. niger* suivi par *Penicillium ochrochloron* (k= 0.0213 jour⁻¹). Les temps de demi-vie correspondants étaient 30.9 et 32.4 jours, respectivement (Essabri *et al.*, 2019).

V.7 Conditions optimales de biodégradation des hydrocarbures pétroliers

Cette étape vise à déterminer la température d'incubation et le pH initial optimaux pour la biodégradation de pétrole, diesel et l'huile usagée par les isolats sélectionnés.

V.7.1 Détermination du pH optimal

Les pourcentages de biodégradation de pétrole dans des pH différents sont illustrés dans la figure 44. Les biomasses mycéliennes récoltées dans ces conditions sont présentées dans la figure 45. Les résultats montrent que les trois isolats ont été capables de dégrader le pétrole dans l'intervalle de pH étudié de 5 à 9. Les deux souches *A. terreus* (PB2) et *A. ustus* (HM3) ont exécuté une dégradation significativement plus élevée à pH6 ce que signifie que c'est le pH initial optimal pour la dégradation de pétrole par ces deux isolats. Le taux de dégradation par ces isolats diminue en augmentant ou en diminuant le pH initial du milieu de culture, les pH neutre étaient les meilleurs pour la dégradation de pétrole par ces deux souches. Des

résultats similaires ont été observés dans une étude menée sur l'adsorption de pétrole par une souche *Aspergillus. sp* RFC1 a des pH initiaux différents où la meilleure adsorption a été notée pour les pH 5 et 6 (Al-Hawash *et al.*, 2018b).

Par contre, la souche *P. lilacinum* (HM4) a montré une dégradation effective de pétrole pour des pH neutres à basiques, le meilleur taux de dégradation a été observé à pH9 (47.51 %) suivi par pH6 (46.43 %). Aucune différence significative n'a été observée entre les taux de dégradation aux pH6, 7, 8 et 9 par cette souche. Un champignon du même genre *Peacilomyces variotii* JH6 a montré une adaptation à un large intervalle de pH pour la biodégradation de phénol, un polluant organique très toxique (Wang *et al.*, 2010).

Les quantités de biomasse accumulée par PB2 dans les différents pH ont été en accord avec les taux de dégradation de pétrole (figure 45). Cependant, pour les isolats HM3 et HM4, des différences ont été observées entre les quantités de biomasse accumulées et les taux de dégradation correspondants sous chaque traitement.

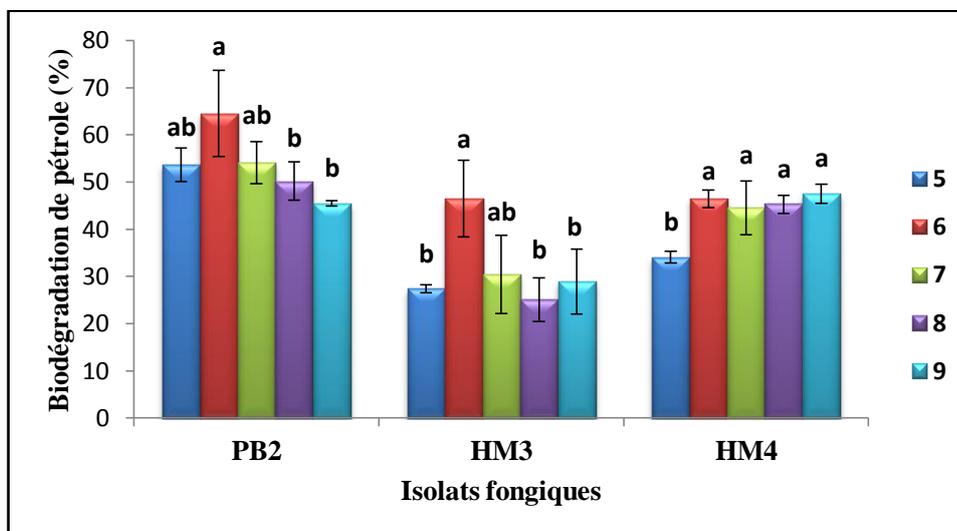


Figure 44. Effets de différents pH sur le pourcentage de dégradation de pétrole par les isolats PB2, HM3 et HM4. Des lettres différentes signifient des différences significatives ($p \leq 0.05$) entre les % de dégradation par le même isolat dans des pH initiaux différents

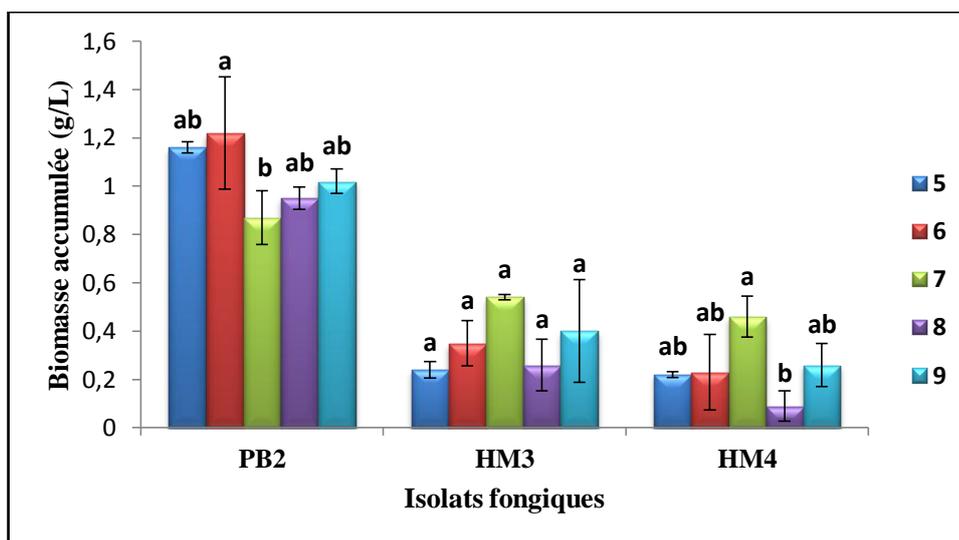


Figure 45. Effets de différents pH sur la quantité de biomasse récoltée par les isolats fongiques en présence de pétrole. Des lettres différentes signifient des différences significatives ($p \leq 0.05$) dans la quantité de biomasse produite par le même isolat dans des pH différents

Les pourcentages de biodégradation de diesel par les souches fongiques sélectionnées à des pH différents sont illustrés dans **la figure 46**. Les biomasses accumulées dans les mêmes conditions sont présentés dans **la figure 47**.

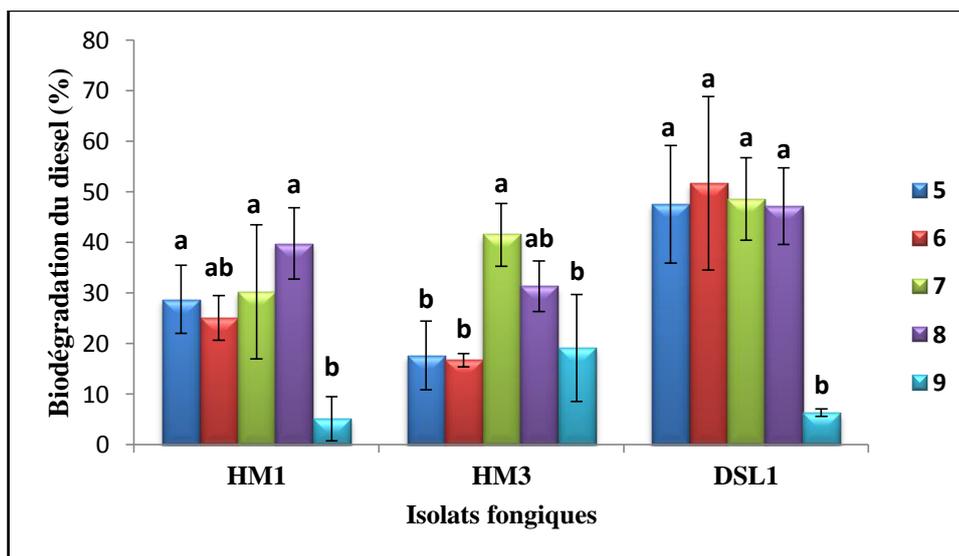


Figure 46. Effets de différents pH sur le pourcentage de dégradation de diesel par les isolats HM1, HM3 et DSL1. Des lettres différentes signifient des différences significatives ($p \leq 0.05$) entre les % de dégradation par le même isolat dans des pH initiaux différents

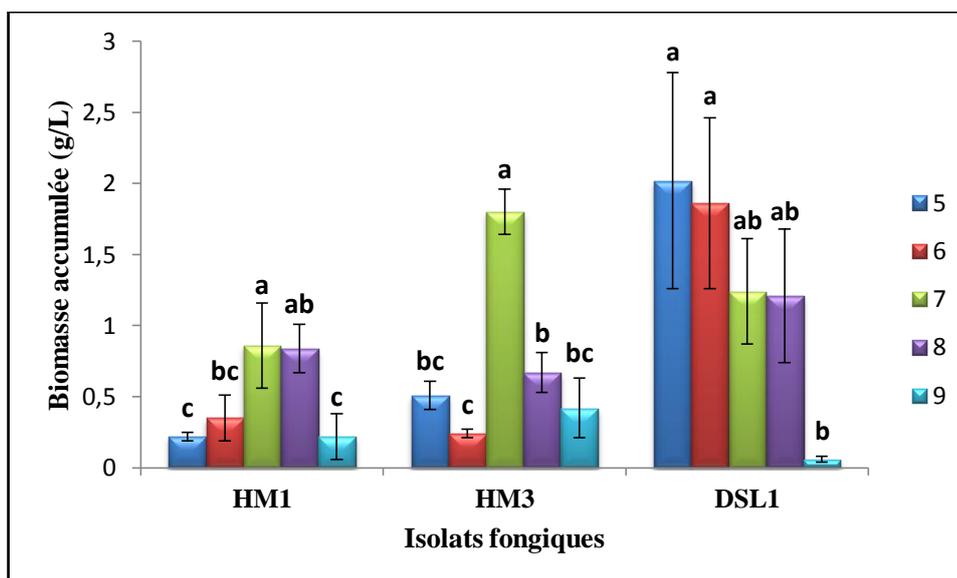


Figure 47. Effets de différents pH sur la quantité de biomasse accumulée par les isolats fongiques en présence de diesel. Des lettres différentes signifient des différences significatives ($p \leq 0.05$) dans la quantité de biomasse accumulée par le même isolat dans des pH différents

Les trois isolats ont montré des comportements différents vis-à-vis la biodégradation de diesel à des pH initiaux différents. Le pH optimal pour la souche *P. chrysogenum* (HM1) était pH8 suivi par le pH7 où les taux de dégradation de diesel enregistrés étaient 39.83% et 30.24%, respectivement. A l'inverse, le pH optimal pour *A. ustus* (HM3) a été le pH7 suivi par le pH 8. Ces deux souches ont préféré généralement un pH neutre à basique pour une dégradation effective du diesel. Les taux de dégradation ont diminué en baissant le pH initial des milieux. Contrairement aux deux isolats précédents, *P. glabrum* (DSL1) a présenté un potentiel élevé de dégradation de diesel dans l'intervalle de pH de 5 à 8 ; aucune différence significative n'a été enregistrée entre les taux de dégradation de diesel par cette souche dans cet intervalle; la dégradation optimale a été au pH6. Des résultats similaires ont été observés chez *P. janthinellum* SDX7 qui a montré une capacité de croissance à un large intervalle de pH de 4.0 à 9.0 en utilisant le kérosène comme source de carbone suggérant sa capacité à dégrader le kérosène dans les conditions acides, neutres et basiques (Khan *et al.*, 2015). Le % de dégradation de diesel le plus élevé par *Trichoderma reesei* H002 a été obtenu pour un pH initial de 6 (Nazifa *et al.*, 2018).

Au pH9, la dégradation de diesel a diminué significativement par les souches HM1 et DSL1 alors que HM3 a montré un taux de dégradation un peu important à ce pH basique.

La croissance des 3 isolats dans les différents pH exprimé par les quantités de biomasse accumulées dans les milieux de culture ont été, en général, en accords avec les taux de dégradation présentés par ces champignons dans les mêmes conditions de culture.

La recherche du pH initial optimal pour la dégradation de l'huile usagée a été effectuée chez deux isolats sélectionnés des tests précédents : *A. terreus* (PB2) et *A. ustus* (HM3). Les résultats montrant les pourcentages de dégradation de l'huile usagée et les quantités de biomasse fongique accumulées sont illustrés dans les **Figures 48** et **49**, respectivement.

Les résultats montrent une différence dans la capacité de dégradation de l'huile usagée entre les deux souches pour des valeurs de pH différents. La souche PB2 a montré une dégradation effective des hydrocarbures totaux dans les pH 5, 6 et 7 avec un taux de dégradation optimal de 25.32 % à pH5. Une diminution significative ($p \leq 0.05$) de dégradation de l'huile à était observée par cette souche dans les pH basiques 8 et 9. Ces résultats sont en ligne avec ceux observé chez une souche fongique du même genre *A. flavus* qui a montré un taux de dégradation des hydrocarbures aromatiques optimal au pH 5.5 (Al Dossary *et al.*, 2020). Une autre étude portée sur la dégradation de décane par *Penicillium sp.* CHY-2 a montré que ce champignon filamenteux est capable de dégrader les hydrocarbures dans des conditions acides mieux que les conditions basiques (Govarthanan *et al.*, 2017).

Contrairement à la souche PB2, la souche HM3 n'a montré aucune différence significative entre les taux de dégradation de l'huile usagée dans l'intervalle de pH étudié. Cependant, Le changement du pH initial du milieu a amélioré considérablement la capacité de dégradation de l'huile usagée par ce champignon de 16.02 % au pH7 à 29.86 % au pH8 qui est le pH optimal pour la dégradation de l'huile usagée par cette souche.

Les biomasses fongiques produites par ces deux souches dans les différents pH du milieu de culture (**Figure 49**) concordent avec les taux de dégradation de l'huile usagée présentés par ces champignons.

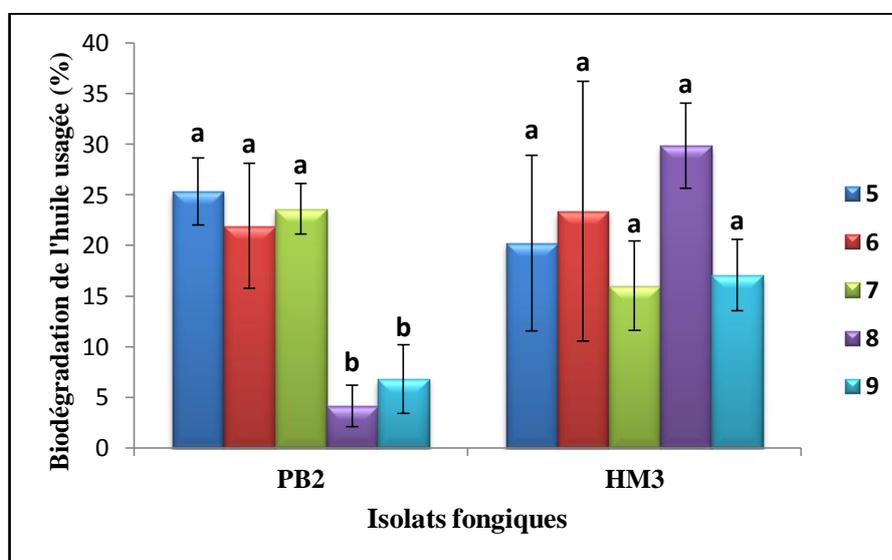


Figure 48. Effets de différents pH sur le pourcentage de dégradation de l'huile usagée par les isolats PB2 et HM3. Des lettres différentes signifient des différences significatives ($p \leq 0.05$) entre les % de dégradation par le même isolat dans des pH initiaux différents

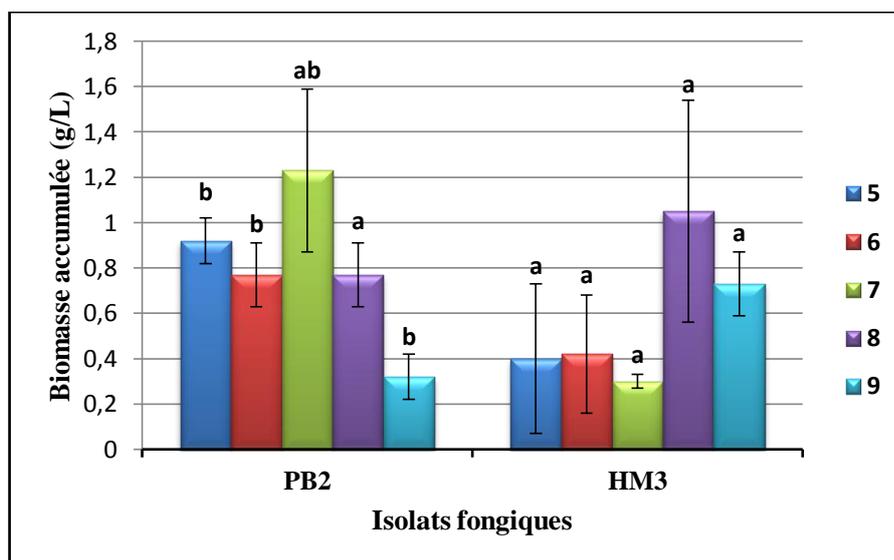


Figure 49. Effets de différents pH sur la quantité de biomasse accumulée par les isolats fongiques en présence de l’huile usagée. Des lettres différentes signifient des différences significatives ($p \leq 0.05$) dans la quantité de biomasse accumulée par le même isolat dans des pH initiaux différents

V.7.2 Détermination de la température optimale

L’effet de la température d’incubation sur le pourcentage de dégradation de pétrole par les isolats fongiques sélectionnés a été évalué et présenté dans **la figure 50**.

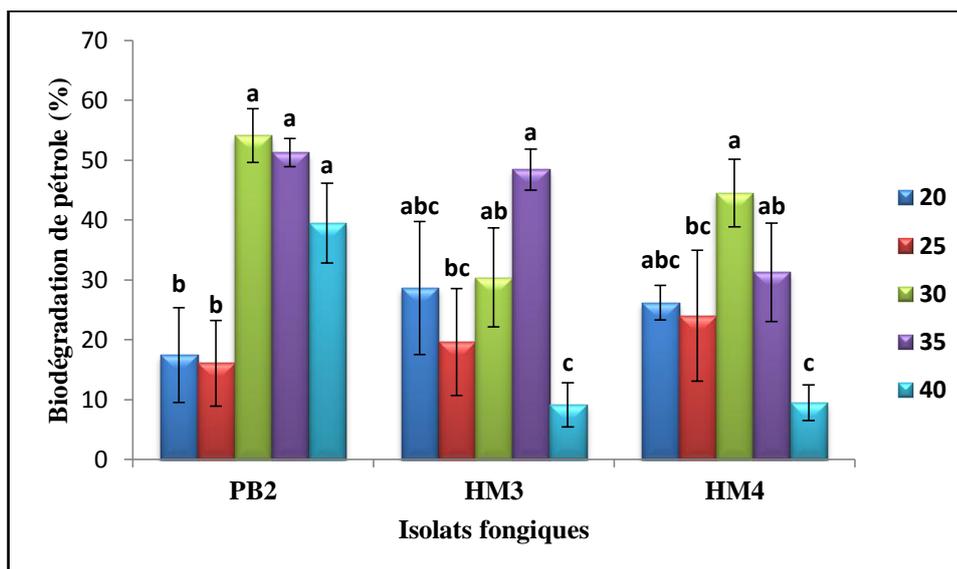


Figure 50. Effets de différentes température d’incubation sur le pourcentage de dégradation de pétrole par les isolats PB2, HM3 et HM4. Des lettres différentes signifient des différences significatives ($p \leq 0.05$) entre les % de dégradation par le même isolat à des températures d’incubation différentes

Les résultats montrent que la température d’incubation a un effet significatif sur le pouvoir de dégradation de pétrole par les isolats fongiques sélectionnés. Les meilleurs taux de dégradation ont été enregistrés par les trois isolats à la température 30 et 35 °C ce qui signifie que ces champignons préfèrent des conditions mésophiles pour la biodégradation des

hydrocarbures pétroliers. À 40 °C, le potentiel de dégradation de pétrole a diminué significativement chez les isolats HM3 et HM4, tandis que le pouvoir de dégradation de PB2 n'a pas été affecté par cette température élevée ce qui suggère sa capacité à tolérer des températures relativement élevées. Des résultats similaires à notre ont été reportés par plusieurs études portées sur la température optimal pour la biodégradation des hydrocarbures pétroliers. **Al-Hawash et al. (2018b)** ont noté que la température optimale pour l'adsorption de pétrole, naphthalène, phénanthrène et pyrène par une souche *Aspergillus. sp* RFC1 était 30°C. De même, la biodégradation des HAP par *A. flavus* a été optimale à la température de 30°C (**Al Dossary et al., 2020**). La température d'incubation qui stimule le maximum de production de biomasse par *Trichoderma virens* UKMP-1M en milieu MSM additionné de 3% (v/v) pétrole lourd comme source de carbone a été également 30°C (**Hamza et al., 2012**).

La température a également affecté la quantité de biomasse produite par chaque isolat fongique en dégradant le pétrole brut (**figure 51**).

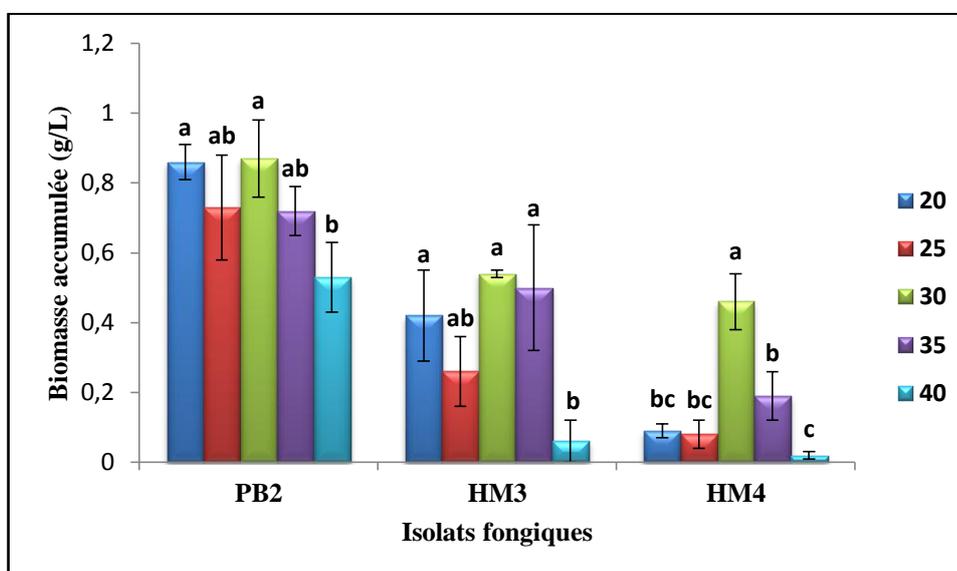


Figure 51. Effets de différentes températures d'incubation sur la quantité de biomasse accumulée par les isolats fongiques en présence de pétrole. Des lettres différentes signifient des différences significatives ($p \leq 0.05$) dans la quantité de biomasse accumulée par le même isolat à des températures d'incubation différentes

La production maximale de biomasse par les isolats HM3 et HM4 a été pour 30 à 35 °C, alors qu'elle a été significativement diminuée à 40 °C. De même, les températures les plus basses (20 et 25 °C) ont aussi diminuée les quantités de biomasse produites. Cependant, la production de biomasse par PB2 n'a pas été affectée par le changement de température d'incubation sauf une faible diminution observée à la température de 40°C. La température favorise la croissance mycélienne en facilitant le contact entre la surface cellulaire et la

source d'énergie. Cependant, à des températures plus élevée, ce processus va diminuer, possible à cause de la déformation des sites d'attachement des substrats disponibles sur la surface des cellules (Al Dossary *et al.*, 2020).

La biodégradation de diesel à des températures d'incubation différents par les isolats HM1, HM3 et DSL1 est présentée par la **figure 52**. La température optimale de dégradation de diesel par les souches HM1 et HM3 était 25 °C alors que la souche DSL1 (*P. glabrum*) a montré une dégradation significativement plus élevée à la température de 20°C, le taux de dégradation enregistré à cette T° est 60.33% qui est le taux de dégradation de diesel le plus élevé observé tout au long cette étude. Ce résultat est en ligne avec ceux de **Govarthanan *et al.* (2017)** qui ont reporté que la croissance d'une souche *Penicillium sp.* CHY2 à une température d'incubation de 20 °C permis d'obtenir le taux de dégradation de décane le plus élevée (75%), après 28 jours d'incubation.

Ces résultats montrent l'importance de la température d'incubation dans l'efficacité du processus de biodégradation des hydrocarbures pétroliers par les champignons filamenteux. En effet, il a été établi que la température est parmi les facteurs qui influencent la composition chimique et physique des hydrocarbures pétroliers (Atlas, 1981). Elle influence aussi l'activité enzymatique qui diminue à des température basse (Bisht *et al.*, 2015). Le métabolisme des hydrocarbures atteint le maximum à des températures relativement élevées qui varient de 30 à 40 °C (Bossert et Bartha, 1984).

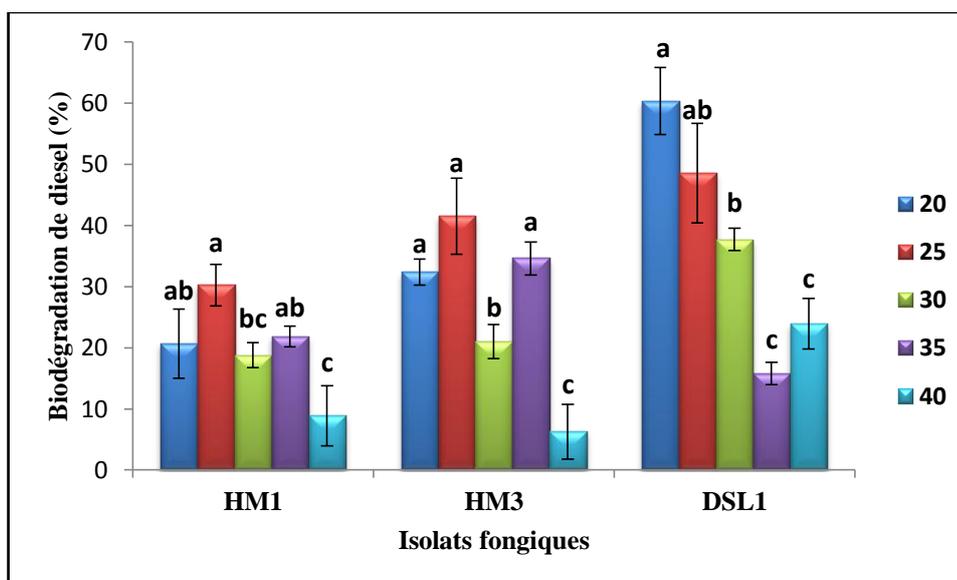


Figure 52. Effets de différentes température d'incubation sur le pourcentage de dégradation de diesel par les isolats HM1, HM3 et DSL1. Des lettres différentes signifient des différences significatives ($p \leq 0.05$) entre les % de dégradation par le même isolat à des températures d'incubation différentes

Les quantités de biomasses produites par chaque isolat suite à la dégradation de diesel à des températures d'incubation différentes sont présentées par la **figure 53**. Les biomasses accumulés par les isolats HM3 et DSL1 sont en accord avec les taux de dégradation de diesel par ces isolats dans les mêmes conditions. Cependant, la biomasse accumulée par HM1 a diminué significativement aux températures 30, 35 et 40 °C, cela est peut être lié à la sensibilité de cette souche aux températures élevées.

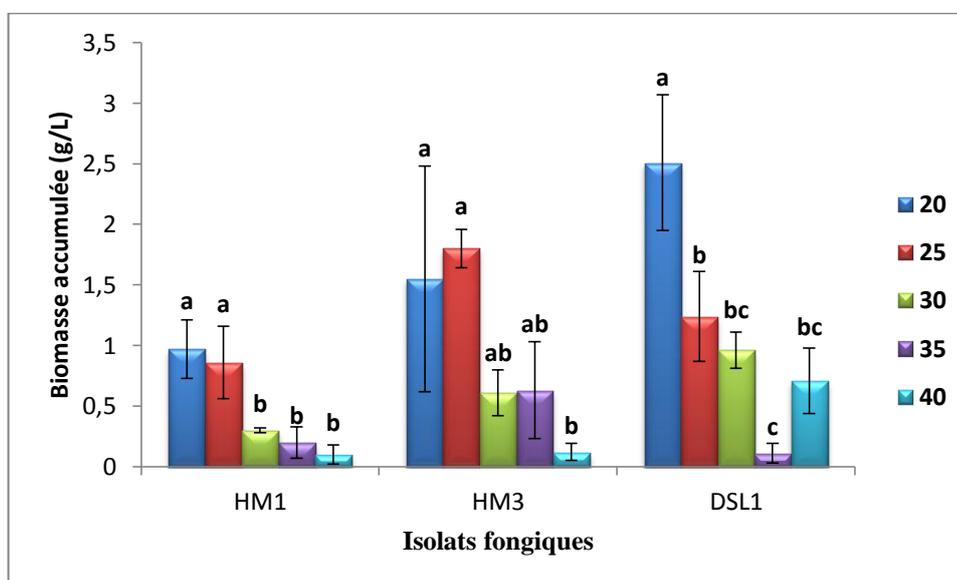


Figure 53. Effets de différentes températures d'incubation sur la quantité de biomasse accumulée par les isolats fongiques en présence de diesel. Des lettres différentes signifient des différences significatives ($p \leq 0.05$) dans la quantité de biomasse accumulée par le même isolat à des températures d'incubation différentes

La biodégradation de l'huile usagée par *A. terreus* (PB2) et *A. ustus* (HM3) à des températures d'incubation différentes est présenté par la **figure 54**.

Les températures d'incubation les plus favorables pour la dégradation de l'huile usagée par ces deux souches étaient 20 et 30 °C. La température optimale chez PB2 était 30 °C alors que des taux de dégradation presque identiques (16.43 % et 16.02 %) ont été noté chez HM3 à 20 et 30 °C. Des taux de dégradation très faibles ont été observés à 35 et 40°C.

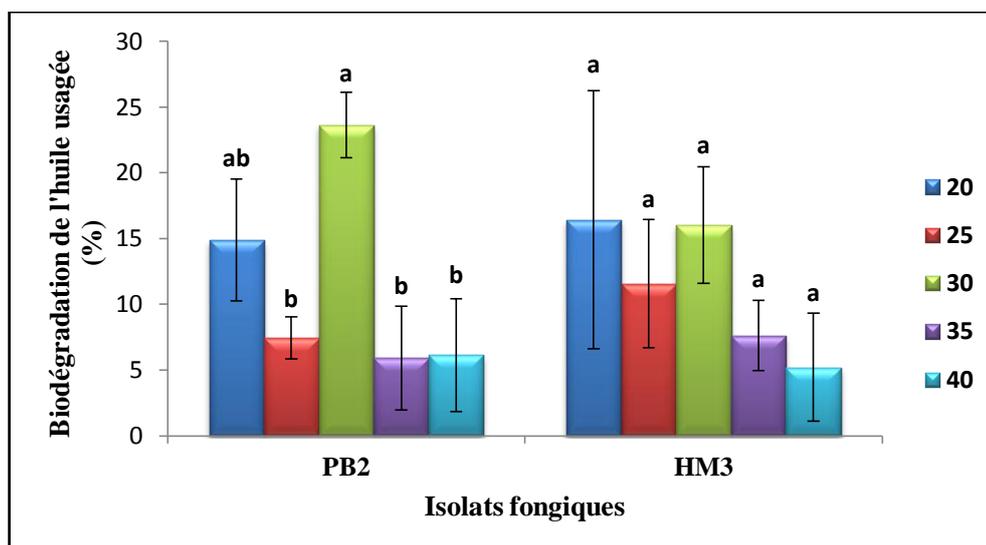


Figure 54. Effets de différentes température d'incubation sur le pourcentage de dégradation de l'huile usagée par les isolats PB2 et HM3. Des lettres différentes signifient des différences significatives ($p \leq 0.05$) entre les % de dégradation par le même isola à des températures d'incubation différentes

La biomasse fongique accumulée par les isolats sélectionnés dégradants l'huile usagée a été également affectée par la température d'incubation (**figure 55**). Les deux isolats ont produits le maximum de biomasse à la température d'incubation de 25 °C.

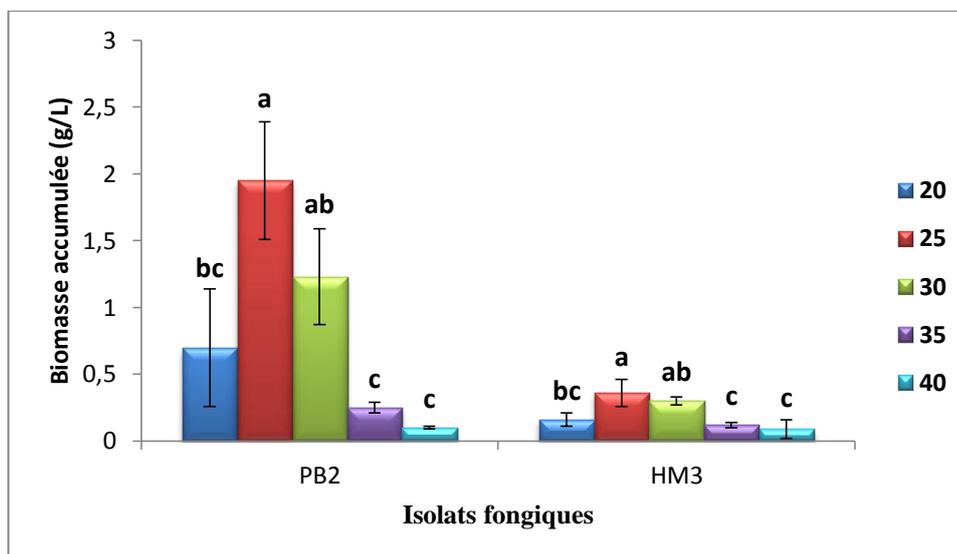


Figure 55. Effets de différentes températures d'incubation sur la quantité de biomasse accumulée par les isolats fongiques en présence de l'huile usagée. Des lettres différentes signifient des différences significatives ($p \leq 0.05$) dans la quantité de biomasse accumulée par le même isolat à des températures d'incubation différentes

V.8 Mycoremédiation en microcosmes de sol pollué par les hydrocarbures pétroliers

Dans une démarche d'élaboration d'un protocole de bioremédiation en conditions réelles, la caractérisation des capacités de biodégradation des souches isolées nous conduit à

envisager des phases d'étude en échantillons de sols pollués au pétrole, diesel ou l'huile moteur usagée. Ces études ont été réalisées en microcosmes de 300 g de sol au laboratoire.

V.8.1 Caractéristiques physico-chimiques du sol

Le sol utilisé pour le test de bioremédiation est un sol agricole non contaminé. Les paramètres physico-chimiques mesurés pour cet échantillon de sol sont résumés dans le **tableau 14**.

Les analyses physico-chimiques montrent que l'échantillon est un sable limoneux. Le pH est neutre (**Soltner, 1989**), le sol est non salé (CE = 0.23 ds/m) d'après l'échelle de la salinité (**Durand, 1983**). L'échantillon du sol est limité en matière organique en raison de la faible teneur en carbone organique (0.69%). Des teneurs faibles en azote ont été également observées.

Tableau 14. Propriétés physico-chimiques du sol utilisé pour la bioremédiation en microcosmes

Propriétés du sol	valeurs
Sable (%)	72.3
Limon (%)	15.0
Argile (%)	12.7
pH	7.23
CE (dS/m)	0.23
Carbone organique (%)	0.93
Azote total (%)	0.13
P (meq/100g)	10.67
Ca ⁺⁺ (meq/100g)	26.15
Mg ⁺⁺ (meq/100g)	2.86
Na ⁺ (meq/100g)	0.21
K ⁺ (meq/100g)	1.05
Calcaire actif (%)	1.38

V.8.2 Sélection d'un consortium – Test d'antagonisme

La construction d'un consortium fongique pour la mycoremédiation a été faite suite à un test d'antagonisme pour détecter des effets inhibiteurs possibles entre les souches fongiques sélectionnés. L'effet antagoniste a été évalué entre les isolats fongiques deux par deux en suivant leur croissance sur milieu PDA. L'aspect morphologique de quelques colonies est illustré par la **figure 56**.

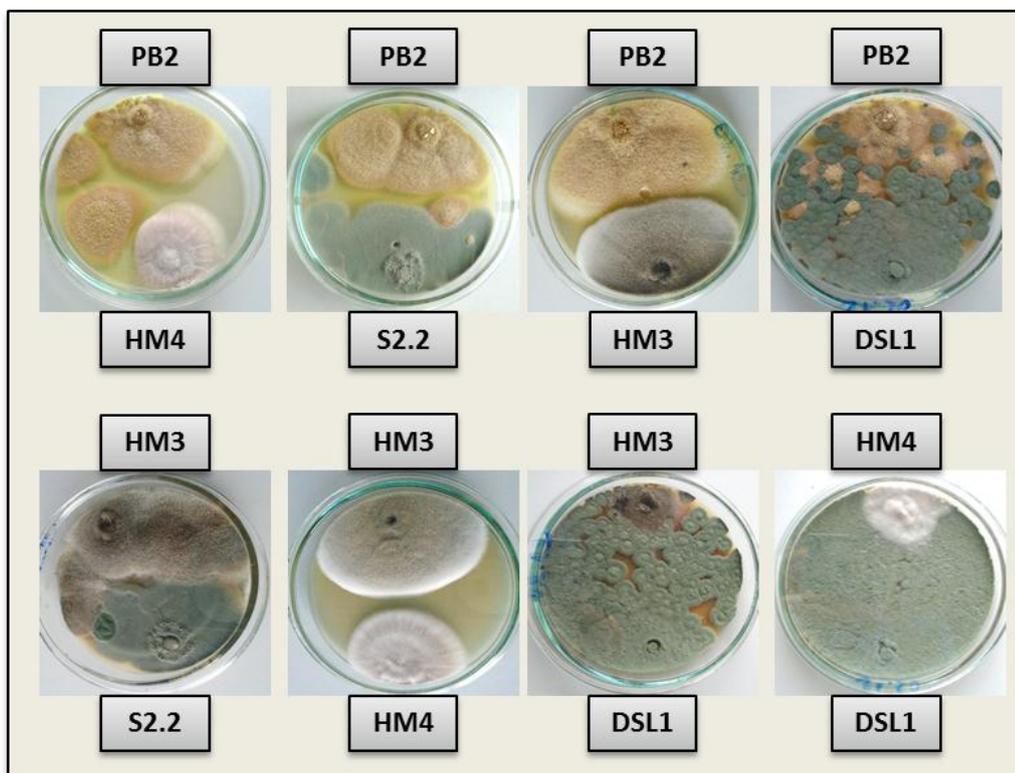


Figure 56. Effets antagonistes entre les champignons par inhibition directe sur milieu PDA

L'effet antagoniste entre les isolats fongiques a été évalué par absence ou présence d'inhibition entre chaque deux souche en mesurant la distance d'inhibition et les résultats sont résumés dans le **tableau 15**.

Tableau 15. Activité inhibitrice entre les champignons par test d'antagonisme

Les souches fongiques	PB2	HM3	HM4	DSL1	S2.2
PB2	/	-	-	±	-
HM3	-	/	-	+	-
HM4	-	-	/	+	±
DSL1	±	+	+	/	+
S2.2	-	-	±	+	/

- : pas d'inhibition; ±: inhibition partielle; + : inhibition

Les résultats montrent la présence de l'effet inhibiteur entre quelques souches et son absence entre les autres. La souche DSL1 a inhibé la croissance de toutes les souches. La croissance de HM4 a été partiellement inhibée par S2.2. Aucune inhibition de croissance mycélienne n'a été observée entre les trois souches PB2, HM3 et S2.2, ces trois souches appartiennent tous au genre d'*Aspergillus*, alors ils ont été sélectionnés pour construire un consortium. Donc, le consortium utilisé dans cette étude est constitué de trois souches fongiques : *A. terreus* (PB2), *A. ustus* (HM3) et *A. fumigatus* (S2.2).

V.8.3 Evaluation de la mycoremédiation en microcosmes de sol

L'efficacité du protocole de bioremédiation des sols artificiellement contaminés par les hydrocarbures pétroliers avec nos souches fongiques a été évaluée par le dosage des hydrocarbures totaux résiduels au temps 0, 45 et 90 jours d'incubation.

Le modèle cinétique de premier ordre défini par **Aggary *et al.* (2013)** a été appliqué pour déterminer la constante de biodégradation des hydrocarbures (k) et le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) dans les différents microcosmes de sol pollué.

V.8.3.1 Mycoremédiation du sol pollué par le pétrole

Les résultats de dégradation des hydrocarbures dans les sols pollués au pétrole par les souches individuelles et le consortium sont présentés par la **figure 57**.

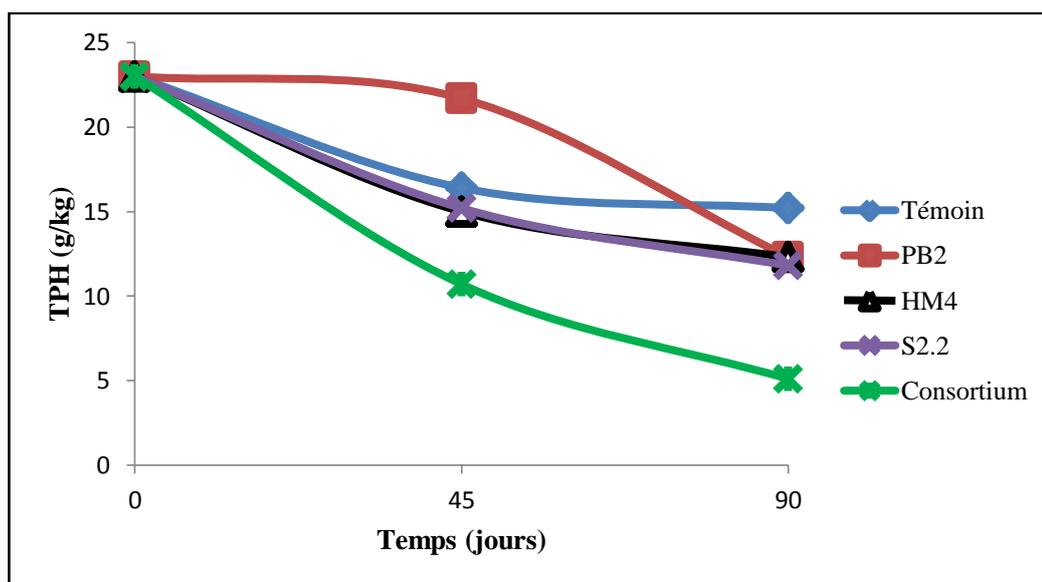


Figure 57. Biodégradation des hydrocarbures pétroliers totaux dans les microcosmes de sols pollués au pétrole

Les résultats montrent que nos souches fongiques sont capables de dégrader les hydrocarbures pétroliers dans le sol. Cette capacité est confirmée par la réduction dans la quantité initiale des TPH dans tous les microcosmes de sol durant les 90 jours d'incubation. Le consortium a été le plus efficace dans la biodégradation de pétrole par rapport aux champignons inoculés individuellement en éliminant environ 78% de la quantité initiale des TPH. La dégradation de pétrole par les deux souches *A. fumigatus* (S2.2) et *P. lilacinum* (HM4) a été comparable en éliminant tous les deux 47% de la quantité initiale des TPH présente dans le sol. Contrairement aux autres souches et au consortium qui ont dégradé une grande partie des hydrocarbures durant les premiers 45 jours d'incubation, *A. terreus* (PB2) a montré une très faible dégradation durant cette période d'incubation et son pouvoir de dégradation n'a été apparu que dans les derniers 45 jours d'incubation.

Des études sur la biodégradation des hydrocarbures dans les sols contaminés par le pétrole dans différentes conditions ont été menées en utilisant principalement des champignons filamenteux, ces champignons ont montré des potentiels de dégradation différents. Une étude qui a investigué la capacité d'une souche *Aspergillus niger* dans la bioremédiation d'un sol contaminé par le pétrole brut a montré une élimination de 30 % des TPH présents dans le sol après 96 jours d'incubation à 30 °C, le sol a été précédemment stérilisé pour éliminer la flore microbienne présente (**Kurnaz et Buyukgungor, 2016**). Une autre étude menée sur la dégradation de pétrole par une souche de *Fusarium* en microcosme de sol a permis d'éliminer 43 et 27% des TPH à partir des sol pollués par 10 et 50 g/kg de pétrole, respectivement, après 5 mois d'incubation (**Azin et al., 2018**).

Le consortium composé par les trois souches *A. terreus*, *A. ustus* et *A. fumigatus* a montré la plus grande diminution de TPH dans le sol pollué au pétrole, par rapport aux souches inoculés séparément. Des résultats similaires ont été obtenus par **Maddela et al. (2017)** qui ont observés que le traitement du sol pollué au pétrole brut par un mélange de 4 microorganismes, deux bactéries du genre *Bacillus* et deux champignons du genre *Geomyces*, a permis d'obtenir le taux de dégradation des hydrocarbures le plus élevé en éliminant 87.45% des TPH du sol après 90 jours d'incubation. Une étude plus récente portée sur la bioremédiation des échantillons de sols pollués par le pétrole et additionnés au pyrène, naphthalène, diesel et asphaltène dans des mini-bioréacteurs a comparé la biodégradation des TPH par des souches fongiques individuelles et 3 consortiums fongiques, le taux de dégradation le plus élevé a été enregistré chez un consortium constitué par 4 souches fongiques (*A. terreus*-SRF-15, *Fusarium proliferatum*-SRF-50, *Fusarium sp*-SRF-58 et *Aspergillus sp*-SRF-67) qui a éliminé 90 % des TPH présents dans le sol suivi par les deux autres consortiums (64% et 76%). La dégradation des hydrocarbures par les trois consortiums a été plus importante que les souches individuelles (10 à 65% des TPH) (**Ramoutar et al., 2019**).

Plusieurs travaux sur la bioremédiation bactérienne ont également montré que l'application des cultures mixtes de bactéries dégradant les hydrocarbures pour remédier les sols contaminés aux hydrocarbures pétroliers donne des résultats mieux que l'utilisation des souches individuels (**Ghazali et al., 2004 ; Yu et al., 2005 ; Benchouk, 2017**).

Ghazali et al. (2004) ont reporté que les microorganismes individuels peuvent minéraliser un nombre limité d'hydrocarbures, alors que l'assemblage d'une population microbienne mixte avec des capacités enzymatiques variées aide à augmenter le taux de dégradation des hydrocarbures pétroliers.

Les paramètres de la cinétique de biodégradation de pétrole ont été en ligne avec les résultats de dégradation des TPH dans le sol (**tableau 16**). Le consortium, qui a montré la capacité de dégradation la plus élevée, a permis d'obtenir la constante de dégradation la plus élevée ($k = 0.017 \text{ jour}^{-1}$) et le temps de demi-vie le plus court ($t_{1/2} = 40 \text{ jours}$). Cependant, la cinétique de dégradation de pétrole dans les microcosmes inoculés par les trois souches PB2, HM4 et S2.2 séparément a été identique en montrant la même constante k (0.007 jour^{-1}) et le même $t_{1/2}$ (99 jours). Le microcosme du sol témoin qui n'a pas reçu une inoculation microbienne a montré une faible dégradation des TPH (environ 34 %). Cette dégradation est favorisée par des phénomènes abiotiques de type volatilisation qui augmente la perte des hydrocarbures de faibles masses molaires (**Fayeulle et al., 2019**). L'étude de ces phénomènes abiotiques a montré que la volatilisation peut être responsable de 30% des pertes en naphthalène dans des sols contaminés artificiellement et que des réactions abiotiques sont responsables d'une diminution de 2 à 20% des concentrations extraites en Hydrocarbures polyaromatiques de 2 et 3 cycles (**Park et al., 1990**).

Tableau 16. Les paramètres de la cinétique de biodégradation du pétrole dans les microcosmes de sol

Isolats	k (jours ⁻¹)	$t_{1/2}$	r^2
PB2	0,007	99,02	0,82
HM4	0,007	99,02	0,96
S2.2	0,007	99,02	0,98
Consortium	0,017	40,77	0,99
Témoin	0,005	138,63	0,88

r^2 : Coefficient de détermination du modèle cinétique du 1^{er} ordre.

V.8.3.2 Mycoremédiation du sol pollué par le diesel

Les quantités des hydrocarbures totaux dégradées dans les sols pollués par le diesel sont illustrées dans la **figure 58**.

L'inoculation des sols contaminés au diesel par les souches fongiques a augmenté le taux de dégradation des TPH par rapport au témoin stérile sauf pour le sol inoculé par la souche *A. ustus* (HM3) qui n'a pas montré une dégradation différente au témoin. Le consortium et les souches *P. glabrum* (DSL1) et *A. fumigatus* (S2.2) ont montré une capacité de décontamination comparable en éliminant, respectivement, 53.20%, 52.82% et 51.46% de la quantité initial des TPH présents dans chaque sol.

Des rapports récents ont également montré un succès dans l'élimination des hydrocarbures dans des sols pollués par le diesel en utilisant des champignons filamenteux. Une expérimentation de biodégradation des hydrocarbures par des champignons filamenteux dans des mini-bioréacteurs avec un sol pollué au diesel et 3 fractions de pétrole (pyrène,

naphthalène et asphaltène) a été réalisée par **Ramoutar et al. (2019)**. Les taux de dégradation de diesel ont été les plus élevés par rapport aux autres fractions pétrolières allant de 55 à 68%, les souches fongiques utilisées par cette étude sont des *Aspergillus sp.* et *Fusarium sp.*

La dégradation des hydrocarbures pétroliers dans un sol pollué par 65000 mg (TPH)/kg de sol, qui a été exposé à une contamination par le diesel durant 20 ans, a été étudiée chez trois champignons filamenteux. Les taux de dégradation obtenus par une souche *Penicillium glabrum* ont été 72.5% et 65% dans les microcosmes qui contiennent des échantillons de sols pollués stériles et non stériles, respectivement (**Pérez-Armendáriz et al., 2010**).

Le consortium de trois souches fongiques et les souches DSL1 et S2.2 inoculées séparément ont montré le même pouvoir de dégradation de diesel dans les microcosmes de sol. Des résultats similaires ont été reportés par **Márquez-rocha et al. (2001)** qui n'ont observé aucune différence significative entre les taux de dégradation de diesel dans des petits échantillons de sol traités par un consortium bactérien et un champignon individuel *Pleurotus ostreatus* (basidiomycètes) après 6 semaines d'incubation.

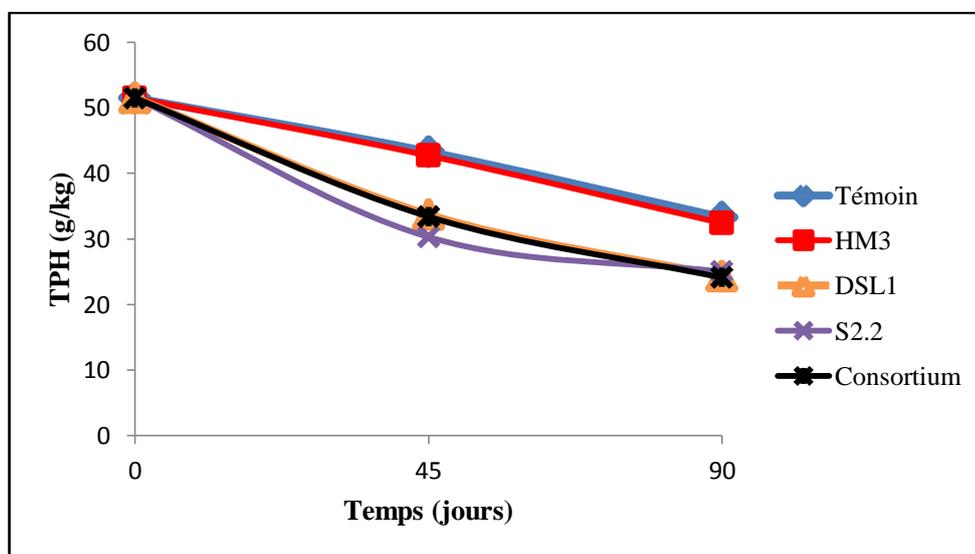


Figure 58. Biodégradation des hydrocarbures totaux dans les microcosmes de sols pollués par le diesel

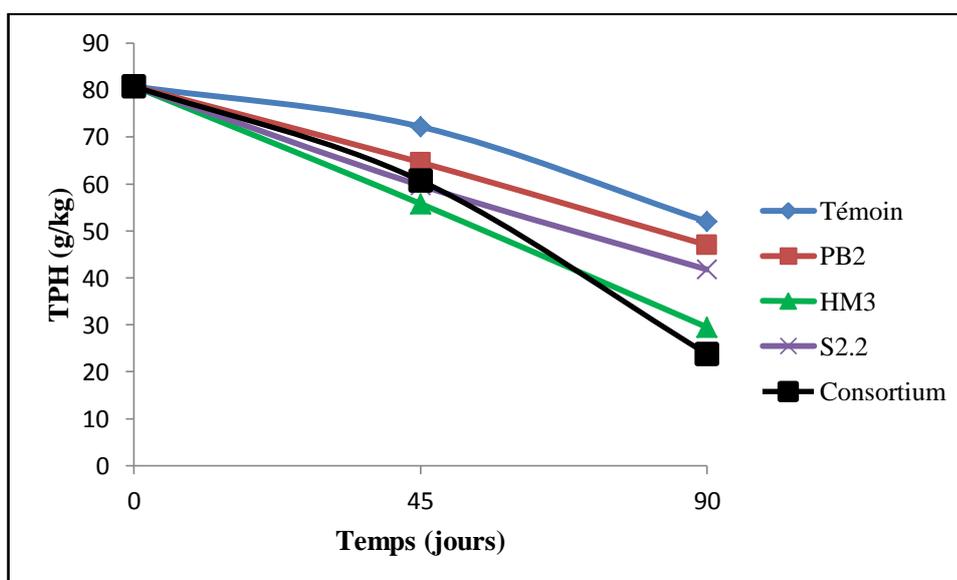
Les paramètres de la cinétique de biodégradation de diesel présentés dans le **tableau 17** sont en accord avec les taux de dégradation des TPH dans les microcosmes de sol pollués par le diesel. Le consortium ainsi que les deux souches DSL1 et S2.2 ont montré la même constante de dégradation $k=0.008 \text{ jour}^{-1}$ et le même temps de demi-vie $t_{1/2}= 86$ jours, ce qui signifie que le comportement de chacun des deux souches DSL1 et S2.2 dans le sol vis-à-vis la biodégradation du diesel est comparable à celui du consortium fongique utilisé dans cette expérimentation.

Tableau 17. Les paramètres de la cinétique de biodégradation du diesel dans les microcosmes de sol

Isolats	k (jours ⁻¹)	t _{1/2}	r ²
HM3	0,005	138,63	0,98
DSL1	0,008	86,64	0,99
S2.2	0,008	86,64	0,95
Consortium	0,008	86,64	0,99
Témoin	0,005	138,63	0,98

V.8.3.3 Mycoremédiation du sol pollué par l'huile usagée

Les résultats de dégradation de l'huile usagée dans les microcosmes de sols inoculés par les souches PB2, HM3, S2.2 et le consortium ainsi que le témoin stérile sont illustrés dans la **Figure 59**.

**Figure 59.** Biodégradation des hydrocarbures totaux dans les microcosmes de sols pollués par l'huile usagée

Contrairement aux résultats obtenus précédemment dans les milieux minéraux liquides, la biodégradation de l'huile usagée dans le sol par nos souches fongiques a révélée plus efficace en montrant une capacité d'élimination des TPH très importante. Le consortium était le plus efficace dans la bioremédiation en éliminant 70.54 % de la quantité initiale des TPH présente dans le sol suivi par la souche *A. ustus* (HM3) qui a dégradé 63.49 % des TPH. Les souches PB2 et S2.2 ont également montré un pouvoir de dégradation de l'huile usagée dans le sol en éliminant 41.83% et 48.80% des TPH, respectivement.

Les paramètres de la cinétique de biodégradation de l'huile usagée calculés par le modèle cinétique du premier ordre sont présentés dans le **tableau 18**. La constante de dégradation la plus élevée ($k=0.014 \text{ jour}^{-1}$) et le temps de demi-vie le plus court ($t_{1/2}= 49.51$

jours) ont été enregistrés dans le microcosme de sol traité par le consortium. Les paramètres de biodégradation observés chez la souche HM3 ($k = 0.011 \text{ jour}^{-1}$ / $t_{1/2} = 63$ jours) ont été également intéressants ce que confirme la capacité de cette souche à décontaminer les sols pollués par l'huile usagée.

Les TPH ont été éliminés par la même cinétique dans tous les microcosmes témoins préparés dans cette étude. La constante de dégradation ($k = 0.005 \text{ jour}^{-1}$) et le temps de demi-vie ($t_{1/2} = 138$ jours) ont été les mêmes dans le témoin contaminé au pétrole et le témoin pollué par le diesel ainsi que celui contaminé par l'huile usagée, ce qui implique que la décontamination des sols témoins a subi les mêmes facteurs abiotiques vu qu'ils ont été incubés dans conditions identiques durant cette étude.

Tableau 18. Les paramètres de la cinétique de biodégradation de l'huile usagée dans les microcosmes de sol

Isolats	k (jours ⁻¹)	t _{1/2} (jours)	r ²
PB2	0,006	115,52	0,99
HM3	0,011	63,01	0,97
S2.2	0,007	99,02	0,99
Consortium	0,014	49,51	0,91
Témoin	0,005	138,63	0,92

Si les applications dans le domaine de la bioremédiation des hydrocarbures sont majoritairement focalisées sur la décontamination des sols pollués par le pétrole brut, la bioremédiation des sols contaminés par les huiles des moteurs usagées fait, de plus en plus, l'objet des recherches scientifiques dans ce domaine (**Adenipekun et Ishikhuemhen, 2008 ; Abioye et al., 2010 ; Daccò et al., 2020**).

La composition des huiles usagées en hydrocarbures et autres composés organiques varient considérablement d'une huile à autre (**Kumar et al., 2014**), cette différence dépend surtout du type de fuel, du temps de travail du moteur et des conditions mécaniques de l'engin (**Vazquez-Duhalt, 1989**). Les huiles usagées peuvent entrer dans l'environnement par plusieurs voies comme les fuites des réservoirs d'huiles, les rejets des industries pétrochimiques, les stations de lavage des véhicules et les garages de la mécanique (**Bhurgri et al., 2018**). Un milliard de gallons d'huile lubrifiante usée sont générés lors des processus de vidange d'huile dans les ateliers automobiles et mécaniques, une partie de cette énorme quantité est recyclée et la plupart sont éliminés par incinération ou mise en décharge (**Ibrahim, 2016**). Toutes ces données ont exigé la recherche de nouveaux isolats capables de dégrader et minéraliser la majorité des composés toxiques dans l'huile usagée.

Les recherches publiées sur la bioremédiation des sols pollués par l'huile usagée ont montré des résultats différents selon le type de microorganisme utilisé et les protocoles expérimentaux appliqués. L'inoculation d'un sol contaminé par l'huile moteur usagée par deux souches fongiques *Aspergillus clavatus* et *Candida tropicalis*, séparément, a montré des taux de dégradation très élevés en éliminant, respectivement, 90.63 et 90.42% des TPH présent dans le sol après 56 jours d'incubation (Mbachu *et al.*, 2018). Une autre étude conduite dans un mésocosme de sol pollué par l'huile usagée durant 60 jours a enregistré le taux de dégradation maximal des TPH de 70% par un consortium constitué par trois souches bactérienne différente (Bagherzadeh-Namazi *et al.*, 2008). D'autre part, un taux de dégradation très faible des TPH (28%) a été observé dans un sol naturellement contaminé par l'huile usagée qui a été inoculé par une culture mixte de deux bactéries *Bacillus thuringiensis* et *B. cereus*, durant 90 jours de traitement à l'échelle de parcelle (Raju *et al.*, 2017).

La comparaison de nos résultats avec tout ce que précède met en évidence le potentiel de nos souches fongiques inoculés séparément ou en consortium pour une décontamination effective des sols pollués aux huiles des moteurs usagées.

V.9 Amélioration du pouvoir de dégradation des hydrocarbures par mutagénèse

Afin d'améliorer génétiquement le potentiel de dégradation de pétrole, de diesel et de l'huile usagée, deux souches fongiques HM3 (*A. ustus*) et PB1 (*A. niger*) ont été traitées par le rayonnement UV.

V.9.1 Effets des rayons UV sur les souches étudiées

Le protocole de mutagénèse consiste à exposer les spores des souches fongiques sélectionnées aux rayonnements UV dans une chambre fermée. L'irradiation a été réalisée à des temps fixés : 0 ; 1 ; 2 ; 4 ; 16 ; 24 et 32 minutes.

Afin d'évaluer l'effet des UV, les spores survivantes sont dénombrées sur gélose PDA pour déterminer le pourcentage de survie. La **figure 60** présente la courbe de survie obtenue.

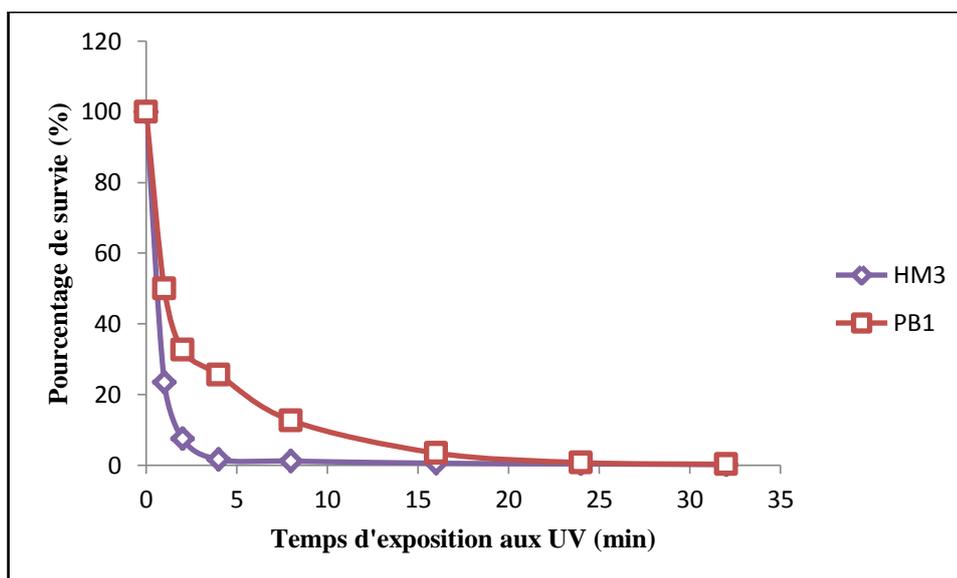


Figure 60. La courbe de survie des souches PB1 et HM3 après exposition au UV

Les résultats montrent que les rayons UV ont un effet létal sur la survie des spores irradiées. L'exposition aux rayonnements UV a diminué considérablement le pourcentage de survie des spores fongiques, 4 minutes d'irradiation ont diminué le pourcentage de survie de la souche HM3 jusqu'à 1.6%. Les spores de la souche PB1 semblent plus résistantes, leur pourcentage de survie a atteint une valeur de 3.44 % après 16 minutes d'exposition.

Les microorganismes répondent aux rayons UV par différentes manières : par changement de croissance, formation de spores, production de pigment et autres réponses (Carlile, 1970). Osman *et al.* (1989) ont observé une inhibition de germination des spores de *Penicillium notatum* et *Aspergillus flavus* suite à l'irradiation par des rayons UV, cette inhibition dépend de la période d'exposition au UV.

V.9.2 Sélection des mutants

La boîte de PDA qui représente la dose létale (5% de survie) a été utilisée pour sélectionner les mutants. Les colonies qui ont montré un aspect macroscopique différents de la souche originale (taille, forme et couleur) ont été sélectionnés (figure 61). Trois mutants pour chaque souche ont été sélectionnés pour le test du pouvoir de dégradation des hydrocarbures pétroliers.

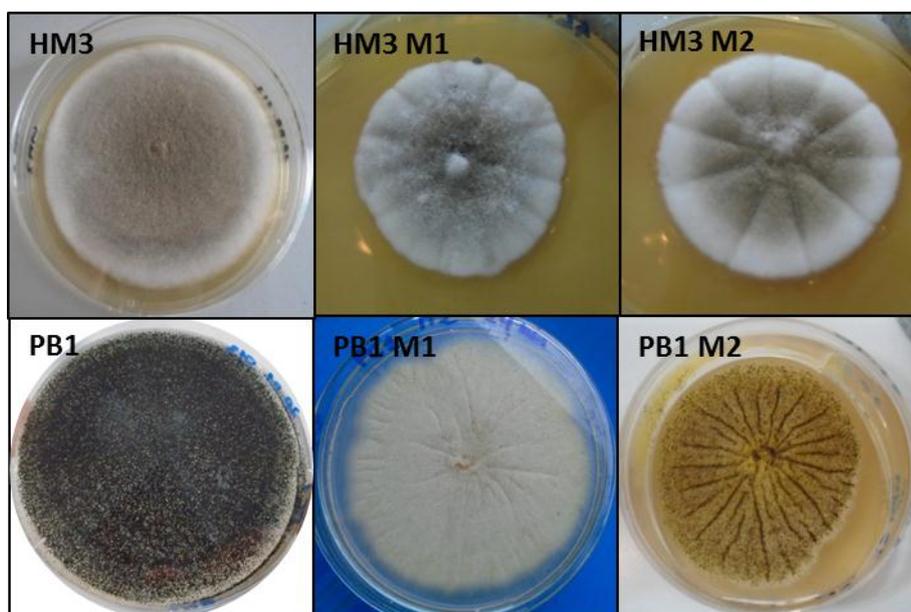


Figure 61. Aspect macroscopique des souches mères HM3 et PB1 et quelques souches mutantes sélectionnées

V.9.3 Biodégradation des hydrocarbures par les mutants sélectionnés (la méthode gravimétrique)

Le potentiel de dégradation des hydrocarbures pétroliers des souches mutantes sélectionnées a été évalué par la méthode gravimétrique en mesurant le pourcentage de biodégradation de pétrole, diesel et de l'huile usagée en milieu BH liquide, après 40 jours d'incubation. Les pourcentages de dégradation des hydrocarbures par les souches mutantes sont comparés avec ceux obtenus par les souches mères et présentés dans les **figures 62 et 63**.

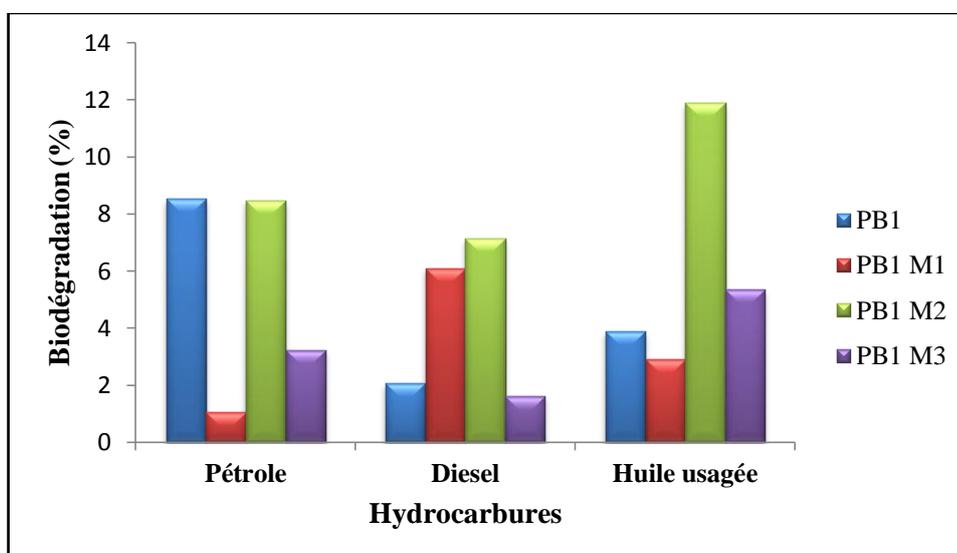


Figure 62. Pourcentage de dégradation des hydrocarbures pétroliers par la souche mère PB1 et ses mutantes

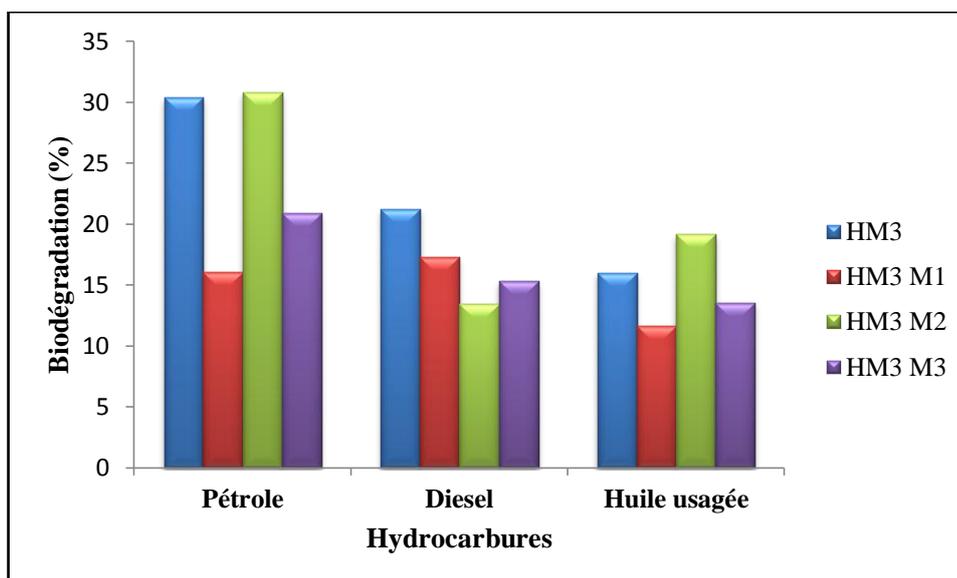


Figure 63. Pourcentage de dégradation des hydrocarbures pétroliers par la souche mère HM3 et ses mutantes.

Les résultats obtenus montrent une amélioration dans le pouvoir de dégradation des hydrocarbures pétroliers chez quelques mutantes et une diminution de ce pouvoir chez d'autres, alors qu'aucune modification dans la capacité de dégradation n'a été observée pour certaines mutantes. Le taux de dégradation de pétrole chez les trois mutantes des deux souches PB1 et HM3 était moins important que celui des souches mères. Les deux mutantes PB1M1 et PB1M2 ont montré un taux de dégradation de diesel un peu plus élevée par rapport à la souche mère (2.09%) en dégradant 6.11 et 7.15%, respectivement. Les taux de dégradation de diesel chez toutes les souches mutantes de HM3 étaient moins importants que la souche mère. Une amélioration très importante dans la biodégradation de l'huile usagée a été notée chez la souche mutante PB1M2 (11.89%) en comparaison avec sa souche mère PB1 (3.88%). La biodégradation de l'huile usagée a reconnu également une amélioration chez la mutante HM3M2 en éliminant 19.14% de la quantité initiale de l'huile par rapport à 16% chez la souche mère HM3. Des résultats similaires ont été obtenus par **Benchouk (2017)** qui a appliqué le même protocole de mutagenèse sur des bactéries afin d'améliorer leur pouvoir de dégradation des hydrocarbures, la capacité de dégradation de pétrole et de diesel de certaines souches mutantes a montré une amélioration alors que chez autres mutantes, le pouvoir de dégradation a été affecté négativement.

L'utilisation des agents mutagènes différents pour l'amélioration des souches a été déjà démontrée par **Parekh et al. (2000)**. De plus, l'irradiation de *Fusarium oxysporum* avec des rayons UV suivi de N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) a été utilisé pour améliorer la production de carboxyméthyl cellulase (CMCase) (**Kuhad et al., 1994**). La production des protéines extracellulaires et les activités cellulase correspondantes chez *A. terreus* D34 ont été

significativement améliorées après des traitements combinés des UV et de mutagenèse chimique (**Kumar *et al.*, 2015**).

Les résultats ont montré aussi que malgré le changement dans l'aspect morphologique de quelques souches mutantes de HM3 suite à l'irradiation par les UV, la capacité de biodégradation des hydrocarbures pétroliers n'a pas été trop affecté ce que signifie que les gènes codant pour les enzymes impliquant dans les processus de biodégradation chez cette souche sont résistante aux mutagènes.

Conclusion

Conclusion & perspectives

La contamination des sols par le pétrole brut et ses dérivés constitue une préoccupation sérieuse pour la santé humaine et écologique. Les champignons filamenteux telluriques apparaissent intéressants pour la bioremédiation des hydrocarbures pétroliers du fait de leur diversité métabolique et de leur adaptation à la vie dans les sols. Ainsi, notre étude porte à la fois sur des aspects fondamentaux de compréhension du processus de biodégradation des hydrocarbures pétroliers par ces microorganismes et sur des essais en microcosmes de sol au laboratoire dans une démarche pour le développement d'un protocole efficace pour la bioremédiation des sols pollués.

Tout d'abord, les échantillons de sol ont été préparés pour l'isolement des champignons filamenteux dégradants les hydrocarbures. Deux types d'échantillons ont été utilisés pour l'isolement ; des sols proviennent de la raffinerie d'Arzew, Algérie, qui sont soumis depuis plusieurs années à une contamination chronique et élevée en hydrocarbures pétroliers. Le deuxième échantillon constitue des sols contaminés artificiellement, au laboratoire, par le pétrole, le diesel ou l'huile moteur usagée.

Dans un premier temps, une phase d'isolement des champignons filamenteux présents dans les deux types d'échantillons de sol a permis d'isoler et de purifier 35 isolats fongiques par deux techniques d'isolement différentes qui permettent d'avoir accès à la fois à des souches métaboliquement actives et des souches majoritairement sporulentes. La caractérisation morphologique des isolats fongiques obtenus met en évidence une grande diversité macroscopique des champignons isolés. Six de ces isolats ont également été identifiés génétiquement par séquençage des séquences ITS de l'ADN ribosomale. Il en ressort ainsi que les souches identifiées correspondent à des espèces saprotrophes telluriques appartenant à la division des *Ascomycota*, avec dominance du genre *Aspergillus*.

Suite à la première étape descriptive de l'isolement des souches qui constituent la mycothèque de cette étude, la deuxième partie du travail se focalise sur l'étude du potentiel de ces souches à dégrader le pétrole brut, le diesel et l'huile moteur usagée dans des milieux minéraux liquides. La première étape dans l'étude du potentiel de biodégradation consiste à des tests préliminaires pour sélectionner les souches fongiques capables d'utiliser les hydrocarbures pétroliers comme source de carbone et d'énergie. Le test de l'indicateur rédox DCPIP et le test utilisant un milieu spécifique pour les champignons adaptés aux

hydrocarbures (HAF) ont permis de sélectionner 6 souches fongiques qui ont été identifiées préalablement comme étant *Aspergillus terreus* (PB2), *Penicillium chrysogenum* (HM1), *A. ustus* (HM3), *Purpureocillium lilacinum* (HM4), *Penicillium glabrum* (DSL1) et *A. fumigatus* (S2.2).

Ensuite, des études quantitatives pour estimer les taux de dégradation des trois huiles pétrolières par les souches sélectionnées ont été conduites en milieu minéral liquide pendant 40 jours d'incubation. Le pourcentage de dégradation des hydrocarbures pétroliers totaux (TPH) a été calculé par la méthode gravimétrique, la quantité de biomasse accumulée dans les milieux de cultures suite à la dégradation des hydrocarbures a été mesurée et la cinétique de biodégradation de chaque huile pétrolière durant la période d'incubation a également été étudiée. Les résultats obtenus ont montré que les souches fongiques sélectionnées ont des capacités différentes de dégradation des hydrocarbures. Le pétrole brut a été le plus dégradé par les souches fongiques, suivie par le diesel. Le meilleur pourcentage de dégradation de pétrole a été 55.98% chez la souche DSL1 suivi par un taux de 54.11% enregistré chez PB2. Les meilleurs taux de dégradation de diesel ont été également observés chez les deux souches PB2 et DSL1 en éliminant, respectivement, 54.61% et 48.56% des hydrocarbures. La dégradation de l'huile usagée a été plus faible où le meilleur taux de dégradation était 23.38% obtenus par la souche PB2.

Les conditions de cultures optimaux pour la biodégradation des hydrocarbures pétroliers ont été recherchés en évaluant les pourcentages de dégradation de chaque huile pétrolière en milieu liquide à des intervalles de pH de 5, 6, 7, 8 et 9 et à des températures d'incubation de 20, 25, 30, 35 et 40°C. La température optimale pour la biodégradation ainsi que le meilleur pH initial du milieu de culture dépendent des souches fongiques et de l'huile pétrolière dégradée. Généralement, les souches testées préfèrent des pH neutres à basiques et des conditions mésophiles à des températures d'incubations de 25 à 35°C. Néanmoins, certaines souches ont montré une dégradation importante des hydrocarbures à des températures élevées (40°C) et à des pH plus basique (pH8 et pH9) ainsi que des pH plus acides (pH5).

L'étape suivante concerne l'application des souches fongiques sélectionnées dans un processus de dépollution des sols contaminés par les hydrocarbures pétroliers. Des microcosmes de 300 g de sols stérilisés et contaminés artificiellement par le pétrole, le diesel ou l'huile usagée ont été préparés puis inoculés par les isolats fongiques individuels ou par un consortium de trois souches fongiques. La biodégradation a été évaluée par le dosage des TPH

résiduels après 90 jours d'incubation. Il en ressort que l'inoculation des sols pollués par les souches fongiques a amélioré la biodégradation des hydrocarbures pétroliers par rapport aux témoins. Le consortium a été le plus efficace dans la décontamination des sols pollués par rapport aux champignons inoculés individuellement en éliminant 78%, 53% et 71 % de la quantité initiale des TPH présente dans les sols pollués par le pétrole, diesel et l'huile usagée, respectivement. Les essais de biodégradation en échantillons de sol et l'étude de l'effet de l'introduction de nos souches fongiques sur l'élimination des polluants pétroliers représentent ainsi une première étape dans le développement d'un protocole de bioremédiation à grande échelle.

Enfin, une approche génétique appliquant la mutagenèse a été effectuée afin d'améliorer le pouvoir de dégradation des hydrocarbures pétroliers chez deux souches fongiques sélectionnées. La mutagenèse a été appliquée par des rayons Ultra-violet dans le but d'avoir des mutations aux niveaux des gènes impliqués dans la biodégradation. Certaines souches mutantes obtenues ont montré une amélioration dans la dégradation des hydrocarbures pétroliers alors qu'une diminution de ce pouvoir a été notée chez les autres.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse doctorale fournit un aperçu sur la capacité des champignons filamenteux telluriques à s'adapter à des environnements pollués par des hydrocarbures pétroliers. Les études en milieu liquide et en microcosmes de sol confirment le potentiel de nos souches fongiques pour la tolérance et la biodégradation des hydrocarbures.

Des études complémentaires sont en effet requises à la compréhension des mécanismes impliqués dans le processus de décontamination afin d'élaborer des protocoles effectives pour la bioremédiation fongique des sols pollués aux hydrocarbures pétroliers :

- Etudier la relation entre le métabolisme fongique et la biodégradation des hydrocarbures pétroliers : étude des enzymes impliqués dans la dégradation des hydrocarbures.
- Evaluer la capacité des souches fongiques à produire des biosurfactants (des tensioactifs de faibles masses molaires qui réduisent les tensions de surface aux interfaces eau/air ou eau/huile, ils ont un grand pouvoir dans la remobilisation des hydrocarbures et l'accélération de leur biodégradation), ainsi que leur caractérisation.

- Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) constituent la partie la plus toxique des huiles pétrolières vue leur pouvoir mutagène et cancérigène très élevé, il serait donc intéressant de tester la capacité de désorption et de dégradation de ces molécules par nos souches fongiques ainsi que l'étude des mécanismes impliquées dans leur biodégradation.
- L'identification des gènes fonctionnels responsables de la dégradation des hydrocarbures pétroliers chez les souches fongiques sélectionnées pourraient permettre de mieux comprendre les voies de dégradation des hydrocarbures chez les champignons filamenteux.
- Les essais de mycoremédiation décrits au sein de cette thèse représentent un premier pas dans le développement d'un protocole de bioremédiation à grande échelle, d'autres études complémentaires sont nécessaires : inoculation des souches fongiques dans des sols non stérile au sein des microflore endogènes (bioaugmentation), bioremédiation des échantillons de sols proviennent des sites naturellement contaminés aux hydrocarbures, tester la concentration minimale des spores fongiques nécessaires pour l'inoculation des sols contaminés, optimiser l'aération des sols durant la période de bioremédiation... etc.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

- Abada, Z., & Bouharkat, M. (2018).** Study of management strategy of energy resources in Algeria. *Energy Reports*, 4, 1-7.
- Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M., & Naidu, R. (2015).** A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. *Applied biochemistry and biotechnology*, 176(3), 670-699.
- Abioye, P. O., Aziz, A. A., & Agamuthu, P. (2010).** Enhanced biodegradation of used engine oil in soil amended with organic wastes. *Water, Air, & Soil Pollution*, 209(1), 173-179.
- Achuba, F. I., & Peretiemo-Clarke, B. O. (2008).** Effect of spent engine oil on soil catalase and dehydrogenase activities. *International Agrophysics*, 22(1), 1-4.
- Adebusoye S. A., Ilori M. O., Amund O. O., Teniola O. D. and Olatope S. (2006).** Microbial degradation of petroleum hydrocarbons in a polluted tropical stream. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(8), 1149-1159.
- Adekunle, A. A., Adebambo, O. A. (2007).** Petroleum hydrocarbon utilization by fungi isolated from *Detarium Senegalense* (J. F Gmelin) seeds. *J Am Sci*, 3 (1), 69–76.
- Adenipekun, C. O., & Isikhuemhen, O. S. (2008).** Bioremediation of engine oil polluted soil by the tropical white rot fungus, *Lentinus squarrosulus* Mont.(Singer). *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 11(12), 1634-1637.
- Adesodun, J. K., & Mbagwu, J. S. C. (2008).** Biodegradation of waste-lubricating petroleum oil in a tropical alfisol as mediated by animal droppings. *Bioresource technology*, 99(13), 5659-5665.
- Agarry, S. E., Aremu, M. O., & Aworanti, O. A. (2013).** Kinetic modelling and half-life study on enhanced soil bioremediation of bonny light crude oil amended with crop and animal-derived organic wastes. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, 4, 137.
- Agarry, S., & Latinwo, G. K. (2015).** Biodegradation of diesel oil in soil and its enhancement by application of bioventing and amendment with brewery waste effluents as biostimulation-bioaugmentation agents. *Journal of Ecological Engineering*, 16(2).
- Albers P. H. (1995).** *Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons* (2 ed.). Lewis publishers, USA.
- Al-Dossary, M. A., Abood, S. A., & Al-Saad, H. T. (2020).** Factors affecting polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by *Aspergillus flavus*. *Remediation Journal*, 30(4), 17-25.

- Al-Hawash, A. B., Alkooranee, J. T., Abbood, H. A., Zhang, J., Sun, J., Zhang, X., & Ma, F. (2018a).** Isolation and characterization of two crude oil-degrading fungi strains from Rumaila oil field, Iraq. *Biotechnology reports*, 17, 104-109.
- Al-Hawash, A.B., Zhang, X., Ma, F. (2018b).** Removal and biodegradation of different petroleum hydrocarbons using the filamentous fungus *Aspergillus* sp. RFC-1. *Microbiology open*, 619:1–14.
- Al-Jawhari, I. F. H. (2014).** Ability of some soil fungi in biodegradation of petroleum hydrocarbon. *J App Environ Microb*, 2 (2), 46-52.
- Al-Nasrawi, H. (2012).** Biodegradation of crude oil by fungi isolated from Gulf of Mexico. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 3, 147.
- Ameen, F., Hadi, S., Moslem, M., Al-Sabri, A., & Yassin, M. A. (2015).** Biodegradation of engine oil by fungi from mangrove habitat. *The Journal of general and applied microbiology*, 61(5), 185-192.
- Ameen, F., Moslem, M., Hadi, S., & Al-Sabri, A. E. (2016).** Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia. *Saudi journal of biological sciences*, 23(2), 211-218.
- Aminzadeh, F., & Dasgupta, S. N. (2013).** *Geophysics for petroleum engineers*. Elsevier Science.
- April, T. M., Foght, J. M., & Currah, R. S. (1999).** Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(1), 38-49.
- Asemoloye, M. D., Ahmad, R., & Jonathan, S. G. (2017).** Synergistic action of rhizospheric fungi with *Megathyrsus maximus* root speeds up hydrocarbon degradation kinetics in oil polluted soil. *Chemosphere*, 187, 1-10.
- Atagana, H. I., Haynes, R. J., & Wallis, F. M. (2006).** Fungal bioremediation of creosote-contaminated soil: A laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fungi. *Water, air, and soil pollution*, 172(1-4), 201-219.
- Atlas, R. M. (1981).** Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological reviews*, 45(1), 180.
- Atlas, R. M. (1995).** Bioremediation of petroleum pollutants. *Int Biodeterior Biodegrad*, 35, 317–327.
- Attar, M., & Hammat, M. (2009).** Le Potentiel en Hydrocarbures de L'Algérie. *Rapport*, Schlumberger – WEC – SONATRACH.

- Azin, E., Moghimi, H., & Heidarytabar, R. (2018).** Petroleum Degradation, Biosurfactant and Laccase Production by *Fusarium neocosmosporiellum* RH-10: A Microcosm Study. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 27(4), 329-342.
- Bagherzadeh-Namazi, A., Shojaosadati, S. A., & Hashemi-Najafabadi, S. (2008).** Biodegradation of used engine oil using mixed and isolated cultures. *Int. J. Environ. Res*, 2 (4), 431-440.
- Baize, D. (1988).** Guide des analyses courantes en pédologie. Institut national de la recherche agronomique. 172p.
- Baize, D. (2018).** Guide des analyses en pédologie: 3e édition revue et augmentée. Editions Quae.
- Baldrian, P., & Gabriel, J., 2002.** Intraspecific variability in growth response to cadmium of the wood-rotting fungus. *Piptoporus betulinus*. *Mycologia*, 94, 428-436.
- Barathi, S., & Vasudevan, N. (2003).** Bioremediation of crude oil contaminated soil by bioaugmentation of *Pseudomonas fluorescens* NS1. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 38(9), 1857-1866.
- Bardi, L., Mattei, A., Steffan, S., Marzona, M. (2000).** Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with β -cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability. *Enzyme Microb Technol*, 27, 709–713.
- Barnes, N. M., Khodse, V. B., Lotlikar, N. P., Meena, R. M., & Damare, S. R. (2018).** Bioremediation potential of hydrocarbon-utilizing fungi from select marine niches of India. *3 Biotech*, 8(1), 1-10.
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998).** Illustrated genera of imperfect fungi. 4th ed. American Phytopathological Society (APS Press).
- Basak, B., & Dey, A. (2016).** Bioremediation approaches for recalcitrant pollutants: Potentiality, successes and limitation. In *Toxicity and waste management using bioremediation* (pp. 178-197). IGI Global.
- Benchouk, A. (2017).** Bioremédiation des sols pollués de pétrole par les micro-organismes indigènes et amélioration génétique de leur pouvoir. Thèse de doctorat. Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem (Algérie), 199 pages.
- Bennett, J. W., Wunch, K. G., & Faison, B. D. (2002).** Use of fungi in biodegradation. In C. J. Hurst (Ed.), *Manual of Environmental Microbiology, Second Edition* (pp. 960-971). Washington: ASM Press.
- Bento, F. M., Beech, I. B., Gaylarde, C. C., Englert, G. E., & Muller, I. L. (2005).** Degradation and corrosive activities of fungi in a diesel–mild steel–aqueous system. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(2), 135-142.

- Bertrand, J. C., & Mille, G. (1989).** Devenir de la matière organique exogène. Un modèle: les hydrocarbures. *Microorganismes dans les écosystèmes océaniques. Masson (Paris), Chapitre, 13, 343-385.*
- Bhurgri, S., Talpur, F. N., Nizamani, S. M., Afridi, H. I., Surhio, M. A., Shah, M. R., & Bong, C. W. (2018).** Isolation of *Bacillus cereus* from botanical soil and subsequent biodegradation of waste engine oil. *International Journal of Environmental Science and Technology, 15(7), 1453-1466.*
- Bidaud, C. (1998).** Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Approche microbiologique et application au traitement d'un sol pollué. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, France, 279 pages.
- Bingham, E., Trosset, R. P., & Warshawsky, D. (1979).** Carcinogenic potential of petroleum hydrocarbons: a critical review of the literature. *Journal of environmental pathology and toxicology, 3(1-2), 483.*
- Bisht, S., Pandey, P., Bhargava, B., Sharma, S., Kumar, V., & Sharma, K. D. (2015).** Bioremediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) using rhizosphere technology. *Brazilian Journal of Microbiology, 46(1), 7-21.*
- Bollag, J. M., & Loll, M. J. (1983).** Incorporation of xenobiotics into soil humus. *Experientia, 39(11), 1221-1231.*
- Bonneau, M., Souchier, B. (1994).** Pédologie. 2 - Constituants et propriétés du sol, 2ème édition, Masson, Paris.
- Bonomo, R. P., Cennamo, G., Purrello, R., Santoro, A. M., & Zappala, R. (2001).** Comparison of three fungal laccases from *Rigidoporus lignosus* and *Pleurotus ostreatus*: correlation between conformation changes and catalytic activity. *Journal of Inorganic Biochemistry, 83(1), 67-75.*
- Boopathy, R. (2000).** Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource technology, 74(1), 63-67.*
- Bossert, I. & Bartha, R. (1984).** The fate of petroleum in soil ecosystems. In Atlas, R. *Petroleum Microbiology.* New York, Macmillan Publishing Co. p.435-473
- Boudjillouli, H. (2001).** Programme de réhabilitation des raffineries. Pour la production des carburants propres en Algérie. Journée d'étude les 16 et 17 Novembre 2001 Promotion des carburants propres. SONATRACH – Activité Aval, Division Raffinage.
- Boulton, C. A., & Ratledge, C. (1984).** The physiology of hydrocarbon-utilizing microorganisms. *Topics in enzyme and fermentation biotechnology, 9, 11-77.*

- Boutefnouchet, N., Bouzerna, N., & Chettibi, H. (2005).** Assessment of the petrochemical industry pollution on the Skikda Bay, Algeria. *International journal of environmental research and public health*, 2(3), 463-468.
- Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006).** The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*, 28(8), 799-808.
- Bushnell, L. D., & hass, H. F. (1941).** The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *J Bacteriol*, 41, 653-673.
- Calvet, R. (2003).** Le sol: Propriétés et Fonctions. Tome 2: Phénomènes physiques et chimiques, Applications agronomiques et environnementales. France Agricole. ed. DUNOD.
- Carlile, M. J. (1970).** The photoresponses of fungi. In *Photobiology of Micro-organisms*. Pp. 309-344. New York: Wiley-Interscience.
- Carmen, V. & Sciortino, Jr. (2017).** Atlas of clinically important fungi. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Ceci, A., Pinzari, F., Russo, F., Persiani, A. M., & Gadd, G. M. (2019).** Roles of saprotrophic fungi in biodegradation or transformation of organic and inorganic pollutants in co-contaminated sites. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(1), 53-68.
- Cerniglia, C. E., and Sutherland, J. B. (2010).** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, eds K. N. Timmis, T. J. McGenity, J. R. van der Meer, and V. de Lorenzo (Berlin: Springer), 2080–2110.
- Chaillan, F., Le Flèche, A., Bury, E., Phantavong, Y. H., Grimont, P., Saliot, A., & Oudot, J. (2004).** Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Research in microbiology*, 155(7), 587-595.
- Chaîneau, C. H., Morel, J., Dupont, J., Bury, E., & Oudot, J. (1999).** Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. *Science of the Total Environment*, 227(2-3), 237-247.
- Chaîneau, C. H., Rougeux, G., Yepremian, C., & Oudot, J. (2005).** Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil. *Soil biology and biochemistry*, 37(8), 1490-1497.
- Chaîneau, C. H., Yepremian, C., Vidalie, J. F., Ducreux, J. & Ballerini, D. (2003).** Bioremediation of a crude oil-polluted soil: biodegradation, leaching and toxicity assessments. *Water, Air, and Soil Pollution*, 144, 419-440.
- Chesters, C. G. C., & Thornton, R. H. (1956).** A comparison of techniques for isolating soil fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 39(3), 301-313.

- Chettouh, S., & Hamzi, R. (2014).** Algerian oil refining industry: Analysis of past industrial accidents of the period 2002–2013. *World Applied Sciences Journal*, 29(7), 933-939.
- Clément, M., Francoise, P., 1998.** Analyse Physique des sols, Méthodes Choisies. Lavoisier Technique & Documentation, Paris, 579 p.
- Cockerham, L. G. and Shane, B. S. (1994).** Basic environmental toxicology. Boca Raton, Florida, 627p.
- Collins, C. H. (1967).** Microbiological methods. 2nd edition. Butterworth-Heinemann, London.
- Coste, A., Micle, V., & Băbut, C. S. (2013).** Study on the *in-situ* bioremediation techniques applicable for soils contaminated with petroleum products. *Pro Environment Promediu*, 6(14), 463-468.
- Crone, M. (2001).** Diagnostic de sols pollués par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) a l'aide de la spectrophotométrie UV. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne; INSA de Lyon (France). 182p.
- Daccò, C., Girometta, C., Asemoloye, M. D., Carpani, G., Picco, A. M., & Tosi, S. (2020).** Key fungal degradation patterns, enzymes and their applications for the removal of aliphatic hydrocarbons in polluted soils: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 147, 104866.
- Daccò, C., Nicola, L., Temporiti, M. E. E., Mannucci, B., Corana, F., Carpani, G., & Tosi, S. (2020).** *Trichoderma*: Evaluation of its degrading abilities for the bioremediation of hydrocarbon complex mixtures. *Applied Sciences*, 10(9), 3152.
- Das, N., & Chandran, P. (2011).** Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnol. Res. Int.* 2011, 1–13.
- Davet, P., & Rouxel, F. (1997)** Détection et isolement des champignons du sol. INRA, Paris, p 203.
- Davies, J. S., Westlake, D. W. S. (1979).** Crude oil utilization by fungi, *Can J Microbiol*, 25, 146-156.
- Degranges, P., Gugalski, T., Leleu, M., & Greffard, J. (1977).** Devenir des hydrocarbures dans les sols. *Rapport du BRGM*, 77.
- Dennis, C., & Webster, J. (1971).** Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: III. Hyphal interaction. *Transactions of the British Mycological Society*, 57(3), 363-369.
- Deshmukh, R., Khardenavis, A. A., & Purohit, H. J. (2016).** Diverse metabolic capacities of fungi for bioremediation. *Indian journal of microbiology*, 56(3), 247-264.

- Dilmi, F. (2019).** Isolation and characterization of oil degrading microorganisms from arzew oil refinery. Thèse de doctorat. Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem (Algérie), 212p.
- Dioha, I. J., Ikeme, C. H., Tijjam, N., & Dioha, E. C. (2012).** Comparative studies of ethanol and kerosene fuels and cook stove performance. *J Nat Sci Res*, 2, 34–39.
- dos Santos, E. O., da Rosa, C. C., dos Passos, C. T., Sanzo, A. V. L., Burkert, J. F. D. M., Kalil, S. J., & Burkert, C. A. V. (2008).** Pre-screening of filamentous fungi isolated from a contaminated site in Southern Brazil for bioaugmentation purposes. *African Journal of Biotechnology*, 7(9).
- Dumas, J. B. A. (1831).** Procédés de l'analyse organique. *Ann. Chim. Phys*, 47, 198-205.
- Durand, J. H. (1983).** Les sols irrigables; étude pédologique. Agence de Coopération Culturelle et Technique, 338 p.
- Ehrhardt, M., & Douabul, A. (1989).** Dissolved petroleum residues and alkylbenzene photo-oxidation products in the upper Arabian Gulf. *Marine chemistry*, 26(4), 363-370.
- Eibes, G., Cajthaml, T., Moreira, M. T., Feijoo, G. & Lema, J. M. (2006).** Enzymatic degradation of anthracene, dibenzothiophene and pyrene by manganese peroxidase in media containing acetone. *Chemosphere*, 64, 408–414
- El Fantroussi, S., & Agathos, S. N. (2005).** Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation?. *Current opinion in microbiology*, 8(3), 268-275.
- El Hanafy, A. A., Anwar, Y., Mohamed, S. A., Al-Garni, S. M. S., Sabir, J. S., Zinadah, O. A. A., & Ahmed, M. M. (2015).** Isolation and molecular identification of two fungal strains capable of degrading hydrocarbon contaminants on Saudi Arabian environment. *International Journal of Bioengineering and Life Sciences*, 9(12), 1215-1218.
- Elshafie, A., AlKindi, A. Y., Al-Busaidi, S., Bakheit, C., & Albahry, S. N. (2007).** Biodegradation of crude oil and n-alkanes by fungi isolated from Oman. *Marine Pollution Bulletin*, 54(11), 1692-1696.
- Essabri, A. M. A., Aydinlik, N. P., & Williams, N. E. (2019).** Bioaugmentation and biostimulation of total petroleum hydrocarbon degradation in a petroleum-contaminated soil with fungi isolated from olive oil effluent. *Water Air Soil Poll*, 230, 76–91.
- Estrada, C., Rojas, E. I., Wcislo, W. T., & Van Bael, S. A. (2014).** Fungal endophyte effects on leaf chemistry alter the in vitro growth rates of leaf-cutting ants' fungal mutualist, *Leucocoprinus gongylophorus*. *Fungal Ecol*, 8, 37-45.
- Fahim, M. A., Al-Sahhaf, T. A., & Elkilani, A. (2009).** *Fundamentals of petroleum refining*. Elsevier.

- Fayeulle, A. (2013).** Étude des mécanismes intervenant dans la biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques par les champignons saprotrophes telluriques en vue d'applications en bioremédiation fongique de sols pollués. Thèse de doctorat. Université du Littoral Côte d'Opale, Dunkerque (France), 204p.
- Fayeulle, A., Veignie, E., Schroll, R., Munch, J. C., & Rafin, C. (2019).** PAH biodegradation by telluric saprotrophic fungi isolated from aged PAH-contaminated soils in mineral medium and historically contaminated soil microcosms. *Journal of Soils and Sediments*, 19(7), 3056-3067.
- Fingas, M. (2012).** *The basics of oil spill cleanup*. Troisième édition, Boca Raton. CRC press, États-Unis, 266 p.
- Fingas, M. (2015).** *Handbook of oil spill science and technology*. Wiley.
- Fingas, M. (2016).** *Oil spill science and technology*. Gulf professional publishing. États-Unis.
- Fokou Mbogne, P. M. (2017).** Biorémédiation augmentée de sols contaminés aux hydrocarbures lourds par ajout de substrats organiques. Mémoire de maîtrise électronique. École de technologie supérieure, université de Québec (Canada). 109p.
- Fritsche and Hofrichter, 2000.** « *Aerobic degradation by microorganisms* ». Bio/Technology Set, Second Edition (eds H »-J. Rehm and G. Reed), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weimheim, Germany.
- García-Cela, E., Marin, S., Sanchis, V., Crespo-Sempere, A., & Ramos, A. J. (2015).** Effect of ultraviolet radiation A and B on growth and mycotoxin production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus parasiticus* in grape and pistachio media. *Fungal biology*, 119(1), 67-78.
- Garon, D., Krivobok, S., Wouessidjewe, D., & Seigle-Murandi, F. (2002).** Influence of surfactants on solubilization and fungal degradation of fluorene. *Chemosphere*, 47(3), 303-309.
- Gesell, M., Hammer, E., Specht, M., Francke, W., & Schauer, F. (2001).** Biotransformation of biphenyl by *Paecilomyces lilacinus* and characterization of ring cleavage products. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1551-1557.
- Ghazali, F. M., Rahman, R. N. Z. A., Salleh, A. B., & Basri, M. (2004).** Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54(1), 61-67.
- Ghouas, H., Haddou, B., Bouabdesselam, H., Bouberka, Z., & Derriche, Z. (2010).** Elimination of fuel spills from effluent using cloud point extraction methods. *Journal of hazardous materials*, 180(1-3), 188-196.

- Gilman, J. C. (1957).** A manual of soil fungi. Revised 2nd ed. Calcutta, Bombay: Oxford and IBH publishing company.
- Godoy, P., Reina, R., Calderón, A., Wittich, R. M., García-Romera, I., Aranda, E. (2016).** Exploring the potential of fungi isolated from PAH-polluted soil as a source of xenobiotics-degrading fungi. *Environ Sci Pollut Res*, 23, 20985–20996.
- Govarthanan, M., Fuzisawa, S., Hosogai, T., & Chang, Y. C. (2017).** Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons using the filamentous fungus *Penicillium sp.* CHY-2 and characterization of its manganese peroxidase activity. *RSC advances*, 7(34), 20716-20723.
- Greene, E. A., Kay, J. G., Jaber, K., Stehmeier, L. G., & Voordouw, G. (2000).** Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons. *Applied and environmental microbiology*, 66(12), 5282-5289.
- Grewer, D. M., Young, R. F., Whittal, R. M., & Fedorak, P. M. (2010).** Naphthenic acids and other acid-extractables in water samples from Alberta: what is being measured?. *Science of the Total Environment*, 408(23), 5997-6010.
- Guermouche, M. A. (2014).** Caractérisation moléculaire des bactéries impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures. Thèse de Doctorat. Université d'Oran (Algérie). 153p.
- Guzmán-Chávez, F., Zwahlen, R. D., Bovenberg, R. A., & Driessen, A. J. (2018).** Engineering of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum* as cell factory for natural products. *Frontiers in microbiology*, 9, 2768.
- Hamzah, A., Zarin, M. A., Hamid, A. A., & Omar, O. Q. (2012).** Optimal physical and nutrient parameters for growth of *Trichoderma virens* uKMP-1M for heavy crude oil degradation. *Sains Malaysiana*, 41, 71–79.
- Hanson, K. G., Desai, J. D., & Desai, A. J. (1993).** A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnol Tech*, 7(10), 745-748.
- Haritash, A. K., & Kaushik, C. P. (2016).** Degradation of low molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by microorganisms isolated from contaminated soil. *Int J Environ Sci*, 6(4), 472-482.
- Harms, H., Schlosser, D., & Wick, L. Y. (2011).** Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat Rev Microbiol*, 9(3), 177–192.
- Harris, J. L. (1986).** Modified method for fungal slide culture. *Journal of clinical microbiology*, 24(3), 460-461.
- Hassaine, A., & Bordjiba, O. (2019).** Removal of hydrocarbons from liquid media by *Aspergillus niger* van Tieghem. *Acta Ecologica Sinica*, 39(4), 300-305.

Head, I. M., Jones, D. M., & Röling, W. F. (2006). Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, 4(3), 173-182.

Hentati, D. (2018). Isolement et caractérisation des bactéries marines hydrocarbonoclastes, production des biosurfactants et étude de la biodiversité microbienne au sein de trois ports de Sfax, Tunisie. Thèse de doctorat. Université Montpellier (France); Université de Sfax (Tunisie), 348p.

Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E. & Lumbsch, H. T. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*, 111(5), 509-547.

Hock, O. G., Cheng, H. C., Fang, V. L. B., Yong, W. Y., & Shing, W. L. (2018). Isolation and identification of potential fungal species for spent engine lubrication oil remediation in Peninsular Malaysia. *Remediation Journal*, 28(3), 91-95.

Hoffman, R. M., & Wood, T. M. (1985). Isolation and partial characterization of a mutant of *Penicillium funiculosum* for the saccharification of straw. *Biotechnology and bioengineering*, 27(1), 81-85.

Hofrichter, M., Scheibner, K. (1993). Utilization of aromatic compounds by the *Penicillium* strain Bi 7/279. *J Basic Microbiol.* 33, 227-232.

Horel, A. A. (2009). Biodegradation of petroleum and alternative fuel hydrocarbons in moderate to cold climate. Thèse de doctorat. University of Alaska Fairbanks. Fairbanks (AK). 262 p.

Hou, F. S. L. (2000). Phytoremediation and bioremediation of petroleum contaminated soils and wastes. Thèse de doctorat. Civil Engineering University of Canterbury, Christchurch (New Zealand). 295p.

Husaini, A., Roslan, H. A., Hii, K. S. Y., & Ang, C. H. (2008). Biodegradation of aliphatic hydrocarbon by indigenous fungi isolated from used motor oil contaminated sites. *World J Microbiol Biotechnol*, 24, 2789–2797.

Hussain, I., Puschenreiter, M., Gerhard, S., Sani, S., Khan, W.D., & Reichenauer, T. (2019). Differentiation between physical and chemical effects of oil presence in freshly spiked soil during rhizoremediation trial. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(18), 18451-18464.

Ibrahim, H. 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(2), 1-13.

Ilarionov, S. A., Nazarov, A. V. & Kalachnikova, I. G. (2003). The Role of Micromycetes in the Phytotoxicity of Crude Oil-Polluted Soils. *Russian Journal of Ecology*, 34(5),303–308

- Jafari, N., Jafarizadeh-Malmiri, H., Hamzeh-Mivehroud, M., & Adibpour, M. (2017).** Optimization of UV irradiation mutation conditions for cellulase production by mutant fungal strains of *Aspergillus niger* through solid state fermentation. *Green Processing and Synthesis*, 6(3), 333-340.
- Jeanneau, L., (2007).** Approche moléculaire quantitative appliquée à l'étude du transfert de micropolluants organiques à la confluence entre la Fensch et la Moselle (France). Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy (France), 367 p.
- Jensen, V. (1975).** Bacterial flora of soil after application of oily waste. *Oikos*, 26, 152–158.
- Keith, L. H., & Telliard, W. A. (1979).** Priority pollutants. I-a perspective view. Special report. *Environ. Sci. Technol*, 13, 416-423.
- Khan, I., Aftab, M., Shakir, S., Ali, M., Qayyum, S., Rehman, M. U., & Touseef, I. (2019).** Mycoremediation of heavy metal (Cd and Cr)–polluted soil through indigenous metallotolerant fungal isolates. *Environmental monitoring and assessment*, 191(9), 1-11.
- Khan, S. R., Nirmal Kumar, J. I., Nirmal Kumar, R., & Patel, J. (2014).** Enzymatic evaluation during biodegradation of kerosene and diesel by locally isolated fungi from petroleum-contaminated soils of western india. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 24(5), 514–525.
- Khan, S. R., Nirmal, J. I., Kumar, R. N., & Patel, J. G. (2015).** Biodegradation of kerosene: Study of growth optimization and metabolic fate of *P. janthinellum* SDX7. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 397-406.
- Koshlaf, E., & Ball, A. S. (2017).** Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. *AIMS microbiology*, 3(1), 25.
- Kostecki, P., Morrison, R., & Dragun, J. (2005).** Hydrocarbons. In Hillel D. (Ed.), *Incyclopedia of soils in the environment* (pp. 217-226).
- Kota, M. F., Hussaini, A. A. S. A., Zulkharnain, A., & Roslan, H. A. (2014).** Bioremediation of crude oil by different fungal genera. *Asian J Plant Biol*, 2, 11–18.
- Kuhad, R. C., Kumar, M., & Singh, A. (1994).** A hypercellulolytic mutant of *Fusarium oxysporum*. *Letters in applied microbiology*, 19(5), 397-400.
- 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.
- Kumar, A. G., Vijayakumar, L., Joshi, G., Peter, D. M., Dharani, G., & Kirubakaran, R. (2014).** Biodegradation of complex hydrocarbons in spent engine oil by novel bacterial consortium isolated from deep sea sediment. *Bioresource technology*, 170, 556-564.

- Kumar, A. K., Parikh, B. S., Singh, S. P., & Shah, D. (2015).** Use of combined UV and chemical mutagenesis treatment of *Aspergillus terreus* D34 for hyper-production of cellulose-degrading enzymes and enzymatic hydrolysis of mild-alkali pretreated rice straw. *Bioresources and Bioprocessing*, 2(1), 35.
- Kumar, A., Munjal, A., & Sawhney, R. (2011).** Crude oil PAH constitution, degradation pathway and associated bioremediation microflora: an overview. *International Journal of Environmental Sciences*, 1(7), 1420-1439.
- Kuppusamy, S., Maddela, N. R., Megharaj, M., & Venkateswarlu, K. (2020).** An overview of total petroleum hydrocarbons. In *Total Petroleum Hydrocarbons* (pp. 1-27). Springer, Cham.
- Kurnaz, S. Ü., & Büyükgüngör, H. (2016).** Bioremediation of total petroleum hydrocarbons in crude oil contaminated soils obtained from southeast Anatolia. *Türk Biyoloji Dergisi*, 29(2), 57-60.
- Labud, V., Garcia, C., & Hernandez, T. (2007).** Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere*, 66(10), 1863-1871.
- Ladji, R., Yassaa, N., Balducci, C., & Cecinato, A. (2010).** Organic components of Algerian desert dusts. *Chemosphere*, 81(7), 925-931.
- Lamb, D. C., Lei, L., Warrilow, A. G., Lepesheva, G. I., Mullins, J. G., Waterman, M. R., & Kelly, S. L. (2009).** The first virally encoded cytochrome p450. *Journal of virology*, 83(16), 8266-8269.
- Landum, M. C., do Rosário Félix, M., Alho, J., Garcia, R., Cabrita, M. J., Rei, F., & Varanda, C. M. (2016).** Antagonistic activity of fungi of *Olea europaea* L. against *Colletotrichum acutatum*. *Microbiological research*, 183, 100-108.
- Langevin, D., Poteau, S., Hénaut, I., & Argillier, J. F. (2004).** Crude oil emulsion properties and their application to heavy oil transportation. *Oil & gas science and technology*, 59(5), 511-521.
- Larson, R. A., Bott, T. L., Hunt, L. L. & Rogenmuser, K. (1979).** Photooxidation products of a fuel oil and their antimicrobial activity. *Environmental Science and Technology*.13, 965-969.
- Leahy, J. G., & Colwell, R. R. (1990).** Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 54(3), 305-315.
- Lecellier, A. (2013).** Détection, caractérisation et identification des moisissures par spectroscopie vibrationnelle infrarouge et Raman. Thèse de doctorat. Université de Reims Champagne-Ardenne (France), 196p.

- Leitão, A. L., Duarte, M. P., & Oliveira, J. S. (2007).** Degradation of phenol by a halotolerant strain of *Penicillium chrysogenum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59(3), 220-225.
- Leitão, A.L. (2009).** Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 6, 1393-1417.
- Leitgib, L., Gruiz, K., Fenyvesi, E., Balogh, G. & Murányi, A. (2008).** Development of an innovative soil remediation: “Cyclodextrin-enhanced combined technology”. *Science of the Total Environment*, 392, 12-21
- Lim, M. W., Von Lau, E., & Poh, P. E. (2016).** A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil - present works and future directions. *Mar Pollut Bull*, 109, 14–45.
- Luangsa-Ard, J., Houbraken, J., van Doorn, T., Hong, S. B., Borman, A. M., Hywel-Jones, N. L., & Samson, R. A. (2011).** *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS microbiology letters*, 321(2), 141-149.
- Macaulay, B. M., & Rees, D. (2014).** Bioremediation of oil spills: a review of challenges for research advancement. *Annals of Environmental Science*, 8, 9-37.
- Maddela, N. R., Scalvenzi, L., & Venkateswarlu, K. (2017).** Microbial degradation of total petroleum hydrocarbons in crude oil: a field-scale study at the low-land rainforest of Ecuador. *Environmental technology*, 38(20), 2543-2550.
- Maddela, N. R., Scalvenzi, L., Pérez, M., Montero, C., & Gooty, J. M. (2015).** Efficiency of indigenous filamentous fungi for biodegradation of petroleum hydrocarbons in medium and soil: laboratory study from Ecuador. *Bull Environ Contam Toxicol*, 95, 385–394.
- Mahmoud, G. A. E., & Bagy, M. M. K. (2018).** Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons. In *Microbial Action on Hydrocarbons* (pp. 299-320). Springer, Singapore.
- Maki, H., Sasaki, T.S. and Harayama, S. (2001).** Photo-oxidation of biodegraded crude oil and toxicity of the photo-oxidized products. *Chemosphere*. 44(5), 1145-1151.
- Maletic, S., Dalmacija, B., Roncevic, S., Agbaba, J., Petrovic, O. (2009).** Degradation Kinetics of an Aged Hydrocarbon-Contaminated Soil. *Water Air and Soil Poll*, 202, 149–159.
- Mancera-López, M. E., Esparza-García, F., Chávez-Gómez, B., Rodríguez-Vázquez, R., Saucedo-Castaneda, G., & Barrera-Cortés, J. (2008).** Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61(2), 151-160.
- Márquez-Rocha, F. J., Hernández-Rodríguez, V., & Lamela, M. T. (2001).** Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. *Water, Air, and Soil Pollution*, 128(3), 313-320.

- Mbachu, A. E., Chukwura, E. I., & Mbachu, N. A. (2018).** Evaluation of the effectiveness of fungi (*Candida tropicalis* and *Aspergillus clavatus*) in bioremediation of used engine oil contaminated soil using bioaugmentation technique. *Inter. J. Environ. Agric. Biotechnol*, 3(4), 1175-1182.
- McLean, J. D., & Kilpatrick, P. K. (1997).** Effects of asphaltene aggregation in model heptane–toluene mixtures on stability of water-in-oil emulsions. *Journal of Colloid and interface Science*, 196(1), 23-34.
- Mejha, O. K. (2016).** Biodegradation of petroleum hydrocarbons in soils co-contaminated with petroleum hydrocarbons and heavy metals derived from petroleum. PhD Thesis. Newcastle University (England).
- Melbye, A. G., Brakstad, O. G., Hokstad, J. N., Gregersen, I. K., Hansen, B. H., Booth, A. M., ... & Tollefsen, K. E. (2009).** Chemical and toxicological characterization of an unresolved complex mixture-rich biodegraded crude oil. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 28(9), 1815-1824.
- Meysami, P., & Baheri, H. (2003).** Pre-screening of fungi and bulking agents for contaminated soil bioremediation. *Advances in Environmental Research*, 7(4), 881-887.
- Miller, E. C., & Miller, J. A. (1981).** Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer*, 47(10), 2327-2345.
- Moghimi, H., Tabar, R. H., & Hamedi, J. (2017).** Assessing the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and laccase production by new fungus *Trematophoma* sp. UTMC 5003. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(7), 1-10.
- Mohammadian, E., Arzanlou, M., & Babai-Ahari, A. (2017).** Diversity of culturable fungi inhabiting petroleum-contaminated soils in Southern Iran. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 110(7), 903-923.
- Mohsenzadeh, F., Rad, A. C., & Akbari, M. (2012).** Evaluation of oil removal efficiency and enzymatic activity in some fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils. *Iranian journal of environmental health science & engineering*, 9(1), 1-8.
- Moore, D., Robson, G. D., & Trinci, A. P. J. (2011).** 21st century guidebook to fungi, Cambridge University Press. Cambridge.
- Mougin, C., Boukcim, H., & Jolival, C. (2009).** Soil bioremediation strategies based on the use of fungal enzymes. In *Advances in Applied Bioremediation* (pp. 123-149). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Moustafa, A. M. (2016).** Bioremediation of oil spill in Kingdom of Saudi Arabia by using fungi isolated from polluted soils. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(5), 680-91.

- Nazifa, T. H., Ahmad, M. A., Hadibarata, T., & Aris, A. (2018).** Bioremediation of Diesel Oil Spill by Filamentous Fungus *Trichoderma reesei* H002 in Aquatic Environment. *International journal of integrated engineering*, 10(9).
- Neff, J. M., Ostazeski, S., Gardiner, W., & Stejskal, I. (2000).** Effects of weathering on the toxicity of three offshore Australian crude oils and a diesel fuel to marine animals. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 19(7), 1809-1821.
- Niu, H., Xu, X. S., Wang, J. H., & Volesky, B. (1993).** Removal of lead from aqueous solutions by *Penicillium* biomass. *Biotechnology and Bioengineering*, 42(6), 785-787.
- Obuekwe, C. O., & Al-Muttawa, E. M. (2001).** Self-immobilized bacterial cultures with potential for application as ready-to-use seeds for petroleum bioremediation. *Biotechnology letters*, 23(13), 1025-1032.
- Ojewumi, M. E., Anenih, V. E., Alagbe, E. E., & Oyeniyi, E. A. (2019).** Kinetics study of biologically remediated crude oil polluted soil using a bacteria and fungi. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1299, No. 1, p. 012001). IOP Publishing.
- Okuda, T., Klich, M. A., Seifert, K. A., & Ando, K. (2000).** Media and incubation effect on morphological characteristics of *Penicillium* and *Aspergillus*. In: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification (Samson RA, Pitt JI, eds). Harwood Academic Publishers, Amsterdam: 83–99.
- Olsen, S., Cole, C., Watanabe, F., & Dean, L. (1954).** Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. USDA Circular Nr 939, U.S. Department of Agriculture, Washington.
- Osman, M., Elsayed, M. A., Mohamed, Y. A. H., & Abo-Zeid, A. M. (1989).** Effect of ultraviolet irradiation on germination and growth in *Aspergillus flavus* and *Penicillium notatum*. *Mycological research*, 92(3), 293-296.
- Oudot, J., Dupont, J., Haloui, S., & Roquebert, M. F. (1993).** Biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating tropical fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 25(9), 1167-1173.
- Oudot, J., Fusey, P., Abdelouahid, D. E., Haloui, S., & Roquebert, M. F. (1987).** Capacités dégradatives de bactéries et de champignons isolés d'un sol contaminé par un fuel. *Can J Microbiol*, 33, 232–243.
- Paralovo, S. L., Borillo, G. C., Barbosa, C. G., Godoi, A. F. L., Yamamoto, C. I., de Souza, R. A., & Pöhlker, C. (2016).** Observations of atmospheric monoaromatic hydrocarbons at urban, semi-urban and forest environments in the Amazon region. *Atmospheric environment*, 128, 175-184.

- Parekh, S., Vinci, V. A., & Strobel, R. J. (2000).** Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Applied microbiology and biotechnology*, 54(3), 287-301.
- Park, J. H., Zhao, X., & Voice, T. C. (2001).** Biodegradation of non-desorbable naphthalene in soils. *Environmental Science and Technology*, 35, 2734-2740.
- Park, K. S., Sims, R. C., Dupont, R. R., Doucette, W. J., & Matthews, J. E. (1990).** Fate of PAH compounds in two soil types: Influence of volatilization, abiotic loss and biological activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9(2), 187-195.
- Paul, E. A. (2014).** *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. Academic press. San Diego, USA.
- Payne, J. R., & Philipps, C. R. (1985).** Photochemistry of petroleum in water: Photooxidation causes changes in oil and enhances dissolution of its oxidized products. *Environmental Science and Technology*, 19(7), 569-579.
- Peng, R. H., Xiong, A. S., Xue, Y., Fu, X. Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y. S., & Yao, Q. H. (2008).** Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS microbiology reviews*, 32(6), 927-955.
- Pérez-Armendáriz, B., Martínez-Carrera, D., Calixto-Mosqueda, M., Alba, J., & Rodríguez-Vázquez, R. (2010).** Filamentous fungi remove weathered hydrocarbons from polluted soil of tropical Mexico. *Revista Internacional de contaminación ambiental*, 26(3), 193-199.
- Pernot, A., Ouvrard, S., Leglize, P., Watteau, F., & Faure, P. (2012).** Soil structure and organic matter repartition as controlling factors of PAH-type compounds availability in a former industrial soil. In 4. *International Congress Eurosoil 2012-Soil Science for the Benefit of Mankind and Environment*.
- Pitt, J. I. (1979).** The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press Inc, London.
- Potin, O., Rafin, C., & Veignie, E. (2004).** Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54(1), 45-52.
- Poyntner, C., Prem, M., Mann, O., Blasi, B., & Sterflinger, K. (2018).** Selective screening: isolation of fungal strains from contaminated soils in Austria. *Die Bodenkultur: Journal of Land Management, Food and Environment*, 68(3), 157–169.
- Prenafeta-Boldú, F. X., De Hoog, G. S., & Summerbell, R. C. (2018).** Fungal communities in hydrocarbon degradation. In *Microbial communities utilizing hydrocarbons and lipids: Members, metagenomics and ecophysiology, handbook of hydrocarbon and lipid*

microbiology, McGenity, T.J., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 1-36.

Prince, R. C., Garrett, R. M., Bare, R. E., Grossman, M. J., Townsend, T., Suflita, J. M., Lee, K., Owens, E. H., Sergy, G. A., Braddock, J. F., Lindstrom, J. E., & Lessard, R. R. (2003). The roles of photooxidation and biodegradation in long-term weathering of crude and heavy fuel oils. *Spill Science & Technology Bulletin*, 8(2) 145-156.

Quentin, A. (2019). Sélection de souches fongiques performantes dans la biosorption de 3 éléments traces métalliques (Cd, Cu et Pb) et étude de leur spéciation minéralogique en microcosme de sol. Thèse de doctorat. Université de Caen Normandie, France, 292p.

Quiñones-Aguilar, E. E., Ferrera-Cerrato, R., Gavi-Reyes, F., Fernandez-Linares, L., Rodriguez-Vazquez, R., & Alarcón, A. (2003). Emergence and growth of maize in a crude oil polluted soil. *Agrociencia*, 37, 585–594.

Rafin, C., de Foucault, B., & Veignie, E. (2013). Exploring micromycetes biodiversity for screening benzo[a] pyrene degrading potential. *Environ Sci Pollut Res*, 20(5), 3280–3289.

Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *Journal of natural products*, 80(3), 756-770.

Raju, M. N., Leo, R., Herminia, S. S., Morán, R. E. B., Venkateswarlu, K., & Laura, S. (2017). Biodegradation of Diesel, Crude Oil and Spent Lubricating Oil by Soil Isolates of *Bacillus* spp. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 98(5), 698-705.

Ramoutar, S., Mohammed, A., & Ramsubhag, A. (2019). Laboratory-scale bioremediation potential of single and consortia fungal isolates from two natural hydrocarbon seepages in Trinidad, West Indies. *Bioremediation Journal*, 23(3), 131-141.

Ravelet, C., Krivobok, S., Sage, L., & Steiman, R. (2000). Biodegradation of pyrene by sediment fungi. *Chemosphere*, 40(5), 557-563.

Reyes-César, A., Absalón, Á. E., Fernández, F. J., González, J. M., & Cortés-Espinosa, D. V. (2014). Biodegradation of a mixture of PAHs by non-ligninolytic fungal strains isolated from crude oil-contaminated soil. *World J Microbiol Biotechnol*, 30(3), 999–1009.

Riazi, M. R. (2005). Characterization and properties of petroleum fractions (Vol. 50). ASTM international. West Conshohocken, USA.

Ritz, K. & Young, I. M. (2004). Interactions between soil structure and fungi. *Mycologist*, 18, 52-59.

Rončević, S., Dalmacija, B., Ivančev-Tumbas, I., Tričković, J., Petrović, O., Klašnja, M., & Agbaba, J. (2005). Kinetics of degradation of hydrocarbons in the contaminated soil layer. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 49(1), 27-36.

- Routien, J. B. (1957).** Fungi isolated from soils. *Mycologia*, 49(2), 188-196.
- Roy, A. S., Baruah, R., Borah, M., Singh, A. K., Boruah, H. P. D., Saikia, N., Deka, M., Dutta, N., & Bora, T. C. (2014).** Bioremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial strains in crude oil contaminated soil under microcosm study. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 94, 79–89.
- Royse, D. J., & Ries, S. M. (1978).** The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. *Phytopathology*, 68(4), 603-607.
- Samaei, M. R., Jalili, M., Abbasi, F., Mortazavi, S. B., Jonidi Jafari, A., & Bakhshi, B. (2020).** Isolation and kinetic modeling of new culture from compost with high capability of degrading n-hexadecane, focused on *Ochrobactrum oryzae* and *Paenibacillus lautus*. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 29(4), 384-396.
- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraeken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H. W., ... & Frisvad, J. C. (2014).** Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in mycology*, 78, 141-173.
- Sardrood, B. P., Goltapeh, E. M., & Varma, A. (2013).** An introduction to bioremediation. In E. M. Goltapeh, Y. R. Danesh, A. Varma (Ed.), *Fungi as bioremediators* (pp. 3–27). Berlin/Heidelberg: Springer.
- Schvartz, C., Decroux, J., & Muller, J. C. (2005).** *Guide de la fertilisation raisonnée: grandes cultures et prairies*. France Agricole Editions.
- Shahsavari, E., Poi, G., Aburto-Medina, A., Haleyr, N., & Ball, A. S. (2017).** Bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon-contaminated environments. In *Enhancing cleanup of environmental pollutants* (pp. 21-41). Springer, Cham.
- Shazia, I., Uzma, S. G., & Talat, A. (2013).** Bioremediation of heavy metals using isolates of filamentous fungus *Aspergillus fumigatus* collected from polluted soil of Kasur, Pakistan. *International Research Journal of Biological Sciences*, 2(12), 66-73.
- Shetaia, Y. M., Mohamed, T. M., Farahat, L. A., & ElMekawy, A. (2016).** Potential biodegradation of crude petroleum oil by newly isolated halotolerant microbial strains from polluted Red Sea area. *Marine pollution bulletin*, 111(1-2), 435-442.
- Sietmann, R., Gesell, M., Hammer, E., & Schauer, F. (2006).** Oxidative ring cleavage of low chlorinated biphenyl derivatives by fungi leads to the formation of chlorinated lactone derivatives. *Chemosphere*, 64(4), 672-685.
- Singh, A., & Ward, O. P. (2004).** Biotechnology and bioremediation—an overview. In *Biodegradation and bioremediation* (pp. 1-17). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Singh, H. (2006).** *Mycoremediation: fungal bioremediation*. John Wiley & Sons.

- Soltani, M. (2004).** Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes variation en fonction de la source de carbone. Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie curie, Paris (France), 284 p.
- Soltner, D. (1989).** The bases of the vegetable production. Volume 1: Ground. C.S.T.A, Anger.
- Song, C., Hsu, C, S., & Mochida, I. (2000).** Chemistry of diesel fuels. Taylor & Francis, New York, USA.
- Souza, H. M. de L., Sette, L. D., Mota, A. J., Nascimento Neto, J. F., Rodrigues, A., Oliveira, T. B., Oliveira, F. M., Oliveira, L. A., Santos Barroso, H., & Zanotto, S. P. (2016).** Filamentous fungi isolates of contaminated sediment in the Amazon region with the potential for benzo(a)pyrene degradation. *Water Air Soil Pollut*, 227, 431.
- Speight, J. G. (2014).** The chemistry and technology of petroleum. CRC press.
- Speight, J. G., & Arjoon, K. K. (2012).** Bioremediation of petroleum and petroleum products. John Wiley & Sons.
- Syakti, A. D. (2004).** Biotransformation des hydrocarbures pétroliers et effets sur les acides gras phospholipidiques de bactéries hydrocarbonoclastes marines. Thèse de doctorat. Université Paul Cezanne Aix Marseille III, Marseille (France). 220p.
- Talbi, Z., Haddou, B., Bouberka, Z., & Derriche, Z. (2009).** Simultaneous elimination of dissolved and dispersed pollutants from cutting oil wastes using two aqueous phase extraction methods. *Journal of hazardous materials*, 163(2-3), 748-755.
- Tan, T., & Cheng, P. (2003).** Biosorption of metal ions with *Penicillium chrysogenum*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 104(2), 119-128.
- Tharanivasan, A., K. (2012).** Asphaltene Precipitation from Crude Oil Blends, Conventional Oils, and Oils with Emulsified Water. Thèse de doctorat. Université de Calgary, Alberta (Canada), 174 p.
- Tiehm, A., & Schulze, S. (2003).** Intrinsic aromatic hydrocarbon biodegradation for groundwater remediation. *Oil & Gas Science and Technology*. 58(4), 449–462.
- Todd, G. T., Chessin, R. L., & Colman, J. (1999).** Toxicological profile for total petroleum hydrocarbons (TPH). U.S. Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Tortella, G. R., Diez, M. C., & Durán, N. (2005).** Fungal diversity and use in decomposition of environmental pollutants. *Critical reviews in microbiology*, 31(4), 197-212.
- Trevors, J. T. (1996).** Sterilization and inhibition of microbial activity in soil. *Journal of Microbiological Methods*, 26(1-2), 53-59.

- Van Epps, A. (2006).** Phytoremediation of petroleum hydrocarbons. Environmental Protection Agency, US.
- Vanishree, M., Thatheyus, A. J., & Ramya, D. (2014).** Biodegradation of petrol using the fungus *Penicillium* sp. *Science international*, 2(1), 26-31.
- Varjani, S. J., Gnansounou, E., Pandey, A. (2017).** Comprehensive review on toxicity of persistent organic pollutants from petroleum refinery waste and their degradation by microorganisms. *Chemosphere*. 188, 280–291.
- Vasudevan, N., & Rajaram, P. (2001).** Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. *Environment International*, 26(5-6), 409-411.
- Vazquez-Duhalt, R. (1989).** Environmental impact of used motor oil. *Science of The Total Environment*, 79(1), 1–23.
- Vázquez-Luna, D. (2012).** Environmental Bases on the Exploitation of Crude Oil in Mexico. In Younes M. (Ed.), *Crude oil exploration in the world* (pp. 89-106). InTech.
- Vigueras, G., Shirai, K., Martins, D., Franco, T. T., Fleuri, L. F., & Revah, S. (2008).** Toluene gas phase biofiltration by *Paecilomyces lilacinus* and isolation and identification of a hydrophobin protein produced thereof. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(1), 147-154.
- Visagie, C. M., Houbraeken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., ... & Samson, R. A. (2014).** Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in mycology*, 78, 343-371.
- Waksman, S. A. (1916).** Soil fungi and their activities. *Soil science*, 2(2), 103-156.
- Walkley, A. J. and Black, I. A. (1934).** Estimation of soil organic carbon by the chromic acid titration method. *Soil Sci*, 37, 29-38.
- Wang, L., Li, Y., Yu, P., Xie, Z., Luo, Y., & Lin, Y. (2010).** Biodegradation of phenol at high concentration by a novel fungal strain *Paecilomyces variotii* JH6. *Journal of Hazardous Materials*, 183(1-3), 366–371.
- Watanabe, T. (2002).** Pictorial atlas of soil and seed fungi. Morphologies of cultured and key to species. CRC Press. Boca Raton.
- Wauquier, J. P. (1994).** Le raffinage du pétrole : Pétrole brut, Produits pétroliers, Schémas de fabrication. Editions Technip-Paris. 461p.
- Webster, J., & Weber, R. (2007).** *Introduction to fungi*. 3rd edn. Cambridge University Press. UK.

- Wu, M., Dickb, W, A., Li, W., Wang, X., Yang, Q., Wang, T., Xu, L., Zhang, M., et Chen, L. (2016).** Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 107, 158-164.
- Xie, J., Li, S., Mo, C., Xiao, X., Peng, D., Wang, G., & Xiao, Y. (2016).** Genome and transcriptome sequences reveal the specific parasitism of the nematophagous *Purpureocillium lilacinum* 36-1. *Frontiers in microbiology*, 7, 1084.
- Yadav, J. S., & Reddy, C. A. (1993).** Degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX) by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and environmental microbiology*, 59(3), 756-762.
- Yang, R. H., Su, J. H., Shang, J. J., Wu, Y. Y., Li, Y., Bao, D. P., & Yao, Y. J. (2018).** Evaluation of the ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS), specifically ITS1 and ITS2, for the analysis of fungal diversity by deep sequencing. *PloS one*, 13(10), 0206428.
- Yang, Z., Wang, Z., Yang, C., Hollebhone, B. P., Brown, C., & Landriault, M. (2013).** Evaluation of total petroleum hydrocarbons (TPH) measurement methods for assessing oil contamination in soil. *Environmental Forensics*, 14(3), 193-203.
- Yavari, S., Malakahmad, A., & Sapari, N. B. (2015).** A review on phytoremediation of crude oil spills. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(8), 279.
- Ye, J. S., Yin, H., Qiang, J., Peng, H., Qin, H. M., Zhang, N., & He, B. Y. (2011).** Biodegradation of anthracene by *Aspergillus fumigatus*. *J. Hazard. Mater*, 185, 174-181.
- Yen, T. F., & Chilingarian, G. V. (2000).** Asphaltenes and asphalts, 2. Netherlands: Elsevier Science.
- Yu, S. H., Ke, L., Wong, Y. S., & Tam, N. F. Y. (2005).** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Environment International*, 31(2), 149-154.
- Yudono, B., Said, M., Napoleon, A., & Fanani, Z. (2013).** Kinetics approach of biodegradation of petroleum contaminated soil by using indigenous isolated bacteria. *Journal of Tropical Soils*, 16(1), 33-38.
- Zafra, G., Absalón, Á. E., Anducho-Reyes, M. Á., Fernandez, F. J., & Cortés-Espinosa, D. V. (2017).** Construction of PAH-degrading mixed microbial consortia by induced selection in soil. *Chemosphere*, 172, 120-126.
- Zafra, G., Absalón, Á. E., Cuevas, M. C., & Cortés-Espinosa, D. V. (2014).** Isolation and selection of a highly tolerant microbial consortium with potential for PAH biodegradation from heavy crude oil-contaminated soils. *Water Air Soil Poll*, 225(2), 1826.

Zaiad, G. M. (2010). Physico-chemical analysis of soils in Al-Khums city, Libya. *J. Appl. Sci. Res*, 6(8), 1040-1044.

Ministère de l'énergie et des mines. Raffinage. Disponible sur : <https://www.energy.gov.dz/?rubrique=produits-petroliers>. [Consulté le 14 février 2021].

Annexe

Annexe

Annexe n°1 : Composition des milieux de culture

Potato Dextrose Agar (PDA)

Filtrat d'infusion de 200g de pomme de terre	
Glucose.....	20g
Agar	20g
Eau distillée.....	1000 ml
* Autoclavage à 121 °C pendant 20 min.	
pH= 5.6 ± 0.2	

Malt Extract Agar (MEA)

Extrait de Malt.....	30g
Peptone mycologique.....	5g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000 ml
* Autoclavage à 115 °C pendant 10 min.	
pH= 5.4 ± 0.2	

Czapek Yeast Autolysate agar (CYA, Pitt 1979)

Concenté de Czapek	10 ml
Saccharose	30 g
Extrait de levure	5 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Trace elements stock solution	1 ml
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml
* Autoclavage à 121 °C pendant 15 min.	
pH = 6.2 ± 0.2.	

Concenté de Czapek

NaNO ₃	30 g
KCl	5 g
MgSO ₄	5 g
FeSO ₄	0.1 g
Eau distillée.....	100 ml
* Conservation à 4–10 °C	

Trace elements stock solution

CuSO ₄	0.5 g
ZnSO ₄	0.1 g
Eau distillée.....	100 ml
* Conservation à 4–10 °C	

Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

Peptone.....	10 g
Glucose.....	20 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH= 6

* Autoclavage à 121 °C pendant 15 min.

Annexe n°2 : Protocole d'extraction d'ADN fongique

Le kit Qiagen Dneasy mini Plant a été utilisé pour l'extraction de l'ADN génomique à partir des mycéliums fongiques.

- 1-** Broyer le tissu fongique en poudre fine à l'aide d'un mortier et d'un pilon en présence d'azote liquide. Transférer la poudre dans un tube de taille appropriée et laisser l'azote liquide s'évaporer. Ne pas laisser l'échantillon se réchauffer. Continuer directement à l'étape 2.
- 2-** Ajouter 400 µl de tampon AP1 et 4µl de RNase A (100 mg/ ml) à 100 mg maximum (poids frais) ou 20 mg (poids sec) de broyat de tissu fongique et vortexer vigoureusement. Aucun agrégat tissulaire ne doit être visible.
- 3-** Incuber le mélange 10 min à 65°C. Pendant l'incubation, mélanger 2-3 fois en inversant le tube. Cette étape permet de lyser les cellules.
- 4-** Ajouter au lysat 130 µl de tampon AP2, mélanger puis incuber 5 min sur la glace. Cette étape permet de précipiter le détergent, les protéines et les polysaccharides. Certains échantillons peuvent produire des lysats très visqueux et des précipités en grande quantité. L'ADN dans l'étape suivante sera alors fragmenté. Dans ce cas, des résultats optimaux peuvent être obtenus en éliminant les précipités par une centrifugation de 5 min à vitesse maximale. Après centrifugation, déposer le surnageant dans la colonne QIAshredder et continuer à l'étape 5.
- 5-** Déposer le lysat dans la colonne QIAshredder (de couleur lilas) placée dans un tube collecteur de 2 ml et centrifuger 2 min à vitesse maximale.
- 6-** Transférer l'effluent obtenu à l'étape 5 dans un nouveau tube, sans entrainer le culot de débris cellulaires.
Généralement, le volume de lysat récupéré est de 450 µl. pour certaines espèces, la quantité récupérée est inférieure. Dans ce cas, déterminer le volume pour l'étape suivante.
- 7-** Ajouter 1,5 volume de tampon AP3/E directement au lysat clarifié et mélanger en pipetant.
Il est important d'ajouter le tampon AP3/E directement au lysat clarifié et de les mélanger immédiatement.
- 8-** Déposer 650 µl du mélange obtenu à l'étape 7, y compris les précipités, dans la colonne DNeasy placée dans un tube collecteur de 2 ml. Centrifuger 1 min à $\geq 6000 \times g$ (≥ 8000 rpm) et jeter l'effluent.
Réutiliser le tube collecteur à l'étape 9.
- 9-** Répéter l'étape 8 avec le reste de l'échantillon. Jeter l'effluent et le tube collecteur.
- 10-** Placer la colonne DNeasy dans un nouveau tube collecteur de 2 ml, ajouter 500 µl de tampon AW et centrifuger 1 min à $\geq 6000 \times g$ (≥ 8000 rpm). Jeter l'effluent et réutiliser le tube collecteur à l'étape 11.
- 11-** Ajouter 500 µl de tampon AW dans la colonne DNeasy et centrifuger 2 min à vitesse maximale afin de sécher la membrane.

Il est important de bien sécher la membrane de la colonne DNeasy car des résidus d'éthanol peuvent interférer les réactions en aval. La centrifugation permet d'éviter toute récupération d'éthanol pendant l'élution. Jeter l'effluent et le tube collecteur.

NB : Après centrifugation, sortir avec précaution la colonne DNeasy du tube collecteur afin que la colonne ne touche pas l'effluent et éviter ainsi d'entraîner de l'éthanol.

12- Transférer la colonne DNeasy dans un tube collecteur de 1,5 ou 2 ml et déposer au centre de la membrane 100 µl de tampon AE préchauffé à 65 °C. Incuber 5 min à température ambiante, puis centrifuger 1 min à $\geq 6000 \times g$ (≥ 8000 rpm).

NB : L'élution avec des volumes de 50 µl (au lieu de 100 µl) augmente la concentration finale de l'ADN dans l'éluat de façon significative, mais réduit légèrement le rendement total. Pour des échantillons contenant plus de 20 µg d'ADN, un volume d'élution de 200 µl (au lieu de 100 µl) améliorera l'efficacité d'élution.

13- Répéter l'élution (étape 12) comme décrit.

Pour la deuxième étape d'élution il est possible d'utiliser un nouveau tube afin de ne pas diluer les premier éluats.

NB : Ne pas éluer avec plus de 200 µl dans un tube de 1,5 ml car la colonne DNeasy peut entrer en contact avec l'éluat.

Annexe n°3 : La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale pour les souches fongiques identifiées

➤ **La souche *Aspergillus terreus* strain PB2.aaa (PB2)**

```
GGTCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGAAAAACAAGTTGCAA  
ATAAATGCGTCGGCGGGCGCCGGCCGGGCTACGGAGCGGAAGA  
CGAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCGCCGCTGC  
CTTTCGGGCCCCTCCCCGGGAGCCGGGGGACGAGGGCCCAACA  
CACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATG  
CCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGA  
TGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTCGCTGC  
GTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTT  
AACTGATTGCAAAGAATCACACTCAGACTGCAAGCTTTCAGAAC  
AGGGTTCATGTTGGGGTCTCCGGCGGGCACGGGCCCGGGGGCGA  
GTCGCCCCCGGCGGCCAGCAACGCTGGCGGGCCCGCCGAAGCA  
ACAAGGTACAATAGTCACGGGTGGGAGGTTGGGCCATAAAGACC  
CGCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAGGAT
```

➤ **La souche *Penicillium chrysogenum* strain HM1.aaa (HM1)**

```
GTCCTACTGATCCGAGGTCAACCTGGATAAAATTTGGGTTGATCG  
GCAAGCGCCGGCCGGGCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCAT  
ACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCC  
GTCCCCCGGGATCGGAGGACGGGGCCCAACACACAAGCCGTGC  
TTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATA  
CCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAA  
TTTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGAT  
GCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAAATAATTTATAT  
TTTCACTCAGACTACAATCTTCAGACAGAGTTCGAGGGTGTCTTC  
GGCGGGCGCGGGCCCGGGGGCGTAAGCCCCCGGCGGCCAGTT  
AAGGCGGGCCCGCCGAAGCAACAAGGTAATAAACAACGGGTG  
GGAGGTTGGACCCAGAGGGCCCTCACTCGGTAATGATCCTTCCG  
CAGGTTACCCCTACGGAAGAGTG
```

➤ La souche *Aspergillus ustus* strain *HM3.aaa* (HM3)

```
GATCTACCTGATCCGAGGTCACCTGGTAAAATAGAAGGTTGGAG
ACGCCGGCTGGCGCCCGGCCGCTAATCGAGCGGGTGACAAA
GCCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTT
CGGGCCCGTCCCCCGGGGGGGACGACACCCAACACACAAGCC
GGGCTTGAAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCG
GAATGCCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCA
CTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAGTTCGCTGCGTTCTT
CATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAATAG
GTTTGCTATCAAGCTCAGACAACACTAAAGACAGGAGGTTCCGGT
GTGGTCTCCGGCGGCTACCCCCGGGGGGGGCGCACCGCCGAAGC
AACGTTGGTCAGGTATTCACGGGTGGGAGGTTAGGCCTGCCCGG
GGGCAGACCTGCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTAC
GGAAACCTTGTTACGACTTTTACTTCCAGG
```

➤ La souche *Purpureocillium lilacinum* strain *HM4.aaa* (HM4)

```
TCTACCTGATCCGAGGTCACCTCTAAGAAAGTTGGGCGTTTTACGG
CGTGACCGCCTCCGCGCTCCGGTGCAGAGGTGTGTGCTACTACGCA
GGGGAGGCTGCGGCGGGGTCCGCACTGCATTTCCGGGGGGCGGCTG
GTGTGCCGTCCCCAACACCGAGGCCCGGGGGGGCTCGAGGG
TTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTGGCGGG
CGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATT
CACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACC
AAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTGTTTTTGTGTTGTG
CACTCAGAGAAGAAATTCCGCCCGCTGGGCGTAATGCAAGAGA
GTTTGGGGTCCCTGCGGCGGGCGCCTGGGTCCGGCGCCGGCGCG
GGGGCAGGCGGCCGGGGCGTTCCCGCCGAGGCAACTGAGGTAAG
GTTACAGTGGGTTTGGGAGTTGTATAACTCGGTAATGATCCCTCC
GCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTCCAAA
```

➤ La souche *Penicillium glabrum* strain *DSL1.aaa* (DSL1)

```
ACCTGATCCGAGGTACCTGAAAAAAGGATGATTGGTTGTCCGGC
TGGCGCCGGCCGGGCCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACG
CTCGAGGACCGGACTCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGACCCGTC
CCCGGGGGGACGGAGCCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCA
GCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGC
GCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCATGAATTCTGCAATT
CACATTAGTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAAC
CAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTTATTTAGTTTATGCTCA
GACTGCAATCTTCAGACAGAGTTCAATAGTGTCTCCGGTGCGCGC
GGACCCGGGGGCAGAAGCCCCCGGCGGCCGTGAGGCGGGGCGC
ACCGAAGCAACAAGGTACAATAAACACGGGTGGGAGGTTGGAC
CCAGAGGGCCCTCACTCAGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCCCT
ACGGAAGCCGTCTGAT
```

➤ La souche *Aspergillus fumigatus* strain *AS2.aaa* (S2.2)

```
GGGTCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTTAGAAAAATAAAGTTGG
GGTGTCGGCTGGCGCCGGCCGGGCCTACAGAGCGGGTGACAAA
GCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTT
CGGGCCCGTCCCCGGGGTGAACCGGGGACGGGGGCCCAACACA
CAAGCCGTGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCC
CCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATG
ATTCATGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCG
TTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTT
AATTGATTATGGTAATCAAACCTCAGACTGCATACTTTCAGAACAG
AGTTCATGTTGGGGTCTTCGGCGGGCGCGGGCCCGGGGGCACAG
GGCCTCCCCGGCGGCCGTTTCGAAAACGGCGGGGCCCGCCGAAGC
AACAAGGTACAATAAACACGGGTGGGAAGGTTGGACCCAGAGG
GCCCTCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTACCCTAT
```

*Travaux
scientifiques*

Travaux scientifiques

Communications Nationales :

- BENGUENAB Asma et CHIBANI Abdelwaheb. Isolement et identification des champignons filamenteux telluriques impliqués dans la biodégradation des hydrocarbures pétroliers. IX^{ème} Journées Scientifiques de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (Université de Mostaganem, Algérie), 6 et 7 Novembre 2019.

Communications internationales :

- BENGUENAB Asma et CHIBANI Abdelwaheb. Biodégradation du pétrole et du diesel par un champignon filamenteux isolé d'un sol contaminé aux hydrocarbures pétroliers. 3ème congrès méditerranéen en bio-analyses- CMB 2019 : Toxicologie, Ecotoxicologie, Aliment et Santé. Association scientifique d'eco-toxicologie, Mahdia Tunisie, 13 au 15 Décembre 2019,
- BENGUENAB Asma et CHIBANI Abdelwaheb. Isolement et identification des champignons filamenteux dégradants le pétrole à partir d'un sol contaminé aux hydrocarbures de la raffinerie d'Arzew, Algérie. Séminaire International sur les Sciences Naturelles et de la Vie en ligne (webinaire), organisé par International Journal of Human Settlements, le 19 et 20 Février 2021.