

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Mlle. HAIDRA FATIMA ZOHRA

Mlle. BERRAHMA SOUAD

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: Microbiologie appliquée

THÈME

Isolement et identification des bactéries marines ayant un
potentiel de biodépollution des déchets

Soutenue publiquement le 29 /06 /2022

DEVANT LE JURY

Président	Mme. SIDHOUM. W	MCA	U. Mostaganem
Encadreur	Mme. BEKENNICHE. N	MAA	U. Mostaganem
Examineur	M. CHIBANI. A	Pr	U. Mostaganem

Thème réalisé au Laboratoire de Microbiologie à Université de Mostaganem

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier le bon Dieu tout puissant de nous avoir aidés à réaliser ce modeste travail.

*Nous remercions très chaleureusement notre encadreur **Madame BEKENNICHE NAHLA** Maitre-Assistante « A » qui nous à encadrées, orienté, aidé et conseillé.*

*Tous nos remerciements à notre chef de parcours **Mr HAMOUM. H** et notre gratitude aux membres du jury «**Mme. SIDHOUM. W** et **M. CHIBANI. A**» pour avoir accepté d'examiner ce travail pour la discussion apportée sur ce projet.*

Nous remercions tous les enseignants de notre cursus universitaire qui ont contribué à notre formation.

*Nous adressons nos remerciements à **Mr Djilali** responsable de « laboratoire de Microbiologie 03 » de l'université de Mostaganem l'établissement l'ITA, pour sa gentillesse, son aide scientifiques, et sa disponibilité.*

Enfin, il nous serait difficile d'omettre de remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail. Qu'ils trouvent dans ces quelques lignes l'expression de nos sincères remerciements.



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour

A ma chère Maman "KHEIRA" qui a toujours cru en moi et qui a été présente quand j'en avais besoin, ses encouragements, sa patience, son attention et ses sacrifices juste pour que je consacre tout mon temps rien que pour mes études, que

Dieu la protège.

A mon cher Papa " NOUR EDDINE" qui a veillé à ce que nous ne manquions de rien, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort, que Dieu le garde pour nous.

À mes chères sœurs "HOURIA et MARWA" que j'aime plus que les mielleuses sœurs du monde.

À mes chers frères "MOUHAMED et HOCINE", que le dieu les gardent.

À toute ma famille

À ma cousine KHEIRA

A mes chères copines AFAF, AHLEM, KARIMA, et TOUATIA pour leurs soutiens et encouragement.

HAIDRA FATIMA ZOHRA



Dédicaces

Avant tout c'est grâce à notre Dieu que je suis arrivée à ce stade.

A la fontaine qui ne se lasse pas de donner à celle qui a tissé mon bonheur avec les fils tissés de son cœur, qui a été présente quand j'en avais besoin, son attention et ses sacrifices s encouragements, s à ma chère mère (KHEIRA).

A ceux qui m'ont cherché et misérable pour jouir du confort et du contentement, qui n'ont rien lésiné pour me pousser sur le chemin du succès, qui m'ont appris à gravir les échelons de la vie avec sagesse et patience jusqu'à mon cher père (LAID).

A ma cher grande mère (MERIEM)

A qui amour coule dans mes veines et mon cœur est rempli de leur souvenir

à mes chères sœurs (AMINA, WAHIBA, NESRINE, KARIMA)

et à mon cher frère (BADR EDDINE).

A mon cher oncle (OUSSAMA) et ma chère tante (MARWA)

A tous ma famille

A qui nous sommes joints main dans la main en cueillant une fleur, nous l'avons appris à mes amis (AICHA et HADJA).

BERRAHMA SOUAD

Résumé

Les hydrocarbures pétroliers sont des polluants organiques très nocifs et constituent un risque majeur sur l'environnement et par conséquent sur la santé humaine et animale.

La dépollution biologique de ces sites pollués nécessite des microorganismes efficaces dans ce procédé biologique.

Les bactéries « hydrocarbonoclastes » sont des microorganismes qui se nourrissent typiquement d'hydrocarbures, et peuvent être aussi de bonnes productrices de biomolécules appelées « biosurfactants » présentant un grand nombre d'applications environnementales et industrielles.

A ce titre, les objectifs de notre travail sont d'isoler et de caractériser des souches bactériennes ayant un potentiel de dégradation des hydrocarbures à partir un échantillon d'eau de mer et de boue situé dans le nord-ouest de l'Algérie.

La mise en culture sur gélose MSM additionnée de pétrole brut a permis d'isoler 6 souche bactériennes, qui diffèrent par leurs caractères macroscopiques et microscopiques et les résultats des quelque tests biochimique.

Ces six isolats sont testés pour leur capacité à dégrader les polluants pétrole brut, diesel et essence dans un milieu MSM liquide, en mesurant la densité optique, et aussi sur le milieu MSM solide par méthode de déplacement d'huile pour le Screening de la production de biosurfactant.

Les résultats du test de biodégradation permettent d'obtenues les 6 souches ont fait la croissance en présence du pétrole brut, diesel et essence, Les 6 isolats ont montré des zones de dégradation et croissance positive, d'une souche qui ont fait une zone claire autour du dépôt.

Mots clés: biodégradation, hydrocarbonoclaste, biosurfactants, pétrole brut

Abstract

Petroleum hydrocarbons are very harmful organic pollutants and pose a major risk to the environment and therefore to human and animal health.

The biological depollution of these sites requires microorganisms that are effective in this biological process.

Hydrocarbonoclastic bacteria are microorganisms that typically feed on hydrocarbons, and can also be good biomolecules producers called biosurfactants with many environmental and industrial applications .

As such, the objectives of our work are to isolate and characterize bacterial strains with a potential for hydrocarbon degradation from a sample of seawater and mud located in northwestern Algeria.

The cultivation on MSM agar with supplemented crude oil has made it possible to isolate 6 bacterial strains, which differ in their macroscopic and microscopic characters and the results of some biochemical tests.

These six isolates are tested for their ability to degrade crude oil, diesel and gasoline pollutants in a liquid MSM medium, by measuring optical density, and also on solid MSM medium by oil displacement method for screening of biosurfactant production.

The results of the biodegradation test allow to obtain the 6 strains made the growth in the presence of crude oil, diesel and gasoline, The 6 isolates showed zones of degradation and positive growth, a strain that made a clear zone around the deposit.

Key words: biodegradation, hydrocarbonoclast, biosurfactants, crude oil

المخلص

الهيدروكربونات البترولية ملوثات عضوية ضارة للغاية وتشكل خطرا كبيرا على البيئة وبالتالي على صحة الإنسان والحيوان. ان تنقية هذه المواقع يتطلب التحليل البيولوجي بواسطة كائنات حية دقيقة و فعالة

البكتيريا الهيدروكربونية هي كائنات حية دقيقة تتغذى عادة على الهيدروكربونات، ويمكن أن تكون أيضا منتجة جيدة للجزيئات الحيوية تسمى بخافضات التوتر السطحي الحيوية التي لها عدة الاستعمالات في مجالات الصناعة و البيئة.

نهدف من خلال مشروعنا هذا الى عزل وتوصيف السلالات البكتيرية القادرة على تحليل الهيدروكربونات من عينة ماء البحر والطين الواقعة في الشمال الغربي للجزائر.

مكثنا الزراعة على الآجار المغذي MSM الصلب مع إضافة طبقة من النفط الخام من عزل ستة سلالات بكتيرية مختلفة مجهريا، ظاهريا و في نتائج بعض الاختبارات الكيميائية الحيوية.

تم اختبار هذه العزلات الست لتحديد قدرتها على تحليل البترول الخام , الديزل و البنزين عن طريق قياس الكثافة الضونية. وكذلك إختبار نزوح طبقة النفط لفحص إنتاج خافضات التوتر السطحية الحيوية.

أظهرت نتائج اختبار التحليل البيولوجي نمو العزلات الست في وجود النفط الخام, الديزل والبنزين كما أنها أظهرت مناطق نزوح النفط على سطح الوسط الصلب, هنالك عزلة واحدة فقط أظهرت منطقة شفافة حول موضع العزلة.

الكلمات المفتاحية : التحليل البيولوجي، الهيدروكربونوكلاست، خافضات التوتر الحيوية، النفط الخام

Liste des abréviations

BN	Bouillon nutritif
C-	Contrôle négatif
°C	Degré Celsius
Cm, mm	Centimètre, millimètre
Columbia	milieu de culture déshydraté
DO	Densité optique
GN	Gélose nutritive
h, min	Heur, minute
MMH	Milieu Mueller-Hinton
ml, µl	millilitre, microlitre
MSM	Minéral Salt Medium
nm	nanomètre
t/m	tours par minute
TSI	Triple sugar iron
UV	Ultra-violet
VG	Voges-Proskauer

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractérisation de quelques pétroles bruts en fonction de leur origine géographique	4
Tableau 2 : Exemple de quelques microorganismes produisant les biosurfactants.	11
Tableau 3 : Les sites de prélèvement des échantillons	12
Tableau 4 : Résumé les résultats obtenus sur milieu MSM solide + pétrole	34
Tableau 5 : Les caractères macroscopique des isolats sur gélose nutritive	36
Tableau 6 : Résultats des tests lypase, protéolyse et l'activité hémolytique	56
Tableau 7 : Les caractères macroscopique et microscopiques des souches isolées.....	57
Tableau 8 : Résultats de croissance des isolats sur milieux sélectifs.....	61
Tableau 9 : Résultats des tests respiratoires	62
Tableau 10 : Résultat de test nitrate réductase après 24h d'incubation.....	64
Tableau 11 : Résultats des tests métabolisme glucidique.....	67

LISTE DES FIGURES

Figure 1: les différents échantillons prélevés (Echantillon du boue du station d'épuration d'Arzew à Oran et l'eau de mer de port de pêche de salamandre à Mostaganem)	13
Figure 2: Localisation des différents sites de prélèvement par le service Google Maps.....	14
Figure 3: Milieu MSM additionnée le pétrole brut	15
Figure 4: Milieu MSM liquide additionnée du pétrole brut	17
Figure 5: Milieu MSM liquide additionnée du diesel	18
Figure 6: Milieu MSM liquide additionnée du pétrole brut plus glucose.....	20
Figure 7: Milieu MSM liquide additionnée du pétrole brut plus tween 80	20
Figure 8: Etude de la biodégradation du pétrole brut par la méthode de déplacement d'huile « Oil displacement method »	21
Figure 9 : Etude de la biodégradation du pétrole brut par la méthode de spray : « oil spreading technique».....	22
Figure 10: Des boîtes Pétri contenant le milieu de dosage de lypase	24
Figure 11: Milieu Mueller-Hinton (MH) + Tween 80 à 5%; Milieu MH + huile d'olive	25
Figure 12: Ensemencement des isolats sur gélose au sang de cheval à 5%	26
Figure 13: Résultats d'isolement sur milieu gélose MSM additionnée le pétrole brut après 12 jours d'incubation. Contrôle négatif (C-): MSM + pétrole sans échantillon	32
Figure 14: Résultats de purification des isolats sur milieu GN après 24h.....	34
Figure 15: Récupération des culots après centrifugation à 3000 t/m pendant 20 minutes pour la conservation.....	35
Figure 16: Résultat d'étude de la dégradation du pétrole brut après 21 jours d'incubation à l'obscurité et sous agitation.....	37
Figure 17: Croissance bactérienne d'isolats dans milieu MSM liquide additionné de pétrole brut	38
Figure 18: Résultat de test de la dégradation du diesel après 21 jours d'incubation à l'obscurité.....	39
Figure 19: Croissance bactérienne d'isolats dans milieu MSM liquide additionné de Diesel	40
Figure 20: Résultat de test de la dégradation de l'essence, après 21 jours d'incubation	41
Figure 21: Croissance bactérienne d'isolats dans milieu MSM liquide additionné d'Essence	42
Figure 22: Résultats de la biostimulation par l'ajout de glucose après 21 jours d'incubation à l'obscurité et sous agitation	43
Figure 23: Croissance bactérienne d'isolats dans milieu MSM liquide additionné de Pétrole brut + Glucose	44
Figure 24: Résultats de la biostimulation par l'ajout de tween 80 après 21 jours d'incubation à l'obscurité et sous agitation	46
Figure 25: Croissance bactérienne d'isolats dans milieu MSM liquide additionné de Pétrole brut + Tween 80.....	47
Figure 26: Résultats du test de la biodégradation du pétrole brut par la méthode de déplacement d'huile « Oil displacement method »	49
Figure 27: Diamètre de la zone claire des isolats sur gélose MSM additionnée de pétrole brut	50
Figure 28: Résultat de test du protéolyse après 24 h d'incubation	50
Figure 29: Résultats de dosage de la lypase sur milieu à base d'huile d'olive après 24h d'incubation.....	51

Figure 30: Résultats de dosage du lypase sur milieu à base de beurre après 24h d'incubation	52
Figure 31: Résultats de dosage de la lypase sur milieu Mueller-Hinton (MH) à base d'huile d'olive après 24h d'incubation à 30 °C	53
Figure 32: Résultats de dosage de la lypase sur milieu à base de Tween 80 à 5 % après 24h d'incubation à 30 °C	53
Figure 33: Croissance des isolats sur gélose au sang de cheval à 5 % après 24h d'incubation à 30 °C.....	54
Figure 34: Observation microscopique des isolats bactériens après le test de sporulation méthode de Benito Trujillo (×100). Tous les isolats sont contient pas des spores	58
Figure 35: Croissance des isolats sur gélose Hektoen. Incubation 24h à 30°C.....	59
Figure 36: Test nitrat réductase après l'ajout de réactif du Grisse pour les différents isolats, la couleur rouge indique la réduction de nitrate au stade nitrite par nitrate réductase.....	62
Figure 37: Résultats des 06 souches après ajouter du zinc.....	62
Figure 38: Résultats de réaction de Voges-Proskauer, pas de coloration rouge indique l'absence d'acétioine dans le milieu donc les 6 isolats sont VP négatif (Voges-Proskauer)....	64
Figure 39: Résultats des tests citrate de simoun et TSI (Triple sugar iron)	65

Sommair

Remerciements	
Dédicaces	
Résumé	
Abstract	
الملخص	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction	1

Partie I : Synthèse bibliographique

I. Le pétrole	4
II. Les hydrocarbures et les produits pétroliers	5
II.1 Les hydrocarbures	5
II.2 Les différentes familles d'hydrocarbures	5
II.2.1 Les hydrocarbures saturés	5
II.2.2 Les hydrocarbures insaturés	6
II.2.3 Les hydrocarbures aromatiques	6
III. Le mécanisme de biodégradation	6
IV. La biostimulation et bioaugmentation	7
V. Facteurs influençant la biodégradation	7
V.1 La température	7
V.2 L'oxygène	8
V.3 Les nutriments	8
V.4 La salinité	8
VI. La croissance bactérienne dans les milieux pollués	8
VII. La production de biosurfactants	9

Partie II : Matériels et méthode

I.	Echantillonnage	12
II.	Screening des bactéries qui dégradent le pétrole brut	15
II.1	Enrichissement et purification des isolats	15
II.2	Conservation des souches bactériennes	16
III.	Étude du potentiel de dégradation des hydrocarbures	16
III.1	Préparation des isolats pour les tests de dégradation	16
III.2	Etude de la dégradation du pétrole brut	16
III.3	Etude de la dégradation du diesel	17
III.4	Etude de la dégradation de l'essence	18
IV.	Etude de la biostimulation des isolats	18
IV.1	La biostimulation par l'ajout du glucose	19
IV.2	La biostimulation par l'ajout du tween 80	19
V.	Screening de la production de biosurfactant	21
V.1	Méthode de déplacement d'huile	21
V.2	Test du protéolyse	23
V.3	Dosage de la lipase	23
V.3.1	Méthode directe	23
	Milieu à base d'huile d'olive	23
	Milieu à base de beurre	23
V.3.2	Méthode indirecte	24
	Milieu à base d'huile d'olive	24
	Milieu à base de Tween 80	25
V.4	Activité hémolytique	25
VI.	Caractérisation des isolats	26
VI.1	Observation macroscopique	26
VI.2	Observation microscopique	26
	Test de coloration de Gram	26

Test de la sporulation	27
Observation de la mobilité	27
VI.3 Isolement dans des milieux sélectifs	27
Isolement sur milieu King A et King B	27
Isolement sur milieu Hektoen	27
VI.4 Tests respiratoires	27
Test catalase	27
Nitrate réductase	28
Type respiratoire à la gélose Viande-foie:	28
VI.5 Métabolisme glucidique	29
Test de croissance sur gélose TSI (Triple sugar iron)	29
Réaction de Voges-Proskauer	29
Utilisation du citrate	29

Partie III : Résultats et Discussion

I. Screening des bactéries qui dégradent le pétrole brut	31
I.1 Enrichissement et purification des isolats	34
I.2 Conservation des souches bactériennes	35
II. Étude du potentiel de dégradation des hydrocarbures	36
II.1 Etude de la dégradation du pétrole brut	36
II.2 Etude de la dégradation du diesel	38
II.3 Etude de la dégradation de l'essence	40
III. Etude de la biostimulation des isolats	42
III.1 La biostimulation par l'ajout du glucose	42
III.2 La biostimulation par l'ajout du tween 80	45
IV. Screening de la production de biosurfactant	48
IV.1 Méthode de déplacement d'huile	48
IV.2 Test du protéolyse	50
IV.3 Dosage de la lipase	51

IV.3.1 Méthode directe	51
Milieu à base d'huile d'olive	51
Milieu à base de beurre	51
IV.3.2 Méthode indirecte	52
Milieu à base d'huile d'olive	52
Milieu à base de Tween 80	53
IV.4 Activité hémolytique	54
V. Caractérisation des isolats	56
V.1 Observation macroscopique	56
V.2 Observation microscopique	56
Test de coloration de Gram	56
Test de sporulation (méthode de Benito Trujillo)	58
Observation de la mobilité	58
V.3 Isolement dans des milieux sélectifs	59
Tests respiratoires	61
Nitrate réductase	62
Métabolisme glucidique	64
Test de citrate de simoun après 5 jours d'incubation	65
Test de croissance sur gélose TSI (Triple sugar iron) après 48 h d'incubation	65
Discussion	67
Références Bibliographiques	69
Annexes	

INTRODUCTION

Introduction

L'Algérie est un pays producteur et exportateur de pétrole. En effet, la production du pétrole brut est en hausse. Elle a atteint 56.8 Millions de TEP en 2009. De nombreux puits ne cessent d'être découverts sur le territoire national par la Sonatrach et/ou par les Associés (Sociétés étrangères d'exploitation et de production), ceci constitue des sources de contamination du sol de plus en plus importante, de l'exploration au transport des hydrocarbures. **(Ali Ahmed, 2011)**

De nombreux déversements ont lieu au niveau des sites d'exploitation et de production générant des surfaces importantes de pollution de sol. Le pétrole est également transporté des lieux de production au sud vers les unités industrielles implantées au nord dans des oléoducs. La quantité transportée et livrée au nord à partir des gisements est estimée à 34.8 Millions de TEP ; 21.80 M de tonnes sont livrés aux raffineries. Le transport de ce produit augmente le risque de déversement accidentel par la corrosion des oléoducs ou la rupture de pipelines contaminant ainsi des hectares de sols le plus souvent voués à l'agriculture d'une part, ou effleurant de nappes souterraines. Avec la pose de 314 km en 2009, la longueur totale du réseau de canalisation a atteint 17450 km. Le réseau de transport sera en mesure d'acheminer plus de 330 millions de TEP et 20.7 M de tonnes de produits raffinés **(Ali Ahmed, 2011)**

L'utilisation des produits pétroliers a considérablement augmenté au cours des dernières décennies. Les produits pétroliers sont principalement dérivés du pétrole brut et sont les ressources énergétiques primaires d'origine biologique les plus utilisées au monde. Les pays en développement dont les pratiques en matière de droit de l'environnement sont faibles sont confrontés à de graves problèmes de déversement de pétrole, en particulier dans le milieu marin. La pollution de l'environnement augmente de jour en jour en raison d'accidents et de rejets incorrects d'huile moteur dans l'océan. Ces polluants hydrocarbures sont dangereux pour la santé des plantes et ont de forts effets cancérigènes, métagénomiques et toxiques sur la santé humaine et animale (Forhad et al., 2022).

Les produits à base de pétrole comprennent une grande variété de composés dangereux comme le n-alcane, le cycloalcane et l'hydrocarbure aromatique. Au cours de l'exploration, du transport, du traitement, du stockage et de l'utilisation à grande

échelle du pétrole, des sites contaminés peuvent apparaître à la suite d'accidents et d'activités opérationnelles. Dans les stations-service, les déversements de carburant peuvent se produire principalement lors de fuites de réservoirs de stockage souterrains, ce qui peut entraîner une contamination du sol et des eaux souterraines. Une fois contaminés, l'eau et le sol doivent être assainis pour assurer la santé humaine et l'équilibre des écosystèmes (Lima et al., 2020).

La bioremédiation s'est avérée être la plus importante des technologies écologiques et rentables pour le nettoyage des polluants pétroliers. Étant donné que de nombreux micro-organismes indigènes ont la capacité de dégrader le pétrole, la technologie microbienne est considérée comme l'une des méthodes importantes pour remédier à la pollution par les hydrocarbures pétroliers. Jusqu'à présent, plus de 100 genres, 200 espèces de micro-organismes de dégradation du pétrole ont été découvertes dans le milieu marin, dont 79 genres de bactéries, neuf genres de cyanobactéries, 103 genres de champignons et 19 genres d'algues (Jin et al., 2021).

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

Un certain nombre de biosurfactants et de bioémulsifiants de haut poids moléculaire sont produits à la fois par des bactéries et des champignons. Les souches bactériennes appartenant au genre *Bacillus* et *Pseudomonas* produisent généralement des biosurfactants lipopeptidiques. Presque toutes les classes de micro-organismes produisent des biosurfactants. En raison de leur nature xénobiotique, les surfactants synthétiques ont l'inconvénient potentiel de persister dans l'environnement (Benckiser *et al.*, 2013)

Le but du présent travail est d'étudier la capacité de dégradation des hydrocarbures par des microorganismes isolés d'un sol et eau contaminé.

Le présent travail est un support bibliographique se subdivise en deux parties. La première partie expose les données relatives aux hydrocarbures dans l'environnement (sources, nature, Organismes utilisées,...), à leur devenir dans

l'environnement (biodégradation des hydrocarbures...) suivi par une deuxième partie présentant d'isolements et purifications des isolats microbiens et la capacité des bactéries à dégradé les hydrocarbures.

En outre, testé la biodégradation du pétrole brut par des souches microbiennes est observée des zones claire sur les boîte pétri qui contient MSM solide avec le pétrole brut comme seul source de carbone. Après avoir vérifié l'aptitude des souches isolées à utiliser les hydrocarbures pétroliers dans le milieu MSM liquide mesurée par la densité optique.

Partie I : Synthèse bibliographique

I. LE PETROLE

L'exploitation rapide des industries du pétrole brut a conduit à la génération de grands volumes d'hydrocarbures pétroliers dangereux qui ont un impact immédiat sur l'environnement et la santé. Le traitement et l'élimination durables des hydrocarbures pétroliers est donc nécessaire pour éviter les nuisances environnementales de la pollution (Suganthi et al., 2018).

Les hydrocarbures pétroliers font partie des contaminants environnementaux les plus courants. Les principales sources de pollution par les hydrocarbures pétroliers sont naturelles infiltration et déversement accidentel pendant le transport. Les hydrocarbures pétroliers se composent de quatre composants principaux : saturés, aromatiques, résines et asphaltènes (Timmis, 2010).

En moyenne, les hydrocarbures saturés et aromatiques représentent ensemble 80 % du pétrole brut et la dégradation microbienne des hydrocarbures a fait l'objet d'études et de revues approfondies (Tableau 1).

Tableau 1: Caractérisation de quelques pétroles bruts en fonction de leur origine géographique (Philippe et al., 2011).

Origine	Saturés totaux %	Aromatiques %	Résine %	ASPHALTENES
Venezuela	16	43	29	12
Arabie Saoudite (Safaniya)	28	41	19	12
Arabie Saoudite (Arabian light)	43	38	15	4
Mer du Nord (Ninian)	53 45	33 29	13 26	1 0
Mer du Nord (Alwyn SeEllon)	63	28	9	0
Algérie (HassiMessaoud)	64	27.5	8	0.5

Les chiffres sont issus de l'ouvrage de Microbiologie pétrolière (J-. Vandecasteele, 2005).

II. Les hydrocarbures et les produits pétroliers

II.1. Les hydrocarbures

Des quantités énormes d'hydrocarbures, principalement pétroliers (de l'ordre de 3×10^9 tonnes. an^{-1}) sont utilisées annuellement. Le raffinage industriel du pétrole consiste à fractionner le pétrole brut en coupes légères, moyennes et lourdes tout en séparant les gaz des essences. L'amélioration de la qualité de base est obtenue par la modification de leur structure chimique. Le terme de réformage est alors employé alkylation, isomérisation, craquage catalytique, hydrocraquage, viscoréduction, etc. Certains de ces produits de base sont ensuite recombinaés pour répondre aux critères techniques, environnementaux et de sécurité requis.

Les produits pétroliers finis obtenus, des plus légers aux plus lourds, sont les suivants : Gaz de Pétrole Liquéfié (GPL), supercarburants, naphtha (distillat du pétrole, intermédiaire entre le supercarburant et le kérosène), « white spirit » (contenant moins de 5% de benzène), pétrole lampant, kérosène, gazole, fioul domestique, lubrifiants, cires, paraffines, fioul lourd, bitumes, etc. Un certain nombre de bases chimiques (oléfines, aromatiques, etc.) sont également produites et servent de réactifs initiaux à toute la pétrochimie pour produire notamment les matières plastiques (Philippe et al., 2011)..

II.2. Les différentes familles d'hydrocarbures

Les hydrocarbures qui sont, au sens strict, des composés exclusivement constitués d'hydrogène et de carbone et aromatiques (Philippe et al., 2011).

II.2.1. Les hydrocarbures saturés

Ils sont regroupés en trois familles: les alcanes linéaires, les alcanes ramifiés et les cycloalcanes. Les alcanes linéaires (n-alcanes ou paraffines): leur formule brute est du type C^nH_{2n+2} et leur nombre d'atomes de carbone est compris entre 5 et 60. Les alcanes ramifiés comportent une ou plusieurs ramifications, qui sont généralement constituées par un groupement méthyle (CH₃); le pristane (2,6,10,14-tétraméthylpentadécane) et le phytane (2,6,10,14-tétra méthylhexadecane) sont des composés à ramifications multiples (isoprénoides). Les cycloalcanes (également appelés hydrocarbures alicycliques ou naphènes), comportent un cycle saturé et sont principalement constitués de dérivés alkylés du cyclopentane et du cyclohexane. Des dérivés polycycliques (bi-, tri-, tétra-,

pentacycliques) sont aussi présents drimanes, terpanes tricycliques, terpanes tétracycliques (ou stéranes), hopanes (Philippe et al., 2011).

II.2.2. Les hydrocarbures insaturés

Il existe deux grandes classes de composés. Les alcènes qui possèdent une à plusieurs double(s) liaison(s) et les alcynes comportant une ou plusieurs triple(s) liaison(s). Par exemple, les phytadiènes se retrouvent dans le zooplancton, les mollusques lamellibranches, les poissons. Les cyanobactéries contiennent des alcènes linéaires (C19 à C29) (Philippe et al., 2011).

II.2.3. Les hydrocarbures aromatiques

Ils comportent 1 cycle aromatique (composés mono aromatiques) ou plusieurs cycles aromatiques (composés polyaromatiques, désignés par l'acronyme HAP). Le benzène et les alkylbenzènes (toluène, éthylbenzène et les trois isomères ortho-, méta-et para-du xylène, constituant le groupe des BTEX) ne comportent qu'un seul noyau benzénique sur lequel sont greffés des groupements méthyle et éthyle. Le naphthalène, le phénanthrène, le benzo [a] pyrène possèdent respectivement 2, 3 et 5 cycles. Certaines structures aromatiques (ou polyaromatiques) sont associées à des noyaux saturés (cycles à 5 ou 6 carbones). De tels composés (ex: stéroïdes) sont qualifiés de naphténoaromatiques (Philippe et al., 2011).

III. Le mécanisme de biodegradation

En raison du coût élevé et la pollution secondaire liée au traitement physique et chimique méthodes, leur application généralisée a été limitée. Par conséquent, la bioremédiation microbienne, en tant que méthode respectueuse de l'environnement et technologie rentable, est la solution la plus réalisable pour atteindre complet dégradation des polluants (Xu et al., 2019).

Le mécanisme de la dégradation microbienne aérobie des hydrocarbures est bien décrit dans plusieurs souches bactériennes. Au cours de la dégradation aérobie, l'oxygène moléculaire agit non seulement comme accepteur terminal d'électrons mais aussi comme co-substrat. Les oxygénases incorporent des groupes hydroxyles, dérivé de l'oxygène moléculaire, dans la chaîne aliphatique ou le cycle aromatique. Les aliphatiques sont généralement convertis en alcools, tandis que les aromatiques sont généralement

métabolisés en composés phénoliques (Heider et al., 1999), qui sont ensuite minéralisés en CO₂ et en eau par des des voies comme le cycle TCA.

IV. La biostimulation et bioaugmentation

Les méthodes de bioremédiation sont réalisées soit en ajoutant des organismes (bioaugmentation) ou en soutenant la croissance d'organismes indigènes micro-organismes (biostimulation) (Roy et al., 2018). Stimulation microbienne par addition d'azote et des boues phosphorées à huileuses contenant de faibles niveaux de ces nutriments peut accélérer la croissance cellulaire et donc augmenter le taux d'hydrocarbure dégradation (Roy et al., 2018).

D'un autre point de vue, la bioaugmentation par inoculation de microbiotes spéciaux, est une stratégie prometteuse et peu coûteuse pour la bioremédiation de diverses polluants (Muangchinda et al., 2018). Cependant, l'ajout d'allochtones bactéries dans un nouvel environnement n'est pas très avantageux en raison de leur manque d'adaptabilité.

L'utilisation de micro-organismes pour éliminer les polluants par la méthode de bioremédiation est une stratégie largement utilisée. La bioaugmentation qui est l'ajout de micro-organismes ou la biostimulation qui est l'addition d'éléments comme l'oxygène ou de nutriments améliore le métabolisme des composés pétroliers (Sherafatmand et Ng, 2015).

Certains facteurs, tels que le pH, la température, l'oxygène et la disponibilité des nutriments affectent les taux de biodégradation du pétrole. Les nutriments sont essentiels pour synthèse des biomolécules; par conséquent, des conditions nutritives adéquates potentialisent la dégradation des hydrocarbures et sont appliqués à biostimuler les micro-organismes dégradant le pétrole (Sherafatmand et Ng, 2015).

V. Facteurs influençant la biodégradation

V.1. La température

La température fait partie des facteurs qui influencent la biodégradation du pétrole en affectant ces compositions physiques et chimiques. A basse température, on observe généralement une diminution du taux de dégradation, ce que l'on pense être le résultat de taux d'activité enzymatique réduits. Le taux de métabolisme des hydrocarbures a atteint son niveau maximum à des températures élevées allant de 30°C à 40°C.

Bien que la biodégradation des hydrocarbures puisse avoir lieu sur un large domaine de températures, le taux de dégradation diminue avec la baisse de température. Les taux de dégradation les plus élevés qui se sont produits à la plage de température de 30 à 40°C, 20 à 30°C et 15 à 20°C dans le sol, les environnements marins et d'eau douce, respectivement, (Atlas, 1985).

V.2. L'oxygène

La concentration d'oxygène a été déterminée comme un taux limitant et variable de la dégradation des hydrocarbures dans l'environnement. La disponibilité de l'oxygène dans le sol ou les eaux dépend du taux de consommation microbienne d'oxygène et le type du biotope (Haritash and Kaushik, 2009).

V.3. Les nutriments

Les nutriments sont des composants les plus importants pour une bonne gestion de la biodégradation des contaminants, y compris l'azote, le fer et le phosphore dans certains cas (Atlas, 1985). Dans les environnements marins et d'eau douce, les déversements d'hydrocarbures provoquaient une augmentation spectaculaire des niveaux de carbone et une diminution de l'azote et les niveaux de phosphore qui peuvent affecter la biodégradation. Dans les milieux marins, les niveaux d'azote et de phosphore sont faibles et les milieux humides sont incapables de fournir les nutriments en raison des fortes demandes de nutriments par les plantes. Ainsi, les nutriments un ajout était nécessaire pour favoriser la biodégradation des contaminants (Hesnawi et Adbeib, 2013).

V.4. La salinité

Une relation positive et très étroite existe entre la salinité et la minéralisation du taux des hydrocarbures dans les sédiments marins comme dans les sols. Qin et al. (2012) ont suggéré que la salinité avait une influence majeure sur le processus de bioremédiation et de biodégradation, et il affecte également la croissance et la diversité microbienne.

VI. La croissance bactérienne dans les milieux pollués

En termes de cinétiques de croissance, les micro-organismes ont des sensibilités différentes à un large spectre de concentrations de polluants présents dans les environnements. Il existe également un seuil en dessous duquel le contaminant n'est pas détecté par les organismes et, d'autre part, au-dessus d'un niveau particulier, il est toxique

pour les micro-organismes. De plus, dans un nombre limité gamme, l'augmentation de la concentration en polluant entraîne une diminution de le taux de dégradation. Ainsi, il est important de déterminer la quantité d'un contaminant qui peut être décomposée par des microbes indigènes communautaire (Vaidya et al., 2017).

La plupart des micro-organismes dégradants les hydrocarbures pétroliers présents dans les boues huileuses et les eaux polluées consomment le pétrole brut car leur source de carbone ne peut dégrader que de faibles niveaux de polluants. Bien que l'isolement des populations microbiennes de divers produits pétroliers milieux riches a été relativement bien étudié, il existe un manque de données sur les souches indigènes qui peuvent dégrader des niveaux élevés de les hydrocarbures pétroliers (Sarkar et al., 2017).

Compte tenu du contexte ci-dessus, le potentielle de dégradation des souches isolées doit être largement étudié et expérimenté pour interpréter leur rôle dans la dégradation des hydrocarbures à la fois dans les milieux salins et dans le processus de compostage.

VII. La production de biosurfactants

Les biosurfactants sont des molécules amphiphiles qui ont la capacité à représenter une grande variété d'activités de surface. Ils comprennent à la fois un groupe hydrophobe et un groupe hydrophile qui aident à son accumulation entre les phases fluides.

Ils permettent un accès facile aux hydrocarbures non polaires de sorte que les micro-organismes dans les milieux riches en pétrole peuvent facilement les dégrader. Un certain nombre de biosurfactants de haut poids moléculaire et les bioémulsifiants sont produits à la fois par des bactéries et des champignons. Les biosurfactants d'origine bactérienne appartiennent à la plupart des classes de composés comprenant des polysaccharides, des protéines, des lipopolysaccharides, lipoprotéines et combinaisons de plusieurs d'entre elles types structuraux. Souches bactériennes appartenant au genre *Bacillus* et *Pseudomonas* produisent généralement des biosurfactants lipopeptidiques. Presque toutes les classes de micro-organismes (tableau 2) produisent des biosurfactants. En raison de leur nature xénobiotique, les tensioactifs synthétiques ont l'inconvénient potentiel de persister dans l'environnement, longtemps après qu'ils aient fait l'objet d'une demande de mesure corrective. En outre, certains des tensioactifs synthétiques sont comparativement plus toxique pour la santé humaine. Comme les biosurfactants sont

d'origine microbienne, ils ont été sous la surveillance active des chercheurs depuis plus d'un décennie. Les biosurfactants peuvent être considérés comme une alternative viable aux tensioactifs de synthèse chimique pour la dépollution de l'environnement (Varadavenkatesan et Murty 2013).

Les biosurfactants ont la capacité d'augmenter la biodisponibilité des hydrocarbures de 5 à 20 fois, augmentant ainsi considérablement leur vitesse de biodégradation. Il a été rapporté que les biosurfactants sont plus efficaces à améliorer la biodisponibilité des substances hydrophobes par rapport aux tensioactifs chimiques (Ron et Rosenberg, 2002).

Lorsque des biosurfactants sont appliqués, la mobilité des hydrocarbures est renforcée par la queue hydrophobe lorsqu'il amène la molécule de biosurfactants à se rassembler aux interfaces de l'émulsion réduisant ainsi la tension interfaciale ou superficielle tandis que la tête hydrophile augmente la solubilité des hydrocarbures en leurs permettant à se dissoudre dans la phase aqueuse (Mulligan, 2009).

La fraction hydrophobe est constituée d'acides gras hydroxylés des acides, des acides gras à longue chaîne ou des acides gras α -alkyl- β -hydroxyle tandis que le fragment hydrophile peut être un phosphate, un alcool, un peptide cyclique, un acide aminé, un glucide ou un acide carboxylique. Les biosurfactants sont devenus une meilleure substitution aux surfactants synthétiques en raison d'une plus grande compatibilité environnementale, biodégradabilité supérieure, capacité moussante supérieure, toxicité inférieure, sélectivité supérieure, capable de fonctionner à des pH, températures et salinités extrêmes (Bezza et Chirwa, 2015).

Tableau 2 exemple de quelques microorganismes produisant les biosurfactants (Varadavenkatesan et Murty, 2013).

Microorganism	Biosurfactant
<i>Torulopsis</i> sp.	Sophorolipids
<i>Pseudomonas</i> sp.	Rhamnolipids
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Trehalose lipids and mycolates Sucrose and fructose lipids
<i>Rhodococcus</i> sp.	Trehalose lipids
<i>Candida</i> sp.	Mannosyl erythritol lipid
<i>Candida bogoriensis</i>	Sophorolipid
<i>Acinetobacter</i> sp.	Fatty acid, glycerides, and emulsan
<i>Corynebacterium lepus</i>	Corynemycolic acids
<i>Candida petrophilum</i>	Peptidolipid
<i>Bacillus subtilis</i>	Cyclic lipopeptide
<i>Bacillus licheniformis</i>	Cyclic lipopeptide
<i>Candida tropicalis</i>	Mannan-fatty acid complex
<i>Corynebacterium hydrocarboclastus</i>	Proteo-lipid-carbohydrate complex

Partie II : Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

I. Echantillonnage

Pour la réalisation de nos expériences, nous avons utilisé un échantillon d'eau et de sol qui ont été prélevés des sites pollués par les hydrocarbures. Le premier échantillon d'eau a été prélevé du port de pêche de salamandre à Mostaganem en mois de mars (2022), et celui du sol a été prélevé de la station d'épuration d'Arzew à Oran (**Figure 1**).

Ces échantillons ont été prélevés dans des zones polluées par les hydrocarbures et les huiles usagées pour favoriser les bactéries hydrocarbonoclastes.

La conservation des échantillons a été faite à 4°C dans des flacons en verre stérile et à l'abri de la lumière.

Les sites d'échantillonnage ont été montrés dans la figure par utilisation de service mondial de cartographie en ligne: Google Maps (**Figure 2**).

Le **tableau 3** montre les différents échantillons prélevés au cours de cette étude.

A partir de ces échantillons nous avons isolé et identifier des bactéries ayant un potentiel du biodégradation des hydrocarbures et production du biosurfactant.

Tableau 3 : Les sites de prélèvement des échantillons

Echantillon	Nature de l'échantillon	Lieu de prélèvement
Ech 1	Eau huileuse	Port de pêche de salamandre, Mostaganem
Ech 2	Boue d'épuration biologique	Station d'épuration d'Arzew, Oran

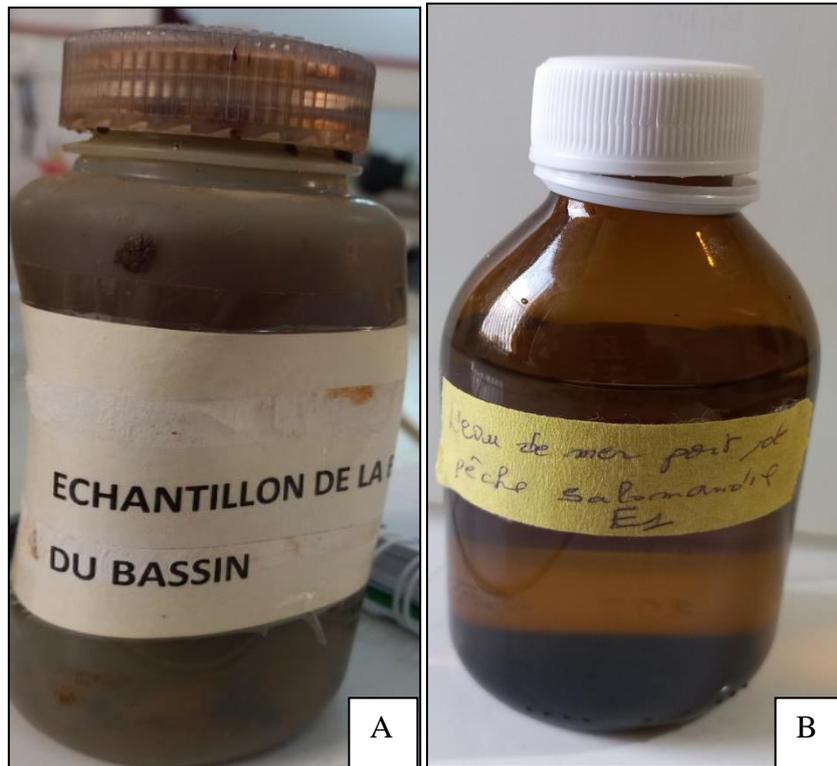


Figure 1: les différents échantillons prélevés (Echantillon du boue du station d'épuration d'Arzew à Oran et l'eau de mer de port de pêche de salamandre à Mostaganem)

A : Boue d'épuration biologique

B : Eau de mer

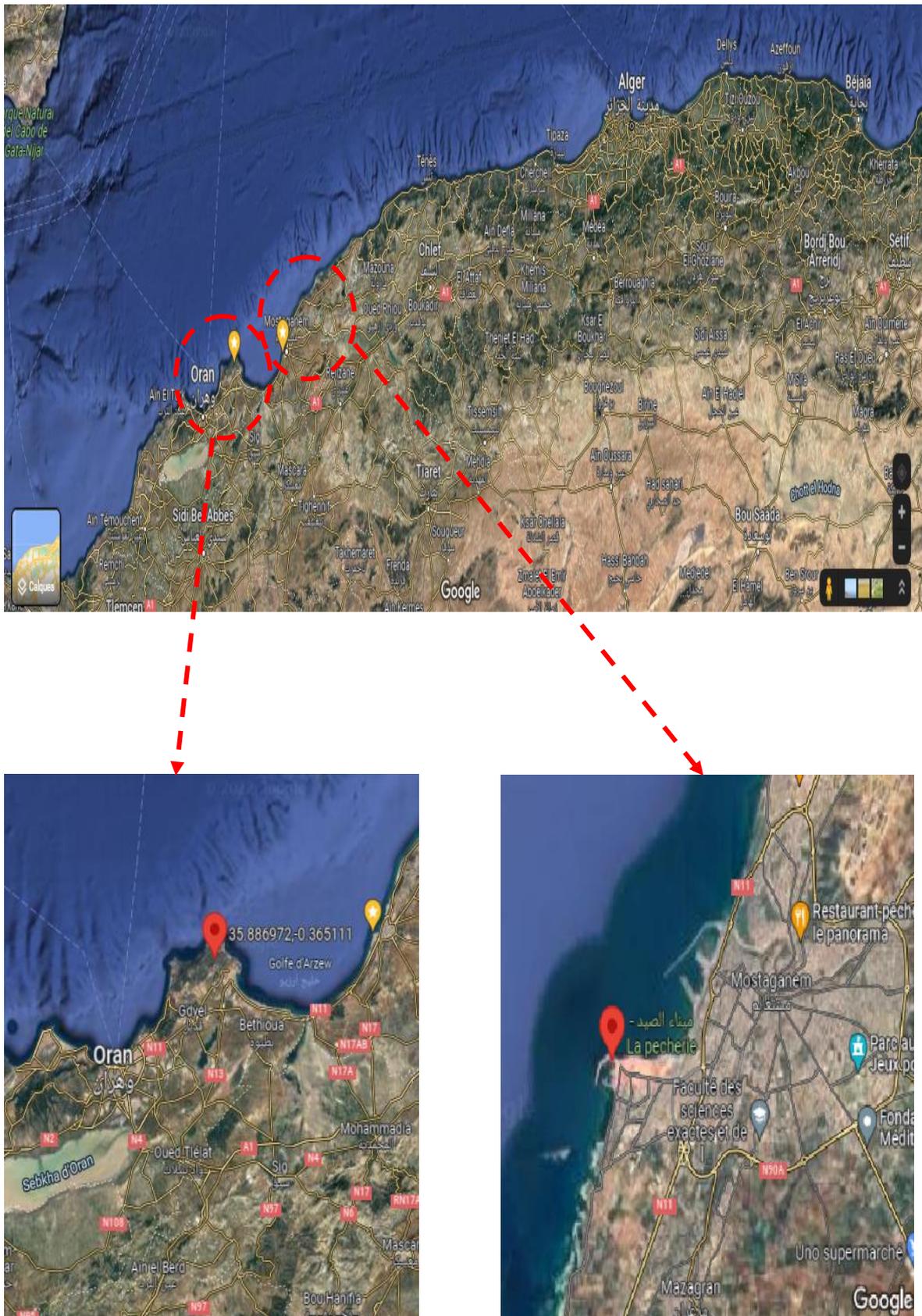


Figure 2: Localisation des différents sites de prélèvement par le service Google Maps

II. Screening des bactéries qui dégradent le pétrole brut

L'isolement a été fait sur milieu minéral MSM (mineral salt medium) sans source de carbone ajouté supplémenté d'eau de mer autoclavé (composition voir l'annexe), additionné de 100µl de pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie (**Figure 3**).

Avec une anse de platine stérile, une gouttelette a été prélevée à partir de nos échantillons et ensemencé sous forme des stries en surface des boîtes Pétri.

L'incubation des boîtes s'est faite à l'obscurité et à 37 °C pendant 7 jours à 21 jours.

Une boîte Pétri contenant le milieu MSM additionné de pétrole brut uniquement sans échantillon a été considérée comme contrôle négatif (Jin Gao et al, 2021).

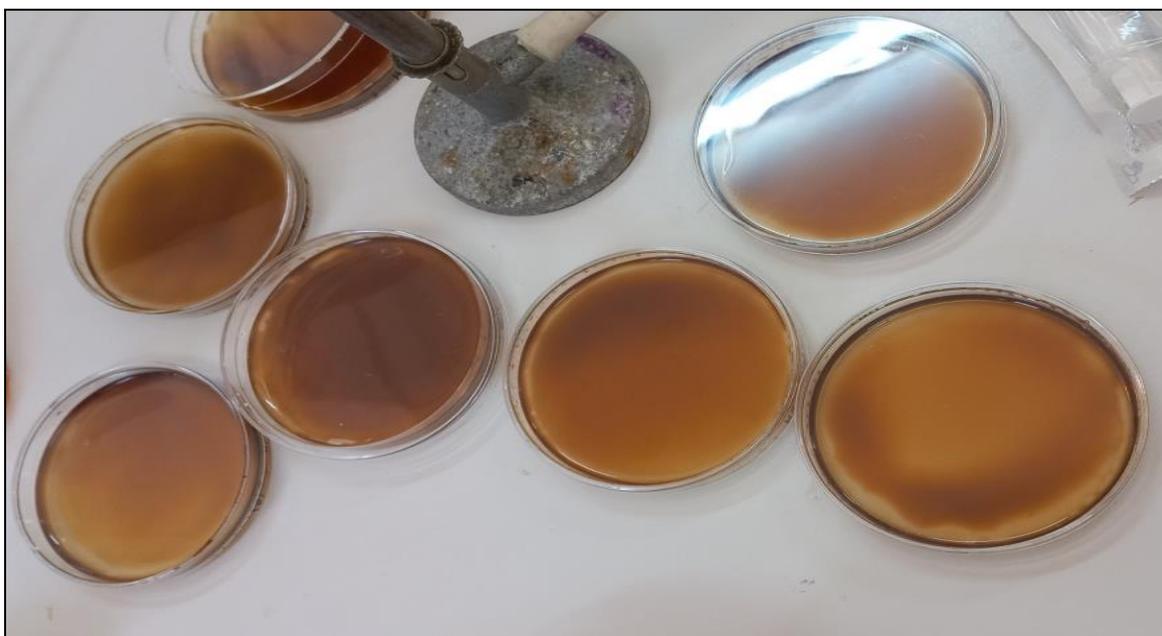


Figure 3: Milieu MSM additionnée le pétrole brut

II.1. Enrichissement et purification des isolats

Après 12 jours d'incubation, nous passons à l'étape de l'enrichissement des cultures. A partir des boîtes de MSM incubées, les colonies qui ont poussé sur pétrole brut ont été repiquées dans du bouillon nutritif (milieu liquide BN). Les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 24 à 48 heures. Une série de dilution a été réalisée avec BN allant de 10^0 jusqu'à 10^{-2} et la concentration 10^{-2} ont été ensemencé sur une gélose nutritive.

Une purification a été réalisée par un repiquage des colonies sur milieu GN à fin d'obtenir des cultures pures (Forhad Hossain et al., 2022).

II.2. Conservation des souches bactériennes

Les isolats purifiés sur milieu GN ont été transférée par une anse de platine stérile dans des tubes contenant 9 mL de milieu BN, les tubes ont été bien agités puis incubés à 37 °C pendant 24 h.

Après 24 h d'incubation, 1 mL de la culture des isolats est centrifugée à 3000 t/m pendant 20 minutes. Le culot est récupéré et additionné de 1 mL de milieu de conservation précédemment autoclavé qui contient BN et glycérol à 20 % (v/v), les tubes Eppendorf ont été conservés à -20 °C (Hassanshahian et al., 2014).

III. Étude du potentiel de dégradation des hydrocarbures

III.1. Préparation des isolats pour les tests de dégradation

Suite au screening et isolement des bactéries sur milieu MSM solide, une culture des isolats a été lancée dans 9 mL de milieu nutritif liquide (BN) et incubée à 37° C pendant 24 h.

Après 24 h d'incubation, la croissance de ces bactéries est mise en évidence par un trouble dans le milieu de culture.

Les suspensions bactériennes ont été récupérées par centrifugation à 3000 t/m pendant 20 minutes.

Les culots ont été lavés par MSM liquide trois fois, en ajoutant 1 mL de MSM liquide aux culots et centrifugés à 3000 t/m pendant 20 minutes. Puis les culots ont été récupérés pour les études de dégradation.

III.2. Etude de la dégradation du pétrole brut

Les culots lavés, ont été re-suspendu dans des tubes contenant 12 mL de MSM liquide additionné de 100 µl de pétrole brut stérile, puis vortexé et incubés à 30 °C pendant 8 jours à l'obscurité et sous agitation (**Figure 4**).

Un tube contenant 12 mL de bouillon MSM additionné de pétrole brut est considéré comme contrôle négatif.

Le suivi de la densité optique (DO) a été réalisé tous les jours pendant 8 jours à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

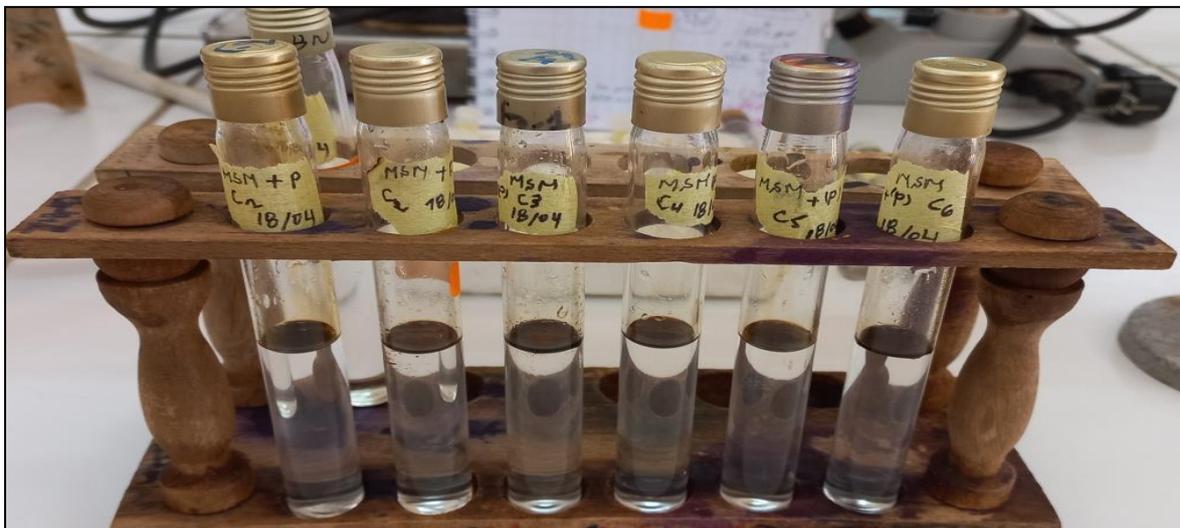


Figure 4: Milieu MSM liquide additionnée du pétrole brut

III.3. Etude de la dégradation du diesel

Les culots lavés, ont été ensemencé dans des tubes contenant 12 mL de MSM liquide additionné de 100µl de diesel provenant d'une station de service Naftal, puis agiter et incubé à 30 °C pendant 8 jours à l'obscurité et sous agitation continue (**Figure 5**).

Un tube contenant 12 mL de bouillon MSM additionné du diesel est considéré comme contrôle négatif.

La densité optique (DO) a été mesurée quotidiennement à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

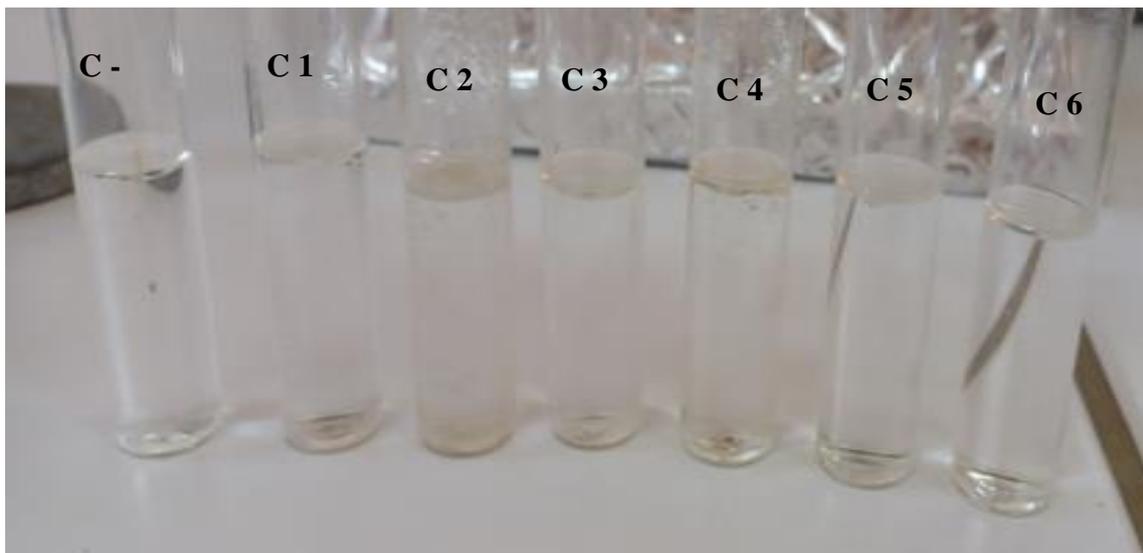


Figure 5: Milieu MSM liquide additionnée du diesel

III.4. Etude de la dégradation de l'essence

Les culots final a été ensemence dans des tubes contenant 12 mL de MSM liquide additionné de 100µl d'essence provenant d'une station de service Naftal , puis agites et incubes à 30 °C pendant 8 jours à l'obscurité et sous agitation.

Un tube contenant 12 mL de bouillon MSM additionné de l'essence est considéré comme contrôle négatif.

La densité optique (DO) a été mesurée quotidiennement à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

IV. Etude de la biostimulation des isolats

Dans de nombreuses situations, certaines conditions environnementales peuvent être modifiées pour améliorer le processus de biodégradation.

Dans la biostimulation, les micro-organismes qui dégradés les hydrocarbures sont stimulés pour augmenter leur potentiel de dégradation par l'ajout de facteurs de croissances tels que les nutriments comme le Nitrate, le Phosphate et potassium, ou les surfactant comme le Tween 80 ou même d'autres métabolites tel que le glucose pour augmenter le taux de dégradation des hydrocarbures (Adams, et al., 2015).

IV.1. La biostimulation par l'ajout du glucose

Les cultures cellulaires de chaque isolat ont été récupérées par centrifugation et ont été re-suspendu dans des tubes contenant 12 mL de MSM liquide additionné de pétrole brut et 1 mL de solution de glucose (0.5 mL de glucose mette dans 9 mL de l'eau physiologique stérile NaCl à 0.9 %).

Un tube contenant 12 mL de bouillon MSM additionné de pétrole brut et de glucose sans suspension bactérienne est considéré comme contrôle négatif (**Figure 6**).

Après une bonne agitation, l'incubation s'était faite à 30 °C pendant 8 jours à l'obscurité et sous agitation. La densité optique (DO) a été mesurée quotidiennement à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre pour voire la stimulation de la croissance des bactéries avec une autre source de carbone.

IV.2. La biostimulation par l'ajout du tween 80

Les cultures récupérées de chaque isolat ont été re-suspendu dans des tubes contenant 12 mL de MSM liquide additionné de pétrole brut et de 40µl de Tween 80 stérile.

Un tube contenant le milieu MSM et le pétrole brut additionné de Tween 80 est considéré comme contrôle négatif (**Figure 7**).

Après une bonne agitation les tubes ont été incubés à 30 °C pendant 8 jours à l'obscurité et sous agitation. La densité optique (DO) a été mesurée quotidiennement à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.



Figure 6: Milieu MSM liquide additionnée du pétrole brut plus glucose



Figure 7: Milieu MSM liquide additionnée du pétrole brut plus tween 80

V. Screening de la production de biosurfactant

V.1. Méthode de déplacement d'huile

Dans cette méthode on a MSM agar on ajoute 6 gouttes de pétrole brut comme seul source de carbone est étalées sur la surface des boites de milieu MSM agar, puis laisser sécher devant le bec benzène.

Les culots finals lavés avec MSM liquide ont étéensemencées par des déposé central sur la surface de gélose. Une boîte Pétri contenant le milieu MSM additionné de pétrole brut est considérée comme contrôle négatif. Les boîtes Pétri ont été incubés à 30°C pendant 21 jours à l'obscurité (**Figure 8**).

Le déplacement d'huile est évident par une zone claire à la surface de milieu (Chittepu, 2019) (**Figure 9**).

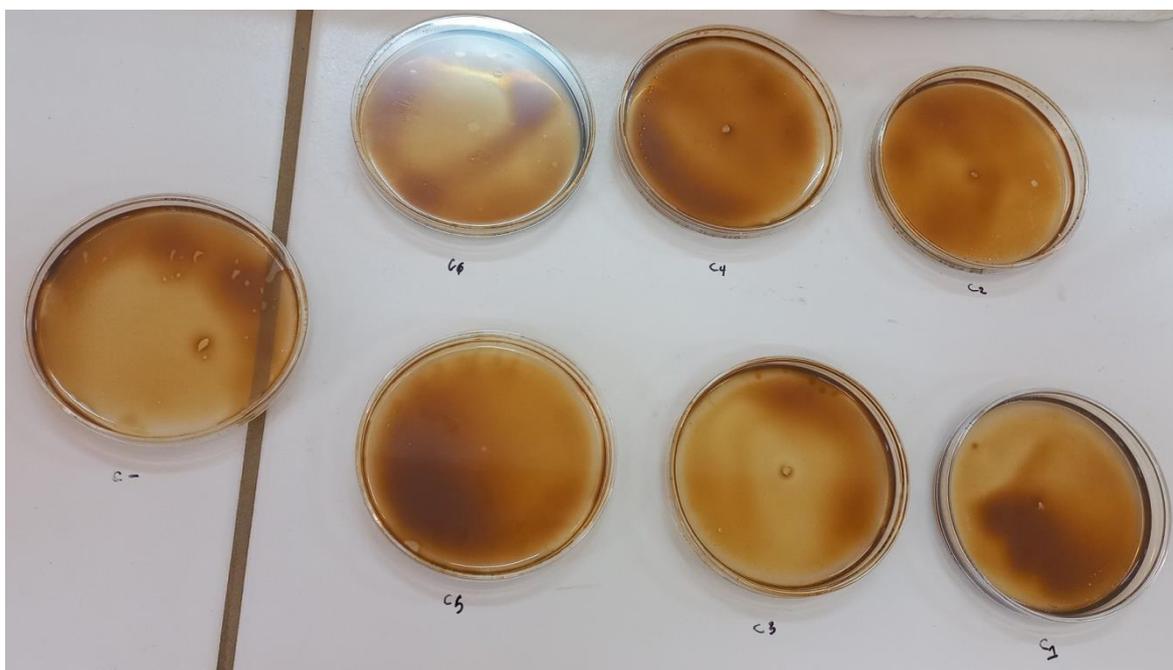


Figure 8: Etude de la biodégradation du pétrole brut par la méthode de déplacement d'huile « Oil displacement method » (Chittepu, 2019)

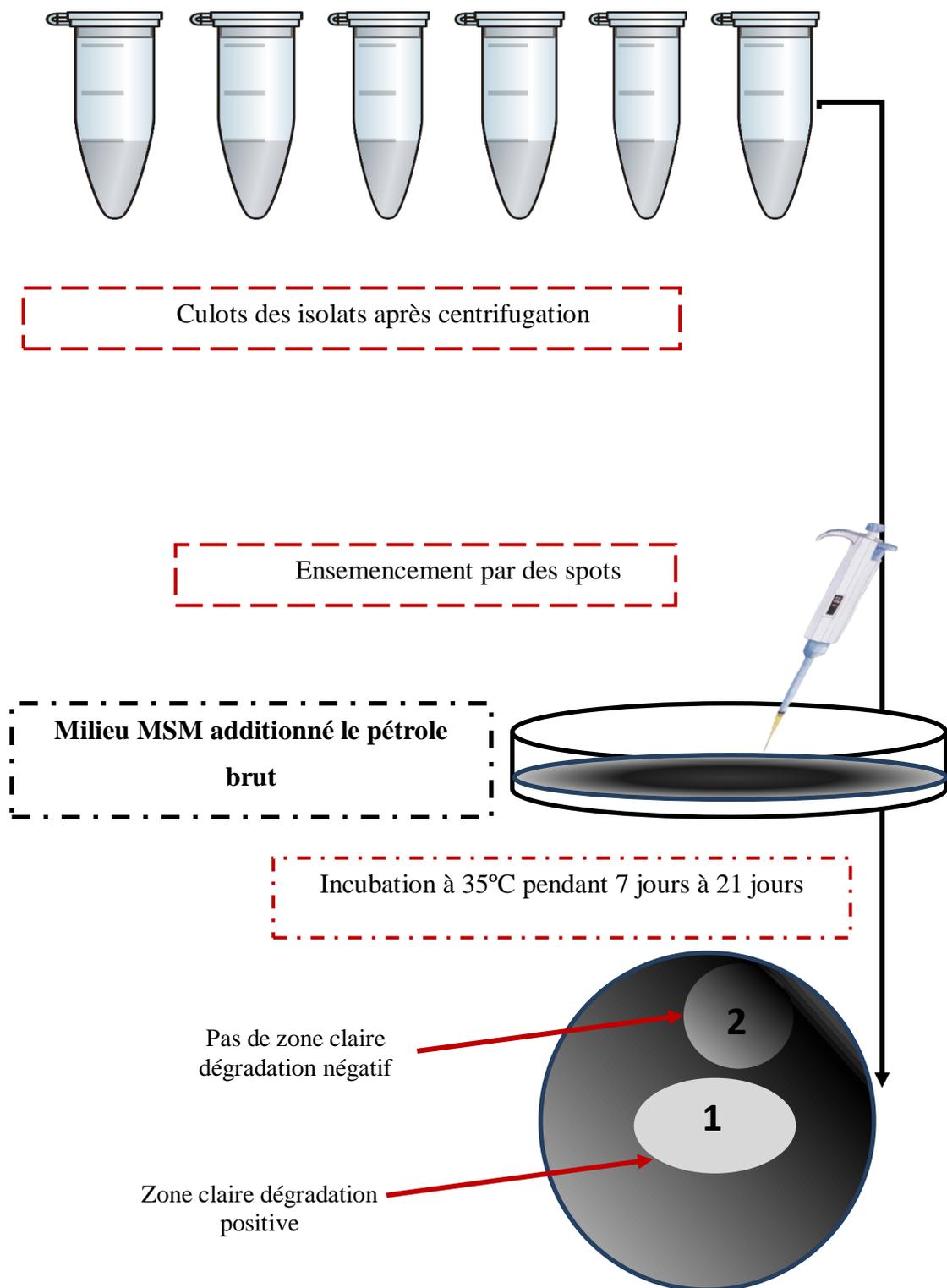


Figure 9 : Etude de la biodégradation du pétrole brut par la méthode de spray : « oil spreading technique »

V.2. Test du protéolyse

Pour ce test ont été préparé le milieu gélose à l'œuf, dans un flacon qui contient 200 ml de gélose Columbia (milieu de culture déshydraté) on ajoute 0.1 ml de Chlorure de calcium (CaCl₂) et 5 ml de jaune d'œuf, puis vortexer et couler le milieu dans des boites Pétri préalablement numérotées et laisser solidifier.

A partir des culots conserves ont été prélevé une goutte pour chaque isolat et ensemences dans les boites par étalement a l'aide d'une pipette pasteur forme râteau sur la surface de la gélose.

Les boites Pétri ont été incubés à 37 °C pendant 24h.

Une zone de précipitation blanche et opaque entourée la colonie indique une activité positive de la lécithinase.

V.3. Dosage de la lypase

V.3.1. Méthode directe

Milieu à base d'huile d'olive

Dans un flacon contient 200 ml de gélose Columbia ont été ajoute 0,1 mL de chlorure de calcium (CaCl₂) plus 4 mL de gamme d'arabique et 4 ml d'huile d'olive pasteurisé dans un bain Mari (70 °C) pendant 30 min, puis agité vigoureusement avant de couler les boites.

Après solidification de milieu, 10 µL de chaque suspension a été ensemences dans les boite par étalement a l'aide d'une pipette pasteur en forme de râteau sur la surface de la gélose (Chittepu, 2019)

Milieu à base de beurre

Dans un flacon contenant 200 ml de gélose Columbia on a ajouté 0,1 mL de chlorure de calcium (CaCl₂), 4 mL de gamme d'arabique et 4 ml de beurre pasteurisé dans un bain Mari (70 °C) pendant 30 min, puis vortexé bien et couler le milieu dans les boites Petri. 10 µL des suspensions ont été ensemencées dans les boites par étalement a l'aide d'une pipette pasteur en forme de râteau sur la surface de la gélose.

Les conditions d'incubation ont été les mêmes pour tous les milieux : à 37 °C et pendant 24 h (**Figure 10**).

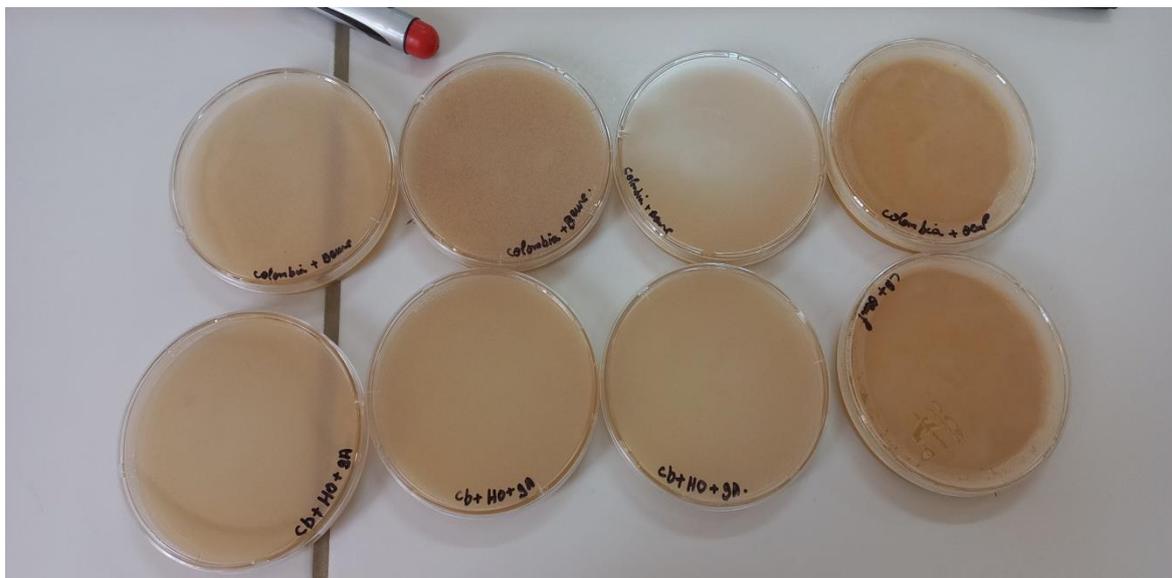


Figure 10: Des boîtes Pétri contenant le milieu de dosage de lypase

V.3.2. Méthode indirecte

Les cultures des isolats ont été lancés dans un milieu nutritif BN pendant 24h à 37 °C, puis 1 ml de chaque culture a été prélevé et mis dans des tubes Eppendorf stériles additionné de 0.5 ml de NaCl à 20 % (solution hypotonique) pour l'éclatement des cellules. Les surnagant ont été récupérée par centrifugation à 3000 t/m pendant 20 minutes.

Le principe de cette technique est que la cellule libèrera des enzymes lors de son éclatement qui elles seront testées dans les milieux suivant:

Milieu à base d'huile d'olive

Dans un flacon contient 50 ml de gélose Mueller-Hinton (MH) ont été ajoute 0,1 mL de chlorure de calcium (CaCl₂) plus 4 mL de gamme d'arabique et 4 ml d'huile d'olive pasteurisé dans un bain mari (70 C°) pendant 30 min, puis vortexé bien et couler le milieu dans les boîtes Petri.

A partir d'une micropipette ont été prélevé 20 μ l de surnagent de chaque isolat, puis l'ensemencement a été fait par dépôts sur des puits préalablement formés dans la gélose (**Figure 11**).

Milieu à base de Tween 80

Dans un flacon contient 50 ml de gélose MH ont été ajoute 0,1 mL de chlorure de calcium (CaCl_2) plus 4 mL de gamme d'arabique et 2.5 mL de tween 80 à 5 % pasteurisé dans un bain mari (70 C°) pendant 30 min, puis vortexé bien et couler le milieu dans les boites Petri.

Après solidification de milieu ont été fait des puits sur la gélose (**Figure 11**), a l'aide d'une micropipette ont été prélevé 20 μ l de surnagent de chaque isolat et déposé dans les puits.

Les conditions d'incubation ont été les mêmes pour tous les milieux : à 37 °C et pendant 24 h



Figure 11: Milieu Mueller-Hinton (MH) + Tween 80 à 5%; Milieu MH + huile d'olive

V.4. Activité hémolytique

Dans cette méthode, 10 μ l de bouillon de culture d'une nuit des isolats sélectionnés ont été inoculés sur une gélose au sang de cheval à 5 % et les plaques ont été incubées à 37°C pendant 48 h. Les présences de zone de lyse autour des colonies ont été vérifiés (Chittepu, 2019) (**Figure 12**).



Figure 12: Ensemencement des isolats sur gélose au sang de cheval à 5%

VI. Caractérisation des isolats

VI.1. Observation macroscopique

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

VI.2. Observation microscopique

Test de coloration de Gram

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

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

D'abord, une première coloration par le violet de gentiane (ou cristal violet) pendant 1 min. En suit le mordantage par l'ajout du Lugol durant 1 min, puis un rinçage à l'eau. Troisièmement, une décoloration avec de l'alcool 90° (10 seconde) succédé par un rinçage à l'eau. Enfin la contre coloration avec la safranine (ou Fuschine) durant 1 min. les lame

sont rincé à l'eau de robinet et sécher à l'air ou entre deux papier absorbant (Denis *et al.*, 2007).

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

Test de la sporulation

Ce test permet de mettre en évidence la présence de spores dans une cellule bactérienne. Réaliser un frottis fixé sur lame de verre. Recouvrir la lame avec une solution aqueuse au vert de malachite à 0,5% et chauffer jusqu'à émission de vapeurs. Laisser refroidir et chauffer nouveau. L'opération doit durer 10 min. Laver à l'eau. Contre-colorer en recouvrant la lame d'éosine durant 2 min. Laver et sécher. Observation à l'objectif 100 à immersion. Les spores apparaissent vertes et les cellules roses, elles peuvent être déformantes ou non déformantes terminales, subterminales ou centrales (Joffin et Leyral, 1997).

Observation de la mobilité

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

VI.3. Isolement dans des milieux sélectifs

Isolement sur milieu King A et King B

Les isolats ont été ensemencés par des stries sur la surface de milieu King A et King B (composition voir l'annexe). L'incubation a été effectuée à 30°C pendant 24 heures.

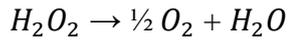
Isolement sur milieu Hektoen

Les isolats ont été ensemencés par des stries sur la surface de milieu gélose Hektoen (composition voir l'annexe). L'incubation a été effectuée à 30°C pendant 24 heures.

VI.4. Tests respiratoires

Test catalase

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



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

Nitrate réductase

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

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

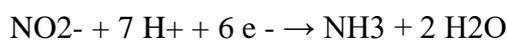
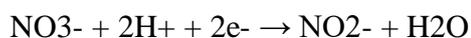
En cas où le milieu reste incolore, on ajoute du zinc (réducteur des nitrates). Après quelques minutes, une coloration rouge montre la présence de nitrites : la bactérie est Nitrate réductase - (il y avait des nitrates dans le milieu qui ont été réduits par le zinc). Une absence de coloration montre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

Les bactéries peuvent utiliser les nitrates de deux façons :

❖ Réduction des nitrates en azote: respiration nitrates en anaérobiose



❖ Réduction des nitrates en nitrites puis NH₃: réduction assimilatrice



Type respiratoire à la gélose Viande-foie:

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

- Si la croissance bactérienne est en surface, la bactérie est aérobie stricte.
- Si la croissance est au fond de tube, la bactérie est dite anaérobie stricte.

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

VI.5. Métabolisme glucidique

Test de croissance sur gélose TSI (Triple sugar iron)

Les bactéries ciblées dans ce test sont les bactéries Gram négatifs à oxydase négative.

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

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

Réaction de Voges-Proskauer

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

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

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

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

Utilisation du citrate

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

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

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

Partie III : Résultats et Discussion

Résultats

I. Screening des bactéries qui dégradent le pétrole brut

Un total de six colonies a été isolé sur le milieu MSM supplémenté avec le pétrole brut comme seule et unique source de carbone et d'énergie ceci a partir des échantillons d'eau de mer et de boue polluées (**Figure 13**).

Nous avons observé que la quantité de pétrole il est disparu pendant la durée d'incubation, ceci prouve la capacité des bactéries à dégrader le pétrole comme seul source de carbone.

Pour l'échantillon d'eau de mère (E2) la quantité de pétrole a été disparue complètement alors que l'échantillon de sol (E1) 3/4 de la quantité du pétrole disparue.

Le **tableau 4** nous montre les différents aspects des colonies.

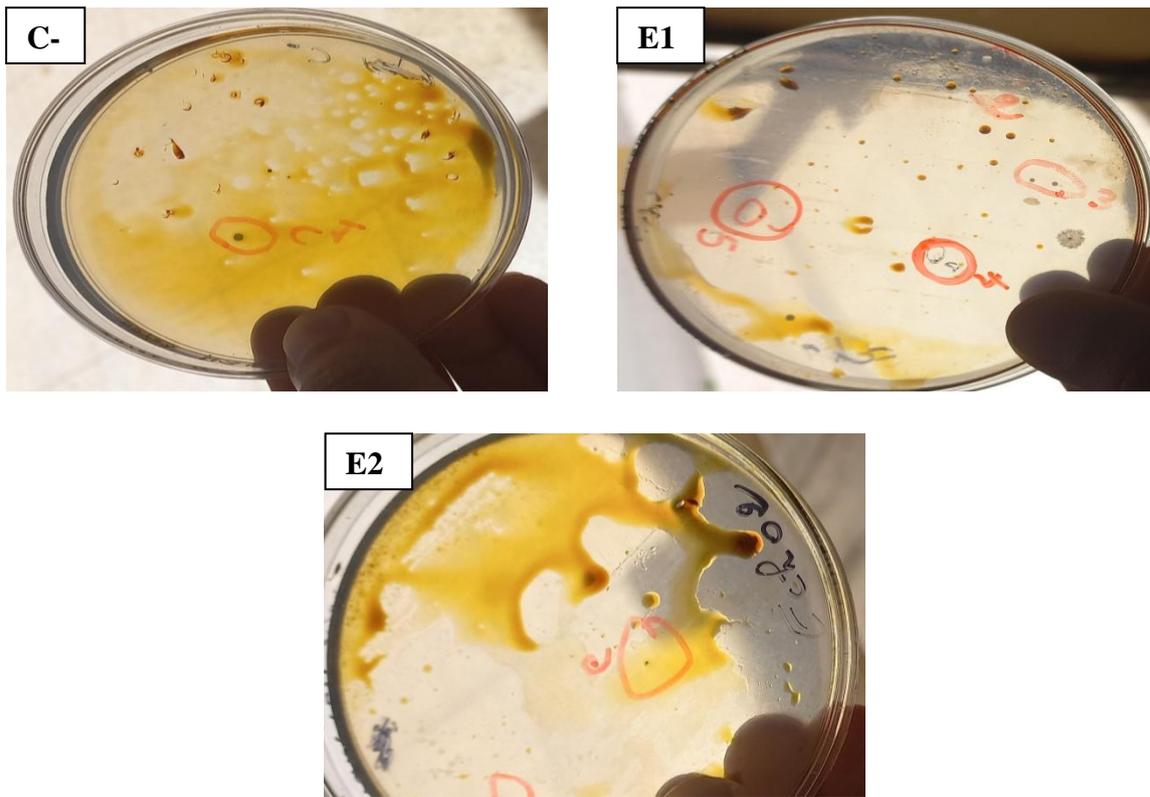


Figure 13 : Résultats d'isolement sur milieu gélose MSM additionnée le pétrole brut après 12 jours d'incubation. Contrôle négatif (C-) : MSM + pétrole sans échantillon

Tableau 4 : Résumé les résultats obtenus sur milieu MSM solide + pétrole

Echantillon	colonie	Observation macroscopique	Forme/ aspect	Couleur
C - (contrôle négatif)	C1		Ronde, bombé(pvoient de pétrole)	Jaune
E1	C2		Ronde, visqueuse, contour transparent régulié	Blanche
	C3		Ronde, petite, contour régulié	Blanche
	C4		Très petites, brillante	Transparente après l'incubation sont devenir marron (pétrole)
	C5		Petite, la quantité de pétrole presque disparu à la surface du gélose	Beige (Jaunâtre pale)
E2	C6		Petite, a poussé sur pétrole, ronde	Blanche

I.1. Enrichissement et purification des isolats

La purification à été fait sur milieu GN suite a une série de dilution, l'étape de la purification à confirme les colonies que nous avons déjà observés sur milieu MSM additionnée le pétrole brut (**Figure 14**).

Cette étape a été suivie par une culture BN pour conserver a fin de conserves les souches.

Les caractères macroscopiques des souches isolées sont regroupés dans le **tableau 5**.

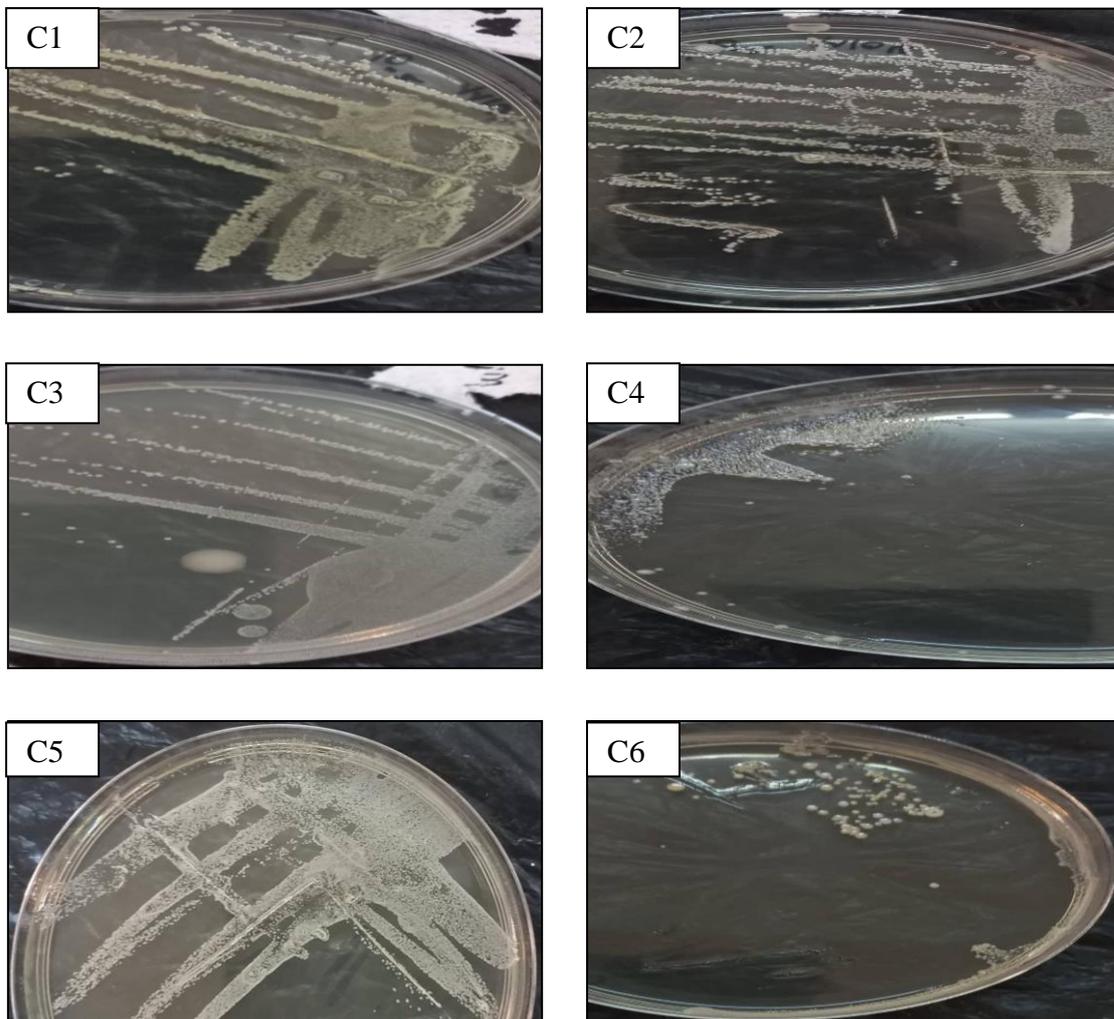


Figure 14: Résultats de purification des isolats sur milieu GN après 24h

Tableau 5 : Les caractères macroscopique des isolats sur gélose nutritive

Colonie	Forme	Bord	Couleur	Aspect	Opacité	Consistance	Élévation
C1	Ronde	Régulier	Jaune	Lisse	Opaque	Crémeuse	Bombée
C2	Ronde	Contour transparent régulier	Blanche	Lisse et brillante	Opaque	Visqueuse	Convexe
C3	Ronde	Régulier	Blanche	Rugueuse	Opaque	Incrusté	Plane
C4	Punctiforme	Irrégulier	Blanche	Lisse et brillante	Opaque	Visqueuse	Elevée
C5	Ronde	Irrégulier	Beige (Jaunâtre pale)	Rugueuse	Opaque	Crémeuse	Plane
C6	Circulaire	Régulier	Blanche	Lisse	Opaque	Visqueuse	Bombée

I.2. Conservation des souches bactériennes:

La conservation des souches bactériennes été faite par l'ajout de milieu de conservation qui contient BN et glycérol à 20 % (v/v) après la récupération des suspensions bactériennes par centrifugation à 3000 t/m pendant 20 minutes (**Figure 15**).

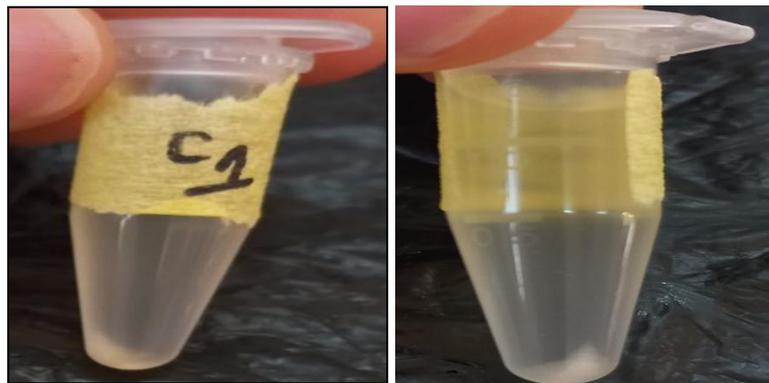


Figure 15: Récupération des culots après centrifugation à 3000 t/m pendant 20 minutes pour la conservation

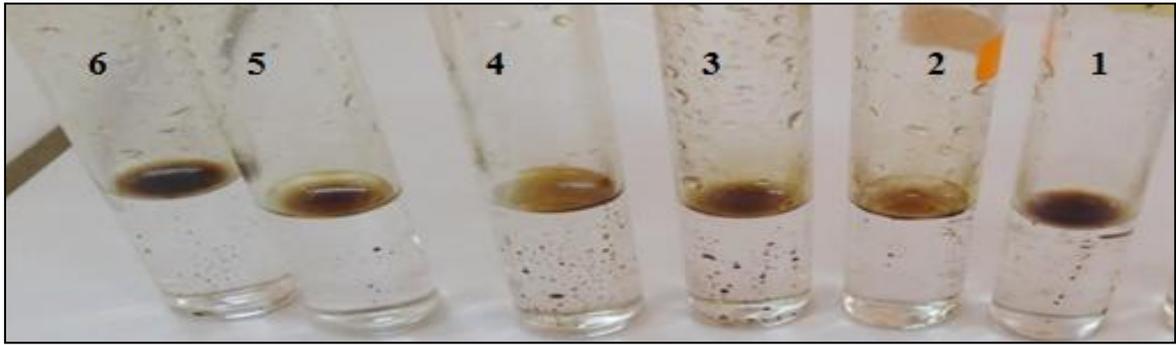
II. Étude du potentiel de dégradation des hydrocarbures

II.1. Etude de la dégradation du pétrole brut

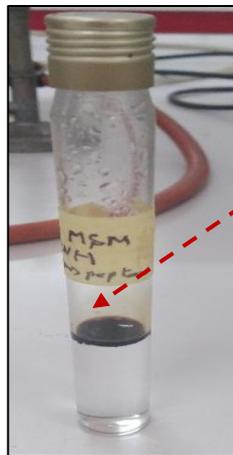
Les six isolats sélectionnés ont été testés dans un milieu MSM liquide additionné le pétrole brut pendant 21 jours à l'obscurité et sous agitation. Les résultats sont montrés dans la **figure 16**

Toutes les cultures présentant une croissance bactérienne avec des huiles fixées à la paroi des tubes. Nous avons observe que l'anneau de pétrole disparu dans les cultures bactériennes sauf la culture 1 apparu un anneau presque disparu.

Dans la culture 5 il ya une formation des gouttelettes d'huile fixé à la paroi du tube.

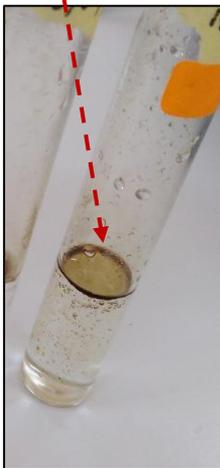


Observation d'un Anneau claire de pétrole à la surface de MSM+ gouttelettes d'huile collées à la paroi du tube après incubation



**Contrôle négatif :
MSM + pétrole brut**

C6



C3



Figure 16: Résultat d'étude de la dégradation du pétrole brut après 21 jours d'incubation à l'obscurité et sous agitation

Suite à la mesure de la DO mesurée à 600 nm pendant 8 jours à l'aide d'un spectrophotomètre UV à partir des cultures liquides précédentes, nous avons remarqué que la croissance bactérienne avait commencé dès le deuxième jour d'incubation. Cette croissance était croissante pour les cultures 1, 2, 3, 4 et 6 alors que les cultures 5 et le contrôle négatif a commencé à partir le quatrième jour d'incubation (**Figure 17**). .

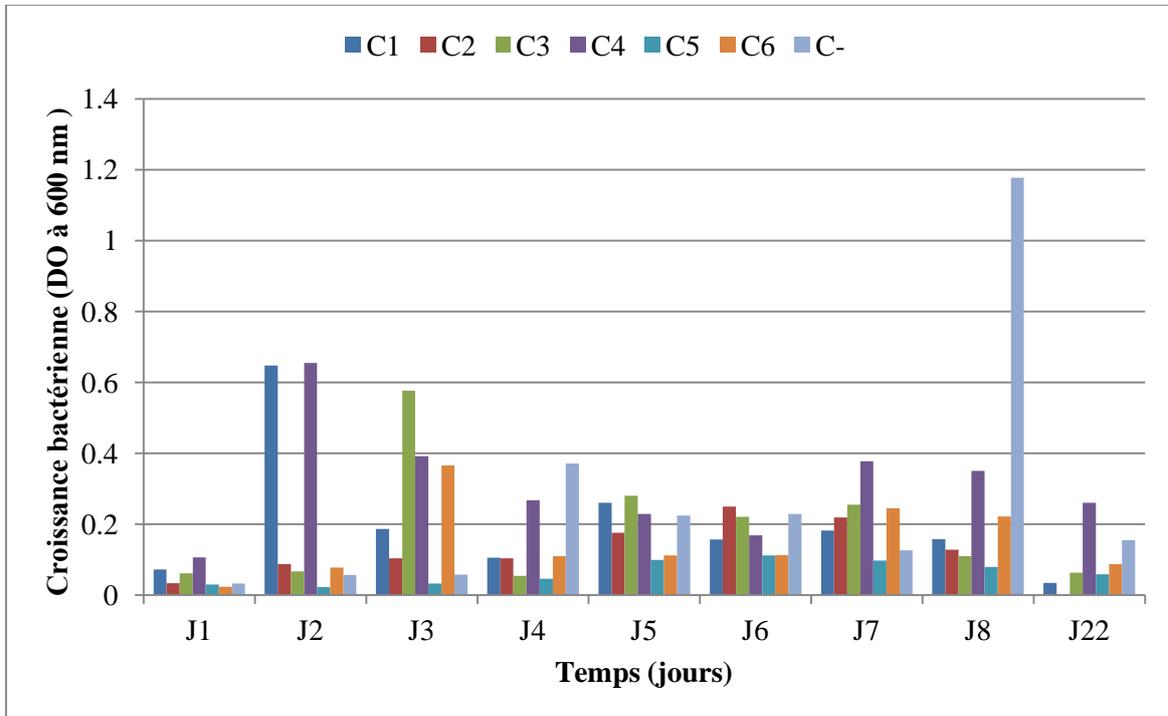


Figure 17: Croissance bactérienne d'isolats dans milieu MSM liquide additionné de pétrole brut

II.2. Etude de la dégradation du diesel

La **figure 18** montrée les six isolats sélectionnés dans milieu MSM liquide additionné du diesel après 24 h d'incubation à l'obscurité et sous agitation. Les cultures des isolats à été comparé avec le contrôle négatif.

Les six cultures donné un trouble dans le milieu. La culture 2 montrée une croissance important que les autres cultures.

D'après nos observations, il ressort que l'anneau du diesel été présente dans les cultures sauf la culture de l'isolat 2 l'anneau à été disparu (le diesel consommé).

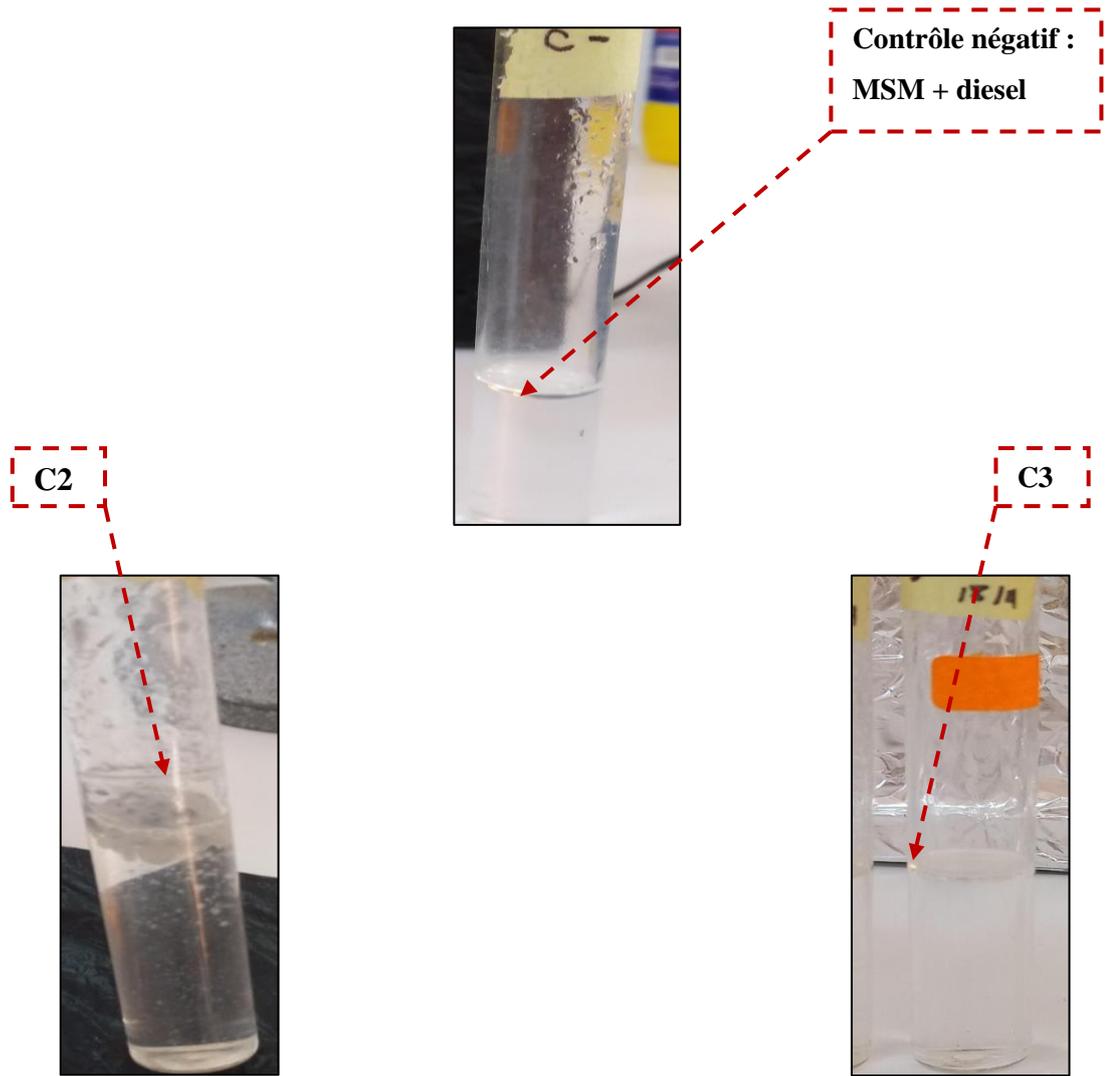
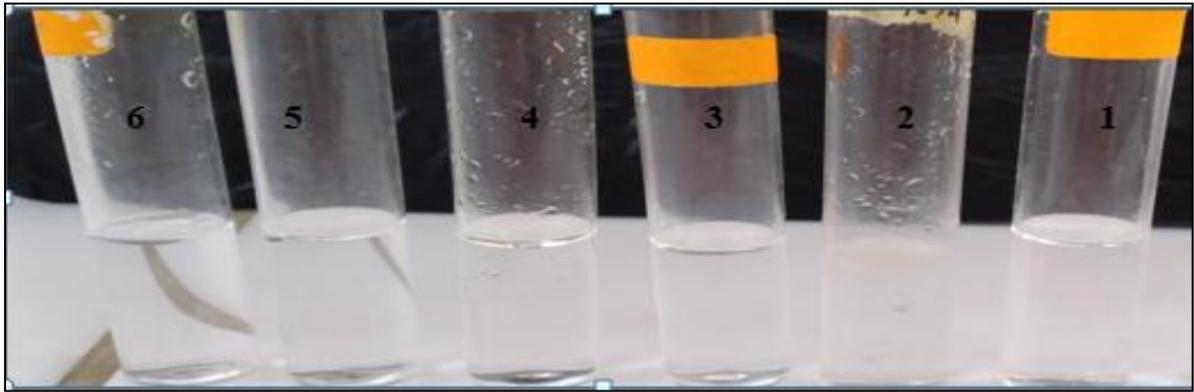


Figure 18 : Résultat de test de la dégradation du diesel après 21 jours d'incubation à l'obscurité

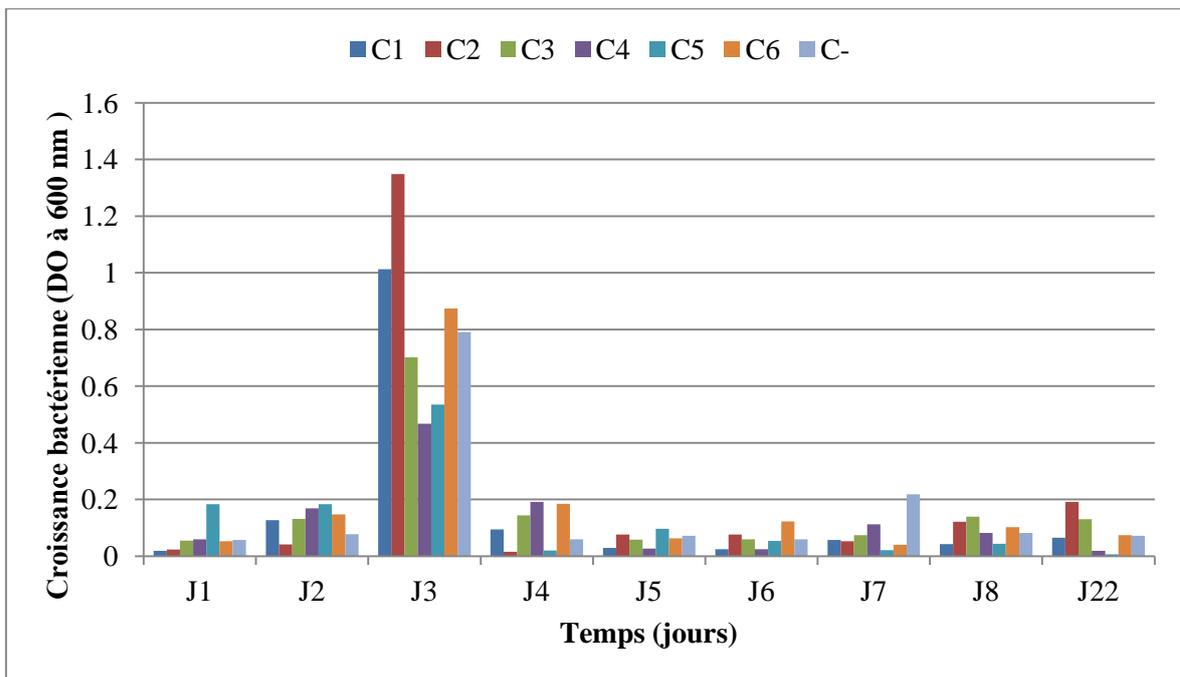


Figure 19 : Croissance bactérienne d'isolats dans milieu MSM liquide additionné de Diesel

II.3. Etude de la dégradation de l'essence

Les colonies C1, C2, C3, C4, C5, C6 ont été testé dans un milieu MSM liquide supplémenté avec l'essence pendant 21 jours à l'obscurité et sous agitation.

Les résultats est porté dans la **figure 20**. Nous avons observés que toutes les cultures présentant une croissance bactérienne faible avec des huiles collés à la paroi des tubes, l'anneau d'essence présent à la surface du milieu des six isolats.

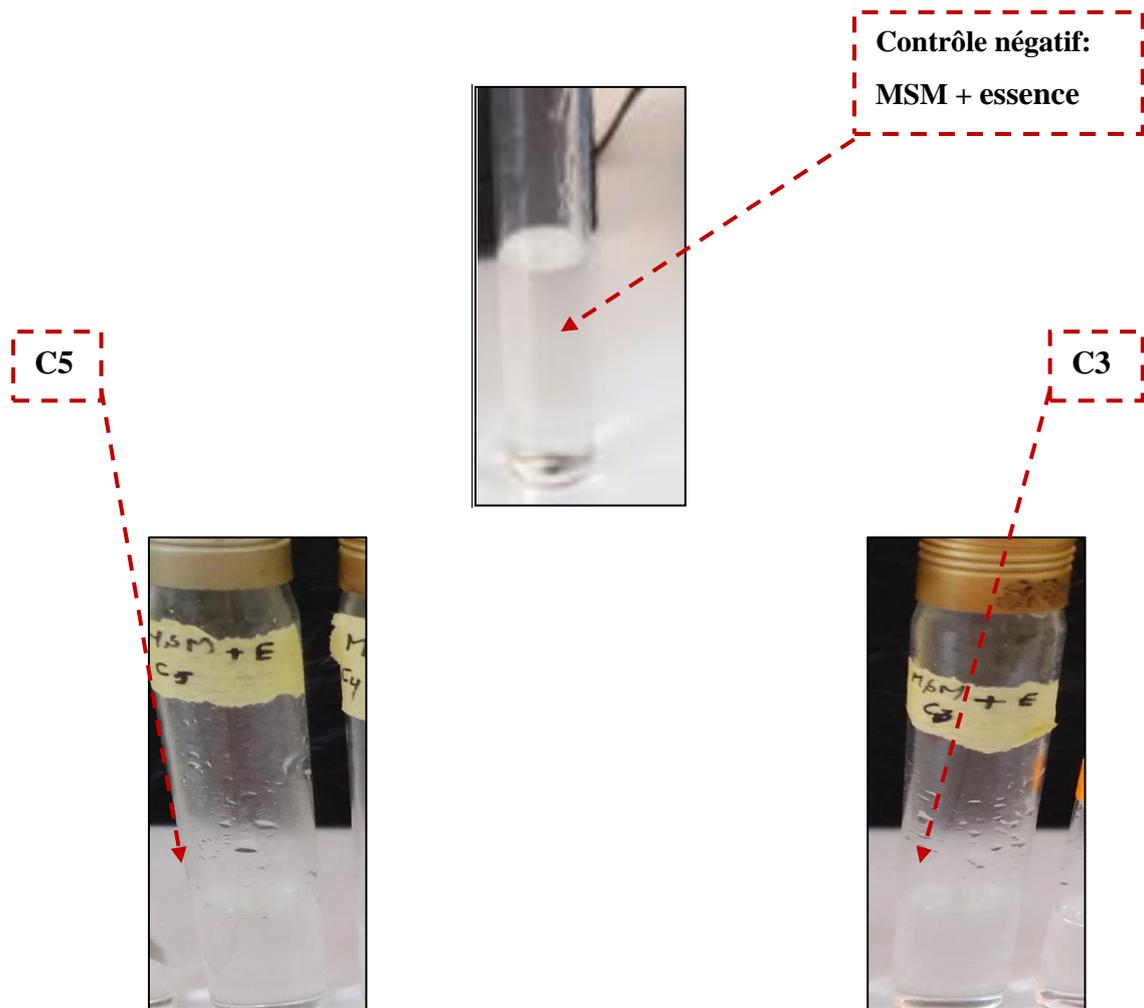
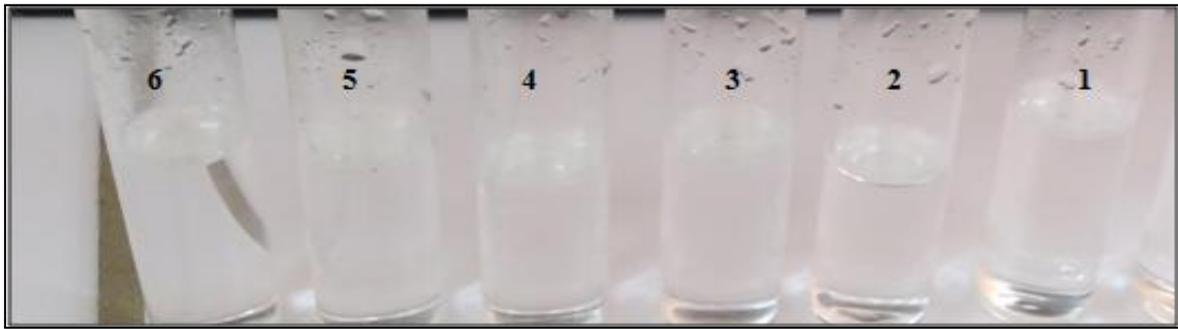


Figure 20 : Résultat de test de la dégradation de l'essence, après 21 jours d'incubation

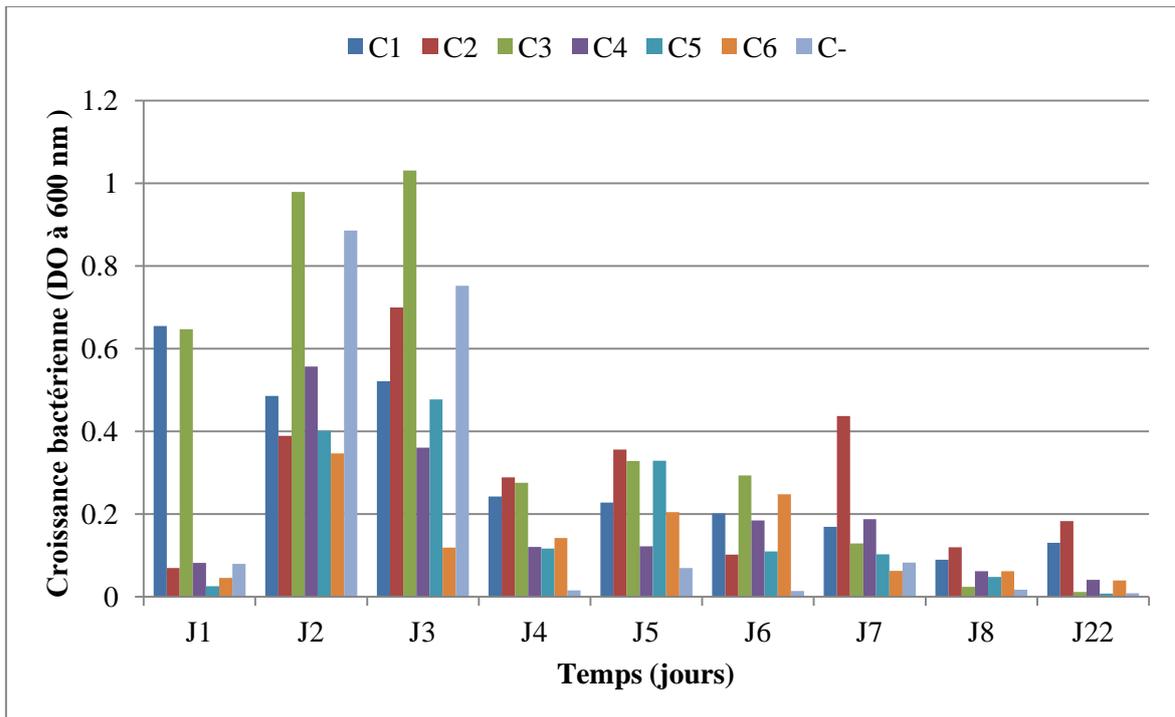


Figure 21: Croissance bactérienne d'isolats dans milieu MSM liquide additionné d'Essence

III. Etude de la biostimulation des isolats

III.1. La biostimulation par l'ajout du glucose

Les 6 isolats ont été testés sur milieu MSM liquide supplémenté le pétrole brute et le glucose pendant 21 jours à l'obscurité et sous agitation.

Tous les cultures donne un trouble dans le milieu qui indiquant la présence de la croissance bactériens (**Figure 22**).

Les cultures 1, 2, 4, 5 et 6 l'anneau de pétrole disparu tandis que la culture 3 l'anneau de pétrole présent sur la surface de milieu MSM.

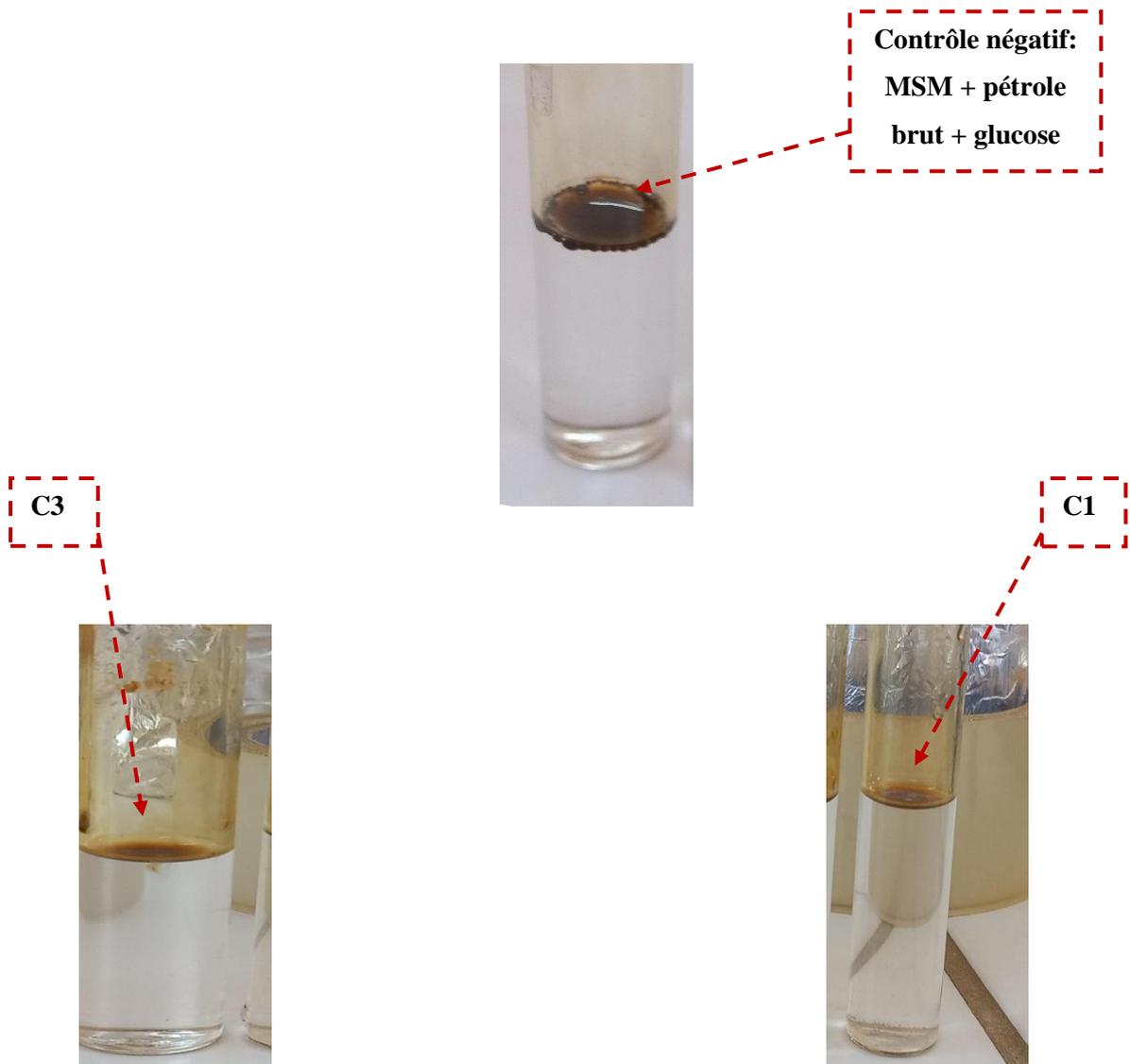
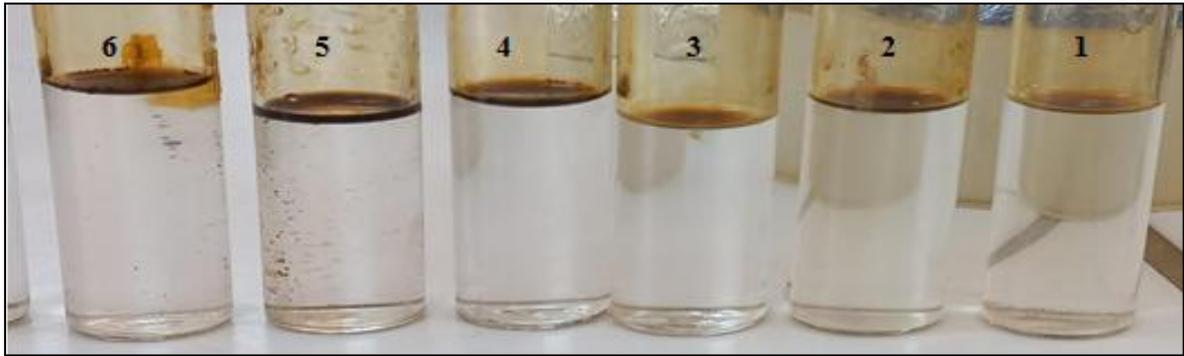


Figure 22 : Résultats de la biostimulation par l'ajout de glucose après 21 jours d'incubation à l'obscurité et sous agitation

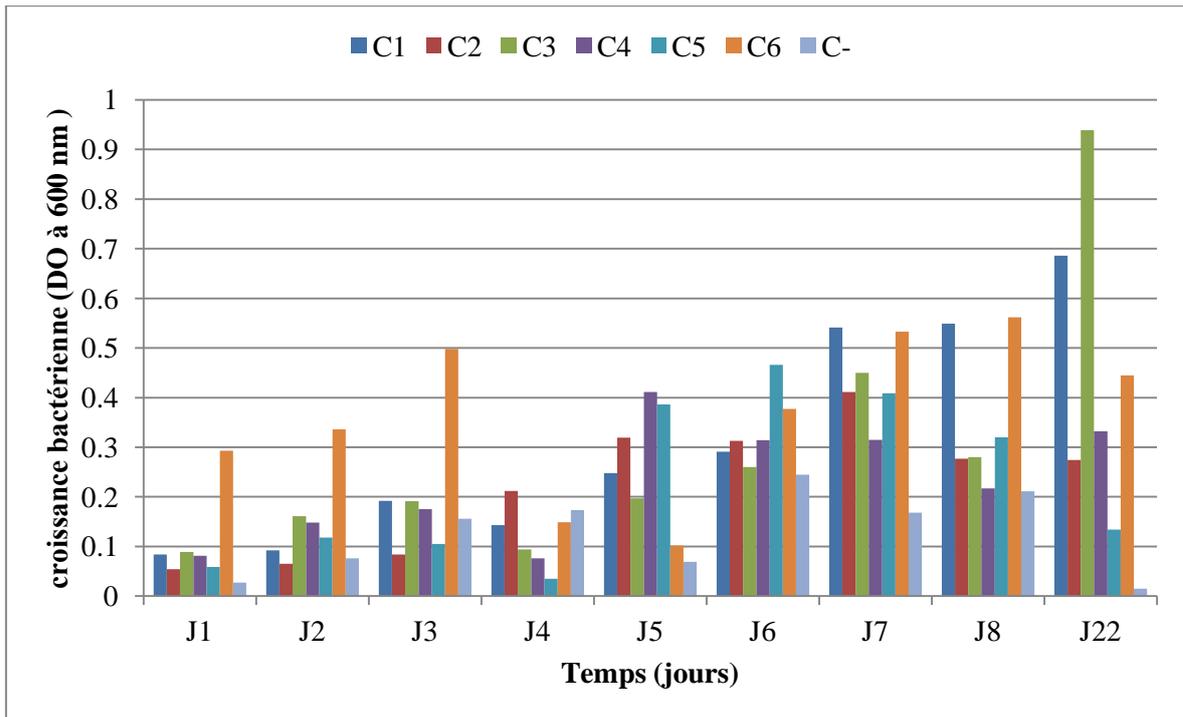


Figure 23 : Croissance bactérienne d'isolats dans milieu MSM liquide additionné de Pétrol brut + Glucose

III.2. La biostimulation par l'ajout du tween 80

Les six isolats ont été testés dans milieu MSM liquide additionné le pétrole brute et le Tween 80 pendant 21 jours à l'obscurité et sous agitation.

Après 21 jours d'incubation les six cultures apparaissent un trouble dans le milieu indiquant la croissance des isolats.

Les cultures 2, 3, 4, 5 et 6 l'anneau de pétrole disparu et formation des gouttelettes d'huile dans les cultures 1 et 2 alors que la culture 4 le pétrole collé à la paroi du tube. La culture 1 l'anneau de pétrole presque disparu (**Figure 24**).

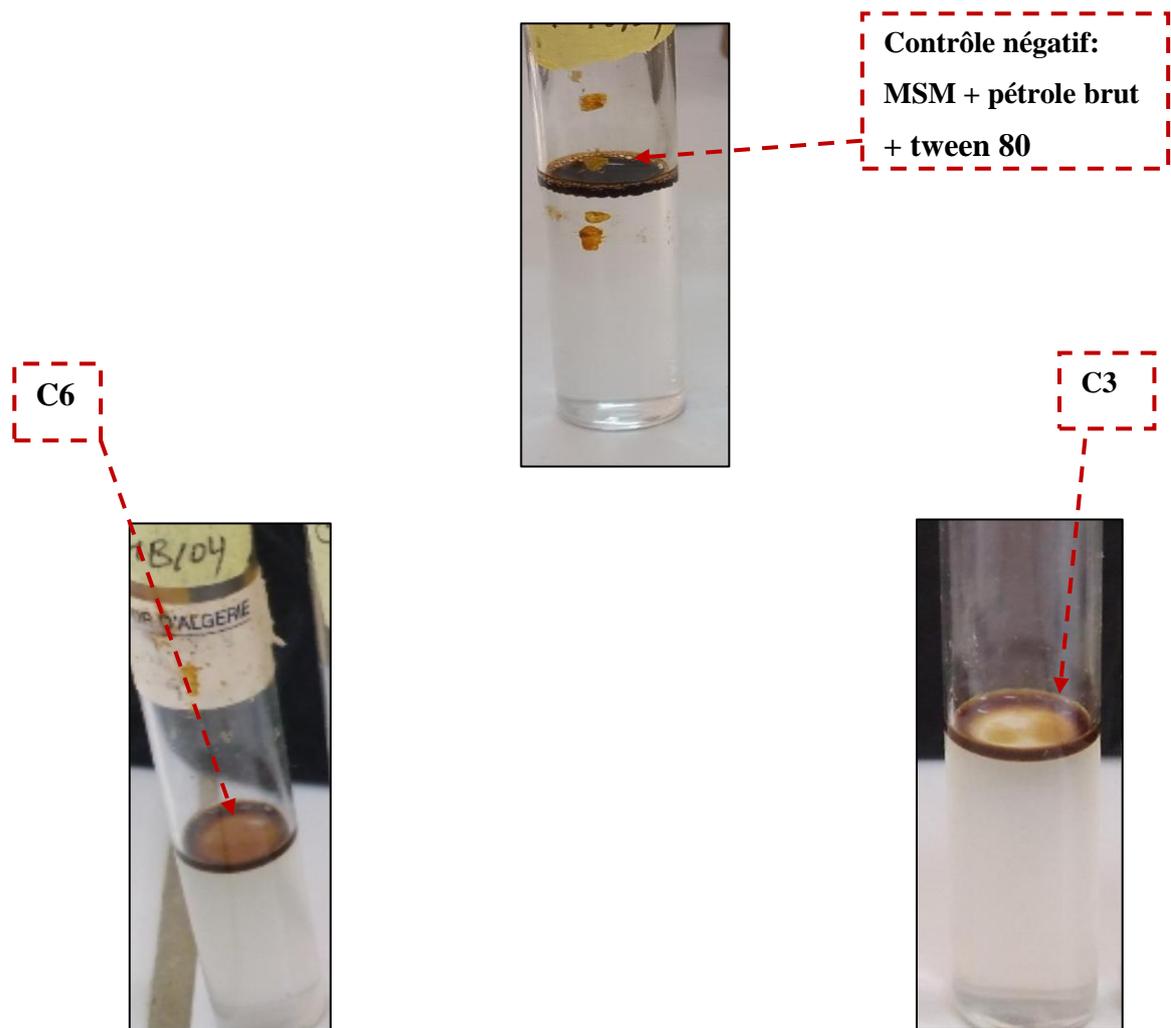
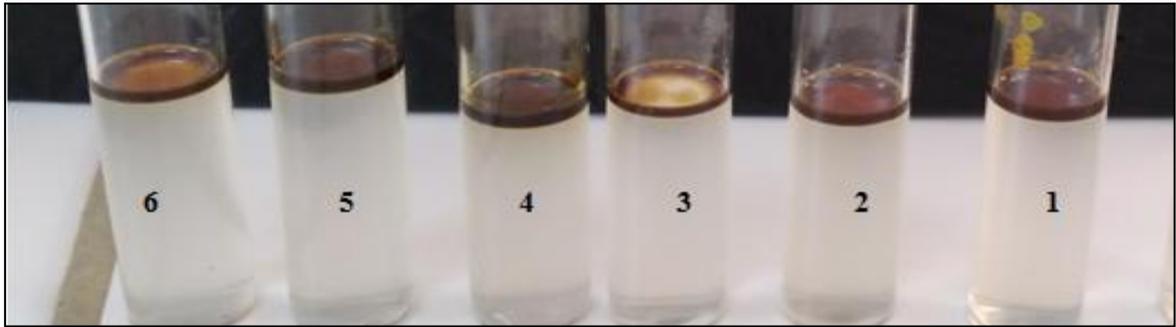


Figure 24 : Résultats de la biostimulation par l'ajout de tween 80 après 21 jours d'incubation à l'obscurité et sous agitation

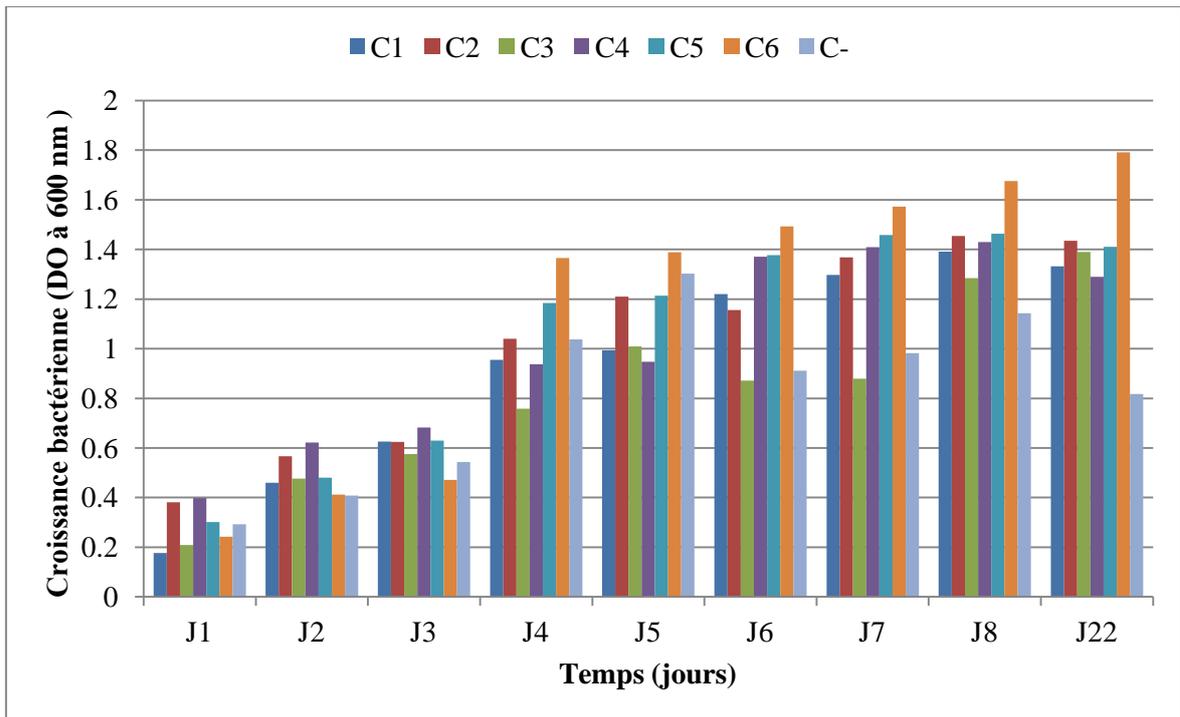


Figure 25 : Croissance bactérienne d'isolats dans milieu MSM liquide additionné de Pétrol brut + Twin 80

IV. Screening de la production de biosurfactant

IV.1. Méthode de déplacement d'huile

L'activité de biodégradation des hydrocarbures à été évident par une zone claire à la surface de milieu (Chittepu, 2019). Les résultats de ce test sont montrés dans la **figure 26**

Les 6 isolats ont montré des zones claires avec des diamètres bien claire et supérieur à 3.5 cm. La colonie 2 et 6 ont représenté un grande déplacement et croissance important sur la gélose alors que la colonie 5 montré une petite zone par rapport aux autres colonies

La souche C3 ont représenté une zone claire autour du dépôt varie de 3mm et une zone de déplacement varie à 4 cm avec une croissance bactérienne importante.

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

Les isolats C1, C2, C3, C4, C5 et C6 ont été testés sur milieu MSM supplémenté avec du pétrole brut comme seule source de carbone.

La **figure 27** montre que les zones claires varient entre 3,5 Cm et 8 Cm de diamètre.

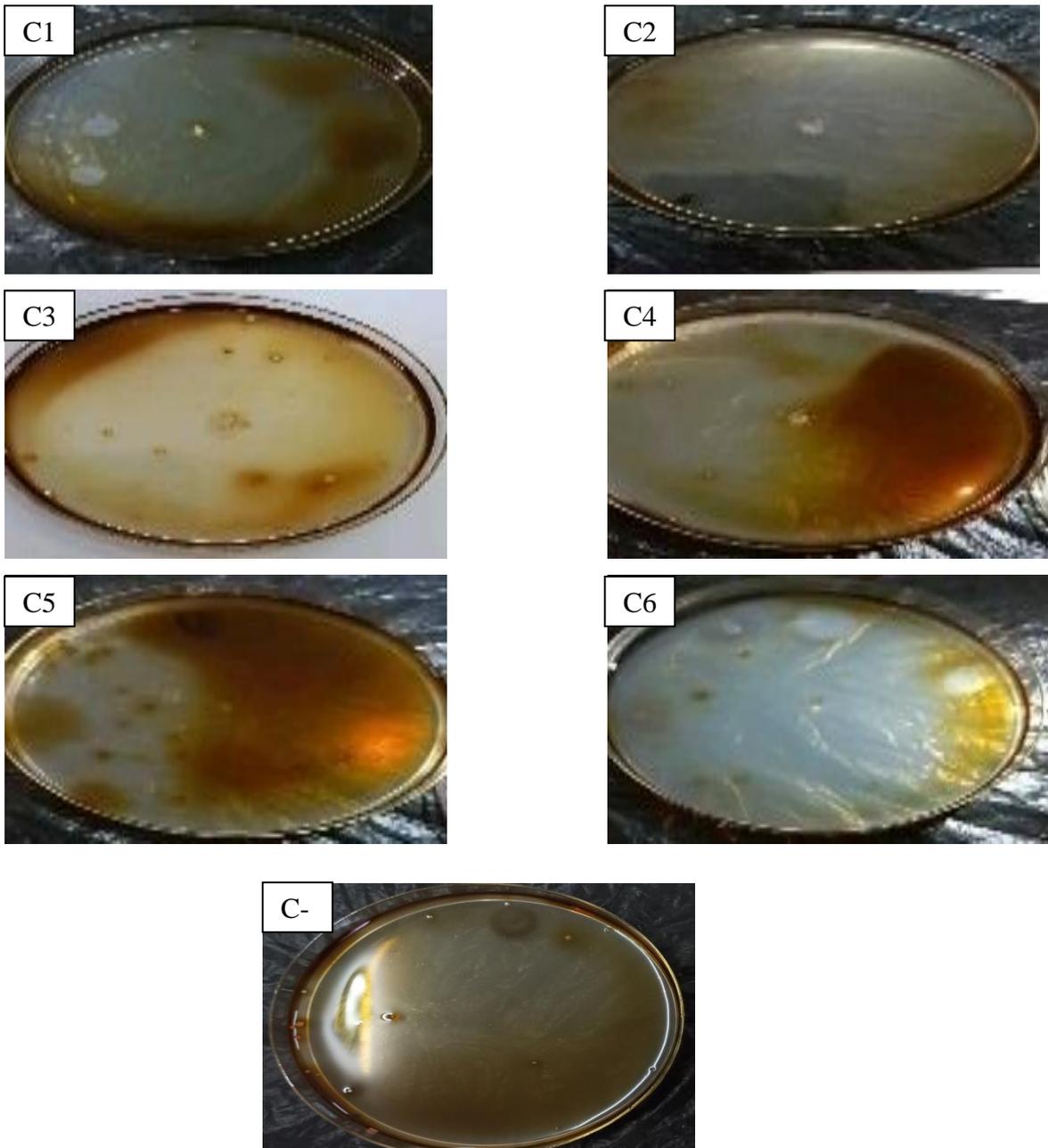


figure 26 : Résultats du test de la biodégradation du pétrole brut par la méthode de déplacement d'huile « Oil displacement method » (Chittepu, 2019)

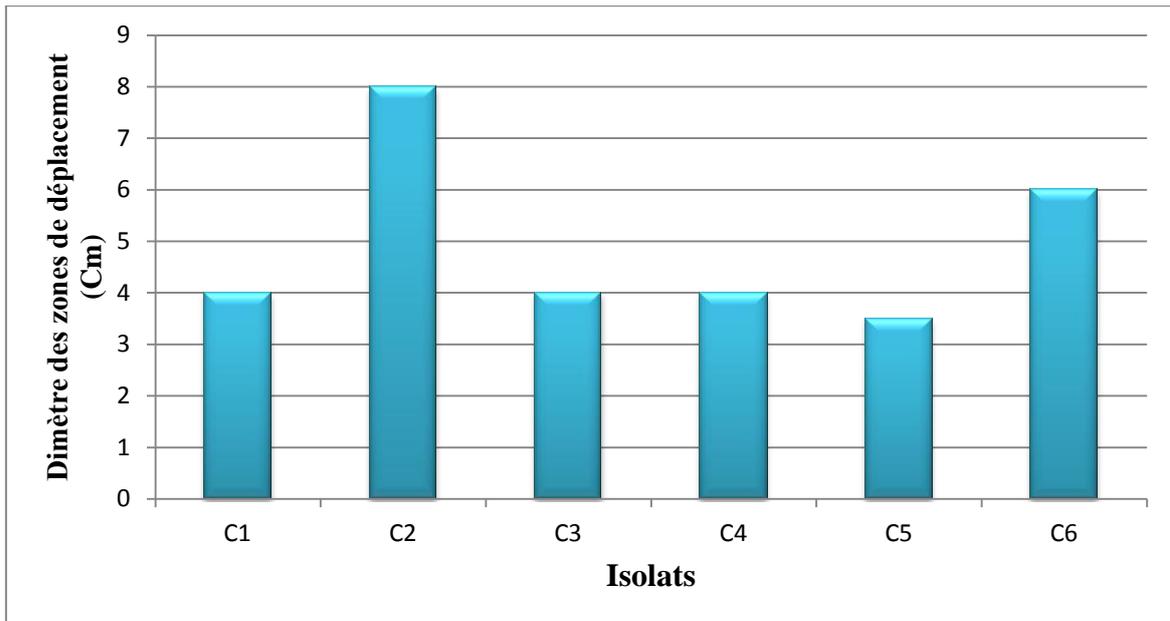


figure 27: Diamètre de la zone claire des isolats sur gélose MSM additionnée de pétrole brut

IV.2. Test du protéolyse

Les 6 isolats ont été testés sur milieu Columbia additionné par jaune d'œuf.

Les isolats montrés une croissance positive dans tous les boites et pas d'apparition des zones de précipitation donc l'activité de la lécithinase est négative (**figure 28**).

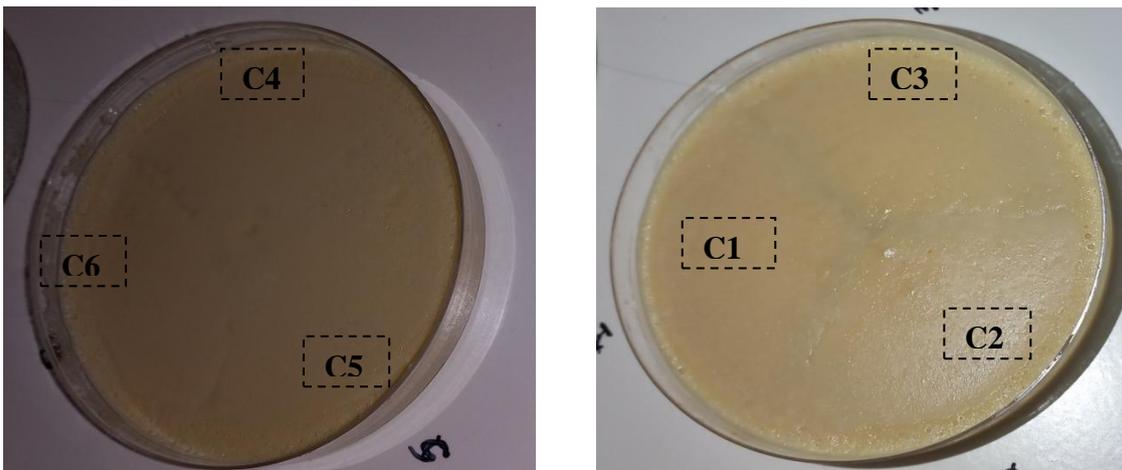


Figure 28 : Résultat de test du protéolyse après 24 h d'incubation

IV.3. Dosage de la lypase

Les résultats de ce test sont montrés dans le **tableau 6**.

IV.3.1. Méthode directe

Milieu à base d'huile d'olive

Les six isolats sont croître sur le milieu à base de l'huile d'olive. Toutes les colonies apparaissent des zones claires et les colonies C3, C5 et C6 montré une précipitation à la surface de milieu (**Figure 29**).

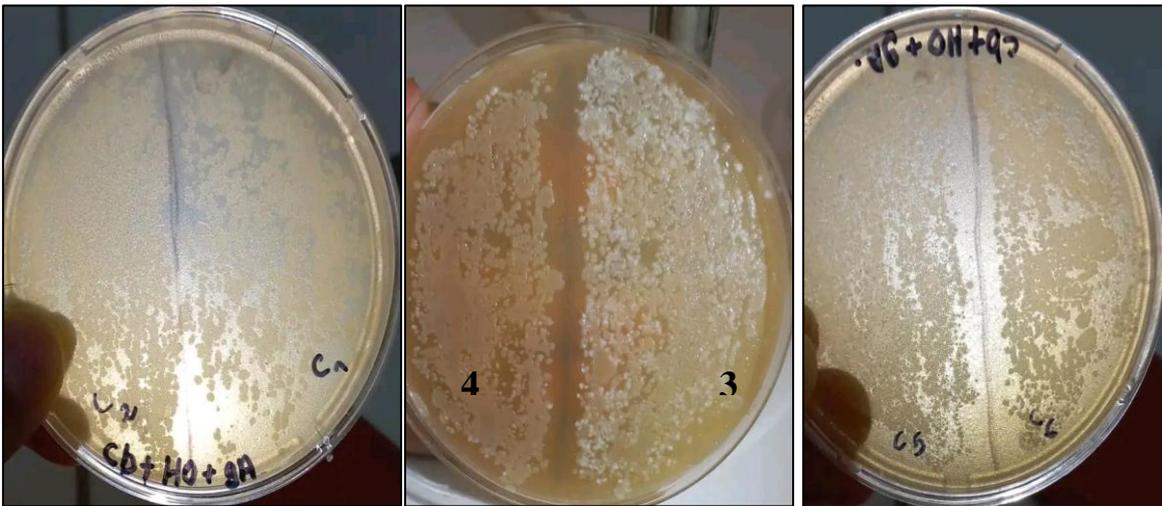


Figure 29: Résultats de dosage de la lypase sur milieu à base d'huile d'olive après 24h d'incubation

Milieu à base de beurre

Les isolats sont testés sur milieu à base de beurre. Nous avons observé que les six souches présentes une croissance.

Toutes les colonies apparaissent des zones claires sauf la colonie C3 et les colonies C3 et C5 montré une précipitation à la surface de milieu (**Figure 30**).

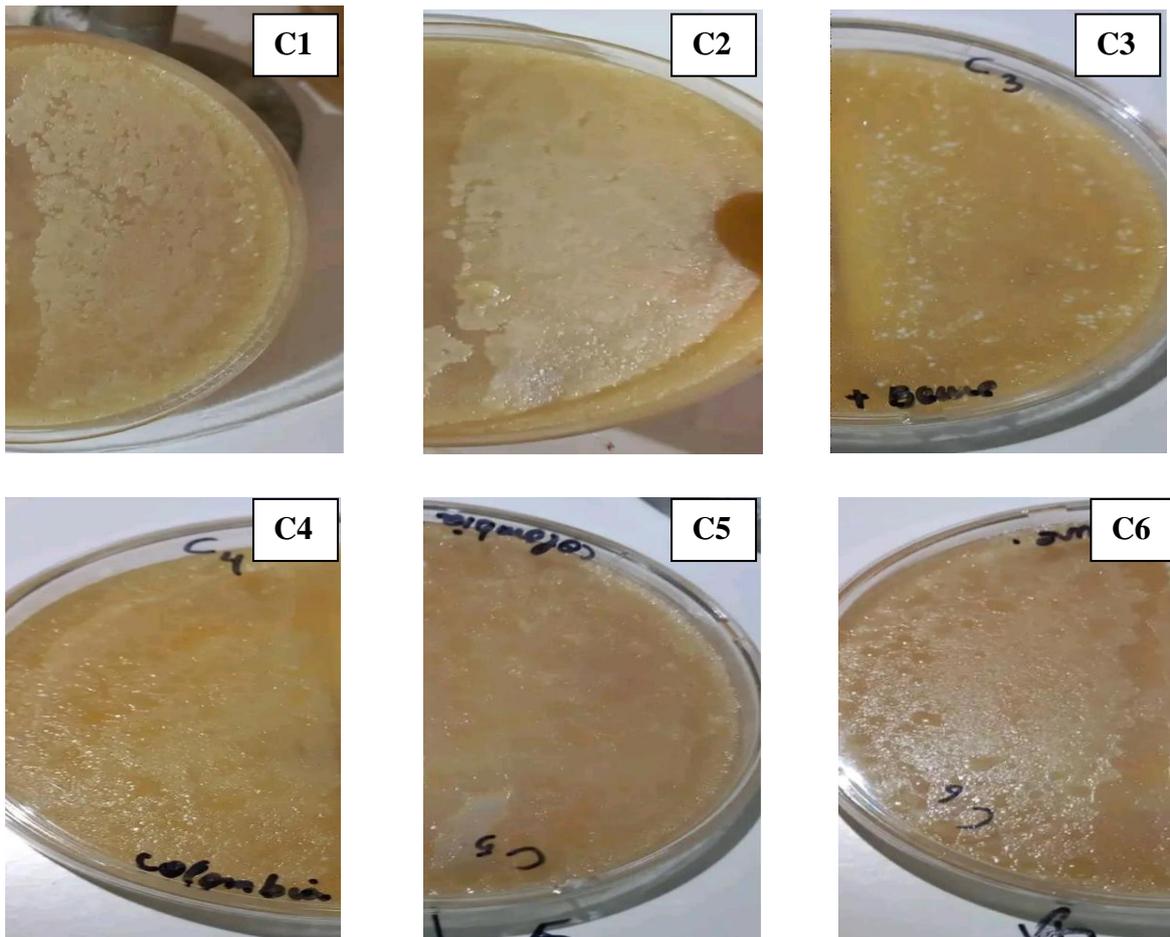


Figure 30 : Résultats de dosage du lipase sur milieu à base de beurre après 24h d'incubation

IV.3.2. Méthode indirecte

Milieu à base d'huile d'olive

Les isolats sont testés sur milieu à base de l'huile d'olive. Les six isolats sont croûte et montré une précipitation à la surface de milieu (**Figure 31**).

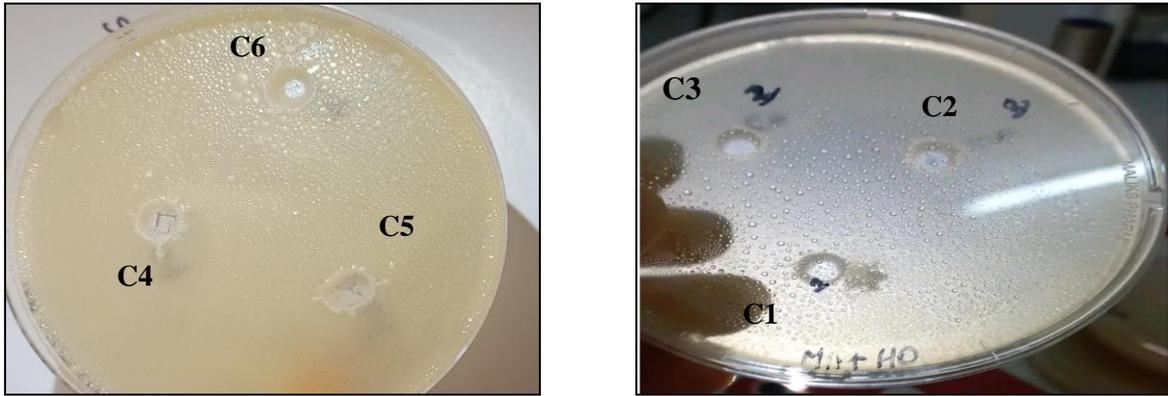


Figure 31 : Résultats de dosage de la lypase sur milieu Mueller-Hinton (MH) à base d'huile d'olive après 24h d'incubation à 30 C°

Milieu à base de Tween 80

Les isolats sont testés sur milieu à base de beurre. Nous avons observé que les six souches présentes une croissance et apparaissent une précipitation.

Les six isolats sont montrés des zones claires à la surface de milieu sauf la colonie C5 (Figure 32).

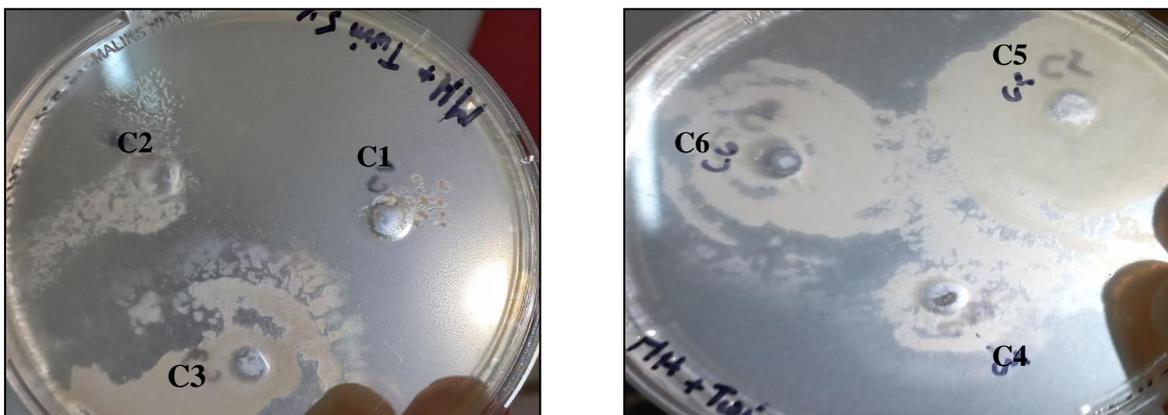


Figure 32 : Résultats de dosage de la lypase sur milieu à base de Tween 80 à 5 % après 24h d'incubation à 30 C°

IV.4. Activité hémolytique

Les six isolats sélectionnés sont ensemencé sur milieu gélose au sang. Après 24 h d'incubation les six isolats sont croitre (**Tableau 6**) et donne une bonne croissance avec des zone de lyse importante sur la surface de la gélose (**Figure 33**).

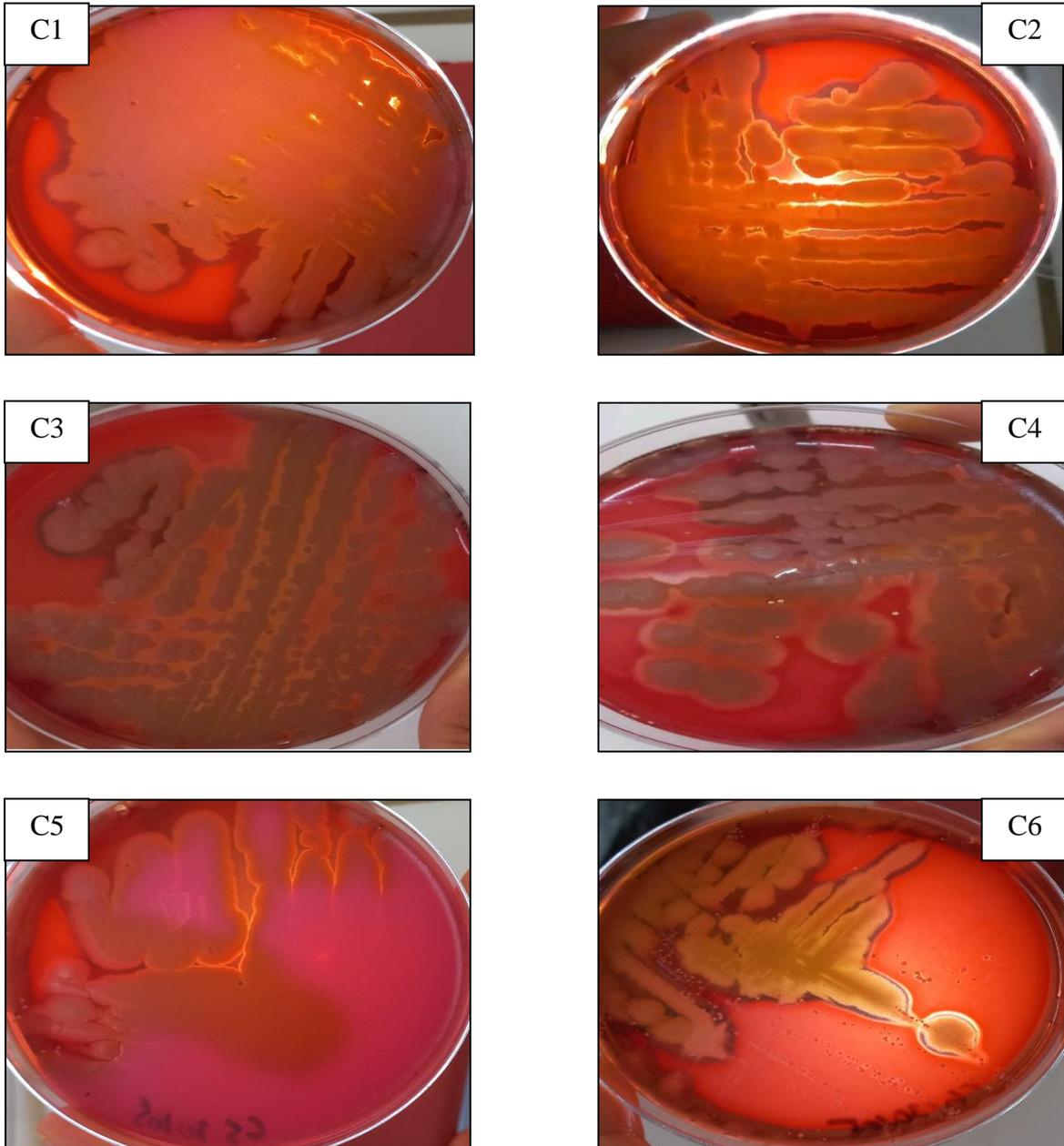


Figure 33 : Croissance des isolats sur gélose au sang de cheval à 5 % après 24h d'incubation à 30 C°

Tableau 6: Résultats des tests lypase, protéolyse et l'activité hémolytique

Test	Milieu		Isolats					
			C1	C2	C3	C4	C5	C6
Dosage de la lypase	Cb+ Ho	croissance	+	+	+	+	+	+
		zone claire	+	+	+	+	+	+
		précipitation	-	-	+	-	+	+
	Cb+ Beurre	croissance	+	+	+	+	+	+
		zone claire	+	+	-	+	+	+
		précipitation	-	-	+	-	+	-
	MH+ Ho	croissance	+	+	+	+	+	+
		zone claire	-	-	-	-	-	-
		précipitation	+	+	+	+	+	+
	MH+ Tween 80 à 5%	croissance	+	+	+	+	+	+
		zone claire	+	+	+	+	-	+
		précipitation	+	+	+	+	+	+
Test du protéolyse	Cb +JO	croissance	+	+	+	+	+	+
		zone de précipitation	-	-	-	-	-	-
Test hémolytique	Gélose au sang	croissance	+	+	+	+	+	+
		zone de lyse	+	+	+	+	+	+
MH: milieu Mueller-Hinton; Cb: milieu colombia; Ho; huile d'olive; JO: jaune d'œuf; +: test positive ; -: test négatif								

V. Caractérisation des isolats

V.1. Observation macroscopique

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

V.2. Observation microscopique

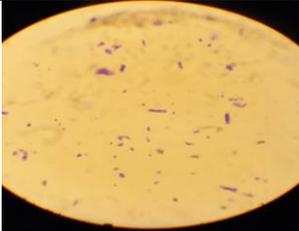
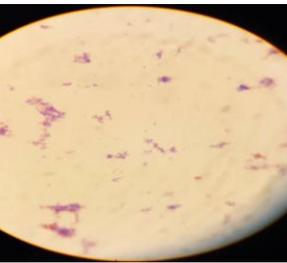
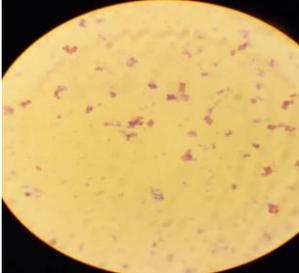
L'observation microscopique a été réalisée à l'état frais et après coloration de gram.

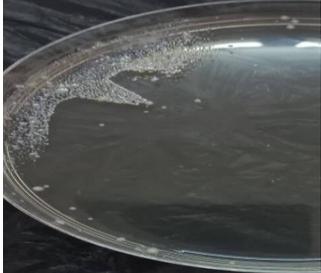
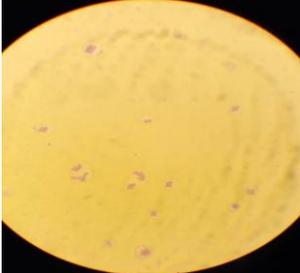
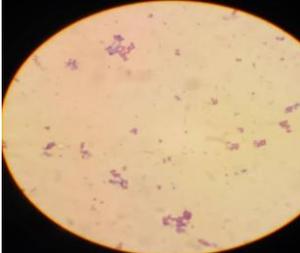
Test de coloration de Gram

L'observation microscopique a été réalisée par la coloration de gram, les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 7**.

Le **tableau 7** nous montre les différents aspects microscopique des souches bactériennes isolés pour les deux échantillons.

Tableau 7 : les caracteres macroscopique et microscopiques des souches isolées

Code des isolats	Observation macroscopique	Observation microscopique(x100)	Aspect microscopique	Gram
C1			Coques en chaînes	+
C2			Bacilles en forme de spirale	-
C3			coques	-

C4			Coques en grappes de raisin	-
C5			Coques en amas	-
C6			Coques en amas	-

D'après nos observations, il ressort que les colonies isolées sont de forme et de gram différents. Les colonies isolées à partir de l'échantillon d'eau de mer (E1) et le sol (E2) sont à Gram négatif, la colonie 1 qui a été isolé à partir la boîte de contrôle négatif est à Gram positive.

Les colonies (1), (3), (4), (5) et (6) sont des coques alors que la colonie (1) est un bacille.

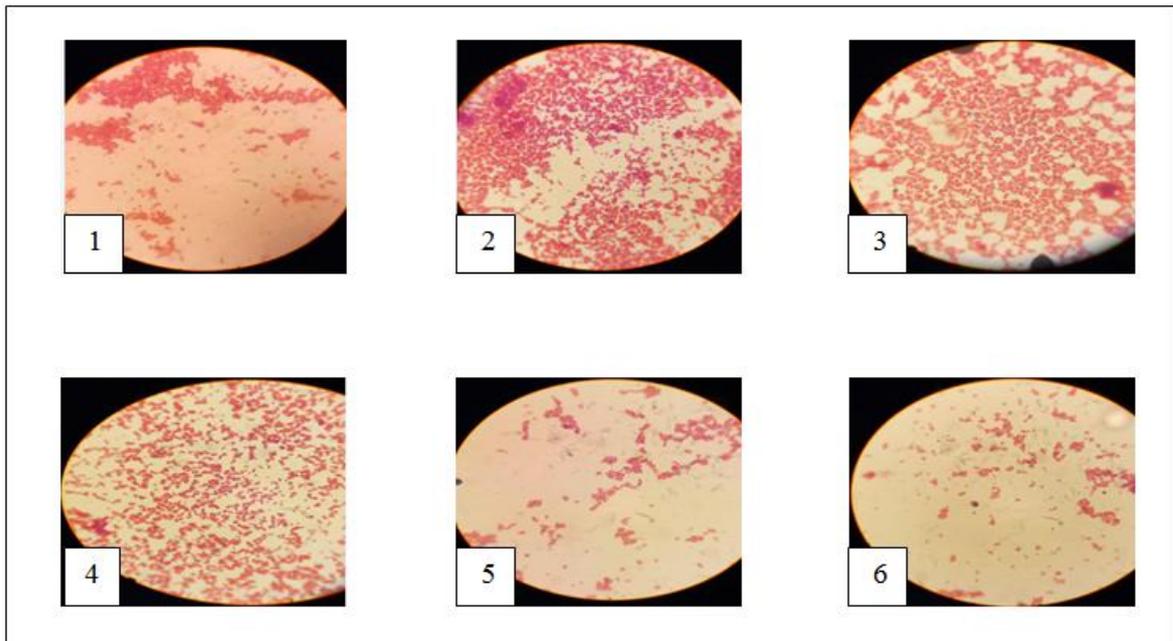
Test de sporulation (méthode de Benito Trujillo)

Figure 34 : Observation microscopique des isolats bactériens après le test de sporulation méthode de Benito Trujillo ($\times 100$). Tous les isolats sont contient pas des spores

Les résultats obtenus après le test de sporulation (**Figure 34**) " méthode de Benito Trujillo " montrent que tous les isolats sont contient pas des spores (les spores apparaissent vertes et les cellules roses (Joffin et Leyral, 1997)).

Observation de la mobilité

L'observation à l'état frais permet de déterminer la forme des bactéries ainsi que leur mobilité. D'après nos observations, il ressort que les six isolats sont immobiles.

V.3. Isolement dans des milieux sélectifs

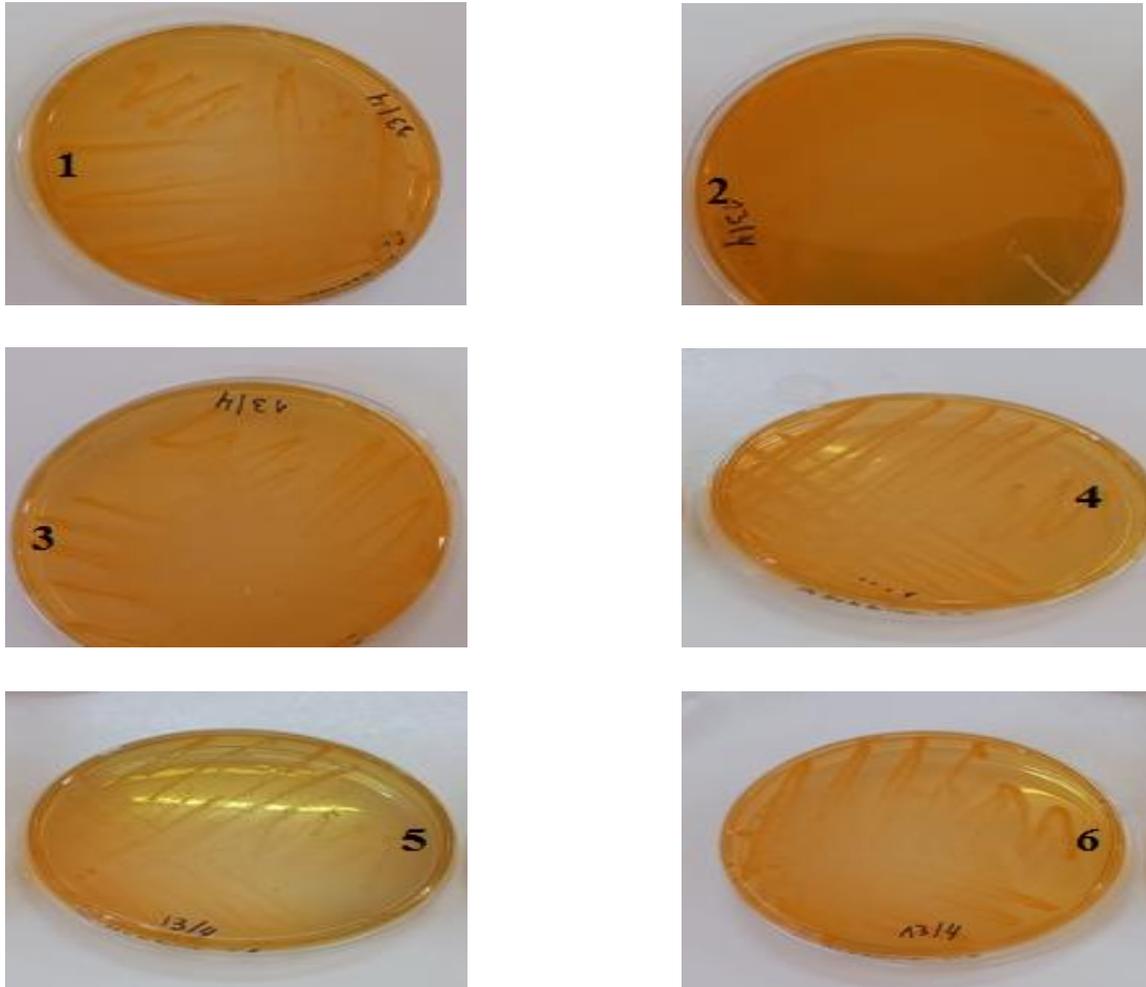
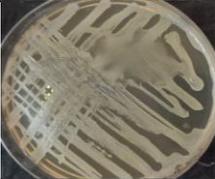


Figure 35 : Croissance des isolats sur gélose Hektoen. Incubation 24h à 30°C.

Tableau 8 : Résultats de croissance des isolats sur milieux sélectifs

	Isolement sur Gélose Hektoen		Isolement sur milieu King A		Isolement sur milieu King B	
	Observation	Interprétation	Observation	Croissance	Observation	Croissance
Colonie 1		Croissance+, changement du couleur vert de gélose vers le miel.		+		+
Colonie 2		croissance+, changement 3/4 de la couleur verte de gélose vers le miel.		+		+
Colonie 3		croissance+, changement du couleur vert de gélose vers le miel.		+		+
Colonie 4		croissance+, changement du couleur vert de gélose vers le miel.		+		+
Colonie 5		croissance+, changement 1/4 du couleur vert de gélose vers le miel.		+		+
Colonie 6		croissance+, changement du couleur vert de gélose vers le miel.		+		+

(+): croissance positive

V.4. Tests respiratoires

Tableau 9 : Résultats des tests respiratoires

	Test catalase			Type respiratoire à la gélose Viande-foie		
	Observation	Interprétation	Conclusion	Observation	Interprétation	Conclusion
Colonie 1		Apparition de bulles , dégagement gazeux de dioxygène	Catalase +		La croissance est au fond de tube	La bactérie est anaérobie stricte
Colonie 2		Apparition de bulles , dégagement gazeux de dioxygène	Catalase +		La croissance est au fond de tube	La bactérie est anaérobie stricte
Colonie 3		Apparition de bulles , dégagement gazeux de dioxygène	Catalase +		La croissance bactérienne est en surface	La bactérie est aérobie stricte
Colonie 4		Apparition de bulles , dégagement gazeux de dioxygène	Catalase +		La croissance est toute au long du tube	La bactérie est aéro-anaérobie facultatif
Colonie 5		Apparition de bulles , dégagement gazeux de dioxygène	Catalase +		La croissance est au fond de tube	La bactérie est anaérobie stricte

Colonie 6		Apparition de bulles , dégagement gazeux de dioxygène	Catalase +		La croissance est toute au long du tube	La bactérie est aéro-anaérobie facultatif
(+): reaction positive						

Nitrate réductase

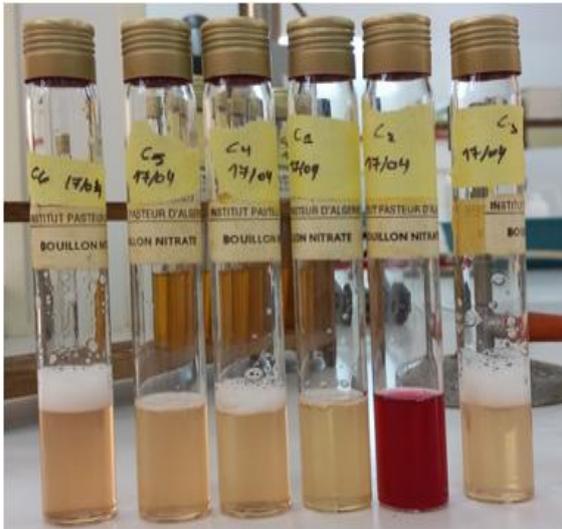
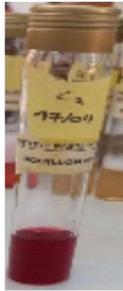


Figure 36 : Test nitrat réductase après l'ajout de réactif du Grisse pour les différents isolats, la couleur rouge indique la réduction de nitrate au stade nitrite par nitrate réductase



Figure 37 : Résultats des 06 souches après ajouter du zinc

Tableau 10: Résultat de test nitrate réductase après 24h d'incubation

	Observation		Interprétation	Conclusion
	Après l'ajout le reactif du grisse	Après l'ajout de la poudre du zinc		
Colonie 1	 Pas de coloration rouge		_ Coloration rouge: le Zn a réduit NO ₃ - encore présents en NO ₂ - qui sont révélés par les réactifs. Pas de réduction des NO ₃ - en N ₂ . Formation des bulles de gez	Nitrate réductase -
Colonie 2	 Coloration rouge		Présence de NO ₂ - issus de la réduction des NO ₃ -	Nitrate réductase + (stade NO ₂ -)
Colonie 3	 Pas de coloration rouge		_ Coloration rouge: le Zn a réduit NO ₃ - encore présents en NO ₂ - qui sont révélés par les réactifs. Pas de réduction des NO ₃ - en N ₂ . Formation des bulles de gez	Nitrate réductase -
Colonie 4	 Pas de coloration rouge		_ Coloration rouge: le Zn a réduit NO ₃ - encore présents en NO ₂ - qui sont révélés par les réactifs. Pas de réduction des NO ₃ - en N ₂ . Formation des bulles de gez	Nitrate réductase -

Colonie 5	 Pas de coloration rouge		<p>Coloration rouge: le Zn a réduit NO₃- encore présents en NO₂- qui sont révélés par les réactifs. Pas de réduction des NO₃- en N₂. Formation des bulles de gaz</p>	Nitrate réductase -
Colonie 6	 Pas de coloration rouge		<p>Coloration rouge: le Zn a réduit NO₃- encore présents en NO₂- qui sont révélés par les réactifs. Pas de réduction des NO₃- en N₂. Formation des bulles de gaz</p>	Nitrate réductase -
(+): Réaction positive ; (-): Réaction négative ; NO ₃ -: Nitrat; NO ₂ -: Nitrite				

V.5. Métabolisme glucidique

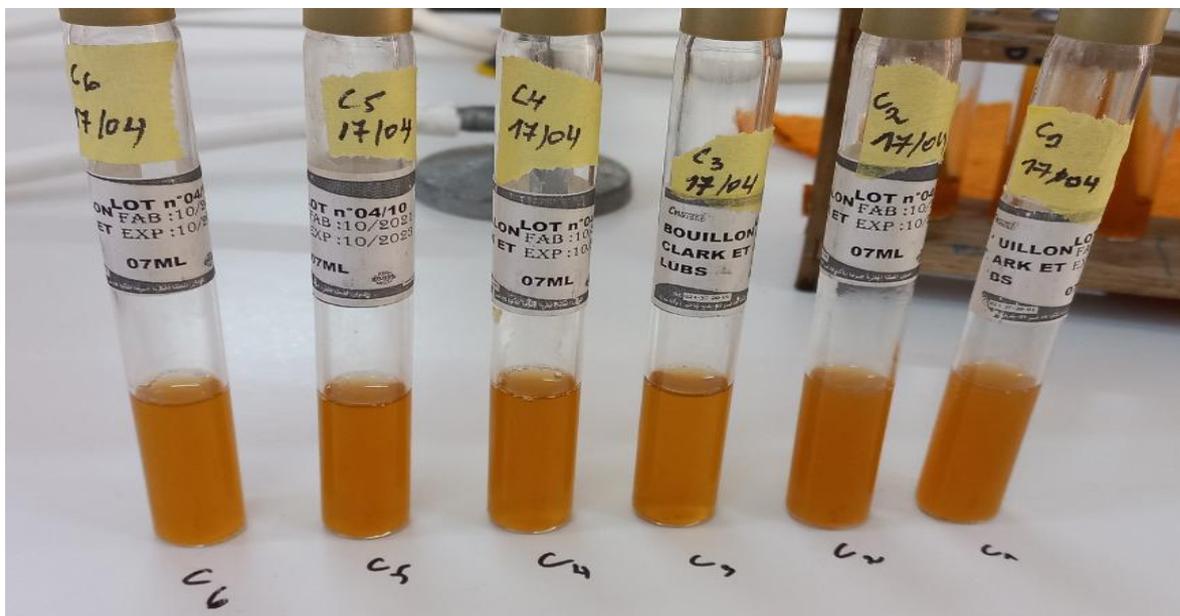
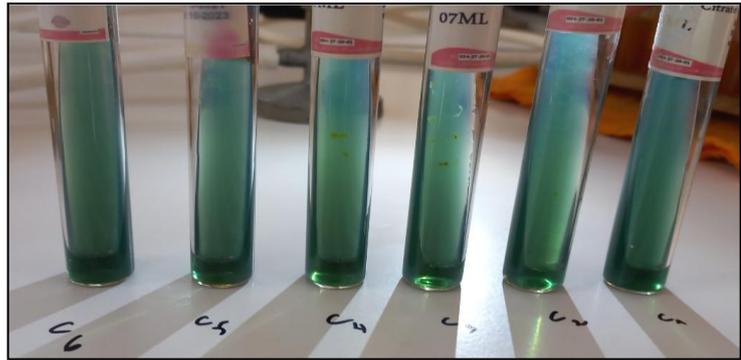


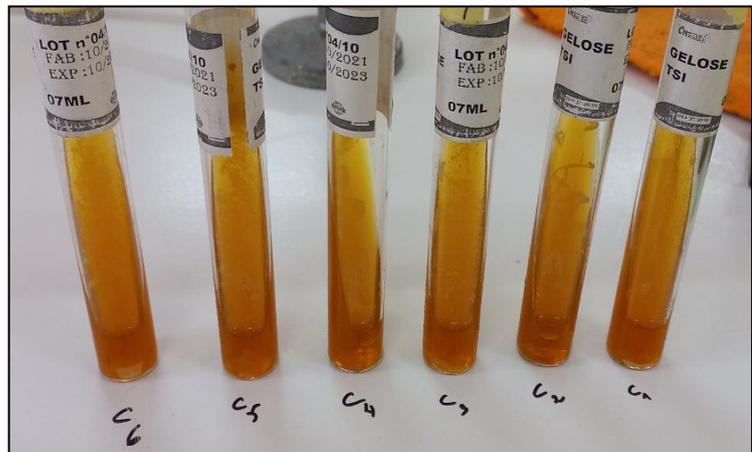
Figure 38 : Résultats de réaction de Voges-Proskauer, pas de coloration rouge indique l'absence d'acétioïne dans le milieu donc les 6 isolats sont VP négatif (Voges-Proskauer)



Test de citrate de simoun après 5 jours d'incubation



Témoin



Test de croissance sur gélose TSI (Triple sugar iron) après 48 h d'incubation

Figure 39 : Résultats des tests citrate de simoun et TSI (Triple sugar iron)

Tableau 11 : Résultats des tests métabolisme glucidique

	Test	Utilisation du citrate	Test de croissance sur gélose TSI	Réaction de Voges-Proskauer
Isolats	C1	Citrate -	Le milieu reste rouge : pas de fermentation, la bactérie est aérobie	-
	C2	Citrate +, Colonie jaune, Bleuissement du milieu	Le milieu reste rouge : pas de fermentation, la bactérie est aérobie	-
	C3		Le milieu reste rouge : pas de fermentation, la bactérie est aérobie	-
	C4		Le milieu reste rouge : pas de fermentation, la bactérie est aérobie	-
	C5		Le milieu reste rouge : pas de fermentation, la bactérie est aérobie	-
	C6	Citrate -	Le milieu reste rouge : pas de fermentation, la bactérie est aérobie	-
(+): réaction positive; (-): réaction négatif				

Discussion

Dans cette étude, nous avons isolé les bactéries d'échantillons de sol et d'eau de mer qui ont été contaminés par des hydrocarbures pétroliers. Dans notre expérience, nous avons utilisé du diesel, de l'essence et du pétrole brut comme seule source de carbone pour les bactéries isolées afin de tester l'efficacité de la dégradation.

Bien que ces les isolats ont la capacité de dégrader ces trois polluants à différentes concentrations leur capacité de dégradation dépend des conditions physiques, chimiques, et les conditions biologiques.

La caractérisation morphologique et biochimique a été réalisée pour caractériser les isolats. Les résultats des tests morphologiques indiquent que toutes les bactéries isolées étaient à Gram négatif sauf la C1 qui est Gram positif.

Tous les isolats sont catalase positive, dans cette étude, tous ces isolats peuvent se développer dans des milieux MSM supplémentés avec de l'huile diesel, l'essence et le pétrole comme la source seul carbone.

Nous avons également optimisé les paramètres de croissance tels que le pH et la température pour une croissance maximale de ces isolats. Le plus haut la croissance de tous les isolats a été trouvée à pH 7,0. Nous avons aussi enregistré que, température 37 °C est optimale pour la croissance de les bactéries isolées. Le but de l'optimisation était d'identifier la condition de croissance la plus favorable pour les isolats, de sorte que nous peut obtenir le plus haut taux de dégradation dans les sites pollués.

Roy *et al.* (2018) ont mentionné que plus la zone de déplacement du pétrole brut est grande plus l'activité du surfactant est élevée. La couche du biosurfactants réduit la viscosité du pétrole piégé dans le milieu et fonctionne comme une émulsion. Cette émulsion élargit le contact entre les bactéries et le pétrole brut dans la phase aqueuse pour une plus grande dispersion des hydrocarbures (Thavasi *et al.*, 2011).

Une croissance bactérienne sur la couche du pétrole brut peut aussi être un résultat positif témoignant la tolérance des souches aux hydrocarbures comme unique source de carbone. Les croissances de tous les isolats testés sont la preuve solide de leur capacité de dégradation des hydrocarbures. Les tubes contenant la suspension bactérienne et le pétrole ont montré un anneau de pétrole réduit et fin par rapport au control.

Au premier jour, la fine couche de pétrole brut flottait sur le milieu liquide et suite à une agitation continue et à l'incubation, la couche s'est transformée en gouttelettes d'huile

collées à la paroi du tube et à un anneau clair sur la surface du milieu MSM liquide (Bekenniche et al, 2021).

La biodisponibilité des nutriments, tels que le carbone ou le glucose ainsi que les facteurs environnementaux, tels que la température et les interactions écologiques, favorisent souvent le taux de dégradation des hydrocarbures pétroliers ainsi que le diesel et l'essence dans les milieux marins (Ali Khan et al. 2017).

En conclusion, ces isolats pourraient être utilisés pour améliorer la biodégradation des complexes composants d'hydrocarbures, y compris les déversements d'hydrocarbures en mer et au sol, en raison de leur faible coût et leur respect de l'environnement.

À l'avenir, la remédiation au déversement d'hydrocarbures et son impact sur d'autres micro-organismes marins indigènes seront étudiés plus profondément avec d'autres quantitatifs et qualitatifs pour évaluer le pourcentage de dégradation ainsi que pour l'identification moléculaire de ces espaces qui ont prouvées leur implication positive face à un polluant hydrocarboné dans un milieu liquide, par la formation de couche émulsifiante comme sur un milieu solide par l'apparition des zones claires qui témoignent de la dégradation.

Références Bibliographiques

Adams, G. O., Fufeyin, P. T. & Ehinomen, I., (2015). Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 3(1), pp. 28-39.

ALI AHMED, S., (2011). Essai de Réhabilitation d'un Sol Contamine par les Hydrocarbures a l'aide de Tensioactifs Obtenus par Voie Biologique. Thèse de Magistère en Sciences Agronomiques de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique.

Ali Khan AH, Tanveer S, Alia S, Anees M, Sultan A, Iqbal M, et al., (2017). Role of nutrients in bacterial biosurfactant production and effect of biosurfactant production on petroleum hydrocarbon biodegradation. *Ecol Eng.*;104:158–64.

Atlas, R.M. (1985). Effects of hydrocarbons on microorganisms and petroleum biodegradation in arctic ecosystems and petroleum effects in the arctic environment. 63-100.

Benckiser G, Entry J. A, Lin, D and Schwab A. P.(2013), Production of a Lipopeptide Biosurfactant by a Novel *Bacillus* sp. and Its Applicability to Enhanced Oil Recovery. *ISRN Microbiology*, 8 pages

Bezza, F. A. & Chirwa, E. M. N., (2017). Possible use of biosurfactant produced by microbial consortium from contaminated soil for microbially enhanced oil recovery. *Chemical Engineering Transactions*, 57, 1411-1416.

Chittepu, O. R., (2019). Isolation and characterization of biosurfactant producing bacteria from. *Grain & Oil Science and Technology*, Volume 2, pp. 15-20.

Forhad Hossain, M. et al., (2022). Bioremediation potential of hydrocarbon degrading bacteria: isolation,. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(1), pp. 211-216.

Haritash, A., Kaushik, C., (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *J. Hazard. Mater.* 169 (1–3), 1–15.

Hassanshahian M, Zeynalipour MS & Musa FH. (2014). Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr provenance). *Marine Pollution Bulletin* 82, 39–44

Hesnawi, R.M., Adbeib, M.M., (2013). Effect of nutrient source on indigenous biodegradation of diesel fuel contaminated soil. *Apchee Procedia* 5, 557–561.

Jin Gao Jie Ming · Meng Xu · Xinge Fu · Liang-Feng Duan · Cong-Chao Xu · Yu Gao · Jian-Liang Xue & Xin-Feng Xiao., (2021). Isolation and characterization of a high-efficiency marine diesel oil degrading bacterium, *Petroleum Science*. 18,641–653.

K. N. Timmis (ed.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, DOI 10.1007/978-3-540-77587-4_66, # Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010.

Lima S. D., Oliveiraa A. F., Golin R., Lopes V. C. P., Caixeta D. S., Lima Z. M & Morais E. B., (2020). Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from gas station leaking-contaminated groundwater in the Southern Amazon, Brazil., *Brazilian Journal of Biology*, vol. 80, no. 2, pp.354-361

Mulligan, C. N., (2009). Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14, 372-378.

Philippe L, Pierre C, Robert M, Philippe N & Jean C.B.,(2011), Ecologie microbienne: Microbiologie des milieux naturels et anthropisés, Presses universitaires de Pau et des Pays de l'Adour; Illustrated édition, 1002 p.

Qin, X., Tang, J., Li, D., Zhang, Q., (2012). Effect of salinity on the bioremediation of petroleum hydrocarbons in a saline alkaline soil. *Lett. Appl. Microbiol.* 55 (3), 210–217.

Ron, E. Z. & Rosenberg, E., (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 249-252.

Roy A., Dutta A., Pal S., Gupta A., Sarkar J., Chatterjee A., Saha A., Sarkar P., Sar P. & Kazy S.K. (2018). Biostimulation and bioaugmentation of native microbial community accelerated bioremediation of oil refinery sludge. *Biores. Technol.* 253 : 22–32.

Sarkar, P., Roy, A., Pal, S., Mohapatra, B., Kazy, S.K., Maiti, M.K., Sar, P., (2017). Enrichment and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from petroleum refinery waste as potent bioaugmentation agent for in situ bioremediation. *Bioresour. Technol.* 242, 15–27.

Sayed K., Baloo L. & Sharma N.K. (2021). Bioremediation of Total Petroleum Hydrocarbons (TPH) by Bioaugmentation and Biostimulation in Water with Floating Oil Spill Containment Booms as Bioreactor Basin. *International Journal of Environmental Reserch and Public Health*, 18: 2226.

Sherafatmand, M., Ng, H.Y., (2015). Using sediment microbial fuel cells (SMFCs) for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Bioresour. Technol.* 195, 122–130.

Singleton P. (1999). Bactériologie 2ème cycle. 4ème édition. Paris : Dunod, 415 p.

Suganthi, S.H., Murshid, S., Sriram, S., Ramani, K., (2018). Enhanced biodegradation of hydrocarbons in petroleum tank bottom oil sludge and characterization of biocatalysts and biosurfactants. *J. Environ. Manag.* 220, 87–95.

T. Varadavenkatesan and V. R. Murty.(2013), Production of a Lipopeptide Biosurfactant by a Novel *Bacillus* sp. and Its Applicability to Enhanced Oil Recover.

Thavasi R., Sharma S. & Jayalakshmi S. (2011). Evaluation of Screening Methods for the Isolation of Biosurfactant Producing Marine Bacteria, *J Pet Environ Biotechnol*, S1:6.

Vaidya, S., Jain, K., Madamwar, D., (2017). Metabolism of pyrene through phthalic acid pathway by enriched bacterial consortium composed of *Pseudomonas*, Burkholderia, and Rhodococcus (PBR). *3 Biotech* 7 (1), 29.

Xu, J., Zhang, Q., Li, D., Du, J., Wang, C., Qin, J., (2019). Rapid degradation of long-chain crude oil in soil by indigenous bacteria using fermented food waste supernatant. *Waste Manag.* 85, 361–373.

Annexes

Milieux de cultures

1. Gélose nutritive

Extrait de viande =	1 g
Extrait de levure =	2 g
Peptone =	5 g
Agar – agar =	15 g
NaCl =	5 g
L'eau distillée =	1000 ml

Préparation

Dissoudre tout les composants dans un bicher avec l'eau distillée et agiter le tous bien puis ajouter le pH à 6,7 . Après ajouter le agar et autoclavé à 120 C ° pendant 20 minutes.

2. Bouillon nutritive

Extrait de viande =	1 g
Extrait de levure =	2 g
Peptone =	10 g
NaCl =	5 g
L'eau distillée =	1000 ml

Préparation

Mettre en suspension 18 g de milieu déshydraté dans 1 litre de l'eau distillée et agiter le tous bien puis ajouter le pH à 6,7. Après autoclavé à 120 C ° pendant 20 minutes.

3. Milieu MSM(Mineral salt medium) liquide

NaCl =	19.45 g
MgCl ₂ =	8.8 g
Na ₂ So ₄ =	3.24 g
CaCl ₂ =	1.8 g
Kcl =	0.550 g
Na HCo ₃ =	0.16 g
KBn =	0.08 g
H ₃ Bo ₃ =	0.022 g

$\text{N}_2 \text{H}_4 \text{O}_3 = 0.0016 \text{ g}$

$\text{Na}_2 \text{HPO}_4 = 0.008 \text{ g}$

$\text{EDTA} = 0.002 \text{ g}$

Préparation du milieu

Mettre en suspension 34.1136 g de milieu minérale dans un 1 litre d'eau distillé. Répartir en flacons . stériliser à l'autoclave à 121 C° pendant 15 min .

4. Milieu MSM (Mineral salt medium) solide

$\text{NaCl} = 19.45 \text{ g}$

Agar- Agar = 15 g

$\text{MgCl}_2 = 8.8 \text{ g}$

$\text{Na}_2\text{So}_4 = 3.24 \text{ g}$

$\text{CaCl}_2 = 1.8 \text{ g}$

$\text{Kcl} = 0.550 \text{ g}$

$\text{Na HCo}_3 = 0.16 \text{ g}$

$\text{KBn} = 0.08 \text{ g}$

$\text{H}_3\text{Bo}_3 = 0.022 \text{ g}$

$\text{N}_2 \text{H}_4 \text{O}_3 = 0.0016 \text{ g}$

$\text{Na}_2 \text{HPO}_4 = 0.008 \text{ g}$

$\text{EDTA} = 0.002 \text{ g}$

Préparation du milieu

Dissoudre tous les minéraux dans un 1 litre de d'eau distillé .ajuster le pH et stériliser à l'autoclavé à 121 C° pendant 15 min.

Application

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

5. Le milieu Hektoen (Kings et Metzger, 1968)

Protéose peptone = 12g

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

pH final $7,5 \pm 0,2$

Préparation du milieu :

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

Précaution d'utilisation : Ne pas autoclaver.

Application La gélose Hektoen est un milieu sélectif pour l'isolement et la différenciation des bacilles Gram (-) entéro-pathogènes, en particulier les *Salmonellesp.* et les *Shigell asp.*

Principe

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

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

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

Lecture :

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

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

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

- Colonies "saumon" : *Escherichia*, *Levinea*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Yersinia*.

- Colonies "saumon" à centre noir : *Proteus vulgaris*.

- Colonies bleues-vertes ou vertes : suspicion de *Shigella* ou de *Salmonella* à différencier de

Proteus morgani ou *rettgeri* *Providencia*, *Hafnia*, *Levinea*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas* (le test de l'oxydase permet de différencier les *Pseudomonas*).

- Colonies bleues-vertes ou vertes à centre noir : suspicion de *Salmonella* ou de *Proteus mirabilis* (la recherche de l'uréase permet de différencier *P. mirabilis*).

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

Gélose King A:

Peptone = 20g

K₂SO₄ (anhydre) = 10g

MgCl₂ (anhydre) = 1,4g

Agar purifié = 12g

Eau distillée (qsp) = 1000 mL

pH_{final} 7,2 ± 0,2

Gélose King B:

Peptone = 20g

K₂HPO₄ (anhydre) = 1,5g

MgSO₄ · 7 H₂O (anhydre) = 1,5g

Agar purifié = 12g

Eau distillée (qsp) = 1000 mL

pH final 7,2 ± 0,2

Préparation des milieux

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

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

Répartir en tubes.

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

Application

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

Principe

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

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

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

Lecture

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

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

7. Milieu gélose - foie

Base viande foie = 30g

Glucose = 2g

Agar = 6g

Eau distillée (qsp)= 1000 mL

pH final 7,4 ± 0,2

Préparation du milieu

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

Application

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

Principes

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

Lecture :

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

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

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

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

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

Tryptone = 14g

Extrait autolytique de levure =	3g
Extrait de viande =	3g
Glucose =	1g
Lactose =	10g
Saccharose =	10g
Chlorure de sodium =	5g
Thiosulfate de sodium =	0,3g
Citrate ferrique ammoniacal =	0,3g
Rouge de phénol =	24mg
Agar =	13,5g
Eau distillée (qsp)=	1000ml

pH final 7,4± 0,2

Préparation du milieu :

Mettre en suspension 60,1 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution complète.

Répartir en tubes.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes. Incliner les tubes de manière à obtenir un culot de 3 cm de hauteur et une pente oblique.

Application

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

Principe

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

Les germes qui fermentent le lactose ou le saccharose font virer au jaune la pente du tube. Les microorganismes ne fermentant aucun des trois sucres ne modifient pas la couleur du milieu.

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

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

Lecture :

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

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

Peptone = 7g

K₂HPO₄ = 5g

Glucose = 5g

Eau distillée (qsp) = 1000ml

pH final 7± 0,2

Préparation du milieu :

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

Répartir en tubes.

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

Principe

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

Lecture :

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

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

10. Milieu citrate de Simmons (Simmons, 1926)

Citrate de sodium =	1g
Chlorure de sodium =	5g
Sulfate de magnésium =	0,2g
Phosphate mono-ammonique =	1g
Phosphate dipotassique =	1g
Bleu de bromothymol =	0,08g

Agar = 15g

pH final $6,8 \pm 0,2$

Eau distillée (qsp) 1000ml

Préparation du milieu :

Homogénéiser la poudre contenue dans le flacon. Mettre 21 grammes de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée stérile. Chauffer lentement en agitant fréquemment, puis porter à ébullition pendant 1 minute. Répartir en tubes ou en flacons. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Refroidir les tubes en position inclinée pour obtenir une pente longue sans culot.

Application

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

Principe

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

Lecture :

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

Solutions et Reactifs

Préparation de la solution INT

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

Réactif du test Voges Proskauer (VP)

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

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

Réactifs du test Nitrate

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

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

11. Milieux de conservation :

En mélange 80 ml de BN avec 20 ml glycérole, Autoclavé à 120 C° Pendant 20 min .

12. Milieu bouillon Nitraté (Joffin et Leyral, 1997).

Infusion coeur-cerveille. = 25g

Nitrate de sodium = 10g

Eau distillée (qsp) = 1000 mL

pH final 7,2 \pm 0,2

Préparation du milieu

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

Application

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

Principe

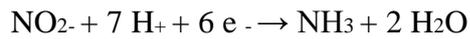
Les bactéries peuvent utiliser les nitrates de deux façons :

❖ Réduction des nitrates en azote : respiration nitrates en anaérobiose



❖ Réduction des nitrates en nitrites puis NH_3 : réduction assimilatrice





Lecture

Après incubation de 30°C/24h, quelques gouttes des réactifs Nitrates 1 et 2 (ou du réactif de

Griess) sont ajouté aux cultures. Une coloration rouge signe la présence de nitrites : la bactérie est nitrate réductase +, stade nitrites. En cas où le milieu reste incolore, ajouter du zinc (réducteur des nitrates). Attendre quelques minutes.

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