



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

**M<sup>lle</sup>. KOIBICH Nabila**

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN BIOLOGIE**

**Spécialité : BIOTECHNOLOGIE DES MICROORGANISMES**

THÈME

**Isolement et identification de quelques  
champignons d'un sol pollué par les  
hydrocarbures**

Soutenue publiquement le 20/06/2016

DEVANT LE JURY

Président	<b>Mr. DJIBAOUI Rachid</b>	<b>M.C.A</b>	<b>U. Mostaganem</b>
Examineur	<b>Mr. NEBBECHE Salim</b>	<b>M.C.B</b>	<b>U. Mostaganem</b>
Encadreur	<b>Mr. CHIBANI Abdelwaheb</b>	<b>M.C.A</b>	<b>U. Mostaganem</b>
Co-Encadreur	<b>Mme. BENGUENAB Asmaa</b>	<b>Doctorante</b>	<b>U. Mostaganem</b>

*Thème réalisé au Laboratoire de Microbiologie de l'université de Mostaganem*

## *Remerciements*

*On remercie Dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.*

*Mes remerciements les plus sincères et respectueux vont à, Monsieur Chibani. A mon promoteur, pour sa rigueur, sa patience, ses conseils fructueux, son soutien continu et surtout pour sa présence tout au long de ce travail. C'est aussi avec un immense plaisir que j'ai réalisé ce travail avec vous.*

*Je tiens à remercier particulièrement Monsieur Djibaoui. R d'avoir acceptée la présidence du jury de ce modeste travail, qu'il trouve ici toutes mes expressions respectueuses.*

*Mes remerciements s'adressent aussi à Monsieur Nebbeche. S d'avoir accepté d'examiner ce travail, qu'il trouve ici l'expression de mon profonde reconnaissance.*

*Mes remerciements s'adressent également à Mme Lazreug. H, responsable du laboratoire de microbiologie qui m'a permis de travailler dans des conditions favorables.*

*Enfin, je tiens à remercier aussi tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.*



# DÉDICACES

Avant tout je remercie **ALLAH** pour les tout .

**Je dédie ce modeste travail :**

A mes très chers parents **MAMAN** et **PAPA** sources de tendresse et la force de courage d'étude.

Je vous remercie d'être toujours à ma coté de me soutenir ,aimer,protéger et pour tous ce que vous avez fait pour moi.

**A mes chères frères et mes soeurs:**

**FAYZA**

**SAMIYA**

**ABD ALHAKIM**

**ABD ALKADER**

**A mes meilleurs amis:**

**KENZA, DJAMILA ET ARBIA**

**A tout la promotion de BIOLOGIE 2015/2016.**

**A tout les enseignants(e) et les étudiants(e) de LITA .**

***NABILA***

## **Abstract**

Hydrocarbons are a major pollutant of soil. Biodegradation of petroleum products through the soil microorganisms has emerged as a method of interest for economic and ecological point of view. The aim of our study was to isolate and identify fungi species present in soil polluted by hydrocarbons: crude oil, diesel and used oil motor. The soil sample was polluted with these hydrocarbon derivatives for 6 months. Isolation of fungi isolates were carried out using the dilution method, whereas the identification of fungi was based on their morphology depending on macroscopic and microscopic appearance.

A number of fungi isolates were isolated from three types of polluted soils on PDA medium. The results showed the presence of two different fungi genera namely: *Aspergillus* and *Penicillium*, with the dominance of isolates belonging to the genus *Aspergillus*. Four isolates were selected for the test of their ability to degrade crude oil. These were grown on three different salt medium: without any carbon source, with sucrose as a carbon source and salt medium supplemented with 1% crude oil as a carbon source. Unfortunately the chosen isolates were unable to degrade crude oil.

**Keywords:** Oil, Biodegradation, Fungi, *Aspergillus*, *Penicillium*.

## الملخص

يعتبر النفط ومشتقاته من أهم الملوثات الرئيسية للبيئة وخاصة التربة. وقد برزت أهمية استعمال الكائنات الدقيقة (بكتيريا وفطريات) التي لها القدرة على تحليل والتخلص من الملوثات البترولية كوسيلة هامة ذات فوائد اقتصادية وبيئية. و قد كان الهدف من دراستنا هو عزل وتحديد أنواع الفطريات الموجودة في تربة ملوثة بثلاثة أنواع من مشتقات البترول وهي النفط الخام، الديزل وزيت المحركات المستعمل. تم تلويث عينات من التربة بهذه المشتقات البترولية لمدة تزيد عن 6 أشهر. أجري عزل الفطريات من التربة باستخدام طريقة التخفيف، في حين تم التعرف على أجناس الفطريات من خلال الشكل الخارجي اعتمادا على الملاحظة العينية و المجهرية.

تم عزل عدد من العزلات الفطرية من جميع الأنواع الثلاثة للتربة الملوثة على الوسط PDA. أظهرت النتائج وجود نوعين مختلفين من الأجناس الفطرية وهما: *Aspergillus* و *Penicillium* ، مع السيادة لجنس *Aspergillus*. تم اختيار أربع عزلات لاختبار قدرتها على تحليل النفط الخام. نمت على ثلاثة أوساط تحتوي على الأملاح المعدنية : الأول من دون أي مصدر للكربون الثاني أضيف له الجلوكوز كمصدر للكربون أما الوسط الثالث فقد أضيف له 1٪ من النفط الخام كمصدر للكربون. للأسف لم تستطع هذه العزلات المختارة أن تحلل النفط الخام.

**الكلمات المفتاحية:** النفط، التحلل البيولوجي، الفطريات، *Aspergillus* ، *Penicillium*.

## **Abréviations**

**Cm<sup>2</sup>** : Centimètre au carré

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone

**g** : Gramme.

**HAP** : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.

**HA** : Hydrocarbures aliphatiques.

**HCP** : Hydrocarbures pétroliers.

**kPa** : Kilopascal.

**LiP** : Lignines peroxydases.

**ml** : Millilitre.

**mm** : Millimètre.

**MnP** : Manganèse Peroxydases.

**MSM** : Minéral Salt Medium

**Mt/an** : Millions de tonnes par an.

**MW**: Mega Watt.

**N**: Azote.

**PDA** : Potato dextrose agar.

**pH** : Potentiel d'hydrogène.

**P** : Phosphore.

**S** : Soufre

**TIA** : Transfert interfacial assisté par les biosurfactants.

**TID**: Transfert interfacial direct.

**UFC**: Unité formant colonie

**%** : Pourcentage.

**°C** : Degré Celsius.

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Des eaux usées jetées dans la Paillote, une plage de Bousmail	<b>5</b>
<b>Figure 2</b> : Site industriel : usines rejetant des fumées polluantes	<b>6</b>
<b>Figure 3</b> : Un déversement d'hydrocarbures	<b>6</b>
<b>Figure 4</b> : La série aliphatique des hydrocarbures	<b>10</b>
<b>Figure 5</b> : Métabolisme du phénanthrène par différents espèces de champignons	<b>20</b>
<b>Figure 6</b> : Voies de dégradation des HAP chez les champignons et les bactéries	<b>21</b>
<b>Figure 7</b> : Les pots contenant les échantillons du sol pollué au laboratoire par les trois hydrocarbures (pétrole cru, gasoil et huile de moteur brulée)	<b>32</b>
<b>Figure 8</b> : Le Ph mètre utilisé pour mesurer le Ph du milieu de culture	<b>32</b>
<b>Figure 9</b> : Schématisation de la méthode de dilution de l'échantillon du sol dans l'eau distillée stérile	<b>33</b>
<b>Figure 10</b> : Etalement de 0.5ml de chaque dilution sur le milieu de culture	<b>33</b>
<b>Figure 11</b> : Les champignons isolés à partir du sol pollué par le gasoil : (a) dilution $10^{-1}$ , (b) dilution $10^{-2}$	<b>37</b>
<b>Figure 12</b> : Les champignons isolés à partir du sol pollué par le pétrole cru : (a) dilution $10^{-1}$ , (b) dilution $10^{-2}$	<b>38</b>
<b>Figure 13</b> : Les champignons isolés à partir du sol pollué par l'huile de moteur brulé : (a) dilution $10^{-1}$ , (b) dilution $10^{-2}$ , (c) dilution $10^{-3}$ , (d) dilution $10^{-4}$ , (e) dilution $10^{-5}$	<b>39</b>
<b>Figure 14</b> : Résultats du dénombrement sur gélose PDA des trois échantillons du sol pollué par : HMB : huile de moteur brulée, GO : gasoil, PC : pétrole cru	<b>41</b>
<b>Figure 75</b> : Résultat de croissance de la souche n°01 dans : a) MSM + 1% de pétrole ; b) MSM + 2% de glucose ; c) témoin	<b>45</b>

## **Liste des tableaux**

<b>Tableau 1 :</b> Température d'ébullition de différent mélange d'hydrocarbures	<b>13</b>
<b>Tableau 2 :</b> Quelques propriétés physiques des hydrocarbures	<b>14</b>
<b>Tableau 3 :</b> Les conditions de culture pour le test de dégradation de pétrole brut	<b>35</b>
<b>Tableau 4 :</b> Résultats du dénombrement sur gélose PDA des trois échantillons du sol	<b>40</b>
<b>Tableau 5 :</b> Identification des champignons filamenteux isolés	<b>42</b>
<b>Tableau 6 :</b> Croissance des souches fongiques dans le milieu minéral additionné de pétrole brut ou de glucose	<b>45</b>

## Sommaire

<b>Abréviations</b> .....	<b>i</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>ii</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>iii</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>I. Etudes bibliographiques</b> .....	<b>4</b>
<b>I.1 La Pollution</b> .....	<b>5</b>
<b>I.1.1 Les type de pollution</b> .....	<b>5</b>
<b>I.1.1.1 La pollution des eaux</b> .....	<b>5</b>
<b>I.1.1.2 La pollution atmosphérique</b> .....	<b>6</b>
<b>I.1.1.3 La Pollution du sol</b> .....	<b>6</b>
<b>I.1.1.3.1 Types de pollution du sol</b> .....	<b>7</b>
<b>I.1.1.3.2 Origines de pollution</b> .....	<b>7</b>
<b>I.1.1.3.3 Types de polluants</b> .....	<b>7</b>
<b>I.1.1.3.4 Pollution par les hydrocarbures et leurs impacts</b> .....	<b>7</b>
<b>I.2 Les hydrocarbures</b> .....	<b>8</b>
<b>I.2.1 Sources d'hydrocarbures</b> .....	<b>8</b>
<b>I.2.2 Classification des hydrocarbures</b> .....	<b>10</b>
<b>I.2.3 Les propriétés physico-chimiques des hydrocarbures</b> .....	<b>12</b>
<b>I.2.3.1 Les propriétés physiques</b> .....	<b>12</b>
<b>I.2.3.2 Les propriétés chimiques des hydrocarbures</b> .....	<b>14</b>
<b>I.3 La bioremédiation</b> .....	<b>15</b>
<b>I.3.1 Traitement des sols pollués par les hydrocarbures</b> .....	<b>15</b>
<b>I.3.1.1 Traitements physiques</b> .....	<b>16</b>
<b>I.3.1.2 Traitements thermiques</b> .....	<b>16</b>
<b>I.3.1.3 Traitements chimiques</b> .....	<b>16</b>
<b>I.3.1.4 Traitements biologiques</b> .....	<b>16</b>
<b>I.3.2 Biodégradation des hydrocarbures</b> .....	<b>18</b>
<b>I.3.2.3 Types de biodégradation</b> .....	<b>19</b>
<b>I.3.3 Les champignons aptes à biodégrader les hydrocarbures</b> .....	<b>19</b>
<b>I.3.3.1 Champignons non lignolytiques</b> .....	<b>19</b>
<b>I.3.3.2 Champignons lignolytiques</b> .....	<b>20</b>
<b>I.3.4 Facteurs influençant la biodégradation des hydrocarbures</b> .....	<b>22</b>

<b>I.3.5 Mécanisme d'accès aux hydrocarbures</b> .....	23
<b>I.3.5.1 Utilisation de la phase dissoute</b> .....	23
<b>I.3.5.2 Transfert interfacial direct (TID)</b> .....	24
<b>I.3.5.3 Transfert interfacial assisté par les biosurfactants (TIA)</b> .....	24
<b>I.3.5.4 Transfert micellaire (Pseudosolubilisation)</b> .....	24
<b>I.3.6 Biodégradation par type d'hydrocarbures</b> .....	25
<b>I.3.6.1 Biodégradation des hydrocarbures saturés</b> .....	25
<b>I.3.6.2 Biodégradation des hydrocarbures aromatiques</b> .....	26
<b>I.4 Les champignons du sol</b> .....	27
<b>I.4.1 Nutrition</b> .....	28
<b>I.4.2 Caractères spécifiques des champignons et répartition dans le sol</b> .....	28
<b>I.4.3 Le rôle des champignons dans le sol</b> .....	30
<b>II. Matériel et méthode</b> .....	31
<b>II.1. Matériel</b> .....	32
<b>II.1.1. Echantillonnage</b> .....	32
<b>II.1.2. Milieux de culture</b> .....	32
<b>II.2. Méthodes</b> .....	33
<b>II.2.1. Isolement des champignons dégradant les hydrocarbures</b> .....	33
<b>II.2.2. Dénombrement</b> .....	34
<b>II.2.3. Purification des souches fongiques</b> .....	34
<b>II.2.4. Conservation des souches</b> .....	34
<b>II.2.5. Identification</b> .....	34
<b>II.2.5.1. Observation macroscopique</b> .....	34
<b>II.2.5.2. Observation microscopique</b> .....	34
<b>II.2.6. Test de dégradation du pétrole brut en milieu liquide</b> .....	35
<b>III. Résultats et discussions</b> .....	36
<b>III.1. Isolement des champignons dégradant les hydrocarbures</b> .....	37
<b>III.1.1. Isolement des souches fongiques à partir du sol pollué par le gasoil</b> .....	37
<b>III.1.2. Isolement des souches fongiques à partir du sol pollué par le pétrole cru</b> .....	37
<b>III.1.3. Isolement des souches fongiques à partir du sol pollué par l'huile de moteur brûlé</b> .....	38
<b>III.2. Dénombrement de la microflore fongique</b> .....	39
<b>III.3. Identification des souches fongiques</b> .....	41

<b>III.4. Test de dégradation du pétrole brut en milieu liquide.....</b>	<b>45</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>48</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>51</b>
<b>Annexe.....</b>	<b>59</b>



# Introduction

Le phénomène de pollution par les hydrocarbures a une importance de plus en plus grande sur les plans environnemental, sanitaire et économique. Cette pollution peut avoir un impact soit direct ou indirect, sur la santé humaine et l'équilibre des écosystèmes aussi bien marins que continentaux. La qualité des sols peut également en être altérée (Mbonigaba *et al.*, 2009).

L'évaluation de la pollution par les hydrocarbures moyennant les analyses quantitatives et qualitatives s'avère très onéreuse bien qu'elle soit indispensable en fournissant des données physicochimiques quantifiées. De plus, ces analyses ne permettent pas de connaître l'impact de ces polluants sur le milieu vivant. Néanmoins, ces mesures permettent de connaître la pollution et de mesurer les concentrations des polluants présents et aussi en mesurer les effets (Greene *et al.*, 2000). Compte tenu des limites présentées par les analyses physico-chimiques, il est nécessaire de faire appel à des moyens biologiques pour surveiller les effets de ces polluants émis par les décharges dans le sol. Le recours aux microorganismes présente l'intérêt d'observer la vie sous ses différentes formes et permet de servir, dans les conditions de perturbation, de signal d'alarme. Le développement de la bio-indication ouvre ainsi la voie à une surveillance écologique plus large intégrant les effets sur l'environnement grâce à des organismes sentinelles (Garrec et Van Haluwyn, 2002).

Par ailleurs, le problème majeur rencontré dans les sols pollués par les produits pétroliers est l'atteinte de la nappe phréatique affectant ainsi la qualité des eaux. Leur décontamination peut nécessiter soit l'intervention de procédés physicochimiques ou alors biologiques (Scow, 2003).

En dépit des utilisations multiples des procédés physicochimiques dans la restauration des sols pollués par les produits pétroliers, la bioremédiation reste la solution la plus efficace, la plus demandée car la mieux maîtrisée et la moins coûteuse (Vogel, 2001). Il s'agit là d'une technique douce dont le principe repose sur la minéralisation complète des produits pétroliers qui ne génèrent aucun sous-produit toxique ; contrairement aux procédés physicochimiques qui consistent souvent en un transfert de la pollution d'un milieu à un autre ou encore à son confinement (Vandecasteele, 2005).

Les microorganismes jouent un rôle crucial dans le devenir des polluants, notamment dans la dégradation des hydrocarbures pétroliers (Leahy et Colwell, 1990). De nombreuses études ont montré que des microorganismes hydrocarbonoclastes étaient sélectionnés suite à la contamination (Yakimov *et al.*, 2005, Head *et al.*, 2006).

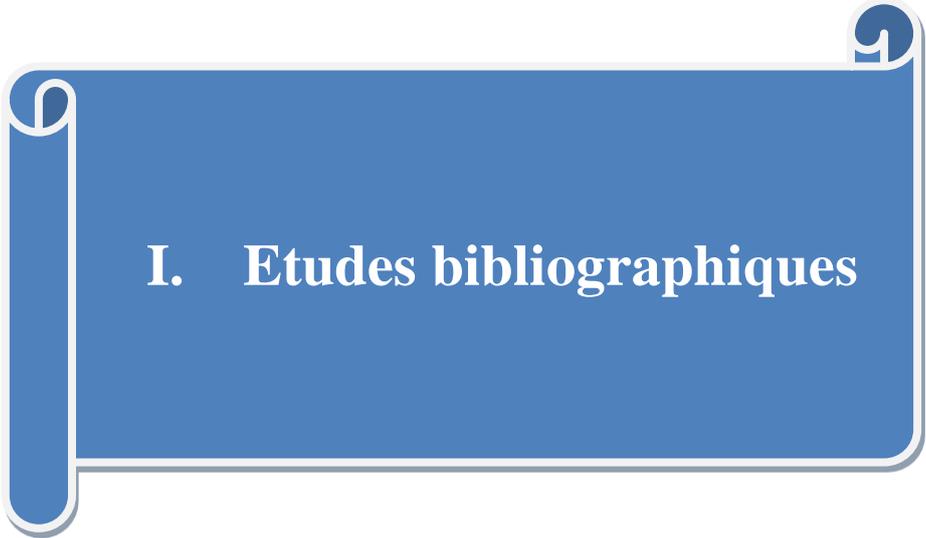
Depuis les deux dernières décennies, les champignons ont attiré l'attention car ils peuvent jouer un rôle important dans la bioremédiation. Pour longtemps les chercheurs se sont

concentrés principalement sur l'utilisation de bactéries, mais récemment les champignons ont reçu une attention considérable grâce à leur potentiel dans la bioremédiation en raison de leurs production des enzymes qui ne sont pas seulement utilisé dans la dégradation de la lignine, mais aussi peut dégrader une large gamme de polluants récalcitrants tels que les hydrocarbures polyaromatiques, les chlorophénols, et les pesticides (Bumpus *et al.*, 1985).

L'objectif principal de ce travail est d'identifier et de caractériser des souches fongiques isolées d'un sol pollué par le pétrole cru, le gasoil et l'huile de moteur brulé, afin d'évaluer leur potentiels de biodégradation des hydrocarbures.

Ce travail s'articule autour de trois chapitres :

- Le premier chapitre aborde une synthèse bibliographique sur la pollution et ces types, les hydrocarbures et le rôle que jouent les microorganismes (les champignons) dans leur élimination.
- Le deuxième chapitre représente l'étude expérimentale et les méthodes analytiques utilisé pour l'isolement et l'identification des souches fongiques ainsi que la mise au point de leur capacité de bioremédiation.
- Le troisième chapitre est dédié à une synthèse des résultats obtenus, qui seront discutés, suivi par une conclusion générale.



# **I. Etudes bibliographiques**

## **I. 1. La Pollution**

Il y a de nombreuses définitions qui ont été données par les experts. Parmi celle-ci nous retiendrons la suivante publiée dans un rapport rédigé par le comité scientifique de la maison blanche intitulé « Pour restaurer la qualité de notre environnement » : C'est une modification défavorable du milieu naturel qui apparaît en totalité ou en partie comme un sous-produit de l'action humaine, au travers d'effets directs ou indirects altérant les critères de répartition des flux d'énergie, des niveaux de radiation, de la constitution physico-chimique du milieu naturel et de l'abondance des espèces vivantes. Ces modifications peuvent affecter l'homme directement ou au travers des ressources agricoles, en eau et autres produits biologiques. Elles peuvent aussi l'affecter en altérant les objets physiques qu'il possède, les possibilités du milieu ou encore en enlaidissant la nature (Emilian K, 2004).

La définition de pollution est donc très large et elle permet de comprendre aussi bien des polluants d'origine naturelle que des polluants liés à l'activité humaine (anthropique). (Emilian K, 2004).

### **I.1.1. Les types de pollution**

#### **I.1.1.1. La pollution des eaux**

L'eau est le vecteur choisi par l'homme pour éliminer la majorité de ses déchets. Les multiples utilisations de l'eau par l'homme donnent lieu à la formation d'eaux usées, présentes en différentes concentrations à l'état pur ou mélangé. Par ailleurs, presque tous les processus industriels et artisanaux consomment de l'eau et rejettent des eaux résiduaires. Sous cette terminologie, on groupe habituellement des eaux d'origines très diverses : les eaux d'origine urbaine (eaux ménagères, eaux vannes), toute cette masse d'effluents est plus ou moins diluée par les eaux de lavage de la voirie et les eaux pluviales (Emilian K, 2004).



**Figure 1.** Des eaux usées jetées dans la Paillote, une plage de Bousmail (*Berki et Boulanouar, 2015*).

### **I.1.1.2. La pollution atmosphérique**

Fort utilisé de nos jours, le terme pollution atmosphérique désigne l'ensemble des rejets de composés toxiques libérés par l'homme dans l'atmosphère, mais aussi les substances malodorantes qui, sans être vraiment dangereuses dans l'immédiat pour les organismes vivants, exercent tout de même une action perturbatrice sur l'environnement (Emilian K, 2004).



**Figure 2.** Site industriel : usines rejetant des fumées polluantes (*Boojoo, Fotolia*).

### **I.1.1.3. La Pollution du sol**

Les sources responsables de cette pollution résultent : d'épandage d'engrais, ou de pesticides, décharge publique et les déchets industrielles (Hamelin *et al.*, 2000). La pollution des sols et des sous-sols résulte des conséquences des diverses activités humaines (industrielles, agricoles ...) cumulées au cours des temps. Ces pollutions négligées jusqu'à une époque relativement récente deviennent aujourd'hui, environnementales et socio-économiques. Il y a contamination lorsqu'une telle substance potentiellement dangereuse est introduite artificiellement dans un milieu naturel, qu'elle que soit sa teneur (contaminant). Il y a pollution quand la teneur est potentiellement dangereuse, ou lorsqu'elle atteint les valeurs limites fixées par les normes (valeur guides) (Jeannot *et al.*, 2001).



**Figure 3.** Un déversement d'hydrocarbures (Alcor in Actualités, 2014).

#### **I.1.1.3.1. Types de pollution du sol**

On distingue deux types de pollution du sol :

##### **I.1.1.3.1.1. Pollutions ponctuelles**

Dépôt ou épandage de polluants sur une surface restreinte, que l'on peut assimiler à une source (Jeannot *et al.*, 2001).

##### **I.1.1.3.1.2. Pollutions diffuses**

Épandage ou retombée de polluants sur une grande surface (Jeannot *et al.*, 2001).

#### **I.1.1.3.2. Origines de pollution du sol**

On distingue deux origines de pollution :

##### **I.1.1.3.2.1. Pollutions accidentelles**

Où une grande quantité de polluant est déversée en fonction du temps (déversement ou dépôt ponctuel de polluants).

##### **I.1.1.3.2.2. Pollutions chroniques**

Dont les effets cumulés peuvent être plus importants que ceux d'une pollution accidentelle (Jeannot et Lemiere, 2001).

#### **I.1.1.3.3. Types de polluants du sol**

Les groupes de composés pétroliers polluants pour lesquelles la biodépollution est possible sont :

- Les hydrocarbures pétroliers (gasoils, fuel, kérosène, huiles minérales).
- Les déchets d'exploitation du pétrole (boues et résidus d'huiles goudrons) (Bliefert et Perraud, 2004).

#### **I.1.1.3.4. Pollution par les hydrocarbures et leurs impacts**

La pollution est une modification défavorable du milieu naturel (dégradation, altération) qui apparaît en totalité ou en partie comme le sous-produit de l'action humaine (Rodrigo *et al.*, 2005). Les impacts de la pollution par les hydrocarbures sont multiples. Les aspects les plus évidents sont les grandes catastrophes très médiatisés (Soltani, 2004).

Les hydrocarbures sont des contaminants environnementaux omniprésents. Ils constituent une classe des produits chimiques organiques dangereux dont certains de leurs effets toxiques sont reconnus comme fortement cancérigènes, génotoxiques, immunotoxique, mutagénique ou tératogénique. Ils représentent une menace pour la santé publique (Wang *et*

*al.*, 2000; Rehmann *et al.*, 2001; Cheung et Kinkle, 2001; Alexander *et al.*, 2002 ; Kanaly *et al.*, 2002; Eriksson *et al.*, 2003).

Les sols contaminés par les hydrocarbures présentent un danger lors d'un contact direct avec l'Homme ou l'animal ou lors de leur transfert dans les chaînes alimentaires. C'est le phénomène de bioaccumulation avec le piégeage par les végétaux et les animaux des polluants ou de leurs produits de dégradation jusqu'à des teneurs atteignant les seuils de toxicité (Scriban, 1999).

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

Le sujet des hydrocarbures est connu par les travaux de Zobell, 1946. Ils ont été étudiés surtout pour leur toxicité sur les organismes vivants. Dès lors, le nombre de publications sur le sujet n'a jamais cessé d'augmenter. Cependant, plusieurs aspects ont été traités et divers produits testés ; dans différents compartiments de la biosphère.

Les hydrocarbures représentent entre 65 et 95 % de la plupart des pétroles bruts. Les composés pétroliers peuvent être classés en quatre familles principales, qui sont présentes en proportions variables selon l'origine : les hydrocarbures saturés (30 à 70 %), les hydrocarbures aromatiques et polyaromatiques (20 à 40 %), les composés polaires (5 à 25 %) et les asphaltènes (0 à 10 %) (Soltani, 2004).

Les hydrocarbures sont des composés organiques dont la formule chimique comprend uniquement des atomes de carbone (C) et d'hydrogène (H), ils peuvent aussi comprendre des atomes d'oxygène, d'azote et de soufre. Les hydrocarbures ont pour formule brute  $C_nH_m$  où  $n$  et  $m$  sont deux entiers naturels. (Franennec *et al.*, 1998).

D'après Standards et Pancanadiens (2008), le terme «hydrocarbure pétrolier » (HCP) est un terme générique qui désigne les mélanges de composés organiques présents dans des matières géologiques comme l'huile, le bitume et le charbon ou dérivés de ces matières. Les hydrocarbures sont solides, liquides ou gazeux selon leur teneur en carbone ; (solide : le goudron, liquide : l'essence et les huiles de graissage).

### **I.2.1. Sources d'hydrocarbures**

Les bilans d'émissions des hydrocarbures posent le problème de l'exhaustivité des sources de pollutions. Nous pouvons distinguer deux sources principales d'hydrocarbures : les sources naturelles et les sources anthropiques.

#### **I.2.1.1. Sources naturelles**

Il s'agit des sources induisant des rejets de substances polluantes mais qui ne sont pas liées à l'activité humaine. Parmi ces sources, on peut distinguer les sources biogéniques (liées à la présence d'organismes vivants) des autres sources. Elles correspondent aux hydrocarbures naturellement produits. On les retrouve en effet dans les cires des végétaux supérieurs et en quantité moindre dans les résines et les déchets microbiens (Colombo *et al.*, 1989).

Les hydrocarbures issus des végétaux terrestres et marins restent cependant à l'état de traces, (Aboul-Kassim et Simoneit, 1995). Les végétaux produisent essentiellement des hydrocarbures aliphatiques. Les feux de forêt et de prairie sont considérés comme l'apport naturel le plus important, avec les éruptions volcaniques. L'érosion des roches contribue également mais à moindre hauteur, à l'apport naturel total biologique, (Hahn et Rudiger, 1994).

### **I.2.1.2. Sources anthropiques**

L'utilisation des combustibles fossiles (pétrole, gaz naturel et charbon) constitue la principale source des polluants d'origine anthropique. En effet ces combustibles à eux seuls, comblent environ 80% des besoins énergétiques mondiaux et se concentrent, en majorité, en milieu urbain. Parmi les sources anthropiques, on oppose souvent les sources fixes aux sources mobiles liées aux transports. Une autre notion également importante pour la caractérisation des sources et leur distribution géographique est la notion de source ponctuelle ou diffuse. Les sources ponctuelles caractérisent les grands sites industriels et sont étudiées en conjonction avec des données concernant leur localisation, leur capacité, leur activité...etc. Les sources ponctuelles, définies par la nomenclature Cortinaire sont : les usines de production ayant une capacité thermique supérieure à 300 MW, les raffineries, les fabriques d'acide sulfurique, d'acide nitrique, les unités de production de fer ou d'acier supérieures à 3 Mt/an.

Deux sources anthropiques sont généralement distinguées : d'une part les sources pétrolières, correspondant à une pétrogenèse à basse température, et d'autre part les sources pyrolytiques correspondant à des processus de combustion à haute température.

La circulation automobile constitue l'une des principales sources d'hydrocarbures puisqu'elle combine les deux processus. Les véhicules émettent des gaz d'échappement provenant de la combustion incomplète des carburants, (Fraser *et al.*, 1997 et 1998) et sont aussi à l'origine de déversements de produits variés tels que les carburants, les huiles lubrifiantes ou les débris de pneumatiques, (Bomboi et Hernandez, 1991). Le chauffage

urbain et les diverses industries employant des processus pyrolytiques (production de coke, craquage catalytique, etc...) constituent aussi des sources importantes d'hydrocarbures en milieu urbain (Aboul-Kassim et Simoneit, 1995).

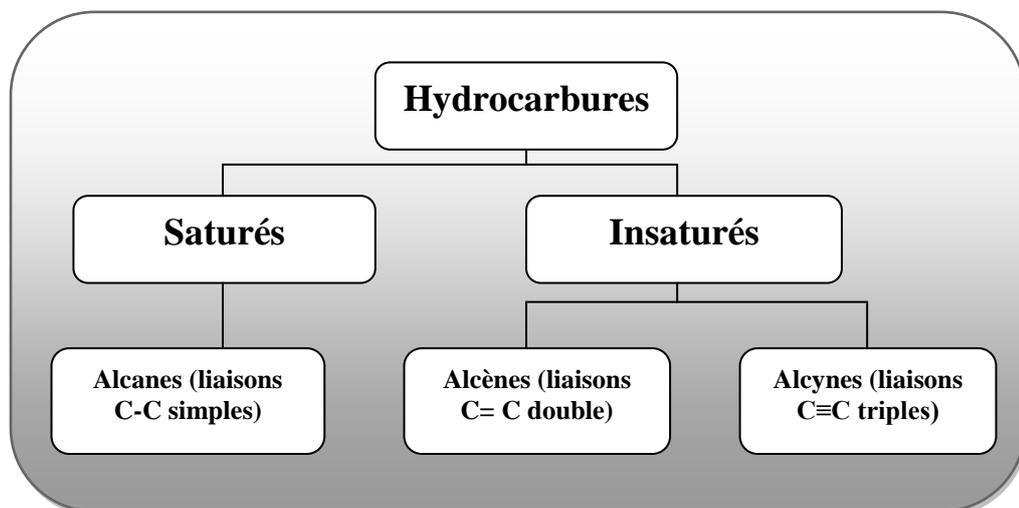
## **I.2.2. Classification des hydrocarbures**

On distingue trois séries distinctes des hydrocarbures : la série aliphatique, la série alicyclique et la série aromatique (Arnaud, 1983).

### **I.2.2.1. Les hydrocarbures aliphatiques**

Les hydrocarbures aliphatiques (HA) sont constitués de chaînes carbonées linéaires qui peuvent être saturées ou posséder une ou plusieurs doubles ou triples liaisons (Arnaud, 1983). Selon la nature des liaisons carbone - carbone, on distingue trois types principaux d'hydrocarbures aliphatiques :

- Les alcanes ( $C_nH_{2n+2}$ ) ;
- Les alcènes ( $C_nH_{2n}$ ) ;
- Les alcynes ( $C_nH_{2n-2}$ ).



**Figure 4.** La série aliphatique des hydrocarbures.

#### **I.2.2.1.1. Les alcanes ou paraffines**

Ce sont des hydrocarbures aliphatiques saturés. Les alcanes sont constitués d'un enchainement d'atomes de carbone portant chacun de 0 à 3 atomes d'hydrogène (sauf le méthane :  $CH_4$ ). Toutes les liaisons carbone-carbone (C-C) sont simples et tous les atomes de carbone sont tétragonaux, (Cortial N, 2006). Les alcanes représentent environ 30% du poids des pétroles bruts, (Fattale, 2008).

#### **I.2.2.1.2. Les alcènes** ou « oléfine »

Ce sont des hydrocarbures insaturés linéaires ou ramifiés, cycliques ou non ; leur formule générale est  $C_nH_{2n}$ , qui est caractérisée par la présence d'au moins une double liaison covalente entre deux atomes de carbone (Cortial N, 2006).

#### **I.2.2.1.3 Les alcynes**

Ce sont des hydrocarbures insaturés et aliphatiques linéaires comportant une seule liaison triple carbone-carbone. Les deux atomes de carbone triplement liés sont dits diagonaux (Cortial N, 2006). Selon qu'il existe un ou deux groupes alkyles, on classe les alcynes en deux groupes :

- les alcynes monosubstitués (ou vrais) de formule  $R-C\equiv C-H$  ;
- les alcynes di-substitués de formule  $R-C\equiv C-R'$  (les radicaux R et R' pouvant être identiques ou différents) (Larousse, 1976).

#### **I.2.2.2. Les hydrocarbures alicycliques**

Les hydrocarbures alicycliques peuvent également être saturés ou posséder une ou plusieurs doubles liaisons, on parle alors respectivement de cyclanes et de cyclènes, (Arnaud, 1983).

##### **I.2.2.2.1. Cyclanes** ou **cyclo-alcanes**

Appelés communément les naphthènes, leur formule générale est  $(CH_2)_n$  ou  $C_nH_{2n}$  (Lefebure, 1978). Ce sont des hydrocarbures entièrement saturés, c'est-à-dire ne comportant que des carbones tétras coordonnés, mais renfermant au moins un cycle carboné (Larousse, 1976).

##### **I.2.2.2.2. Les cyclènes** ou **cyclo-alcènes**

Ce sont des hydrocarbures du même type que les cyclanes, mais ils comportent dans le cycle une double liaison carbone-carbone (Lassalle A et Robert D, 2010). Ce sont des hydrocarbures cycliques insaturés de formule  $C_nH_{2n-2}$  (Khelil, 2004). Les cycles moyens possédant 5 ou 6 atomes de carbone possèdent une réactivité comparable à celle des alcènes (Gerard Dupuis, 2014).

##### **I.2.2.2.3. Les cyclynes**

Ce sont des hydrocarbures cycliques insaturés de formule  $C_nH_{2n-4}$  avec  $n > 8$ . Ils comportent une triple liaison : ce sont des composés très instables (Khelil, 2004).

##### **I.2.2.2.4. Les hétérocycles**

Le cycle d'une molécule peut contenir des atomes différents du carbone, appelés alors hétéroatomes. Les hétéroatomes le plus courant sont le soufre, l'azote et l'oxygène. On peut également rencontrer le bore, le phosphore et le sélénium (M el atyqy, 2013).

### **I.2.2.3. Les hydrocarbures aromatiques**

La série aromatique ne comprend que des hydrocarbures insaturés. Elle rassemble tous les composés renfermant un ou plusieurs noyaux aromatiques.

Les hydrocarbures aromatiques contenant plusieurs noyaux aromatiques accolés sont appelés hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Arnaud, 1983).

En générale les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) forment généralement (entre 15 et 40%) des pétroles bruts (Fattal, 2008).

## **I.2.3. Les propriétés physico-chimiques des hydrocarbures**

### **I.2.3.1. Les propriétés physiques**

Les propriétés physiques des pétroles et produits pétroliers sont décrits avec les paramètres suivants : densité, viscosité, tension de vapeur, point éclair et point d'écoulement, (Ericle Gentil, 2009).

#### **I.2.3.1.1. Densité**

Elle détermine la flottabilité des hydrocarbures. Les paraffiniques au poids moléculaire faible ont tendance à rester en surface, alors que les naphthènes ou asphaltées plus lourds peuvent couler. Outre le poids moléculaire plusieurs autres facteurs contribuent à modifier et augmenter la densité, il s'agit de la température, de l'évaporation ou encore de l'association avec d'autre particules, (Fattal, 2008).

#### **I.2.3.1.2. Viscosité**

La viscosité d'un hydrocarbure définit sa résistance à l'écoulement. Les hydrocarbures à forte viscosité s'écoulent moins facilement que ceux à plus faible viscosité. Tous les hydrocarbures deviennent plus visqueux (c'est-à-dire s'écoulent moins facilement) au fur et à mesure que la température baisse (Itopf a, 2013). Elle diminue lorsque la température augmente (Fattal, 2008). Les hydrocarbures à faible densité ont une faible viscosité et renferment une forte proportion d'éléments volatils (Jendi, 2006). Presque tous les hydrocarbures liquides sont plus légers que l'eau. Pour les produits plus courbatus, la densité varie entre 0.7 à 0.9 (Flaherty, 2007 et Simon, 2009).

#### **I.2.3.1.3. Le point d'ébullition ou la température d'ébullition**

Chaque fraction d'hydrocarbures a une température d'évaporation. Les fractions légères s'évaporent à des températures relativement basses, inférieures à 20°C. Il faut des températures de plus de 100°C pour évaporer les hydrocarbures lourds. Avec l'évaporation, les hydrocarbures, restant devient plus visqueux et plus denses (Fattal, 2008). La température d'ébullition augmente avec la longueur de la chaîne. On en déduit que les forces intermoléculaires de Van der Waals, attractives, augmentent avec la longueur de la chaîne (tableau 1).

**Tableau 1.** Température d'ébullition de différent mélange d'hydrocarbures (Sarais M, 2008).

Produit	Longueur de chaîne carbonée (en nombre d'atome de carbone)	Température d'ébullition (°C)
Gaz pétrolier	1 à 4	40
Essence	5 à 12	40 à 205
Kérosène	10 à 18	175 à 325
Diesel	12 et plus	250 à 350
Fioul	20 à 70	370 à 600

#### **I.2.3.1.4. Le point d'écoulement**

Le point d'écoulement est la plus basse température à laquelle le pétrole continu de couler. La majorité des hydrocarbures a un point d'écoulement inférieur à 0°C. Il est lié corrélativement à la teneur en alcanes et le pourcentage en paraffine augmente, plus la, température du point d'écoulement augmente (<5% pour des températures <5°C ;<15% pour des températures <20°C) (Fattal, 2008).

#### **I.2.3.1.5. La solubilité**

Les hydrocarbures totaux ont une solubilité variable dans l'eau (Pointard, 2008). La solubilité des hydrocarbures est souvent faible à l'exception des hydrocarbures aromatiques qui sont les plus solubles (Ammari, 2004).

#### **I.2.3.1.6. La pression de vapeur**

La pression de vapeur donne une autre indication de la volatilité d'un hydrocarbure, généralement citée en pression de vapeur Reid mesurée à 37,8 °C. Dans la plupart des conditions, une pression de vapeur supérieure à 3 kPa (23 mm Hg) est requise pour que

l'évaporation se produise. La pression de vapeur de l'essence, par exemple, est de l'ordre de 40 à 80 kPa (300 à 600 mm Hg). Le pétrole brut Cossack a une pression de vapeur Reid de 44 kPa et est très volatil, avec une forte proportion de composants atteignant leur point d'ébullition à basse température (Itopf, 2013).

**Tableau 2.** Quelques propriétés physiques des hydrocarbures (Itopf, 2013).

Produits	Densité relative	Viscosité à 20°C	Point d'écoulement (°C)	Point éclair (°C)
Bruts	<b>0.80-0.95</b>	<b>3 - 3000</b>	<b>35 à + 30</b>	<b>Variable</b>
Essence	<b>0.65-0.75</b>	<b>0.5 - 1</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
Kérosène	<b>0.80</b>	<b>2</b>	<b>&gt; - 53</b>	<b>&gt; - 38</b>
Diesel	<b>0.80</b>	<b>15</b>	<b>- 40</b>	<b>+ 55</b>

### **I.2.3.2. Les propriétés chimiques des hydrocarbures**

Les propriétés chimiques des hydrocarbures sont innombrables. Cependant deux grandes familles de propriétés chimiques sont intéressantes (Lescole, 2002) : Les propriétés de liaison et les propriétés d'oxydation.

#### **I.2.3.2.1. Les propriétés de liaison**

L'atome de carbone peut non seulement être associé à des atomes d'hydrogènes, mais encore être lié à un autre carbone qui sera lui - même lié à d'autres atomes d'hydrogènes. Cette aptitude permet la formation de chaînes linéaires ou fermées (Lescole, 2002).

#### **I.2.3.2.2 Les propriétés d'oxydation**

L'action brutale de l'oxygène sur les hydrocarbures conduit à une oxydation rapide qui détruit l'édifice en formant du gaz carbonique et de l'eau en libérant une grande quantité de calories (Lescole, 2002).

#### **I.2.3.2.3. La combustion**

La combustion est une réaction rapide ente un combustible et l'oxygène à haute température pour donner du gaz carbonique et de la vapeur d'eau dans le cas d'une combustion complète (Jendi, 2006). Le but de la combustion est de produire la chaleur indispensable à la plupart des opérations de raffinage du pétrole (Jendi, 2006).

#### **I.2.3.2.4. Le craquage**

Le craquage est une opération industrielle qui consiste à casser les molécules des alcanes lourds (par pyrolyse ou par voie catalytique) pour obtenir des alcanes et alcanes plus légers, (Wuithier, 1972).

## **I. 3. Bioremédiation**

La biorémediation est définie par l'utilisation d'organismes vivants pour détruire les polluants environnementaux (Perry ,2001). C'est une technique de traitement biologique qui base sur l'utilisation de souches microbiennes (bactéries et/ou champignons) afin de dégrader des contaminants. Cette technique a de multiples applications, incluant le nettoyage des eaux, du sol et de bouts industriels. Il existe des microorganismes capables de dégrader efficacement des polluants comme les produits pétroliers, les huiles et les graisses, les hydrocarbures mono et polycycliques, les BPC (biphénylpolychlorés), cette technique permet de diminuer les couts d'assainissement. Tout comme les autres traitements, les procédés de bioremédiation peuvent être regroupés en deux sous parties, la première consacrée aux traitements de dépollution « in situ », la seconde aux traitements « hors site » (Li et Chen, 2002).

### **I.3.1. Traitement des sols pollués par les hydrocarbures**

Les hydrocarbures sont connus pour représenter un risque certain pour la santé humaine et les écosystèmes, si leur concentration et leur mobilité sont trop importantes. Afin d'éviter la diffusion des HCP des sites contaminés vers les profondeurs des sols, des mesures doivent être prises en considération. Le choix d'une méthode particulière de dépollution va dépendre, au préalable, de certains paramètres comme le type de polluant et de la variabilité de son comportement (volatilité, adsorbabilité, polarité...), de la diversité des conditions locales (nature du sol, de la nappe, accessibilité, disponibilité de surfaces utilisables à proximité, zone urbaine ou non), de voir s'il s'agit d'une pollution récente ou ancienne, de son étendue ou non. En plus, les exigences économiques et administratives sont à prendre en compte. Tout ceci nécessite donc, au préalable, un diagnostic (Vogel, 2001). En fonction de ces différents aspects, trois catégories d'actions peuvent être menées :

- Les méthodes *ex situ* qui consistent en l'excavation des sols contaminés. On parlera de méthode "**hors site**" si le sol est évacué vers un centre de traitement spécialisé, ou de méthode "**sur site**" si le sol excavé est redéposé sur le site pour être traité
- Les méthodes *in situ* pour lesquelles l'opération de dépollution s'effectue sans excavation du sol. Cette option est souvent choisie pour traiter des sites en activité ou lorsque la zone

polluée est trop étendue pour avoir recours à l'excavation (Ballerini et Vandecasteele, 1999). La dépollution peut être mise en œuvre en utilisant les procédés suivants :

### **I.3.1.1. Traitements physiques**

Actuellement, les traitements physiques constituent la majorité des techniques mises en œuvre. Elles consistent à séparer et concentrer les polluants, sans les modifier ou les détruire. Les procédés d'extraction, de lavage et de confinement sont les plus souvent utilisés (Scriban, 1999).

### **I.3.1.2. Traitements thermiques**

Deux techniques *ex situ* sont utilisées, l'incinération et la désorption thermique. Elles sont employées pour la décontamination des sols pollués par les produits organiques. Ces technologies consistent à utiliser les hautes températures pour réduire les polluants en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O (Lecomte, 1995).

### **I.3.1.3. Traitements chimiques**

Les traitements chimiques ont pour but de détruire les polluants ou de les transformer en une forme moins nocive pour l'environnement ; et ceci par l'intermédiaire de réactions chimiques se produisant entre le polluant et le réactif ajouté. Ils peuvent être applicables *in situ* ou après excavation des sols. La majorité des procédés exigent que les sols soient sous forme de boues ou que les contaminants soient mobilisés dans un milieu liquide (Masten et Davies, 1997).

### **I.3.1.4. Traitements biologiques**

Les procédés biologiques permettent de dégrader les polluants par l'action des organismes (bactéries, champignons, levures, plantes). Ils peuvent être utilisés seuls ou en complément d'une autre technique. La décontamination par voie biologique consiste donc à stimuler un phénomène naturel pour en augmenter le rendement afin de détruire le polluant organique qui sera utilisé comme source de carbone (Colin, 2000). Pour la dégradation des hydrocarbures, différents micro-organismes sont utilisés tels que *Arthrobacter*, *Novocardia* ou *Pseudomonas*. Si la flore locale est inadaptée à la dégradation des polluants ou est peu abondante, des souches bactériennes performantes allochtones peuvent être ajoutées au sol (Scow, 2003).

#### **I.3.1.4.1. Traitement *in situ***

La biodégradation par traitement *in situ* Cette technique fait appel au pompage et injection de l'oxygène sous forme gazeuse ( $O_2$ ,  $O_3$ ) ou liquide ( $H_2O_2$ ) avec injection de nutriments nécessaires à l'activité microbienne. La source d'oxygène est le principal inconvénient de ce système, car l'injection d'eau saturée en air n'est pas suffisante. L'apport d'oxygène s'effectue de plus en plus en phase liquide surtout à partir de peroxyde d'hydrogène. Cependant, cette source d'oxygène présente trois inconvénients majeurs : son coût, le caractère corrosif de  $H_2O_2$ , qui attaque les puits d'injection et le pouvoir désinfectant de  $H_2O_2$  si celui-ci est utilisé à de fortes concentrations (Kosaric, 2001).

### **I.3.1.4.2. Traitement en réacteur**

Le principe du traitement en réacteur consiste à réaliser et faciliter la biodégradation dans un contenant installé sur le site, en ajoutant au sol les nutriments nécessaires aux microorganismes (Vogel, 2001). Le sol excavé va subir diverses opérations de broyage, de tamisage et d'homogénéisation. Il sera ensuite mélangé à de l'eau, généralement en proportions de 30 % poids/volume et introduit dans le réacteur par pompage. Différents modes de fonctionnement sont possibles, soit en continu ou en discontinu (Vandecasteele, 2005).

La plupart des dispositifs sont constitués de plusieurs réacteurs en chaîne, ce qui permet de transférer la boue d'un réacteur à l'autre. Les quantités de nutriments, calculées en fonction de la quantité initiale de polluant, sont ajoutées régulièrement afin de maintenir un rapport optimum entre les taux de carbone, d'azote et de phosphore. Des micro-organismes peuvent également être ajoutés pour maintenir la concentration en biomasse. Dans chaque réacteur, un brassage assure un contact et un transfert de masse maximum entre le polluant et les bactéries (Morgan *et al.*, 1994 ; Dubourguier, 2000).

### **I.3.1.4.3. Bioterre et Landfarming**

Le bioterre et le landfarming regroupent toutes les applications mettant en œuvre des lots de terres contaminées de différentes hauteurs, y compris ceux auxquels ont été additionnés des matières végétales (composts) (Lecomte, 1995). Pour se faire, le sol est étalé après excavation sur une grande surface imperméable, sur une épaisseur de quelques dizaines de centimètres. Ensuite la terre est retournée avec d'éventuels ajouts favorisant la biodégradation (Lecomte, 1995). Lorsque le taux d'élimination n'est pas suffisamment élevé, la biostimulation peut être effectuée par ajout de nutriments spécifiques et/ou bioaugmenté par ajout de bactéries adaptées à la pollution. Straube *et al.*, (2003) ont constaté une réelle amélioration des taux de dégradation des hydrocarbures après avoir ajouté de l'azote

(augmentation de 10 % du taux de biodégradation). De même, Juhasz et Naidu (2000) suggèrent que la bioaugmentation est une méthode pour favoriser la dégradation des HAP lourds (benzo [a] pyrène) ou le traitement des sols fortement contaminés.

#### **I.3.1.4.4. Phytoremédiation**

Certaines plantes permettent de transformer (phytoremédiation) ou de stabiliser (phytostabilisation) les polluants dans les sols. En effet, les racines de celles-ci sont étroitement associées à une microflore bactérienne et fongique qui va aider ou faciliter la dégradation des hydrocarbures (Liste et Alexander, 2000). Longtemps, la phytoremédiation était restée essentiellement appliquée aux métaux lourds, mais de récentes études ont montré que cette technique est utilisable pour les HAP (Ballerini, 1999). Cependant, les mécanismes mis en jeu sont encore mal connus (Binet *et al.*, 2000).

### **I.3.2. Biodégradation des hydrocarbures**

#### **I.3.2.1. Définition de la biodégradabilité**

La biodégradabilité est l'aptitude d'une matière organique à subir la biodégradation, c'est-à-dire la dégradation moléculaire en milieu généralement aqueux résultant des actions complexes des microorganismes. Sous l'activité enzymatique des ces microorganismes, une substance pourra subir la biodégradation en se transformant en métabolites et finalement, en dioxyde de carbone et en eau (Scow, 2003).

#### **I.3.2.2. Les processus de biodégradation**

##### **I.3.2.2.1. Biodégradation primaire**

Biodégradation primaire qui est l'évaluation de la disparition de substance, dans des conditions définies par la mesure de la quantité résiduelle ou la perte de propriétés (Scow, 2003).

##### **I.3.2.2.2. Biodégradation ultime**

Biodégradation ultime qui exprime le stade auquel la ou les molécules sont totalement transférées en CO<sub>2</sub> (conditions aérobie) ou en CH<sub>4</sub> (conditions anaérobie), soit en constituant de la biomasse, soit en éléments minéraux (ex: minéralisation de l'azote organique en nitrate, ammonium...) (Bouillon, 2003).

##### **I.3.2.2.3. Biodégradation acceptable**

Biodégradation acceptable qui est la dégradation biologique d'un composé organique au point d'atténuer sa toxicité (Scow, 2003).

### **I.3.2.3. Types de biodégradation**

#### **I.3.2.3.1. Biodégradation aérobie**

Selon Zhenpeng et *al.*,(2002), La biodégradation aérobie d'une substance organique est le degré de modification physique et chimique que subit cette matière organique par les microorganismes. Celle-ci peut être affectée par la modification de l'un des facteurs suivants :

- Vitesse de dégradation des composés organiques.
- Quantité de l'oxygène consommée.
- Produits résultant de la dégradation.
- Activité microbienne.

#### **I.3.2.3.2. Biodégradation anaérobie**

La biodégradation anaérobie d'une substance organique est le degré de modification physique et chimique que subit cette matière organique par les microorganismes en conditions d'anaérobiose (Hongwie et *al.*, 2003).

### **I.3.3. Les champignons aptes à biodégrader les hydrocarbures**

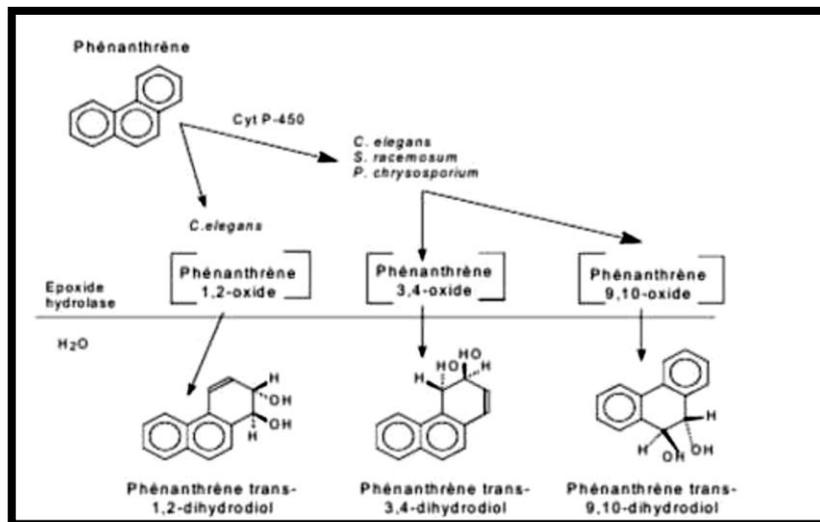
Selon des auteurs, les champignons aussi peuvent dégradées les hydrocarbures. La majorité des champignons est capable d'attaquer les HAP de haut poids moléculaire produisant des intermédiaires plus solubles et plus réactifs, qui sont potentiellement métabolisables par certaines bactéries aérobies (Boonchan et *al.*, 2000). Contrairement aux bactéries, et en général, les champignons n'utilisent pas les HAP comme leur source unique de carbone et d'énergie, mais ils transforment ces composés en métabolites détoxifiés par cométabolisme (Boonchan et *al.*, 2000). Chez les champignons, parmi les voies d'attaque des HAP, il faut distinguer entre celles existant chez les champignons lignolytiques de celles existant chez les autres champignons. Cette différence a fait l'objet de nombreux travaux, mais deux cas sont à considérer (Bouchez, 1995).

#### **I.3.3.1. Champignons non lignolytiques**

Les champignons non lignolytiques tels que *Cunninghamella elegans*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium janthinellum*, *Syncephalastrum sp* et *Saccharomyces cerevisiae* peuvent transformer une variété de HAP ; y compris le pyrène, le chrysène, et le benzo[a]pyrène en métabolites polaires. En effet, une étude a montré la

capacité de la souche *Aspergillus niger* à transformer le pyrène et le phénanthrène en 1-méthoxypyrène et 1-méthoxyphénanthrène. L'attaque initiale des HAP est catalysée par le biais d'une monooxygénase. Un atome d'une molécule d'oxygène est incorporé dans un cycle aromatique des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) impliqués formant alors une arène oxyde pouvant évoluer en phénol ou en trans-dihydrodiol.

L'autre atome de la molécule d'oxygène est réduit en eau. L'attaque initiale des HAP pouvant se faire en différentes positions, et à partir d'un même HAP, de très nombreux isomères peuvent ainsi être formée (Figure3). La monooxygénase responsable de cette dégradation est le cytochrome P-450 (enzyme membranaire inductible), (Boonchan *et al.*, 2000).



**Figure 5.** Métabolisme du phénanthrène par différents espèces de champignons (Sutherland *et al.*, 1995).

### I.3.3.2 Champignons lignolytiques

Le mécanisme d'attaque des HAP est dans ce cas complètement différent des précédents. Lorsqu'ils sont cultivés en conditions limitées en carbone, en azote ou en soufre, les champignons lignolytiques produisent des enzymes extracellulaires. Parmi elles, il y a des lignines peroxydases [LiP] qui permettent l'attaque de la structure aromatique de la lignine et également le manganèse peroxydases [MnP]. Ces enzymes sont présumées être impliquées dans le processus de dégradation des HAP. En fait, il s'agit de cométabolisme, puisque les composés libérés ne peuvent pas servir de substrats de croissance aux champignons qui les produisent. Les lignines peroxydases sont peu spécifiques. Elles agissent sous forme oxydée en soustrayant un électron à la structure aromatique attaquée. Les HAP tels que l'anthracène et le pyrène, sont oxydés mais l'attaque reste très limitée. Des structures quinoniques (pyrène 1,6- dione dans le cas du pyrène) et des composés aromatiques hydroxylés sont obtenues.

Dans la plupart des cas, le métabolisme de ces produits ne va pas plus loin.

Les champignons lignolytiques excrètent trois types d'enzymes solubles, les lignine-peroxydases, les manganèse-peroxydases, ou les phénol-oxydases, ainsi que des enzymes produisant du peroxyde d'hydrogène. Ces enzymes sont impliquées dans la dégradation de la lignine, un polymère constitué de structures phénoliques, (Haritash et Kaushik, 2009) (Figure.4.). Certains champignons dits de la pourriture blanche (*Pycnoporus cinnabarinus*, *Bjerkandera adusta* et *Pleurotus ostreatus*) produisent, les laccases, (Mercier, 1998 ; Rama et al., 1998). Sous l'action de l'ensemble de ces enzymes, la transformation initiale des HAPs augmente significativement leur biodégradabilité, l'attaque du cycle par les systèmes enzymatiques bactériens étant facilitée par la présence d'un groupe réactif (quinone), (Gramms et al., 1999 ; Kotterman et al., 1998).

Il existe aussi d'autres champignons de la pourriture blanche. Le mieux et plus étudié pour ses capacités de dégradation : est *phanerochaete chrysosporium*, (Boonchan et al., 2000), car il possède un avantage par rapport aux bactéries est qu'à la fois les HAP et les phénols peuvent être complètement éliminés, que la biodégradation a lieu par l'action d'enzymes extracellulaires, ce qui est meilleur pour la biodégradation des HAP de poids moléculaire élevé et les molécules faiblement hydrosolubles. Toutefois, la biodégradation n'est pas complète et des intermédiaires sont détectés (Kennes et Lema, 1994), ce qui pose d'autres problèmes. Toutefois, Salicis et al., (1999) et Ravelet et al., (2000) ont récemment montré la capacité de certains Deutéromycètes des genres *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* et *Rhizopus sp.* à utiliser le fluoranthène et le pyrène comme seules sources de carbone et d'énergie.

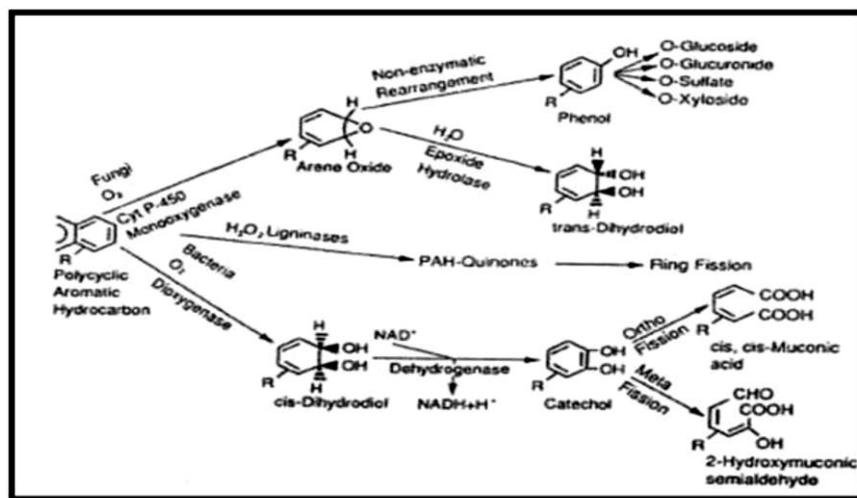


Figure 6. Voies de dégradation des HAP chez les champignons et les bactéries, (Cerniglia, 1984).

### **I.3.4. Facteurs influençant la biodégradation des hydrocarbures**

De nombreux paramètres influent sur l'efficacité du traitement biologique, il s'agit de :

#### **I.3.4.1. Structure et nature du sol**

Les bioprocédés s'appliquent à une grande variété de sol. Pour cela, il est important connaître la structure et la nature de sol (Lecomte, 1995). Nam *et al.* (2003) ont observé que les agrégats de sols réduisaient la biodégradation.

#### **I.3.4.2. Composition chimique des hydrocarbures**

Les hydrocarbures pétroliers diffèrent par leur susceptibilité aux attaques microbiennes. Ainsi, la vitesse de biodégradation est plus élevée pour les hydrocarbures saturés, viennent ensuite les aromatiques légères, les aromatiques à haut poids moléculaire et les composés polaires ayant la vitesse de dégradation la plus faible (Soltani, 2004).

#### **I.3.4.3. Humidité**

L'humidité est un paramètre important dans les processus de dégradation des composés organiques simples ou complexes. Il est connu que les faibles humidités inférieures à 2% limitent la vitesse de biodégradation (Davis et Madsen, 1996). Inversement, des teneurs trop élevées vont influencer sur la perméabilité des sols aux gaz et générer des conditions de limitations de transfert d'oxygène et donc de limitation de métabolisme microbien aérobie (Ballerini, 1999).

#### **I.3.4.4. Température**

La température influence profondément la multiplication microbienne et sur leurs métabolismes. Les températures optimales de la croissance et de l'activité des réactions chimiques des microorganismes du sol varient selon l'espèce. L'intervalle de température favorable à la bonne activité microbienne se situe entre 20 et 37°C (Scriban *et al.*, 1999; Gibbs *et al.*, 2001).

#### **I.3.4.5. Salinité**

La salinité diminue le nombre de micro-organismes dans le sol. Elle ralentit les processus de l'humification et de la minéralisation des matières organiques. En effet, de tous les processus biologiques, la nitrification est la plus touchée, ainsi que le dégagement de CO<sub>2</sub> (Mallouhi, 1989). Les fortes salinités constituent donc une barrière naturelle pour la biodégradation (Bertrand *et al.*, 1993).

#### **I.3.4.6. Potentiel d'hydrogène (pH)**

L'activité microbienne est largement influencée par le pH. Il doit être situé entre 5 et 9 avec un optimum aux alentours de 7 (Gabet, 2004). Si le pH est acide, il peut favoriser la solubilisation des métaux lourds qui sont très toxiques pour les bactéries (Abul-Kassim et Simoniete, 2001).

#### **I.3.4.7. Taux d'oxygène**

Le processus biologique aérobie est souhaitable pour la bioremédiation de sol pollué par le diesel (Brinkmann et *al.*, 1998). Ainsi, la respiration aérobie semble être le mécanisme primaire pour la biodégradation des hydrocarbures (Greer et *al.*, 2003). Plusieurs auteurs montrent que la biodégradation anaérobie est plus lente que la biodégradation aérobie (Huang et *al.*, 2000).

#### **I.3.4.8. Contenu en nutriments**

Les nutriments sont indispensables à l'activité et au développement des microorganismes. Ce sont des corps simples qui peuvent être assimilés, sans transformation digestive par les organismes et favoriser la croissance des populations de bactéries. Les plus importants sont l'azote et le phosphore (N, P) (Baroah et Borthakor, 1999).

### **I.3.5. Mécanisme d'accession aux hydrocarbures**

Selon Scott et Finnerty (1976), le mécanisme d'accession impliqué dans le transport des hydrocarbures à travers la paroi des microorganismes est mal élucidé bien que des gouttelettes d'hydrocarbures soient fréquemment observées dans la cellule. Depuis longtemps, la faible dégradation de plusieurs contaminants a été attribuée à leur récalcitrance (résistance à l'attaque enzymatique). Mais, depuis le début des années 90, il a été avancé que c'est plutôt leur très basse hydro-solubilité qui expliquerait leur catabolisme difficile et limité (Comeau, 1999). Ainsi, du fait de la faible solubilité de la plupart des hydrocarbures, le mécanisme d'accession par les microorganismes peut se faire d'après de nombreux auteurs selon quatre modes que l'on peut décrire comme suit :

#### **I.3.5.1. Utilisation de la phase dissoute**

Ce modèle est celui généralement accepté pour la plupart des substrats. Une fois le substrat dissout assimilé, la bactérie ne peut utiliser que les molécules se solubilisant dans l'eau. Par exemple, il a été démontré que la solubilité et la vitesse de dissolution du naphthalène limitent la croissance d'une souche *Alcaligenes NP-ALK*. Au début de la croissance, la faible densité cellulaire de la culture initiale permet une croissance exponentielle puisque la concentration de naphthalène dissous suffit aux besoins métaboliques.

Si la densité cellulaire augmente à un niveau où les exigences nutritionnelles surpassent la vitesse de dissolution, la biodisponibilité deviendra alors limitant et la croissance linéaire. Cette dernière va dépendre alors de la vitesse de dissolution du naphthalène (Comeau, 1999).

#### **I.3.5.2. Transfert interfacial direct (TID)**

Dans ce cas, le microorganisme ne produit pas de biosurfactant mais va adhérer du fait de sa forte hydrophobicité à l'interface phase hydrophobe/phase aqueuse (Ballerini et Vandecasteele, 1999). Ainsi, d'après Finnerty et Singer (1985) beaucoup de microorganismes dégradant les hydrocarbures ont des surfaces hydrophobes et peuvent donc s'associer aux gouttelettes d'hydrocarbure ou même entrer dans la phase organique pendant la culture.

Singer et Finnerty (1984) ainsi que Rateldge (1978) ont largement démontré que les changements étendus dans la composition des lipides de la membrane cellulaire peuvent se produire pendant la croissance sur des alcanes ; et peuvent dans certains cas, représenter le moyen d'augmenter l'association cellulaire avec la phase d'hydrocarbure. Un système actif de transport employé par *Acinetobacter HOI-N* cultivé sur n-hexadécane a été décrit par KAPPELI et Finnerty (1979), où des gouttelettes d'hydrocarbure ont été encapsulées dans les microvésicules de la membrane finissant alors par pénétrer dans la cellule.

#### **I.3.5.3. Transfert interfacial assisté par les biosurfactants (TIA)**

Des biosurfactants sont produits par les bactéries. Ils ne sont pas indispensables au transfert qui s'effectue comme dans le cas précédent mais ils vont l'accélérer de façon importante en augmentant l'aire inter faciale entre les phases hydrophobe et hydrophile (émulsification) (Ballerini et Vandecasteele, 1999). La formation d'une émulsion est souvent observée lors de la croissance de microorganismes sur des hydrocarbures aliphatiques (huiles). Dans ce cas, la production de bioémulsifiant permet un accroissement du ratio surface/volume, ce qui va augmenter la surface disponible pour l'adhésion direct des microorganismes au substrat (Comeau, 1999). L'emulsane est le bioémulsifiant le plus connu, sécrété par la souche *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 (Foght et al., 1989 ; Hommel, 1994). Il existe aussi l'alsane sécrété par *Acinetobacter radioresistens* KA53. Barkay et al. (1999) et Toren et al. (2002) ont démontré que le complexe alsane augmente considérablement la solubilité des hydrocarbures polyaromatiques dans la phase aqueuse.

#### **I.3.5.4. Transfert micellaire (Pseudosolubilisation)**

Certains microorganismes peuvent produire des biosurfactants qui solubiliseraient le substrat dans des micelles qui à leur tour seraient directement assimilés (Comeau, 1999). Un

mutant Tn5 d'une souche de *P.aeruginosa* dégradant des hydrocarbures et qui est incapable de se développer sur n-hexadécane a été isolé par Koch et al. (1991). Ces auteurs ont constaté que la mutation avait eu comme conséquence une perte de production de biosurfactant. Ce qui a entraîné la cessation complète de la prise des hydrocarbures. Goswami et Singh (1991) ont remarqué qu'un processus de pseudo solubilisation (formation de microémulsion) a été impliqué dans la prise du n-hexadécane. Ces auteurs ont étudié deux souches de *Pseudomonas* capables de croître sur cet hydrocarbure. Ils ont observé qu'une souche s'est développée beaucoup plus rapidement que l'autre, avec un taux de croissance très élevée. Ce résultat est dû à la production simultanément d'un émulsifiant «une lipoprotéine» et d'un facteur de pseudo solubilisation «une glycoprotéine» qui ont fonctionné en synergie.

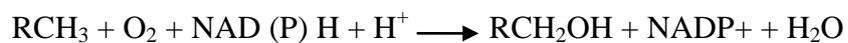
Les espèces les plus importantes sont celles appartenant au genre *Pseudomonas* produisant les rhamnolipides et les espèces du genre *Torulopsis* produisant les sophorolipides. Les biosurfactants de ces différentes espèces sont extrêmement efficaces et créent les niveaux de tension superficielle les plus bas et ceci pour des concentrations inférieures à celles requises pour les agents tensioactifs synthétiques (Vandecasteele, 2005). Il convient de noter que les rhamnolipides sont activement synthétisés au cours de la phase stationnaire de *Pseudomonas aeruginosa*. Par conséquent, ils sont également produits pendant la première étape du processus de la bioremédiation et contribuent à la mobilisation et solubilisation des contaminants pendant les étapes de minéralisation (Chayabutra et Ju, 2000).

### **I.3.6. Biodégradation par type d'hydrocarbures**

#### **I.3.6.1. Biodégradation des hydrocarbures saturés**

La biodégradation des hydrocarbures saturés est essentiellement un processus aérobie réalisé par des bactéries. La dégradation des n-alcanes a été étudiée en détail. Une spécialisation nette des microorganismes selon les longueurs de chaîne des alcanes est une première caractéristique importante. En effet, les bactéries méthylo trophes strictes sont seules capables (hormis quelques levures) de dégrader le méthane. Elles sont très répandues dans la nature, ce qui reflète la large distribution du méthane dans l'environnement. Ces bactéries appartiennent à cinq genres de bactéries Gram-négatives (*Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylomonas*, *Methylocystis*, *Methylosinus*) (Parales et al., 2000). Les alcanes à chaîne moyenne (C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub>) sont utilisés notamment par des espèces de bactéries du genre *Pseudomonas* comme *P.aeruginosa*, *P. putida* et *P. oleovorans* qui ont été particulièrement étudiées (Kaistner et al.1994 ; Vandecasteele, 2005). Les alcanes à chaîne longue (C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>) sont très bien utilisés par les microorganismes, plus rapidement que les alcanes moyens. Les

bactéries remplissant ce rôle appartiennent en particulier aux groupes des *Corynebacterium*, *Mycobacterium* et *Nocardia* (CMN); notamment au genre *Rhodococcus*, c'est le cas de la souche *Rhodococcus* Q15 capable d'utiliser une large gamme des alcanes (C<sub>10</sub> à C<sub>21</sub>) et à des températures allant de 0 °C à 30°C, (Whyte *et al.*, 1998). De plus, les alcanes à très longue chaîne (>C<sub>20</sub>) sont également dégradés par les microorganismes, mais l'utilisation de ces substrats solides à température ambiante a été moins étudiée (Ballerini et Vandecasteele, 1999). Le catabolisme des n-alcanes commence par l'hydroxylation du carbone situé à une extrémité de la chaîne (oxydation terminale) correspondant au bilan réactionnel d'une monooxygénase (Truffaut *et al.*, 2001; Morgan *et al.*, 1994), selon la réaction suivante:



Le système enzymatique impliqué est bien connu chez la souche *Pseudomonas oleovorans*, modèle de référence pour la dégradation des alcanes. Ce système comprend trois composantes: Une hydroxylase membranaire (gène *alkB*) qui catalyse l'oxydation de la molécule, ainsi qu'une rubridoxine-Fe<sup>2+</sup> couplée à une rubrédoxine réductase qui assurent le transport d'électrons (Vandecasteele, 2005). En ce qui concerne les alcènes, le cas des doubles liaisons terminales a été étudié. Ces alcènes sont biodégradables et leur métabolisme est proche de celui des alcanes. Plusieurs modes d'attaques ont été mis en évidence, mais l'oxydation du groupement méthyle terminal est considérée comme le mécanisme majeur (Ballerini et Vandecasteele, 1999).

### **I.3.6.2. Biodégradation des hydrocarbures aromatiques**

En aérobiose, la plupart des voies cataboliques des hydrocarbures aromatiques convergent vers des intermédiaires hydroxylés tels que les catéchols ou leurs dérivés (protocatéchuate, gentisate). Les enzymes qui catalysent ces transformations sont des monooxygénases et des dioxygénases. D'autres dioxygénases vont agir ensuite pour réaliser l'ouverture du cycle aromatique de ces intermédiaires selon un clivage en position ortho ou méta. Ainsi, les dioxygénase impliquées dans le catabolisme des hydrocarbures aromatiques par des microorganismes du sol illustrent bien leur nature et leur capacité à s'adapter à différentes sources de carbone (Mesarch *et al.*, 2000; Truffaut *et al.*, 2001; Sakamoto *et al.*, 2001). La dégradation des hydrocarbures monoaromatiques est essentiellement le fait de bactéries Gram négatives, telles que les espèces de *Pseudomonas* (*P.putida* OIG3, *P.putida* PaW1, *P.pseudoalcaligenes* KF707, *P.putida* F1, *P.mendocina* KR1, *Burkholderia cepacia* G4, *Ralstonia pickettii* PKO1), mais également Gram positives du groupe des

*Corynebacterium*, *Mycobacterium* et *Nocardia* (CMN) (Hanson et al., 1999; Ballerini et Vandecasteele, 1999; Parales et al., 2000; Chablain et al., 2001; Suenaga et al., 2001).

#### **I. 4. Les champignons du sol**

Ce sont des microorganismes hétérotrophes filamenteux et immobiles. Si l'hétérotrophie est la règle générale, le caractère filamenteux n'est cependant par un critère absolu puisque beaucoup de champignons, dont certains ont une grande importance pratique se présentent sous forme unicellulaire : se sont les levures, ainsi que plusieurs groupes de champignons inférieurs. De même, si l'absence de mobilité est totale chez les champignons dits supérieurs, chez certains autres groupes, la dispersion est assurée par des zoospores flagellées.

Le cytoplasme est parcouru par des courants cytoplasmiques dirigés vers la zone apicale. Ce flux facile à observer chez les champignons dépourvus de cloisons, assurent un apport de nutriment et probablement d'hormones aux parties en croissance. Un courant en sens inverse ou cycle, beaucoup moins net, permet sans doute un retour d'information vers la base et une régulation des flux. Le cytoplasme est bordé par une membrane constituée de phospholipides, de protéines et de stérols. L'ergostérol est un composant caractéristique de la membrane cytoplasmique des champignons à mycélium cloisonné (Mekkaoui A, 2012).

Les oomycètes non-cloisonnés ne sont pas capables de le synthétiser (Davet, 1996). Ces quelques considérations suffisent pour montrer, que le règne des champignons constitue en fait un ensemble très hétérogène et regroupe des êtres vivants dont les ancêtres n'avaient guère des traits communs. Néanmoins, l'importance numérique est le rôle joué par les divers groupes ne sont pas du tout les mêmes et lorsque, par la suite nous parlerons de champignons, c'est presque de tous les organismes filamenteux « typiques » qu'il s'agira.

Les champignons ont des modes de reproduction sexués qui font appel à des mécanismes très divers, aboutissant à la fusion de deux noyaux haploïdes. Ce zygote est généralement pourvu de parois épaisses qui lui permettent de survivre pendant une période défavorable. La reproduction sexuée ne joue généralement qu'un rôle modeste dans la dissémination, des champignons, comparée à la voie asexuée. La plupart des espèces sont capables de former des spores, soit à l'intérieur des sporocystes, soit sur des ramifications différenciées du mycélium (conidiophores). En conditions défavorables, le cytoplasme d'un

article d'un hyphe peut se condenser et s'entourer d'une membrane très épaisse formant un chlamydospore (Mekkaoui A, 2012).

### **I.4.1. Nutrition**

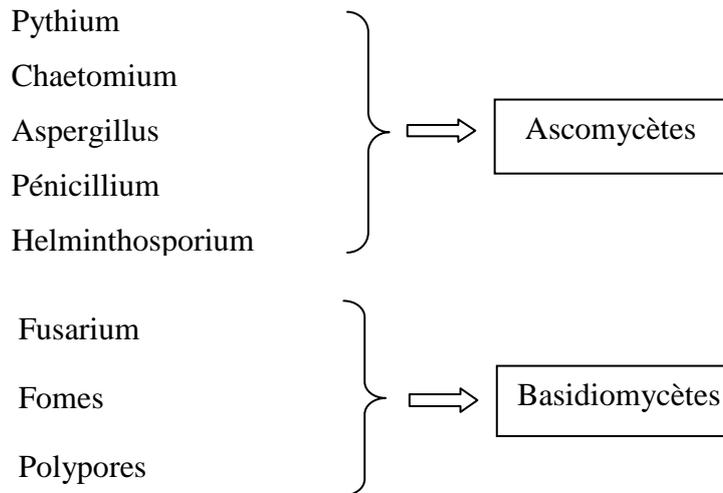
Les champignons sont des hétérotrophes : ils utilisent des composés organiques comme source de carbone. Comme chez les bactéries, la digestion de grosses molécules doit commencer dans le milieu extérieur, car seules les molécules de taille relativement petites peuvent franchir les parois et gagner le cytoplasme. La panoplie enzymatique des champignons est extrêmement riche et leur permet d'utiliser, plus efficacement encore que les bactéries, les substrats les plus complexes : cellulose, lignine, kératine, acides humiques.

Dans les circonstances ordinaires, l'oxydation des molécules organiques fournit l'énergie dont les champignons ont besoin. Mais lorsque ces résultats sont présent en trop faible quantité, beaucoup d'espèces peuvent aussi tirer leur énergie de l'oxydation d'ion ou de minéraux tels-que S,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{Mn}^{++}$  et réserver la totalité du substrat organique à la fourniture de carbone. Il semblerait que, dans ces conditions, un champignon banal comme *Fusarium oxysporum* soit capable de fixer le dioxyde de carbone atmosphérique, se comportant ainsi comme un chimio-autotrophe (Davet, 1996).

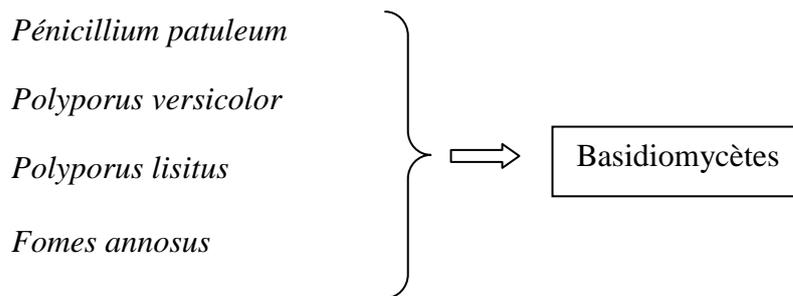
### **I.4.2. Caractères spécifiques des champignons et répartition dans le sol**

Les champignons peuvent être des colonisateurs primaires qui, avec les bactéries, envahissent les substrats nouveaux tombés sur le sol, d'autres sont des colonisateurs secondaires qui se développent sur des substrats abandonnés par les premières vagues de microorganismes. Le complexe enzymatique des champignons peut être très actif.

#### **I.4.2.1. Cellulolytiques**



#### **I.4.2.2. Ligninolytiques**



Toutes les pourritures blanches

#### **I.4.2.3. Pectinolytiques**

Pénicillium  
Fusarium  
Levures et basidiomycètes

La morphologie filamenteuse de la plupart des champignons leur permet de se développer sur de nombreux substrats tout en leur assurant leur alimentation indispensable (rhizomorphes de plusieurs mètres). Installé sur ces nouveaux substrats, et grâce à leur complexe enzymatique efficace, ils vont perforer le revêtement protecteur (cuticules, membrane, etc.), et atteindre de nouveaux milieux nutritifs. Ces perforations vont constituer par la suite, après la lyse des filaments mycéliens, autant de voies de passage pour les bactéries et autres micro-organismes.

Beaucoup de ces champignons exsudent ou libèrent des produits variés, substances hydrosolubles constituées de polyphénols, de sucres simples, d'acides aminés antibiotiques et surtout d'acides organiques, qui vont réorienter tout l'équilibre microbiologique, ou pigments granulaires sombre dont le rôle est important dans l'humification (Kilbertus et Mangenot, 1976).

#### **I.4.2.4. Exigences écologiques**

On a cru pendant longtemps que l'oxygène était indispensable au développement des champignons. On s'est ensuite aperçu que beaucoup d'espèces banales pourraient, au moins temporairement, s'en passer et utiliser d'autres accepteurs d'électrons. Dans ces conditions, elles ont souvent besoin d'un apport extérieur de vitamines, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* *Geotricum candidum*, peuvent avoir une croissance normale sous une atmosphère d'azote en présence de glucose et d'azote minéral (Tabak et Cook, 1968).

Les champignons ont besoin d'humidité, mais leur exigences sont moins élevées que celles des bactéries c'est pourquoi on les retrouve dans les couches superficielles du sol, qui se dessèchent rapidement. La majorité des champignons permettent de les considérer comme des mésophiles : ils se développent de 40 à 45°C, mais ils ne supportent pas plus de 60°C. Un autre groupe, aussi restreint, croît à basse température (entre -5 et 10°C). Les champignons supportent généralement bien le pH acides et dans de telles conditions, sont plus compétitifs que les bactéries pour l'exploitation d'un substrat. On trouve donc plus de champignons que de bactéries dans les sols acides (Mekkaoui A, 2012).

#### **I.4.3. Le rôle des champignons dans le sol**

- Par sa taille et sa structure, un mycélium peut transporter activement des quantités important d'eau et de substances d'un endroit à l'autre du sol.
- La translocation des aliments organiques sert à la formation des fructifications en un ou deux jours, une part importante des matériaux de réserve accumulée dans un mycélium est ainsi transportée dans des fructifications en développement.
- La translocation de sels minéraux prend toute sa signification chez les mycorhizes.

Le champignon est ici collecteur des sels minéraux qu'il transfère à la plante ou les garde en réserve. Par leurs structures ramifiées, les mycéliums augmentent la cohésion des particules dans les couches superficielles du sol (Michel *et al.*, 1997).

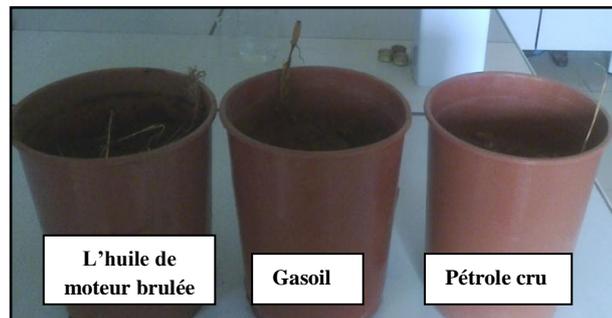


## II. Matériel et méthode

## II. 1. Matériel

### II.1.1. Echantillonnage

Les échantillons du sol contaminé par les hydrocarbures (pétrole cru, gasoil et huile de moteur brûlée) ont été pris à partir de trois pots différent contenant chacun une quantité du sol pollué par un hydrocarbure et exposé à l'air libre pendant 4 mois. Les hydrocarbures utilisés pour la pollution sont : le pétrole cru, le gasoil et l'huile de moteur brûlée.



**Figure 7.** Les pots contenant les échantillons du sol pollué au laboratoire par les trois hydrocarbures (pétrole cru, gasoil et huile de moteur brûlée).

### II.1.2. Milieux de culture

Le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) a été utilisé pour l'isolement et la purification des microorganismes.

Le milieu MSM (Minéral Salt Medium) a été utilisé pour tester la capacité de dégradation des hydrocarbures. Le pH du milieu MSM a été ajusté à 7.2 par un pH mètre (CRISON) (figure 8) en ajoutant quelques gouttes de solution HCl.

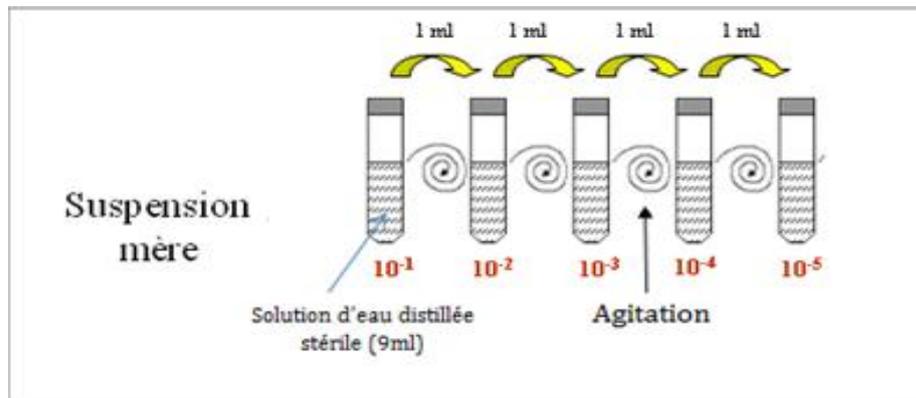


**Figure 8.** Le pH mètre utilisé pour mesurer le pH du milieu de culture  
La composition des milieux de culture est figurée dans l'annexe.

## II. 2. Méthode

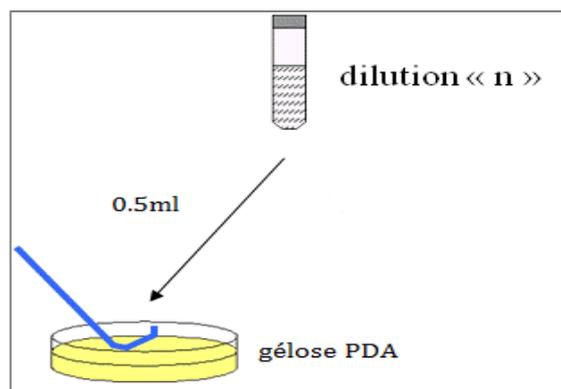
### II.2.1. Isolement des champignons du sol pollué par les hydrocarbures

1g de sol a été prélevé de chacun des trois pots renfermant les sols pollués par les hydrocarbures (pétrole cru, gasoil et huile de moteur brûlée) puis versé dans des tubes contenant 9 ml d'eau distillée stérile et agitée pendant quelques minutes au vortex pour assurer l'homogénéisation. Une série de dilutions a été faite à partir de la solution mère allant de  $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-5}$  (figure 9)



**Figure 9.** Schématisation de la méthode de dilution de l'échantillon du sol dans l'eau distillée stérile.

Un volume de 0.5 ml de chaque dilution a été étalé avec un étaloir stérile sur la surface des boîtes Pétri contenant le milieu PDA (figure 10)



**Figure 10.** Etalement de 0.5ml de chaque dilution sur le milieu de culture.

Les boîtesensemencées ont été incubées à 30°C pendant 7 jours.

### **II.2.2. Dénombrement**

Le dénombrement a été effectué sur des boîtes de pétri présentant des colonies fongiques après 7 jours d'incubation à 30 °C.

### **II.2.3. Purification des souches fongiques**

Après 7 jours d'incubation, nous passons à l'étape de purification des cultures. Celle-ci nous permet d'obtenir des cultures pures à partir des différentes colonies isolées.

La surface des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA stérile a été divisé en quatre secteur, chaque secteur a été inoculé, à l'aide d'une anse stérile, par une quantité des spores et des hyphes de chaque colonie présente dans les boîtes d'isolement précédente.

Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 7 jours.

### **II.2.4. Conservation des souches**

Les souches isolées ont été conservées pour des études ultérieures. La conservation a été effectuée à 4 °C dans le milieu PDA. Cette méthode présente un intérêt de conserver l'aspect des colonies et l'utilisation de la souche par repiquage directe, mais elle nécessite des repiquages fréquents, tous les 6 mois environ.

### **II.2.5. Identification**

Les champignons microscopiques présentent une grande variabilité physiologique, mais aussi une grande variabilité génétique.

Conventionnellement, l'identification des genres fongiques repose sur l'observation des critères morphologiques par l'observation macroscopique et microscopique.

#### **II.2.5.1. Observation macroscopique**

L'observation macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation (aspect des colonies et de leurs revers, la taille et la couleur).

#### **II.2.5.2. Observation microscopique**

Nous avons placé une quantité de spores ainsi que des mycéliums dans une goutte d'eau distillée entre lame et lamelle. La préparation est observée ensuite au microscope optique au grossissement (X 40) puis (X100).

## **II.2.6. Test de dégradation du pétrole brut en milieu liquide**

La capacité des souches fongiques isolées à dégrader le pétrole brut a été testée dans un milieu minéral liquide : Minéral Salt medium (MSM). Quatre souches de champignons différents ont été sélectionnées pour réaliser ce test.

La dégradation de pétrole brut s'effectue dans des flacons de 250 ml contenant 100 ml de milieu MSM préalablement stérilisés. Chaque flacon est additionné de 1% de pétrole brut comme seul source de carbone. Des flacons additionnés de 2% de glucose comme source de carbone ont été préparé. Les flacons ont été ensuite inoculés par une quantité du mycélium fongique précédemment cultivées pendant 7 jours sur milieu PDA (tableau 3).

L'incubation s'effectue à température ambiante dans un système à agitation pendant une période de 15 jours.

Les témoins ont été incubés en suivant les mêmes conditions de culture mais sans addition d'une source de carbone.

**Tableau 3.** Les conditions de culture pour le test de dégradation de pétrole brut.

<b>Les isolats</b>	<b>Les conditions de culture</b>		
isolat n° 01	100ml milieu MSM + 1 ml de pétrole	100ml milieu MSM + 2 g de glucose	100ml milieu MSM (témoin)
isolat n° 02	100ml milieu MSM + 1 ml de pétrole	100ml milieu MSM + 2 g de glucose	100ml milieu MSM (témoin)
isolat n° 03	100ml milieu MSM + 1 ml de pétrole	100ml milieu MSM + 2 g de glucose	100ml milieu MSM (témoin)
isolat n° 04	100ml milieu MSM + 1 ml de pétrole	100ml milieu MSM + 2 g de glucose	100ml milieu MSM (témoin)

A blue scroll graphic with a white border and a white shadow. The scroll is unrolled in the middle, revealing the text. The top and bottom edges of the scroll are curled up.

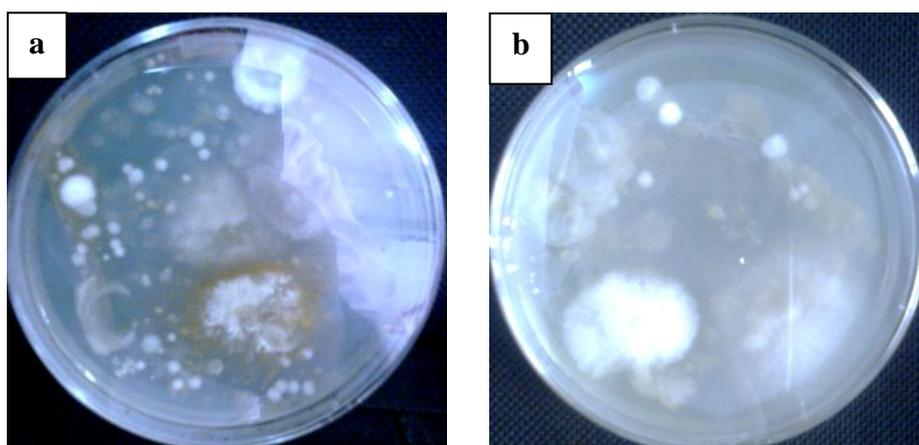
### **III. Résultats et discussions**

### **III.1. Isolement des champignons d'un sol pollué par les hydrocarbures**

L'isolement des champignons à partir des sols pollués par les trois types d'hydrocarbures (pétrole cru, gasoil et huile de moteur brûlée) a permis d'obtenir une croissance fongique sur le milieu PDA avec une densité de croissance qui décroît de la dilution la plus faible vers la dilution la plus forte.

#### **III.1.1. Isolement des isolats fongiques à partir du sol pollué par le gasoil**

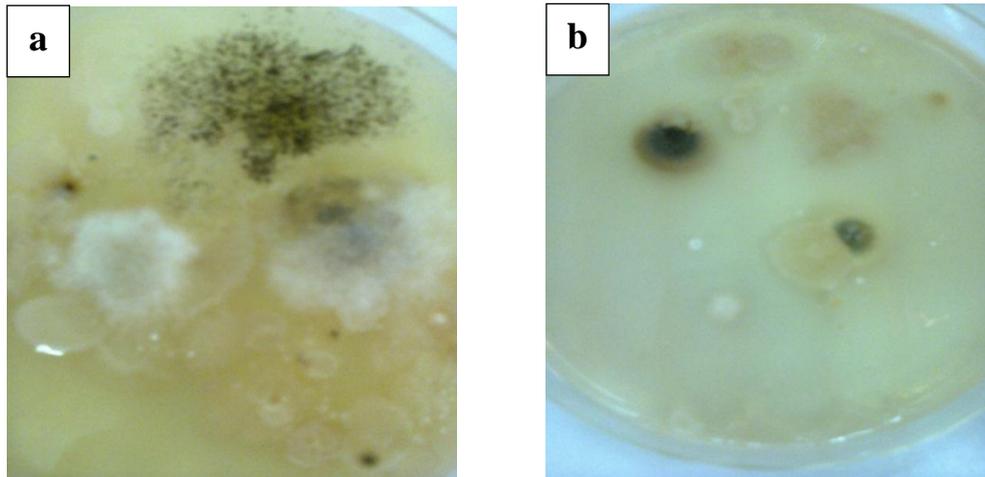
L'isolement à partir du sol pollué par le gasoil a permis d'observer un taux de croissance élevé sur la boîteensemencé par la dilution  $10^{-1}$  avec l'apparition de plusieurs forme de colonies qui se diffèrent par la couleur, la taille et l'aspect du mycélium. Le taux de croissance est plus faible pour la boîteensemencée par la dilution  $10^{-2}$  tandis qu'aucune croissance n'a été observée pour les boîtesensemencées par les dilutions  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$ .



**Figure 11.** Les champignons isolés à partir du sol pollué par le gasoil : (a) dilution  $10^{-1}$ , (b) dilution  $10^{-2}$ .

#### **III.1.2. Isolement des isolats fongiques à partir du sol pollué par le pétrole cru**

L'isolement des champignons à partir du sol pollué par le pétrole cru a permis l'observation d'une croissance des souches fongiques sur la boîteensemencé par la dilution  $10^{-1}$  et une faible croissance pour la boîteensemencée par la dilution  $10^{-2}$ , alors qu'aucune croissance n'a été observée pour les boîtesensemencées par les dilutions  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$ .

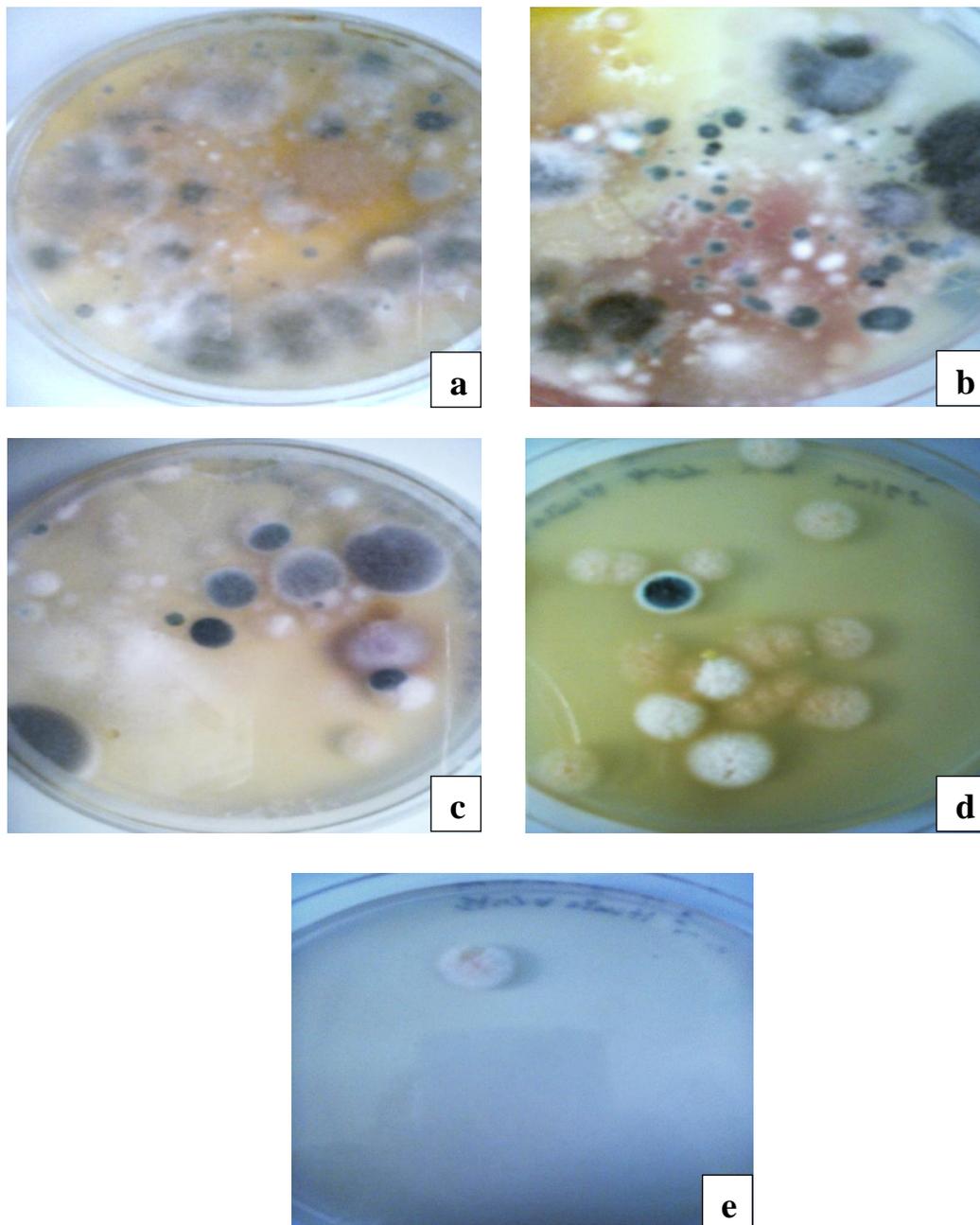


**Figure 12.** Les champignons isolés à partir du sol pollué par le pétrole cru : (a) dilution  $10^{-1}$ , (b) dilution  $10^{-2}$ .

### **III.1.3. Isolement des isolats fongiques à partir du sol pollué par l'huile de moteur brûlée**

Le sol pollué par l'huile de moteur brûlée a montré la présence de la plus grande population fongique qui résiste à la pollution par cet hydrocarbure exprimée par le taux de croissance élevé des champignons sur les boîtesensemencées par les dilutions  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$ . Une colonie d'un champignon a été observée sur la boîte de  $10^{-5}$ . Des colonies de plusieurs formes et couleur ont été remarqué dans les boîtesensemencées par le sol pollué par l'huile brûlé.

L'apparition des colonies sur les boîtesensemencées par les dilutions  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$  n'a été enregistrée que dans ce type de polluant.



**Figure 13.** Les champignons isolés à partir du sol pollué par l'huile de moteur brûlé : (a) dilution  $10^{-1}$ , (b) dilution  $10^{-2}$ , (c) dilution  $10^{-3}$ , (d) dilution  $10^{-4}$ , (e) dilution  $10^{-5}$ .

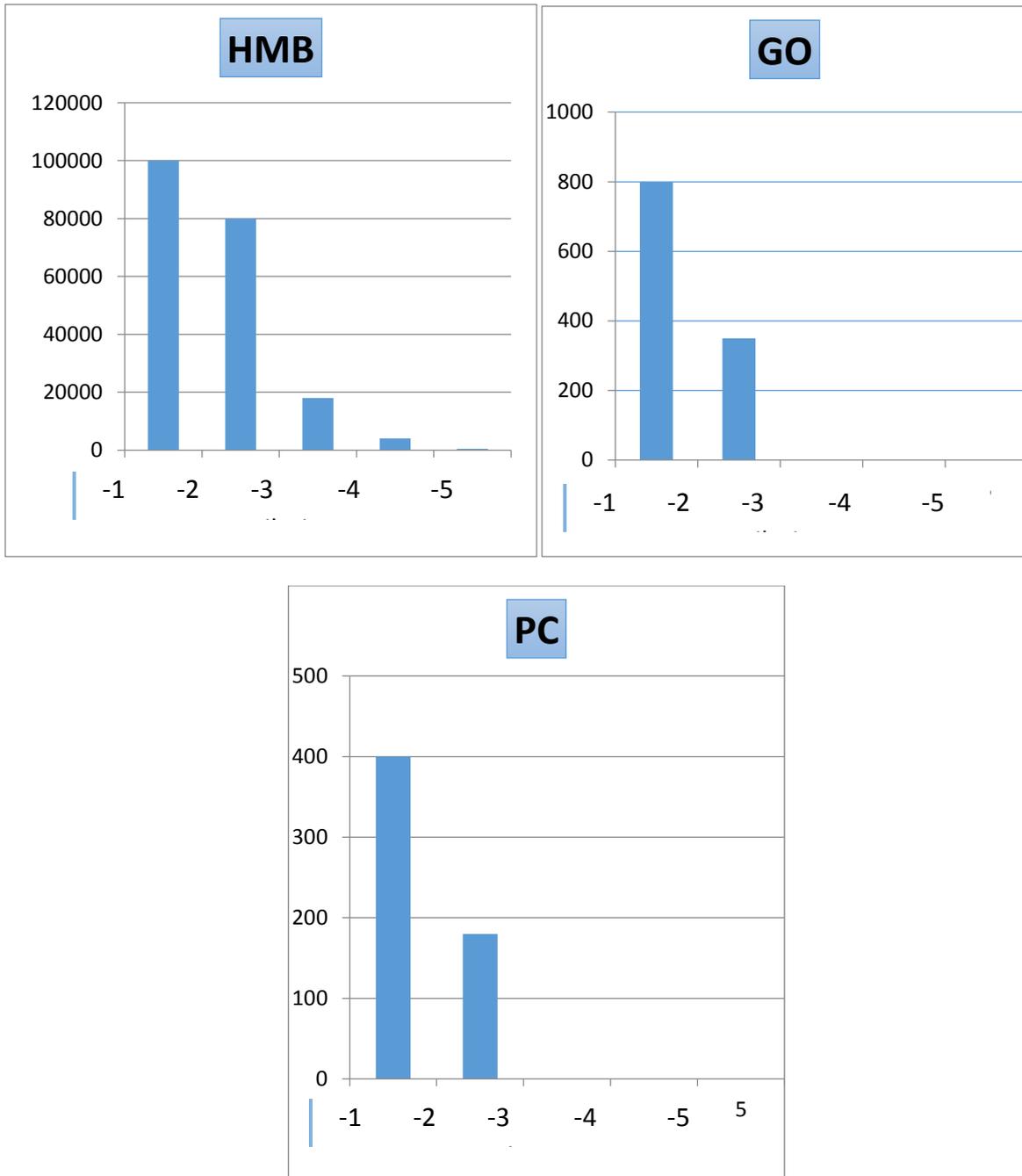
### III.2. Dénombrement de la microflore fongique

Le dénombrement de la microflore fongique présente dans les différents échantillons des sols étudiés a été réalisé par le comptage de nombre de colonies apparus sur le milieu

PDA après 7 jours d'incubation puis en multipliant par le facteur de l'inverse de dilution. Les résultats sont illustrés dans le tableau 4.

**Tableau 4.** Résultats du dénombrement sur gélose PDA des trois échantillons du sol.

Type de sol	La dilution	UFC/g de sol
<b>Sol pollué par l'huile de moteur brûlé</b>	$10^{-1}$	450
	$10^{-2}$	$40.10^2$
	$10^{-3}$	$18.10^3$
	$10^{-4}$	$8.10^4$
	$10^{-5}$	$1.10^5$
<b>Sol pollué par le gasoil</b>	$10^{-1}$	350
	$10^{-2}$	$8.10^2$
	$10^{-3}$	0
	$10^{-4}$	0
	$10^{-5}$	0
<b>Sol pollué par le pétrole cru</b>	$10^{-1}$	180
	$10^{-2}$	$4.10^2$
	$10^{-3}$	0
	$10^{-4}$	0
	$10^{-5}$	0



**Figure 14 :** Résultats du dénombrement sur gélose PDA des trois échantillons du sol pollué par : HMB : huile de moteur brûlée, GO : gasoil, PC : pétrole cru.

### III.3. Identification des souches fongiques

L'identification des différentes souches fongiques isolées à partir des sols pollués par les trois types d'hydrocarbures a permis de répertorier deux genres de champignons filamenteux avec différentes espèces. Les deux genres identifiés sont *Aspergillus* et

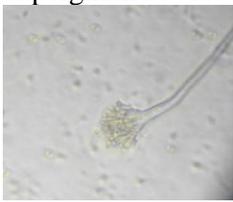
*Penicillium*. L'identification des espèces n'a pas été possible dans les conditions et les moyens de travail disponible au laboratoire.

La dominance des espèces appartenant au genre d'*Aspergillus* et de *Penicillium* dans les sols pollués par les hydrocarbures a été observée dans les travaux réalisés par El Hanafy *et al.* (2015).

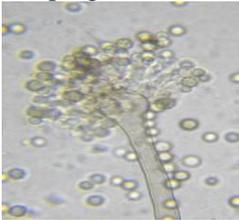
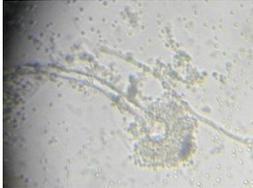
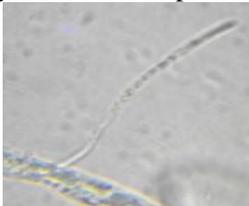
Santos *et al.* (2008) ont isolé quatre espèces différentes du genre *Aspergillus* dégradant les hydrocarbures.

Le tableau 5 résume les différentes observations macroscopiques et microscopiques qui ont conduit à l'identification des souches fongiques isolées des trois échantillons du sol pollués par les hydrocarbures.

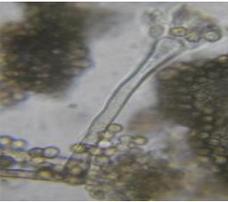
**Tableau 5.** Identification des champignons filamenteux isolés.

Type de polluant	Les souches	Les caractères		Identification	
		Macroscopique			Microscopique
		recto	revers		
l'huile de moteur brûlé	01			<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mycélium septé</li> <li>- Tête aspergillaire avec vésicule.</li> </ul> 	<i>Aspergillus</i> sp
	02			<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mycélium septé</li> <li>- Tête aspergillaire avec vésicule.</li> </ul> 	<i>Aspergillus</i> sp
	03			<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mycélium septé</li> <li>- Tête aspergillaire avec vésicule.</li> </ul> 	<i>Aspergillus</i> sp

## Résultats et discussions

	04			<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mycélium septé</li> <li>- Tête aspergillaire avec vésicule.</li> </ul> 	<i>Aspergillus</i> sp
	05			<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mycélium septé</li> <li>- Tête aspergillaire avec vésicule</li> </ul> 	<i>Aspergillus</i> sp
	06			<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mycélium septé</li> <li>- Conidiophore en "pinceau"</li> </ul> 	<i>Penicillium</i> sp
	07			<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mycélium septé</li> <li>- Tête aspergillaire avec vésicule</li> </ul> 	<i>Aspergillus</i> sp
le gasoil	01			<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mycélium septé</li> <li>- Tête aspergillaire avec vésicule</li> </ul> 	<i>Aspergillus</i> sp
	02			<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mycélium non septé.</li> </ul> 	Non identifié

## Résultats et discussions

	03			<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mycélium septé.</li> </ul> 	<b>Non identifié</b>
le pétrole cru	01			<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mycélium septé</li> <li>- Tête aspergillaire avec vésicule</li> </ul> 	<b><i>Aspergillus</i> sp</b>
	02			<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mycélium septé</li> <li>- Tête aspergillaire avec vésicule</li> </ul> 	<b><i>Aspergillus</i> sp</b>
	03			<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mycélium septé</li> <li>- Tête aspergillaire avec vésicule</li> </ul> 	<b><i>Aspergillus</i> sp</b>

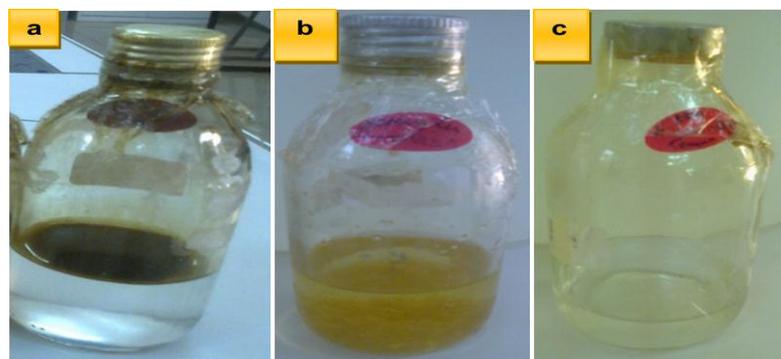
### III.4. Test de dégradation du pétrole brut en milieu liquide

Après incubation à température ambiante et sous agitation pendant 15 jours, on a fait les observations résumées dans le tableau 6. Un aspect des résultats est illustré par la figure 15.

**Tableau 6.** Croissance des isolats dans le milieu minéral additionné de pétrole brut ou de glucose.

Les isolats	milieu MSM + 1 % de pétrole	milieu MSM + 2 % de glucose	(témoin)
isolat n°01	-	+	-
isolat n°02	-	+	-
isolat n°03	-	+	-
isolat n°04	-	+	-

+ : présence de croissance  
- : absence de croissance



**Figure 15.** Résultat de croissance de l'isolat n°01 dans : a) MSM + 1% de pétrole ; b) MSM + 2% de glucose ; c) témoin.

Les observations réalisées sur les milieux de culture après 15 jours d'incubation expriment une croissance du mycélium dans le milieu minéral avec le glucose comme source de carbone.

Le glucose est généralement la source de carbone préféré par les champignons du sol parce qu'il est plus simple, cela exprime la croissance des champignons dans le milieu additionné de glucose.

Aucune croissance n'a été enregistrée dans les milieux additionnés de 1% de pétrole brut.

L'absence de croissance dans les flacons témoins est due à l'absence de la source de carbone.

### **Discussion :**

Les activités industrielles humaines ont souvent été impliquées dans la destruction de l'environnement. Les hydrocarbures et leurs dérivés pétroliers sont l'une des pires formes de pollution. Les déchets provenant des industries et les raffineries de pétrole, qui contiennent des hydrocarbures de pétrole, des métaux, des matières radioactives et les sels, ont le potentiel de provoquer la pollution des sols empêchant la croissance des plantes. Les techniques classiques de décontamination ont quelques inconvénients majeurs. La tendance récente dans l'assainissement de l'environnement est par l'utilisation de microorganismes telluriques ou autres (bioremédiation). La bioremédiation est basée sur des processus d'atténuations naturelles, il est considéré comme plus acceptable que d'autres technologies (Saranraj, 2015).

Dans la présente étude nous avons montré que l'identification des différentes souches fongiques isolées à partir des sols pollués par les trois types d'hydrocarbures a permis de répertorier deux genres de champignons filamenteux. Les deux genres identifiés sont *Aspergillus* et *Penicillium*. L'identification des espèces n'a pas été possible dans les conditions et les moyens de travail disponible au laboratoire.

La dominance des espèces appartenant au genre d'*Aspergillus* et de *Penicillium* dans les sols pollués par les hydrocarbures a été observée dans les travaux réalisés par Al-Nasrawi (2012) ; Maamar, 2015 ; El Shafie et al 2007, El Hanafy *et al.* (2015) Saranraj (2015). Al-Nasrawi (2012) a isolé seize souches fongiques d'un site pollué par le pétrole au Gulf de Mixique, seulement quatre d'entre eux ont été confirmées pour la capacité de biodégradation du pétrole brut.

Le test de biodégradation de pétrole brut par des isolats sélectionnés d'*Aspergillus* et *Penicillium* a été négatif. Aucune croissance n'a été observée dans le milieu de culture MSM

supplémenté par 2% de pétrole brute comme source de carbone. Le résultat été le même après le prolongement de l'incubation avec l'agitation à plus d'un mois. Il est clair que ses isolats fongiques non pas pu produire les enzymes nécessaires pour la dégradation de pétrole. L'explication la plus probable est que la période de 4 mois de contamination du sol n'était pas suffisante aux champignons de s'adapté aux différents polluants. Peut-être que la période de contamination doit être allongée jusqu'à une année où même plus.

Kota *et al* (2014) ont attribué la raison qui contribue à l'inefficacité de quelques champignons dans la dégradation du pétrole à la composition de l'hydrocarbure lui-même, dans ce cas, le pétrole brut. La composition chimique d'une huile brute détermine le type de champignon qui poussent sur cette huile et certains champignons peuvent se développer sur un certain type d'huile brut et pas d'autres (Van Gestel, 2003 ; Davies et Westlake, 1979). Ceci est également pris en charge par Sugaira *et al* (1997) et Atlas et Bartha (1972), qui ont indiqué que, la dégradation du pétrole brut diffère en dépit d'être utilisés par les mêmes espèces de micro-organismes à cause de son origine géographique.



**Conclusion**

La contamination des sols et des eaux souterraines par des déversements d'hydrocarbures pétroliers est fréquente. Elle entraîne des risques pour l'environnement et la santé humaine. Souvent, la contamination est associée aux défaillances des réservoirs de stockage souterrain dans les stations de service. Lorsque les substances dangereuses contenues dans les hydrocarbures sont près des activités humaines, elles peuvent altérer l'eau potable et les sols agricoles et causer des odeurs désagréables.

Les voies d'élimination chimiques et physiques de la pollution par les hydrocarbures ont leurs limites du fait de leur coût ou de leur impact secondaire sur l'environnement. La voie biologique est actuellement en plein essor et suscite de très nombreux travaux de part le monde entier.

Les objectifs de cette étude étaient d'isoler et d'identifier des souches fongiques à partir du sol pollué par les hydrocarbures afin de les investir dans la bioremédiation des sols.

Les échantillons ont été prélevés à partir d'un sol pollué au laboratoire, pendant 4 mois, par trois types différents d'hydrocarbures : pétrole cru, gasoil et l'huile de moteur brûlé.

La méthode d'isolement utilisée dans ce travail été celle des dilutions dans l'eau distillée stérile. Après purification, une identification des souches fongiques a été réalisée par étude de l'aspect macroscopique puis microscopique de différentes colonies fongiques obtenues.

La capacité de quelques champignons isolés à dégrader le pétrole cru a été testé en milieu minéral (Mineral Salt Medium) en ajoutant 1% de pétrole cru.

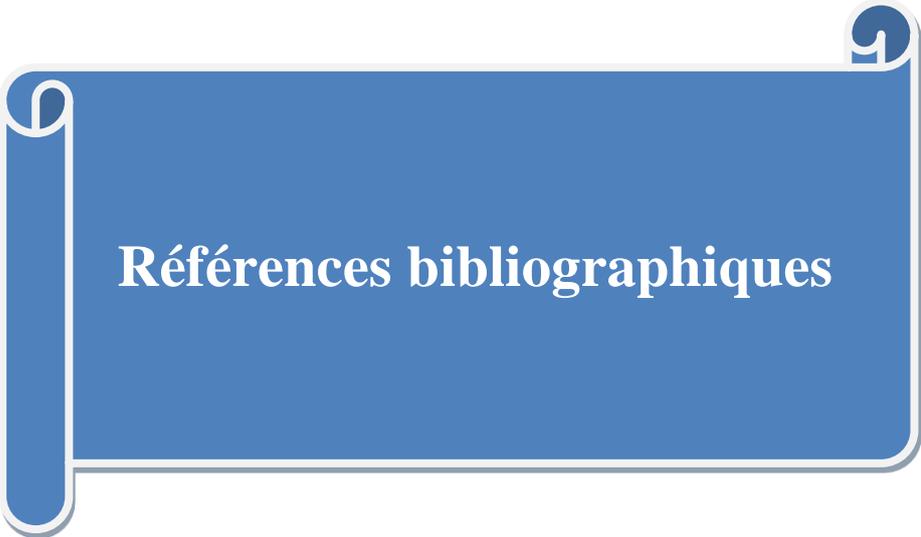
Notre travail de recherche a montré une variabilité importante et complexe de champignons filamenteux dans le sol pollué par les hydrocarbures, notamment celui pollué par l'huile de moteur brûlé. Deux genres ont été identifiés : *Penicillium sp* et *Aspergillus sp*.

Le test de dégradation du pétrole n'a montré aucun résultat positif avec les souches testées. Le test réalisé est insuffisant pour confirmer la capacité ou l'incapacité de ces souches à dégrader les hydrocarbures ; ce qui oblige de faire d'autres tests plus convaincants.

La présence d'une variabilité de champignons qui résistent à la présence des hydrocarbures dans le sol permet de conclure qu'on peut utiliser ces microorganismes pour la biodégradation et la dépollution des zones où les hydrocarbures et leurs dérivés sont déversés.

Ce travail peut être accompli par d'autres travaux :

- confirmer la capacité des souches à dégrader les hydrocarbures par des tests ;
- cibler les souches qui montrent une grande capacité de dégradation de pétrole et de ces dérivés puis tester leur efficacité in situ.

A blue scroll-like banner with white text. The banner has a white border and a white scroll effect on the left side. The text is centered and reads "Références bibliographiques".

## Références bibliographiques

**A**

1. **ABOU LKASSIM T. et SIMONEIT B., 1995.** Aliphatic and aromatic hydrocarbons in particulate fallout of Alexandria, Egypt: sources and applications. *Environnemental Science and Technology*, 29, 2473-2483.
2. **Al-Nasrawi H. (2012)** Biodegradation of crude oil by fungi isolated from Gulf of Mexico. *J Bioremed Biodegrad*, 3:4
3. **AMMARI.R., 2004.** Bio indication de la pollution atmosphérique par les hydrocarbures de la zone urbaine SKIKDA et sa périphérie à l'aide d'une espèce lichénique. Mémoire ingénieur. Université d'Annaba, P3-18.
4. **ARNAUD P., 1983.** Cours de Chimie Organique. Enseignement de la Chimie, Tome 1, 505 p.
5. **Atlas RM and Bartha R. (1972)** Biodegradation of petroleum in seawater at low temperatures. *Can J Microbiol.*; 18(12), 1851-1855.

**B**

6. **BALLERINI et KANDECASTEELE (1999)** .Traitements biologique des sols .Technique de l'ingénieur, traité Environnement, G 2 620 : 1- 6 .
7. **BERTRAND J.C.et MILLE G., (1989).**Devenir de la matière organique exogène. Un modèle : les hydrocarbures. In : BIANCHI M., MARTY D., BERTRAND J.C., et GAUTHIER M.J. (Eds.), *Microorganismes dans les écosystèmes océaniques*. Masson (Paris), chapitre 13 :343-385.
8. **BINET P., PORTAL J .M. et LEYVAL C. ;(2000).** Dissipation of 3-6 ring polycyclique aromatic
9. **BLIFERT C et PERRAUD R., (2004).** Chimie de l'environnement air, eau, sols, déchet. De Boeck université. P (369 ,372-375).
10. **BOMBOI M.T et HERNANDEZ A., 1991.** Hydrocarbons in urban runoff: Their contribution to the wastewaters. *Water Research*, 25, 557-565.
11. **BOONCHAN S., BRITZ M. L., et G. A. STANLEY., 2000.** Degradation and Mineralization of High- Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Defined Fungal-Bacterial Cocultures *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (3) : 1007 – 1019.

12. **BOUCHEZ M., 1995.** La biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques : métabolisme du substrat non conventionnel. Thèse de doctorat de l'école nationale supérieure des industries agro-alimentaires, p. 245.
13. **BOUSSABOUA H., (2002)-** Elément de microbiologie.
14. **Bouderhem Amel.** 2011 .Utilisation des souches bactériennes telluriques autochtones dans la biodetection et la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures. Mémoire de Magister en Microbiologie Appliquée, Univ Kasdi Merbah.
15. **Bumpus JA, Tien M, Wright D, Aust SD (1985)** Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* 228:1434–1436.

### C

16. **CERNIGLIA, C.E., 1984.** Microbial transformation of aromatic hydrocarbons. In: Atlas, R.M. (Ed.), *Petroleum Microbiology*. Macmillan Publishing Company, New York. p 99- 128.
17. **COLOMBO J.C., PELLETIER E., BROCHU C. et KHALIL M., 1989.** Determination of hydrocarbon sources using n-alkane and polyaromatic hydrocarbon distribution indexes. Case study: Rio de la Plata estuary, Argentina. *Environmental Science and Technology*, 23, 888-894.
18. **COLIN F, (2000).** Pollution localisée des sols et des sous –sols par les hydrocarbures et par les solvants chlorés, Académie des sciences, rapport n° 44, Edition Tec & Doc .417.
19. **CORTIAL N. 2006.** CHIMIE. BTS industriels. Ellipse.

### D

20. **Davies JS, and Westlake DW (1979).** Crude oil utilization by fungi. *Can J Microbiol.*; 25(2), 146-156.
21. **Dos Santos, E. O., da Rosa, C. C., dos Passos, C. T., Sanzo, A. V. L., Burkert, J. F. D. M., Kalil, S. J., & Burkert, C. A. V. (2008).** Pre-screening of filamentous fungi isolated from a contaminated site in Southern Brazil for bioaugmentation purposes. *African Journal of Biotechnology*, 7(9).
22. **DUBOURGUIER H .C. (2000).**From the laboratory to industrial scale: Composting of polluted soils from former coal industry and gas plants: future research needs, NATO Advanced Research Workshop the Utilization of Bioremediation to Reduce

Soil Contamination: Problems and Solutions. Liblice Castle, Czech republic, June.14-19.

**E**

23. **EL ATYQY M., 2013.** Chimie organique. Rappel des notions fondamentales.
24. **El Hanafy, A. A., Anwar, Y., Mohamed, S. A., Al-Garni, S. M. S., Sabir, J. S., Zinadah, O. A. A., & Ahmed, M. M. (2015).** Isolation and Molecular Identification of Two Fungal Strains Capable of Degrading Hydrocarbon Contaminants on Saudi Arabian Environment. World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering, 9(12), 1056-1059.
25. **El-Shafie a., Alkindi A.; Albusaidi S.; Charle B.; Abahry S. (2007)** Biodegradation of crude oil and n-alkanes by fungi isolated from Oman. *Marine Pollution Bulletin* 54(11):1692-1696
26. **EMILIA KOLLER, (2004).** Traitement des pollutions industrielles : Eau, Air, Déchets, Sols, Boues.
27. **ERIC LE GENTIL., 2009.** Pollution par les hydrocarbures en Manche et golfe de Gascogne. Risques et prévention entre 1960 et 2004. THESE DE DOCTORAT .P26.

**F**

28. **FATALLE, P ., 2008.** Pollution des cotes par les hydrocarbures .Presse Universitaire, De Renne France .P79, 81 ,91.
29. **FLAHERTY., 2007 et SIMON., 2009.** Les feux d'hydrocarbures .Ed Divonne.20 p.
30. **FRANENNEC J.P.LEPRINCEP., TREMBOUZE P ., FAVENNEC J .P. et EDERNY., 1998.** Le raffinage de pétrole: Exploitation et gisement de la raffinerie, Tome 5, Technip.
31. **FRASER M., CASS G. et SIMONEIT B., 1998.** Gas-phase and particle-phase organic compounds emitted from motor vehicle traffic in a Los Angeles roadway tunnel. Environmental Science and Technology, 32, 2051-2060.
32. **FRASER M., CASS G., SIMONEIT. B et RASMUSSEN R.A., 1997.** Air quality model evaluation data for organics. C2-C36 non aromatic hydrocarbons. Environmental Science and Technology, 31, 2356-2367.

**G**

33. **GERARD DUPUIS., 2014.** Chimie générale et organique.
34. **GRAMMS, G; VOIGT, K. et KIRSCH B., 1999.** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with three to seven aromatic rings by higher fungi in sterile and unsterile soils. Biodeg. 10:51-62.
35. **GHELIMI S., MEZOUAGHI F. et GHERMIT M., 2011.** Isolement de quelques microorganismes bénéfiques du sol et leur intérêt dans le domaine de la lutte biologique. Mémoire d'ingénieur d'état en Génie Biologie, Université d'Abdelhamid Ibn Badis.

**H**

36. **HAHN H. et RUDIGER P., 1994.** The contribution of parked vehicle emissions to the pollution of urban runoff. The Science of the Total Environment, 146, 525-533.
37. **HAMELIN R, LAPRTE J.et PTC A, (2000)** – Environnement et nuisances Edition Clartés. P 157.
38. **HARITASH AK, KAUSHIK CP 2009.** Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): a review. J. Hazard. Mater. 169: 1-15.
39. **Head, I. M., D. M. Jones, et al. (2006).** "Marine microorganisms make a meal of oil." Nature Reviews Microbiology 4: 173-182.

**I**

40. **ITOPF (International Tanker Owners Pollution Federation Limited),, 2013a.** Guides d'informations techniques : Devenirs des déversements d'hydrocarbures en mers. p 4 -5.

**J**

41. **JENDI MOUHAMED EL ADEL, 2006.** Contribution à l'étude de la pollution par le pétrole brut et son interaction sur certaine caractéristique physico-chimique des sols d'AIN.SAMARA dans la wilaya de Constantine. Mém Ing .Université Annaba5 – 1pp et p19.
42. **JUHASZH A.L et R. NAIDU, (2000).** Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo [a] pyrene. International Biodeterioration & Biodegradation, 45, 57-88.

**K**

43. **KENNES C., LEMA J.M., 1994.** Biotechnol. Letters, Vol.16, n07, 759-764 : Degradation of major compounds of creosotes (PAHs and phenols) by Phanerochaete chrysosporium.
44. **KHELIL., 2004.** Utilisation des lichens comme bio indicateurs de la pollution atmosphérique dans la région de Hassi Messaoud, thèse Magistère agro-sah, université d'Ouargla.
45. **KOSARIC N, (2001).** Biosurfactants and their application for soil bioremediation. Food Technol .Biotechnol.39 (4):295-304.
46. **Kota, M.F., Hussaini, A.A.S.A., Zulkharnain, A., Roslan, H.A. (2014)** Bioremediation of Crude Oil by Different Fungal Genera. *Asian Journal of Plant Biology*, 2014, Vol 2, No 1, 11-18
47. **KOTTERMAN, M.J; RIETBERG H.J. et FIELD J.A., 1998.** Polycyclic aromatic hydrocarbon oxidation by the white-roi fungus Bjerkandera sp. Strain BOS55 in the presence of nonionic surfactants. Biotech. Bioeng. 57(2):220-227.

**L**

48. **LAROUSSE., 1976.** Grande-encyclopedie. p 3941
49. **LASSALE A., ROBERT D., 2010.** Comprendre la chimie organique. Technosup.
50. **Leahy, J. G. and R. R. Colwell (1990).** "Microbial degradation of hydrocarbons in the environment." Microbiological Reviews 54: 305-315.
51. **LECOMTE P., 1995.** Les sites pollués, traitement des sols et des eaux souterraines. Édition Lavoisier, TEC & DOC, p. 198.
52. **LEFEBURE., 1978.** Chimie des hydrocarbures, Ed Technip, pp
53. **LESCOLE ., 2002.** Les feux d'hydrocarbures, centre de Divonne – les Baines, P20.
54. **LI J et CHEN B H, (2002),** Solubilization of model polycyclic aromatic hydrocarbons by nonionic surfactants, *Chemical Engineering Science*,57, (14), 2825-2835.
55. **LISTE H. et ALEXANDER M, (2000).** Plant- promoted pyrene degradation in soil .Chemosphere. 40:7-10.

**M**

56. **Maamar A. (2015)** Etude de la biodégradation du pétrole brut par le peuplement fongique du port d'Oran. Thèse de Magistère, université d'Oran.
57. **MASTEN S. J. et S.H.R .DAVIES, (1997)**. Efficacy of in-situ ozonation for the remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soils, *J. Contam. Hydrol.* 28:327-335.
58. **MEKKAOUI ALI, (2012)**. Dégradation de la matière végétale et évolution des microbes du sol
59. **MERCIER R., 1998**. Traitement par des champignons filamenteux de sols contaminés par des composés organiques persistantes: applications aux hydrocarbures aromatiques polycycliques. Thèse de l'université Aix-Marseille I. Spécialité Biologie Cellulaire et Microbiologie.
60. **MORGAN P., WATKINSON R.J et RATLEDGE C, (1994)**. Biodegradation of components of petroleum .In: *Biochemistry of microbial degradation* .Ed Kluwer Academic Publishers.1-31.

**P**

61. **PERRY G., (2001)**. Microbiologie cours et questions de révision. PCEM. PCEP. 1 er Cycle /Licence. 2 éme Cycle / Master. pp (849-853).
62. **POINTARD., 2008**. Mise au point d'un protocole pour l'analyse des hydrocarbures totaux dans l'eau, Master 2, pp 5-6.

**R**

63. **RAMA-MERCIER, R; MOUGIN, C; SIGOILLOT, J.C; SOHIER, L; CHAPLAIN, V. AND ASTHER M., 1998**. Wet sand cultures to screen filamentous fungi for the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biotechnol. Tech.* 12(10):725- 728.
64. **RAVELET, C; KRIVOBOK, S; SAGE, L. AND STEIMAN R., 2000**. Biodegradation of pyrene by sediment fungi. *Chemosphere.* 40:557-563.
65. **Rodrigo J. J.S., E. C. Santas, F. M.Bento, M. C. R. Peralba, P. A. Selbach, E. L. S. Sa and F. A. O. Camargo, 2005**. Anthrasene biodegradation by *pseudomonas Sp*. From a petrochemical sludge landfarming site. *International biodeterioration et biodegradation.* 56. 143-150.

66. **R. JEANNOT, B. LEMIERE, S. CHIRON** avec la collaboration de : F. Augustin, D. Darmendrail, (2001)- Guide méthodologique pour analyse des sols pollués (Document du BRGM 298). Editions BRGM.

**S**

67. **SALICIS, F; KRIVOBOK, S; JACK M. AND BENOIT-GUYOD, J., 1999.** Biodegradation of fluoranthene by soil fungi. *Chemosphere*. 38(13):3031-3039.
68. **SARAI MATHIEU. 2008.** Rapport: analyse historique des accidents dans les depots d'hydrocarbures. Université Polytechnique de Catalunya. Certec.
69. **Saranraj E. (2015)** Isolation of oil degrading fungi from marine environment and their bioremediation potential. Master thesis University of Nandanam , chennai, India
70. **(SCRIBAN, 1999) Scriban R. (1999).** Biotechnologie. 5eme édition. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris. P. 149-159.
71. **Soltani, M., (2004).** Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Doctorat en Chimie Analytique de l'université Paris 6, 284 p.
72. **STANDARDS et PANCANADIENS Y., 2008.** Relatifs aux hydrocarbures pétroliers (HCP) dans le sol.
73. **STRAUBE W.L., C .C. NESTLER, L.D. HANSEN, D.RINGLEBERG, P.H. P RITCHARD et J. JONES-MEEHAN, (2003).** Remediation of polycyclic hydrocarbons (PAHs) through Landfarming with Biostimulation .*Acta Biotechnol.* 23, (2-3): 179-196.
74. **Sugaira K, Ishihara M, Shimauchi T, and Harayama S. (1997)** Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environ Sci Technol.*; 31(1), 41-51.
75. **SUTHERLAND, J.B; RAFFI, F; KHAN, A. A. et CERNIGLIA, C.E., 1995.** Mechanisms of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation. In *Microbial Transformation and degradation of toxic organic chemicals*. Edited by Young, L.L and C.E. Cerniglia. Wiley-Liss. New York.

**T**

76. **TOREN Orr E., Y. PAITAN, E. Z. RON and E. ROSENBERG, (2002).** The Active Component of the Bioemulsifier Alasan from *Acinetobacter radioresistens* KA 53 Is an OmpALiKe Protein. *Journal of Bacteriology*, 184(1):165-170.

**V**

**77. VANDECASTEELE J.P.,( 2005).** Microbiologie pétrolière, Ed technip .Volume 2.

**78. Van Gestel K, Mergaert J, Swings J, Coosemans J, and Ryckeboer. J. (2003)**  
Bioremediation of diesel oil-contaminated soil by composting with biowaste. *Environ Poll.*; 125(3), 361-368.

### W

**79. Wang R. F. D. Wennerstrom, W. W. Cao, A. A. Khan, and C. E. Cernigli, 2000.**  
Cloning, Expression, and Characterization of the Kat G Gene, Encoding Catalase-Peroxidase, from the polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacterium *Mycobacterium Sp*, strain PYR-1. *Applied and environmental Microbiology*, 66 (10): 4300-4304.

**80. Whyte L. G., Hawari J., Zhou E., Bourbonniere L., Inniss W. E., Greer C.W.**  
(1998). Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus sp*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2578-2584.

**81. WUITHIER P., 1972.** Pétrole, Raffinage et Génie chimique. Seconde édition .  
Edition Technip. Paris.

### Y

**82. Yakimov, M.M., Timmis, K.N., et al. 2005.** Obligate oil-degrading marine bacteria  
*Current Opinion in Biotechnology*, 18 (3): 257 – 266.

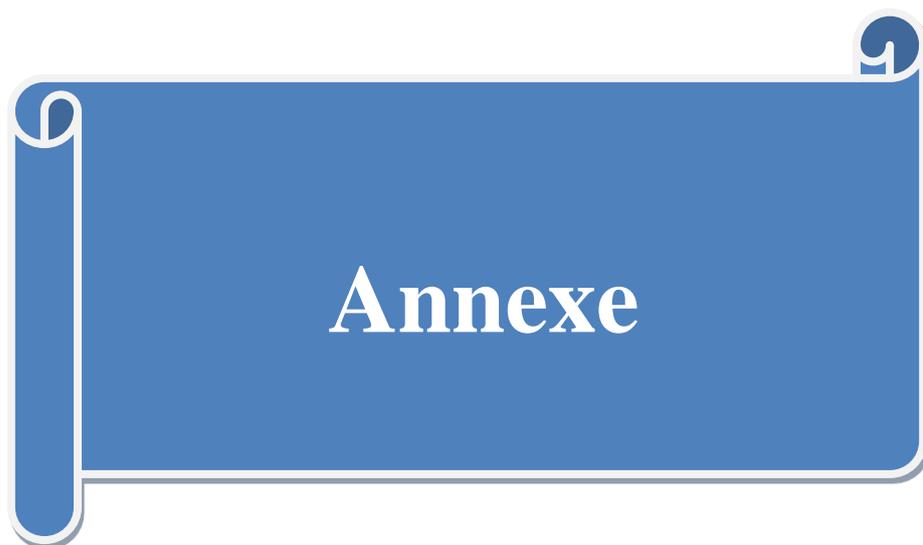
### Z

**83. ZOBELL, C.E., 1946.** Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriol. Rev.*  
10, 1-49.

**84. Berki G et Boulanouar W. (28 juillet 2015).** **In :** *Tout sur l'Algérie*. Disponible sur :<  
<http://www.tsa-algerie.com/wp-content/uploads/2015/07/pollution4.png>>

**85. Boojo, Fotolia.** Site industriel : usines rejetant des fumées polluantes. **In :** *larousse*.  
Disponible sur : <[http://www.larousse.fr/encyclopedie/data/images/1311726-Site\\_industriel.jpg](http://www.larousse.fr/encyclopedie/data/images/1311726-Site_industriel.jpg)>

- 86.** Alcor in Actualités. Pollution\_sols\_causes\_consequences (6 avril 2014). **In** : Alcor diagnostic-pollution des sols. Disponible sur : [http://www.larousse.fr/encyclopedie/data/images/1311726-Site\\_industriel.jpg](http://www.larousse.fr/encyclopedie/data/images/1311726-Site_industriel.jpg)



**Annexe**

---

## Les Milieux de culture

### potato dextrose agar (PDA)

Filtrat de pomme de terre .....	200g
Glucose .....	20g
Agar .....	20g
Eau distillée .....	1000ml

pH=5,6

### minéral salt medium (MSM)

Nacl .....	10g
MgSo <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O .....	0.42g
Kcl .....	0.29g
KH <sub>2</sub> po <sub>4</sub> .....	0.83g
Na <sub>2</sub> Hpo <sub>4</sub> .....	1.25g
Na No <sub>3</sub> .....	0.42g
Eau distillée .....	1000ml

PH=7.2

## Résumé

Les hydrocarbures constituent un polluant majeur des sols. La biodégradation des produits pétroliers par le biais des microorganismes de sol a apparus comme une méthode d'intérêt de point de vue économique et écologique. Le but de notre étude était d'isoler et d'identifier les espèces de champignons présents dans le sol pollué par des hydrocarbures: pétrole brut, le diesel et le moteur de l'huile usagée. Les échantillons de sol ont été pollués par ces dérivés d'hydrocarbures pendant 6 mois. L'isolement des isolats fongiques a été effectué en utilisant la méthode de dilution, tandis que l'identification des champignons a été basée sur leur morphologie, en fonction de l'aspect macroscopique et microscopique.

Un nombre des isolats de champignons ont été isolés à partir de trois types de sols pollués sur un milieu PDA. Les résultats ont montré la présence de deux genres de champignons différents à savoir: *Aspergillus* et *Penicillium*, et la prédominance des isolats appartenant au genre *Aspergillus*. Quatre isolats ont été sélectionnés pour le test de leur capacité à dégrader le pétrole brut. Ils ont été cultivé sur trois milieu de base différent contenant seulement des sels minéraux: sans aucune source de carbone, avec du glucose comme source de carbone et le troisième additionné de 1% du pétrole brut comme source de carbone. Malheureusement, les isolats choisis ont été incapables de dégrader le pétrole brut.

**Mots clés :** Hydrocarbures, Biodégradation, Champignons, *Aspergillus*, *Penicillium*.

## **Abstract**

Hydrocarbons are a major pollutant of soil. Biodegradation of petroleum products through the soil microorganisms has emerged as a method of interest for economic and ecological point of view. The aim of our study was to isolate and identify fungi species present in soil polluted by hydrocarbons: crude oil, diesel and used oil motor. The soil sample was polluted with these hydrocarbon derivatives for 6 months. Isolation of fungi isolates were carried out using the dilution method, whereas the identification of fungi was based on their morphology depending on macroscopic and microscopic appearance.

A number of fungi isolates were isolated from three types of polluted soils on PDA medium. The results showed the presence of two different fungi genera namely: *Aspergillus* and *Penicillium*, with the dominance of isolates belonging to the genus *Aspergillus*. Four isolates were selected for the test of their ability to degrade crude oil. These were grown on three different salt medium: without any carbon source, with sucrose as a carbon source and salt medium supplemented with 1% crude oil as a carbon source. Unfortunately the chosen isolates were unable to degrade crude oil.

**Keywords:** Oil, Biodegradation, Fungi, *Aspergillus*, *Penicillium*.

## الملخص

يعتبر النفط ومشتقاته من أهم الملوثات الرئيسية للبيئة وخاصة التربة. وقد برزت أهمية استعمال الكائنات الدقيقة (بكتيريا وفطريات) التي لها القدرة على تحليل والتخلص من الملوثات البترولية كوسيلة هامة ذات فوائد اقتصادية وبيئية. و قد كان الهدف من دراستنا هو عزل وتحديد أنواع الفطريات الموجودة في تربة ملوثة بثلاثة أنواع من مشتقات البترول وهي النفط الخام، الديزل وزيت المحركات المستعمل. تم تلويث عينات من التربة بهذه المشتقات البترولية لمدة تزيد عن 6 أشهر. أجري عزل الفطريات من التربة باستخدام طريقة التخفيف، في حين تم التعرف على أجناس الفطريات من خلال الشكل الخارجي اعتمادا على الملاحظة العينية و المجهرية.

تم عزل عدد من العزلات الفطرية من جميع الأنواع الثلاثة للتربة الملوثة على الوسط PDA. أظهرت النتائج وجود نوعين مختلفين من الأجناس الفطرية وهما: *Aspergillus* و *Penicillium* ، مع السيادة لجنس *Aspergillus*. تم اختيار أربع عزلات لاختبار قدرتها على تحليل النفط الخام. نمت على ثلاثة أوساط تحتوي على الأملاح المعدنية : الأول من دون أي مصدر للكربون الثاني أضيف له الجلوكوز كمصدر للكربون أما الوسط الثالث فقد أضيف له 1٪ من النفط الخام كمصدر للكربون. للأسف لم تستطع هذه العزلات المختارة أن تحلل النفط الخام.

**الكلمات المفتاحية:** النفط، التحلل البيولوجي، الفطريات، *Aspergillus* ، *Penicillium*.