

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université d'IBN BADIS MOSTAGANEM



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Domaine : S.N.V
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Microbiologie appliquée
Option: interaction microorganismes, hôtes et environnement

THÈSE

PRESENTEE POUR L'OBTENTION DE DIPLOME DE DOCTORAT
3^{ème} CYCLE LMD

Par

M^{me} *BENCHOUK Amina*

THEME

Bioremédiation des sols pollués de pétrole par les micro-organismes indigènes et amélioration génétique de leur pouvoir

Soutenu publiquement le : 13 /12/ 2017

Devant le jury composé de :

<i>REGUIEG YSSAAD Hocine</i>	Président	Professeur	Université de Mostaganem
<i>BENSOLTANE Ahmed</i>	Examineur	Professeur	Université d'Oran
<i>DALLACHE Fatiha</i>	Examineur	Professeur	Université de Mostaganem
<i>DJIBAOUI Rachid</i>	Examineur	Professeur	Université de Mostaganem
<i>CHIBANI Abdelwaheb</i>	Encadreur	Professeur	Université de Mostaganem

Laboratoire de Microbiologie et Biologie Végétale
Année universitaire : 2017 – 2018

Remerciements

*Merci au bon **DIEU** de m'avoir aidé à réaliser ce travail.*

*J'exprime ma gratitude aux membres de jury pour avoir accepté d'examiner ce travail. Je témoigne mes vifs remerciements au Pr **REGUIEG Yessaad Hocine** qui a bien voulu présider le jury de ce doctorat, au Pr **BENSOLTANE Ahmed**, au Pr **DALLACHE Fatiha**, au Pr **DJIBAOUI Rachid** qui nous ont honoré de leur présence et pour avoir accepté de juger ce travail.*

Un projet de thèse ne se réalise jamais seul, c'est pourquoi je souhaiterai ici remercier toutes les personnes qui ont participé à des années d'aventure scientifique et humaine.

*Je voudrais dire un grand merci à mon directeur de thèse professeur **CHIBANI Abdelwaheb** Pour son aide précieuse, sa présence et sa compréhension.*

*Je souhaiterai aussi remercier l'ensemble du personnel de la raffinerie d'Arzew **NAFTEC** et en particulier tout le staff du laboratoire, le chef de service du laboratoire monsieur **BERREBIA** ainsi que mademoiselle **NOUAR Naziha**.*

*Je voudrai dire un grand merci au Pr **Bulent Icgen** du Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement au Département d'Ingénierie environnementale de l'Université Technique du Moyen-Orient (METU), Ankara-Turquie pour leur accueil et leur collaboration, pour les connaissances qu'ils m'ont fait partager durant 1mois de stage.*

*Merci à tous les membres de laboratoire de microbiologie et biologie végétale et à Mme **Hamid Djahira** pour m'avoir donné un environnement de travail agréable grâce à leur présence, leur bonne humeur et leur soutien.*

Merci à tous.

Dédicaces

A

Mes très chers parents.

En témoignage de mon profond amour et mon plus grand respect. Je ne vous remercierai jamais assez pour votre soutien tout au long de ma scolarité, pour tous vos sacrifices.

A

Mon mari Hasni,

Pour son soutien et son amour indéfectible. Je leur dédie cette thèse.

A

Ma grande mère Khadidja et ma belle-mère Malika

Merci pour leur présence, leur aide, leur compréhension et leur amour

Mes proches, toute ma famille mes sœurs Meriem et sa fille Malek, Karima, Zineb, Khadidja, Mayssoun et Loudjaina et mes frères Mohamed et Ismail et tous mes amis Djahira, Latifa, Wafae, Sihem, Firdous, Wahiba et Nassima. Merci d'être toujours à mes côtés.

الملخص:

يعد التلوث النفطي الناجم عن الأنشطة في صناعة البتروكيماويات واحدة من المشاكل البيئية الرئيسية. تفرض المكونات الهيدروكربونية تهديدات خطيرة باستمرار على صحة الإنسان والبيئة نظرا لوجودها لفترات طويلة في الطبيعة. تعتبر المعالجة البيولوجية أداة فعالة لتحويل المنتجات الملوثة إلى أخرى أقل خطورة أو غير خطيرة مع أقل كمية من المواد الكيميائية، والطاقة والوقت من خلال استعمال الكائنات الحية الدقيقة.

كان الهدف من هذه الدراسة هو تقييم قدرات تحليل النفط ومشتقاته باستخدام سلالات جرثومية معزولة من تربة ملوثة من مصفاة أرزيو في الجزائر. وقد تم التعرف وتحديد خمس سلالات جرثومية من خلال شكل المستعمرات، مورفولوجيا الخلايا والخصائص البيوكيميائية. وكانت أربع سلالات بكتيرية موضوع التوصيف الجزيئي، وفقا لطريقة التسلسل الجيني لمورثة الحمض النووي الريبسي ADNr 16S. وقد وصفت السلالات المعزولة على أنها *Candida sp.* (L1)، *Bacillus sp.* (B2)، *Pseudomonas aeruginosa* (P1) و *Pseudomonas putida* (P3 ; P4).

لقد تم اختبار قدرة السلالات المعزولة على تحليل النفط والديزل في وسط سائل، من خلال قياس الكثافة الضوئية، وتركيز الخلايا، وتركيز مجموع الهيدروكربونات البترولية، DCO، DBO₅ و مؤشر الاستحلاب (E₂₄). تم اختبار تحليل المركب isomerat بواسطة كروماتوغرافيا الطور الغازي (CPG) مع كاشف أيوني باللهب (FID). وتشير النتائج إلى أن السلالات المعزولة يمكنها استخدام النفط والديزل كمصدر وحيد للكربون، حيث تم الإستدلال على حدوث عملية التحليل البيولوجي عن طريق زيادة الكثافة الضوئية وتركيز الخلايا، وانخفاض في TPH, DCO و DBO₅.

وأظهرت المعالجة البيولوجية للتربة الملوثة بشكل مصطنع عن طريق السلالات الخمسة المعزولة (منفردة أو مجتمعة) تأثيرها على تحليل النفط والديزل. ومن أجل تحسين التحلل البيولوجي للنفط والديزل، أجرينا عمليات تظهير باستعمال الأشعة فوق بنفسجية للسلالات *Candida sp.* (L1)، *Bacillus sp.* (B2) و *Pseudomonas putida* (P4). فأشارت النتائج إلى أن للطفرة تأثير ايجابي وسلبي على تحلل النفط و الديزل.

كلمات البحث: المعالجة البيولوجية، النفط والديزل، ADNr 16S، *Bacillus*، *Candida*، *Pseudomonas*، مزيج السلالات، إحدات الطفرات.

Résumé :

L'un des principaux problèmes environnementaux est la contamination par les hydrocarbures résultant des activités liées à l'industrie pétrochimique. Les composants hydrocarbonés imposent de sérieuses menaces pour la santé humaine et affectent constamment l'environnement en raison de son existence prolongée dans l'environnement. La bioremédiation est un outil pour transformer ces composés en formes moins dangereuses ou non dangereuses avec moins d'apport de produits chimiques, d'énergie et de temps par des agents biologiques comme les microorganismes.

L'objectif de cette étude est d'évaluer les capacités de biodégradation du pétrole et du diesel par les souches microbiennes isolées par la technique d'enrichissement à partir des sols contaminés provenant de la raffinerie d'Arzew (Algérie). Cinq souches microbiennes isolées ont été identifiées par leur morphologie coloniale et cellulaire et leurs caractéristiques biochimiques en utilisant les galeries biochimiques. Les quatre souches bactériennes ont fait l'objet d'une caractérisation moléculaire, en utilisant une méthode de séquençage le gène codant l'acide ribonucléique ribosomique (ADNr 16S). Les souches isolées ont été identifiées comme *Candida* sp. (L1), *Bacillus* sp. (B2), *Pseudomonas aeruginosa* (P1) et *Pseudomonas putida* (P3 et P4).

La capacité des souches isolées à dégrader le pétrole et le diesel a été réalisée dans un milieu liquide, en mesurant la densité optique, la concentration microbienne (UFC/ml), la concentration d'hydrocarbures pétroliers totaux (TPH), DCO, DBO₅ et l'indice d'émulsification (E₂₄). La dégradation du composé pétrolier "isomérat" a été analysée par chromatographie en phase gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme (FID). Les résultats indiquent que les souches isolées peuvent être utilisés le pétrole et le diesel comme sources de carbone unique, où la biodégradation a été définie par une augmentation de la densité optique et de la concentration microbiennes (CFU/ml) et une diminution de la TPH, DCO et DBO₅.

La bioremédiation des sols artificiellement contaminés par les souches et le consortium a montré le plus grand effet de la dégradation des hydrocarbures. Dans le but d'améliorer la dégradation des hydrocarbures, une mutagénèse a été effectuée pour les souches *Candida* sp. (L1), *Bacillus* sp. (B2) et *Pseudomonas putida* (P4). Les résultats obtenus indiquent que la mutagénèse des souches a rapporté des mutants présentant une capacité plus importante ou réduite de dégradation de pétrole et de diesel.

Mots-clés : bioremédiation, pétrole, diesel, ADNr 16S, *Candida*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, consortium, mutagénèse.

Abstract:

One of the major environmental problems today is hydrocarbon contamination resulting from the activities related to the petrochemical industry. Hydrocarbon components are imposing serious threats to human health and are constantly affecting the surrounding environment due to its prolonged existence in the environment. Bioremediation is the tool to transform the compounds to less hazardous/non-hazardous forms with less input of chemicals, energy, and time by biological agents like microorganisms.

The objective of this study was to evaluate the biodegradation capacities of petroleum and diesel by the microbial strains isolated by the enrichment technique from contaminated soil from the Arzew refinery in Algeria. Five isolated microbial strains were identified by their colonial morphology, cell morphology and biochemical characteristics using biochemical galleries. The four bacterial strains were molecularly characterized according to a method of sequencing the genes encoding the 16S rRNA (16S rDNA). The isolates were identified as *Candida* sp. (L1), *Bacillus* sp. (B2), *Pseudomonas aeruginosa* (P1) and *Pseudomonas putida* (P3 and P4).

The ability of isolated strains to degrade petroleum and diesel was carried out in a liquid medium by measuring optical density, microbial concentration (CFU/ml), concentration of total petroleum hydrocarbons (TPH), COD, BOD₅ and emulsification index (E₂₄). The isomerase degradation was analyzed by gas chromatography with flame ionization detector (FID). The results indicate that isolated strains can be used as petroleum and diesel as single carbon sources, where biodegradation has been defined by an increase in optical density, microbial concentration (CFU/ml) and a decrease in TPH, COD and BOD₅.

Bioremediation of the soils artificially contaminated by the strains and the consortium showed the greatest effect of hydrocarbon degradation. In order to improve the degradation of hydrocarbons, a mutagenesis was carried out for *Candida* sp. (L1), *Bacillus* sp. (B2) and *Pseudomonas putida* (P4). The results obtained indicate that the mutagenesis of strains reported has a greater or lesser capacity for degradation of petroleum and diesel.

Keywords: bioremediation, petroleum, diesel, 16S rDNA, *Candida*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, consortium, mutagenesis.

Table Des Matières

INTRODUCTION	1
PARTIE 01 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	5
I. HYDROCARBURES PETROLIERS	4
I.1. ORIGINE	4
I.2. LA COMPOSITION CHIMIQUE	4
I.3. CLASSIFICATION	5
I.3.1. Hydrocarbures saturés	5
I.3.1.1. Alcanes linéaires	5
I.3.1.2. Alcanes ramifiés	5
I.3.1.3. Cycloalcanes	6
I.3.2. Hydrocarbures aromatiques polycycliques	6
I.3.3. Les composés non-hydrocarbonés	8
I.3.3.1. Résines et asphaltènes	8
I.3.3.2. Les composés azotés, soufrés et oxygénés	8
I.3.3.3. Les métaux	9
I.4. DEVENIR DES HYDROCARBURES DANS L'ENVIRONNEMENT	9
I.4.1. La transformation abiotique	10
I.4.1.1. Evaporation	10
I.4.1.2. Solubilisation	10
I.4.1.3. Emulsification	11
I.4.1.4. Sédimentation	11
I.4.1.5. Photo-oxydation	11
I.4.2. La transformation biotique	12
I.5. LES TYPES DE PETROLE BRUT	12
I.6. LE RAFFINAGE DE PETROLE	13
I.6.1. Les procédés de séparation	15
I.6.2. Procédés de transformations	15
I.7. LES HYDROCARBURES EN ALGERIE	17
I.7.1. Présentation du pôle industriel d'Arzew	17
I.7.2. Raffinerie d'Arzew	18
I.7.3. Présentation générale des unités de la raffinerie	19
II. LA POLLUTION PAR LES HYDROCARBURES PETROLIERS	21
II.1 LA TOXICITE DES HYDROCARBURES PETROLIERS	21
II.2 L'IMPACT DE LA POLLUTION PETROLIERE SUR L'ENVIRONNEMENT	23
II.2.1. Sur les sols et les eaux souterraines	23
II.2.2. Sur les végétaux et la chaîne alimentaire	24
II.2.3. Sur les milieux marins	25

III.	LA BIOREMEDIATION DES SOLS POLLUES PAR LES HYDROCARBURES PETROLIERS	27
III.1.	LES PRINCIPALES METHODES DE LA BIOREMEDIATION	28
III.1.1.	La bioaugmentation	28
III.1.2.	La biostimulation.....	29
III.2.	LA BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES PAR LES MICRO-ORGANISMES.....	30
III.2.1.	Les microorganismes utilisés dans la dégradation des hydrocarbures	31
III.2.1.1.	Les bactéries	32
III.2.1.2.	Les champignons	32
III.2.2.	Accession des microorganismes aux composés organiques hydrophobes	33
III.2.2.1.	L'assimilation des hydrocarbures solubles.....	33
III.2.2.2.	L'accession interfaciale.....	33
III.2.2.3.	L'accession interfaciale facilitée (émulsification)	34
III.2.2.4.	Le transfert micellaire.....	34
III.2.3.	Les voies métaboliques de la dégradation des hydrocarbures pétroliers.....	35
III.2.3.1.	La biodégradation aérobie	35
III.2.3.2.	Minéralisation complète ou voie de dioxygénase.....	36
III.2.3.3.	Cométabolisme	36
III.2.3.4.	La biodégradation anaérobie	37
III.2.3.5.	La biodégradation de toluène	38
	PARTIE 02 :PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES	41
I.	MATERIEL ET METHODES	41
I.1.	SITE DE PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS	41
I.2.	EVALUATION DES HYDROCARBURES TOTAUX DANS LE SOL POLLUE	42
I.2.1.	Le prétraitement de l'échantillon du sol:.....	42
I.2.2.	L'extraction et l'évaluation de pourcentage des hydrocarbures totaux	42
I.3.	ENRICHISSEMENT ET ISOLEMENT DES MICRO-ORGANISMES DEGRADANTS LES HYDROCARBURES	42
I.4.	LA PURIFICATION ET LA CONSERVATION DES SOUCHES ISOLEES	43
I.5.	L'IDENTIFICATION DES ISOLATS DEGRADANTS LES HYDROCARBURES	43
I.5.1.	Etude morphologique :.....	43
I.5.2.1.	Aspect macroscopique	43
I.5.2.2.	Aspect microscopique.....	43
I.5.2.	Etude biochimique	45
I.5.2.1.	Étude du type respiratoire.....	45
I.5.2.2.	Recherche de la catalase	45
I.5.2.3.	Recherche d'une Cytochrome Oxydase	46
I.5.2.4.	Recherche du nitrate réductase	46
I.5.2.5.	La croissance sur les milieux King A et King B	47
I.5.2.6.	La croissance sur les milieux Sabouraud + chloramphénicol et PDA	47
I.5.2.7.	L'utilisation de l'amidon	47

I.5.2.8.	L'hémolyse du sang	48
I.5.2.9.	Test d'hydrolyse de la lécithine.....	48
I.5.2.10.	Test d'hydrolyse de la caséine.....	49
I.5.2.11.	Mannitol-Mobilité	49
I.5.2.12.	Galleries d'identification (Système API)	49
I.5.2.13.	Etude de la sensibilité des Pseudomonas aux antibiotiques	50
I.5.3.	L'étude moléculaire	51
I.5.3.1.	Extraction de l'ADN génomique	51
I.5.3.2.	Vérification de la qualité d'ADN par le gel d'agarose.....	52
I.5.3.3.	Amplification de la région ADN _r 16S.....	52
I.5.3.1.	Séquençage de l'ADN	53
I.5.3.2.	Analyse phylogénétique des séquences.....	54
I.6.	BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES	54
I.6.1.	Le suivi de la biodégradation des hydrocarbures pétroliers.....	54
I.6.1.1.	La densité optique	55
I.6.1.2.	La concentration microbienne (UFC/ml)	55
I.6.1.3.	La Détermination de la dégradation des hydrocarbures par la concentration des hydrocarbures totaux (TPH, Total Petroleum Hydrocarbons)	55
I.6.1.4.	Détermination de la demande chimique en oxygène (DCO).....	56
I.6.1.5.	Détermination de la demande biochimique en oxygène (DBO ₅).....	56
I.6.1.6.	Test d'index d'émulsification (E ₂₄).....	57
I.6.1.7.	Détermination de la biodégradation des hydrocarbures par la méthode gravimétrique	58
I.6.2.	Analyse de la biodégradation de l'isomérat par chromatographie en phase gazeuse ...	58
I.7.	LA BIOREMEDIATION DES SOLS POLLUES PAR LE PETROLE ET LE DIESEL	59
I.7.1.	Le prélèvement et la préparation de l'échantillon du sol.....	59
I.7.1.1.	Site d'échantillonnage	59
I.7.1.2.	Le prétraitement des échantillons du sol	59
I.7.1.3.	La stérilisation des échantillons de sol	59
I.7.2.	Les analyses physico-chimiques des sols	60
I.7.2.1.	Les analyses physiques	60
I.7.2.2.	Les analyses chimiques	60
I.7.3.	Préparation de l'inoculum.....	61
I.7.4.	Description de l'expérience (préparation des microcosmes).....	62
I.7.5.	Le suivi de la bioremédiation des sols pollués.....	62
I.7.6.	L'évaluation de l'effet de la bioremédiation.....	62
I.7.6.1.	Matériel végétal	62
I.7.6.2.	Test de germination	63
I.7.6.3.	Paramètres biologiques mesurés.....	63
I.8.	L'AMELIORATION DE POUVOIR DE DEGRADATION DES ISOLATS PAR LA MUTAGENESE : ..	64
I.8.1.	Préparation d'inoculum.....	65
I.8.2.	Traitements mutagènes par rayonnement ultraviolet.....	65
I.8.3.	Sélection de mutants	66
I.8.4.	La biodégradation des hydrocarbures par les mutants sélectionnés	66

II.	RESULTATS ET DISCUSSION	66
II.1.	RESULTATS	66
II.1.1.	EVALUATION DES HYDROCARBURES TOTAUX DANS LE SOL POLLUE	66
II.1.2.	ISOLEMENT DES SOUCHES DEGRADANTES D'HYDROCARBURES	66
II.1.3.	L'IDENTIFICATION DES ISOLATS DEGRADANTS LES HYDROCARBURES	66
II.1.3.1.	L'étude morphologique	66
II.1.3.1.1.	Aspect macroscopique	66
II.1.3.1.1.	Aspect microscopique	66
II.1.3.2.	L'étude biochimique des isolats	68
II.1.3.3.	Etude de la sensibilité des Pseudomonas aux antibiotiques	72
II.1.3.4.	L'étude moléculaire	74
II.1.3.4.1.	Résultats de la vérification de la qualité d'ADN par le gel d'agarose	74
II.1.3.4.2.	Résultats de l'amplification de l'ADNr 16S	74
II.1.3.4.3.	Résultats de séquençage de l'ADN amplifié	75
II.1.3.4.4.	La construction de l'arbre phylogénétique	75
II.1.3.4.5.	Numéros d'accès des séquences nucléotidiques	77
II.1.4.	LA BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES	78
II.1.4.1.	La cinétique de croissance des isolats purifiés	78
II.1.4.2.	Détermination de la dégradation des hydrocarbures par la concentration des hydrocarbures totaux	81
II.1.4.3.	Détermination de la demande chimique en oxygène (DCO)	82
II.1.4.4.	Détermination de la demande biochimique en oxygène (DBO ₅)	83
II.1.4.5.	Index d'émulsification (E ₂₄)	85
II.1.4.6.	Estimation de potentiel de biodégradation des hydrocarbures par la méthode gravimétrique:	86
II.1.4.7.	L'analyse de la biodégradation de l'isomérat par CPG	87
II.1.5.	BIOREMEDIATION DES SOLS ARTIFICIELLEMENT POLLUES PAR LE PETROLE ET LE DIESEL	90
II.1.5.1.	Les analyses physico-chimiques du sol	91
II.1.5.2.	Le suivi de la bioremédiation des sols pollués	92
II.1.5.1.	L'évolution de la concentration microbienne dans les sols pollués	92
II.1.5.2.	Suivi de la biodégradation de pétrole et diesel par dosage des hydrocarbures totaux	94
II.1.5.3.	Les tests de germination	95
II.1.5.3.1.	Le taux de germination	95
II.1.5.3.2.	La longueur racinaire	98
II.1.5.3.3.	L'indice de germination	100
II.1.6.	L'AMELIORATION DE POUVOIR DE DEGRADATION DES ISOLATS PAR LA MUTAGENESE	101
II.1.6.1.	L'effet de l'exposition des souches étudiées aux UV	101
II.1.6.2.	Sélection de mutants	102
II.1.6.3.	La biodégradation des hydrocarbures par les mutants sélectionnés	102

II.2.	DISCUSSION	105
II.3.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	116
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	119
	ANNEXES	136

Liste des figures :

Figure 1: Structure moléculaire de base des principaux hydrocarbures pétroliers.	5
Figure 2 : Ensemble des hydrocarbures présents dans les pétroles bruts.....	6
Figure 3: Structure de quelques hydrocarbures aromatiques polycycliques abondants (HAP) dans l'environnement	7
Figure 4: Structures et nomenclatures des 16 HAP figurant sur la liste des polluants prioritaires de l'US-EPA	8
Figure 5 : Représentation schématique du devenir d'une pollution pétrolière à la surface du sol.	9
Figure 6 : Le principe de raffinage de pétrole	14
Figure 7 : Situation du pôle industriel d'Arzew	18
Figure 8 : Devenir des HAP dans les écosystèmes	24
Figure 9 : Fréquence (%), par type d'hydrocarbures, des événements de déversements accidentels significatifs ayant entraîné une pollution d'eaux continentales ou estuariennes en Europe, pour la période 2005-2009.....	26
Figure 10 : Les mécanismes d'accession des microorganismes aux hydrocarbures	33
Figure 11 : Implication du biosurfactant (rhamnolipide) produit par <i>Pseudomonas</i> sp dans l'absorption d'hydrocarbures.....	35
Figure 12 : Les différentes voies de dégradation aérobie du par les bactéries : <i>P. putida</i> (TOL), <i>P. putida</i> (F1), <i>P. mendocina</i> (KR1), <i>P. pickettii</i> (PKO1), et <i>B. cepacia</i> (G4)	39
Figure 13 : La dégradation anaérobie de Toluène. Après la conversion du benzoyl-CoA en cyclohex-1,5-diène-1-carboxy-CoA, ce produit est traité différemment avec deux bactéries différentes, <i>R. palustris</i> (A) et <i>Thauera aromatica</i> (B).....	40
Figure 14 : Carte de l'Algérie, région d'échantillonnage du sol contaminé par les hydrocarbures pétroliers - raffinerie d'Arzew-Oran	41
Figure 15 : Détermination du type respiratoire.	45
Figure 16 : La galerie API 20E avant incubation.....	49
Figure 17 : La galerie API 20NE avant incubation.....	50
Figure 18 : La galerie API <i>Candida</i> avant incubation	50
Figure 19 : Principe de PCR.....	54
Figure 20 : Test d'émulsion.	57
Figure 21 : L'aspect macroscopique et microscopique de l'isolat L1.....	70
Figure 22 : L'aspect macroscopique et microscopique de l'isolat B2.	71
Figure 23 : L'aspect macroscopique et microscopique de l'isolat P1.....	71
Figure 24 : L'aspect macroscopique et microscopique de l'isolat P3.....	72
Figure 25 : L'aspect macroscopique et microscopique de l'isolat P4.....	72
Figure 26 : Electrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN génomique des quatre bactéries isolées.	74
Figure 27 : L'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments d'ADN amplifiés.....	75
Figure 28 : Arbre phylogénétique basée sur les séquences d'ADNr 16S de la souche <i>Bacillus</i> sp. (B2) et des espèces apparentées du BLAST database.	76
Figure 29 : Arbre phylogénétique basée sur les séquences d'ADNr 16S de la souche	

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P1) et des espèces apparentées du BLAST database.	76
Figure 30 : Arbre phylogénétique basée sur les séquences d'ADNr 16S de la souche <i>Pseudomonas putida</i> (P3) et des espèces apparentées du BLAST database.	77
Figure 31 : Arbre phylogénétique basée sur les séquences d'ADNr 16S de la souche <i>Pseudomonas putida</i> (P4) et des espèces apparentées du BLAST database.	77
Figure 32 : Le suivie de la DO des isolats en présence du pétrole pendant 12 jours d'incubation.	79
Figure 33 : Le suivie de la DO des isolats en présence du diesel pendant 12 jours d'incubation.	79
Figure 34 : Le suivie de la concentration microbienne des isolats en présence du pétrole pendant 12 jours d'incubation.	80
Figure 35 : Le suivie de la concentration microbienne des isolats en présence du diesel pendant 12 jours d'incubation.	80
Figure 36 : Le suivie de la concentration de TPH des cinq isolats dans le milieu BH additionné par 2 % de pétrole pendant la période d'incubation.	81
Figure 37 : Le suivie de la concentration de TPH des cinq isolats dans le milieu BH additionné par 2 % de pétrole pendant la période d'incubation.	82
Figure 38 : Les concentrations de la DCO pendant l'incubation des isolats dans le milieu BH additionné par 2 % de pétrole.	83
Figure 39 : Les concentrations de la DCO pendant l'incubation des isolats dans le milieu BH additionné par 2 % de diesel.	83
Figure 40 : Les concentrations de la DBO ₅ au début et à la fin de l'incubation des souches dans le milieu BH additionné par 2 % du pétrole.	84
Figure 41 : Les concentrations de la DBO ₅ au début et à la fin de l'incubation des souches dans le milieu BH additionné par 2 % de diesel.	85
Figure 42 : Le pourcentage de l'index d'émulsion (E ₂₄) des souches en présence de pétrole et de diesel.	86
Figure 43 : Le pourcentage de dégradation du pétrole et du diesel par les souches microbiennes par la méthode gravimétrique.	87
Figure 44 : Le chromatogramme de l'Isomérat non inoculé (témoin) à la fin de l'incubation.	88
Figure 45 :Le chromatogramme de l'Isomérat inoculé par l'isolat L1 à la fin de l'incubation.	88
Figure 46 : Le chromatogramme de l'Isomérat inoculé par l'isolat B2 à la fin de l'incubation.	88
Figure 47 : Le chromatogramme de l'Isomérat inoculé par l'isolat P1 à la fin de l'incubation.	89
Figure 48 : Le chromatogramme de l'Isomérat inoculé par l'isolat P3 à la fin de l'incubation.	89
Figure 49 : Le chromatogramme de l'Isomérat inoculé par l'isolat P4 à la fin de l'incubation.	89
Figure 50 : Le pourcentage de la biodégradation des hydrocarbures de l'isomérat par les isolats L1, B2, P1, P3 et P4.	90
Figure 51 : L'évolution de la concentration microbienne de chaque isolat et le consortium	

dans les sols contaminés par le pétrole.....	92
Figure 52 : L'évolution de la concentration microbienne de chaque isolat et le consortium dans les sols contaminés par le diesel.	93
Figure 53 : La dégradation des hydrocarbures totaux par l'introduction des isolats L1, B2, P1, P3, P4 et le consortium dans les sols pollués par le pétrole.	94
Figure 54 : La dégradation des hydrocarbures totaux par l'introduction des isolats L1, B2, P1, P3, P4 et le consortium dans les sols pollués par le diesel.....	95
Figure 55 : Le taux de germination des graines de blé dans les sols contaminés par le pétrole non traités et traités par les isolats et le consortium (Témoin : sol non contaminé)	96
Figure 56 : Le taux de germination des graines de blé dans les sols contaminés par le diesel non traités et traités par les isolats et le consortium (Témoin : sol non contaminé)	97
Figure 57 : La longueur racinaire des plantules de blé dans les sols contaminés par le pétrole non traités et traités par les isolats et le consortium (Témoin : sol non contaminé).	98
Figure 58 : La longueur racinaire des plantules de blé dans les sols contaminé par le diesel non traités et traités par les isolats et le consortium (Témoin : sol non contaminé)	99
Figure 59: L'indice de germination des graines de blé cultivées dans les sols contaminé par le pétrole non traités et traités par les isolats et le consortium (Témoin : sol non contaminé) ..	100
Figure 60 : L'indice de germination des graines de blé cultivées dans les sols contaminé par le diesel non traités et traités par les isolats et le consortium (Témoin : sol non contaminé)	101
Figure 61 : La courbe de survie après l'exposition aux UV des isolats L1, B2 et P4.....	102
Figure 62: Le pourcentage de dégradation du pétrole par les souches mères L1, B2 et P4 et leurs mutants respectif selectionnés après la mutagenèse (M).....	103
Figure 63 : Le pourcentage de dégradation du diesel par les souches mères L1, B2 et P4 et leurs mutants respectif selectionnés après la mutagenèse (M).....	103

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Valeurs de DL ₅₀ de certains HAP	23
Tableau 2 : Aspects des colonies sur la gélose au jaune d'œuf et enzymes détectées	48
Tableau 3 : Aspect macroscopique de l'ensemencement des isolats sur GN après purification	67
Tableau 4: Les Différents aspects microscopiques des isolats.	67
Tableau 5 : Résultats des tests biochimiques de l'isolat L1.....	68
Tableau 6 : Résultats des tests biochimiques de l'isolat B2.	68
Tableau 7: Résultats des tests biochimiques des isolats P1, P3 et P4.....	69
Tableau 8: Le profil de résistance des isolats de Pseudomonas (P1, P3 et P4).	73
Tableau 9 : Présentation des numéros d'accèsion, l'identité des souches et le pourcentage de similarité.....	78
Tableau 10 : Les résultats des analyses physico-chimiques de l'échantillon du sol.....	91
Tableau 11 : L'analyse de la variance ANOVA des taux de germination des graines de <i>Triticum durum</i> Desf.dans les sols contaminés par le pétrole.....	96
Tableau 12 : L'analyse de la variance ANOVA des taux de germination des graines de <i>Triticum durum</i> Desf.dans les sols contaminés par le diesel.....	97
Tableau 13 : L'analyse de la variance ANOVA de la longueur racinaire des graines de <i>Triticum durum</i> Desf.dans les sols contaminés par le pétrole.	98
Tableau 14 : L'analyse de la variance ANOVA la longueur racinaire des graines de <i>Triticum durum</i> Desf.dans les sols contaminés par le diesel.	99

Liste des annexes

Annexe 01: Composition des milieux de culture utilisés

Annexe 02: Préparation des solutions pour l'extraction de l'ADN

Annexe 03: Préparation du gel d'agarose pour l'électrophorèse de l'ADN

Annexe 04 : Le marqueur d'ADN (FERMENTAS, Lambda DNA/HindIII Marker)

Annexe 05: Le marqueur d'ADNr 16S (100 bp DNA Ladder BIOLABS, England)

Annexe 06: Dispositif expérimentale adopté pour les tests de germinations de blé

Annexe 07: La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s pour les souches étudiées

Annexe 08: Comparaison des moyennes des taux de germination des graines de *Triticum durum* Desf. Dans les sols contaminés par le pétrole, d'après le test de Newman-Keuls.

Annexe 09: Comparaison des moyennes des taux de germination des graines de *Triticum durum* Desf. Dans les sols contaminés par le diesel, d'après le test de Newman-Keuls

Annexe 10: Comparaison des moyennes des longueurs racinaires des graines de *Triticum durum* Desf. dans les sols contaminés par le pétrole, d'après le test de Newman-Keuls

Annexe 11: Comparaison des moyennes des longueurs racinaires des graines de *Triticum durum* Desf. dans les sols contaminés par le diesel, d'après le test de Newman-Keuls

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ADNr: ADN ribosomique

ADNr 16 S: ADN codant l'ARN ribosomal 16S

ARN: Acide ribonucléique

ARNr 16S: l'ARN ribosomal 16S

BET: Bromure d'éthidium.

BH: Bushnell and Haas

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BN : Bouillon nutritif

BTEX : Benzène, Toluène, Ethylène et Xylène

CPG-FID : Chromatographie en phase gazeuse à détection par ionisation de flamme

DBO₅ : Demande Biologique en Oxygène pendant cinq jours.

DCO : Demande Chimique en Oxygène.

DL₅₀ : La dose létale médiane

dNTP : Désoxyribonucléotides tri-phosphate.

DO : Densité optique.

EDTA : éthylène diamine tétra-acétique
Acide

GN : Gélose nutritive

HAPs : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.

pb : Paire de bases.

PCR : Polymerase chain reaction.

pH : Potentiel d'Hydrogène

ppm : Partie par million.

rpm: Rotation par minute

sp. : Du latin species pluralis, espèce non précise

TBE : Tris-Borate-EDTA

TE: Tris base, EDTA

UFC : Unité formant colonie

UV: Ultra-Violet

INTRODUCTION

Introduction :

Les hydrocarbures sont des polluants organiques très nocifs aussi bien pour l'homme que pour l'environnement. En effet, certains d'entre eux peuvent présenter une grande toxicité du fait de leurs pouvoirs mutagènes et/ou cancérogènes (**Das et Chandran., 2011**). Le raffinage, le stockage et le transport des produits pétroliers sont toutes les sources ponctuelles de la pollution des sols et des eaux (**Chikereet al, 2011**). Les hydrocarbures pétroliers peuvent être divisés en quatre classes: Les saturés, les aromatiques, les asphaltènes (phénols, acides gras, cétones, esters et porphyrines) et les résines (pyridines, quinolines, carbazoles, sulfoxydes et amides) (**Leahy et Colwell, 1990**).

Les sols avec les milieux aquatiques et l'atmosphère sont les composants majeurs de la biosphère. A ce titre, ils jouent en permanence un rôle déterminant dans l'apparition et le maintien de l'activité biologique et de la biodiversité à la surface de la planète. La pollution des sols est le résultat des activités minières et d'industries lourdes, comme l'industrie pétrolière ou l'industrie chimique. Les polluants sont majoritairement des composés organiques (hydrocarbures, composés phénolés et chlorés,...) et des métaux lourds. La dépollution des sols vise à diminuer la biodisponibilité des polluants, en évitant leur transfert vers les nappes phréatiques ou les chaînes alimentaires par l'implication des trois processus : physiques, chimiques et biologiques (**Yadav et Hassanizadeh, 2011, Lipińska et al, 2014**).

Cependant, en raison des limites des processus physico-chimiques qui sont coûteux, non écologiques, complexes, peuvent conduire à la destruction de la texture et les caractéristiques du sol et ne conduisent pas toujours à la neutralisation complète des polluants, la bioremédiation est reconnu comme une alternative précieuse pour la désintoxication et l'élimination de la substance toxique, en raison de leur rentabilité, leur respect à l'environnement, leur simplicité technologique et la conservation de la texture et des caractéristiques du sol (**Agarry et Ogunleye, 2012**).

La bioremédiation est l'utilisation de microorganismes pour détoxifier ou éliminer les polluants en raison de leurs diverses capacités métaboliques, c'est une méthode évolutive pour l'élimination et la dégradation de nombreux polluants environnementaux, y compris les produits de l'industrie pétrolière. La biodégradation par les populations naturelles de microorganismes représente l'un des principaux mécanismes par lesquels le pétrole et les autres polluants hydrocarbonés peuvent être éliminés de l'environnement (**Das et Chandran,**

2011; Kumar et al, 2011). La réussite de La biodégradation des hydrocarbures dans le sol reside non seulement dans le choix de l'agent biologique mais également dans la maîtrise des conditions physicochimiques du sol telles que l'humidité, le pH, le taux d'oxygène, la disponibilité des nutriments, la concentration des contaminants, qui permettent son développement (**Kumar et Gopal, 2015**).

Les microorganismes jouent un rôle pmordiale dans la bioremédiation, ils sont très divers dans la nature et composés de bactéries, champignons (**Yadav et Hassanizadeh, 2011**). Un certain nombre d'espèces bactériennes sont connues pour la dégradation des hydrocarbures et la plupart d'entre elles sont isolées à partir des sols ou des sédiments contaminés. plusieurs espèces microbiennes sont recensées et qualifiées aptes à dégrader des hydrocarbures telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Mycobacterium* spp., *Haemophilus* spp., *Rhodococcus* spp., *Paenibacillus* spp (**Haritash et Kaushik, 2009**).

Les hydrocarbures diffèrent par leur sensibilité aux attaques microbiennes. En général, la susceptibilité des hydrocarbures à la dégradation microbienne peut être classée comme suit: alcanes linéaires> alcanes ramifiés> petits aromatiques> alcanes cycliques (**Leahy et Colwell, 1990; Das et Chandran, 2011**). La biodégradation des hydrocarbures pétroliers est observée dans des conditions aérobies et anaérobies, la vitesse peut être augmentée par l'addition de bactéries produisant des biosurfactants, car le facteur exogène est un élément crucial pour améliorer la biodisponibilité des polluants et donc être dégradé efficacement (**Kaczorek et Olszanowski, 2011**).

La bioremédiation peut être renforcée par les deux approches complémentaires suivantes: la bioaugmentation et la biostimulation. La bio-augmentation repose sur l'ajout de microorganismes capables de minéraliser, décomposer ou transformer des contaminants en substances moins nocives, alors que la bioestimulation est basées sur la croissance des microorganismes indigènes, stimulée par l'ajout de nutriments (principalement N et P) et de surfactants accompagnés d'oxygène dans le sol (**Kumar et Gopal, 2015**).

Cependant, seulement très peu d'études algériennes sont rapportées dans la littérature sur la biodégradation des hydrocarbures pétroliers par les micro-organismes isolés des sols contaminés. Ceux-ci inclus les *Corynebacterium aquaticum* et *Pseudomonas aeruginosa* souches isolées du rejet industriel de la raffinerie d'Arzew (**Aouad et Abbouni, 2012**),

Natrialba sp. isolées à partir des eaux salines contaminées par le pétrole à Ain Salah (Khemini-Talbi *et al*, 2015), les genres *Pseudomonas* et *Shewanella*, *Enterobacter*, *Serratia* isolés du sol contaminé provenant d'une raffinerie à Arzew (Guermouche *et al*, 2013), *Paenibacillus* sp isolée à partir d'un échantillon du sol contaminé par le pétrole provenant de Hassi Messaoud (Mesbaiah *et al*, 2016) et *Pseudomonas citronellolis* isolée d'une boue grasse résiduelle provenant d'un réservoir de stockage de pétrole brut situé à la raffinerie d'Alger (Sadouk *et al*, 2009).

Le but du présent travail est d'étudier la capacité de dégradation des hydrocarbures par des microorganismes isolés d'un sol contaminé d'une raffinerie de pétrole. L'identification des isolats microbiens est réalisée. En outre, la capacité de dégradation du pétrole et du diesel des souches microbiennes est mesurée par la densité optique, le nombre des colonies (UFC/ml), la concentration des hydrocarbures pétroliers totaux (TPH), DCO, DBO₅ et l'indice d'émulsification (E₂₄). La dégradation d'isomérat par les isolats est caractérisée par la chromatographie en phase gazeuse avec détecteur d'ionisation de flamme (CPG/FID). Après avoir vérifié l'aptitude des souches isolées à utiliser les hydrocarbures pétroliers dans le milieu liquide, nous nous sommes proposé de les utiliser en combinaison avec la bioaugmentation pour dépolluer les sols artificiellement contaminés par le pétrole et le diesel. La minéralisation du pétrole et du diesel est estimée au moyen d'indicateurs biologiques (tels que la concentration microbienne et la germination des graines de blé) et chimiques par le dosage des hydrocarbures totaux résiduels. Dans un dernier temps et dans le but d'améliorer le potentiel de dégradation des souches isolées, une mutagénèse à l'aide de l'UV est impliquée.

Partie 01 :

ETUDE

BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I :

Les Hydrocarbures Pétroliers

I. HYDROCARBURES PETROLIERS:

I.1. Origine :

Le pétrole est une roche liquide carbonée, ou huile minérale, constituée d'une multitude de molécules composées majoritairement d'atomes de carbone et d'hydrogène appelés hydrocarbures. Suite à la sédimentation de matières organiques végétales et animales et à leur enfouissement sous d'autres couches sédimentaires. La décomposition de ces matières organiques provoque une perte d'oxygène dans le milieu induisant des réactions réductrices. Puis, sous l'action combinée de la chaleur (60 °C) et de la pression (enfouissement d'environ 1 200 à 1 800 mètre), la transformation en hydrocarbures débute. Ce pétrole en formation est moins dense que la roche qui l'entoure, il migre donc vers la surface. Si le pétrole est arrêté dans sa progression par des roches imperméables, il se concentre pour former des poches qui sont à l'origine des réservoirs actuels (**Tissot et Welte, 1984**).

I.2. La composition chimique :

Le pétrole brut est parmi les mélanges les plus complexes des composés organiques qui se produisent sur la terre. Les progrès récents de la spectrométrie de masse à ultra-haute résolution ont permis d'identifier plus de 17 000 composants chimiques distincts et le terme de pétroleomique est inventé pour exprimer cette complexité récemment découverte (**Hassanshahian et Cappello, 2013**).

Les hydrocarbures pétroliers contiennent principalement des molécules composées d'atomes de carbone et d'hydrogène. Il s'agit d'alcane non cycliques (ou paraffines), des cycloalcane (ou naphènes), d'alcènes (ou oléfines) et d'hydrocarbures aromatiques (**Harayama et al, 1999**). D'autres constituants mineurs sont également présents dans les hydrocarbures pétroliers, comme des métaux et les composés polaires qui contiennent de l'azote, du soufre ou de l'oxygène. Les molécules polaires de faible masse moléculaire sont appelées des résines, les plus lourdes étant regroupées sous l'appellation d'asphaltènes (**Balba et al, 1998**). La composition élémentaire des hydrocarbures pétroliers est présentée dans la figure 1.

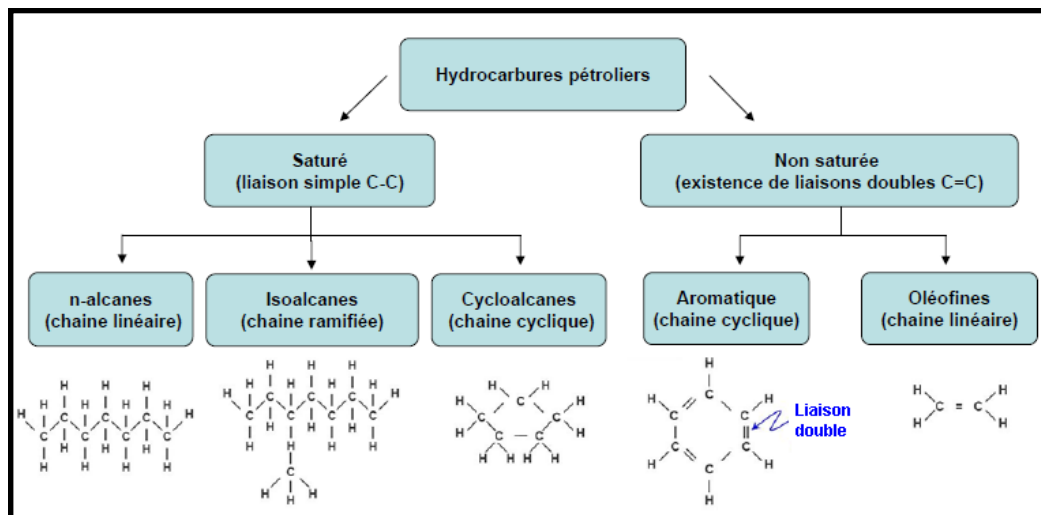


Figure 1: Structure moléculaire de base des principaux hydrocarbures pétroliers (Colombano *et al*, 2008).

I.3. Classification :

Les hydrocarbures constituent la fraction la plus importante d'un brut pétrolier, ils représentent entre 65 et 95 % de la plupart des pétroles bruts. Ces hydrocarbures peuvent être classés en quatre familles principales qui sont présentes en proportions variables selon leur origine: les hydrocarbures saturés (30 à 70 %), les hydrocarbures aromatiques et polyaromatiques (20 à 40 %), les composés polaires (5 à 25 %) et les asphaltènes, les résines et les métaux (0 à 10 %) (Syakti, 2004). Selon Harayama *et al*, (1999), les hydrocarbures pétroliers sont classés comme suit:

I.3.1. Hydrocarbures saturés: Parmi les hydrocarbures saturés on distingue:

I.3.1.1. Alcanes linéaires :

Les alcanes linéaires (n-alcanes, C_nH_{2n+2}), dont la longueur de leur chaîne (n) varie entre 7 et 40 constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier) (Bertrand et Mille, 1989) (figure 2).

I.3.1.2. Alcanes ramifiés :

Les alcanes ramifiés les plus abondants sont les iso-alcanes (groupement méthyle en position 2). Les autres composés ramifiés antéiso (groupement méthyle en position 3) ou polyramifiés tels que les isoprénoïdes (exemple: pristane, phytane) sont beaucoup moins

nombreux. Ces composés se trouvent dans le pétrole brut à des proportions sensiblement égales à celles des n-alcanes.

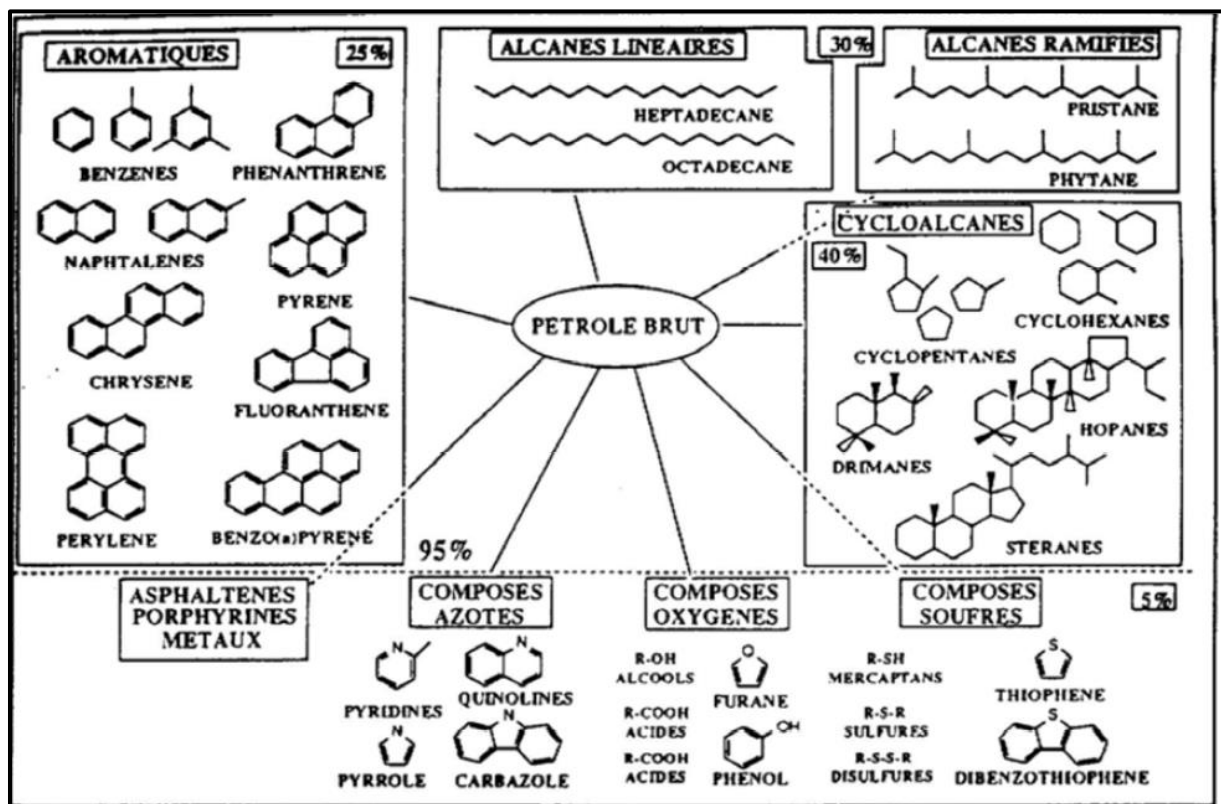


Figure 2 : Ensemble des hydrocarbures présents dans les pétroles bruts (Bertrand et Mille, 1989).

I.3.1.3. Cycloalcanes :

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

I.3.2. Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)

Les HAP sont une famille de composés constitués d'atomes de carbone et d'hydrogène, assemblés en au moins deux cycles benzéniques reliés entre eux par les arêtes. Il existe une grande variété de molécules (Cerniglia, 1992). Quelques exemples de HAP parents sont présentés dans la figure 3.

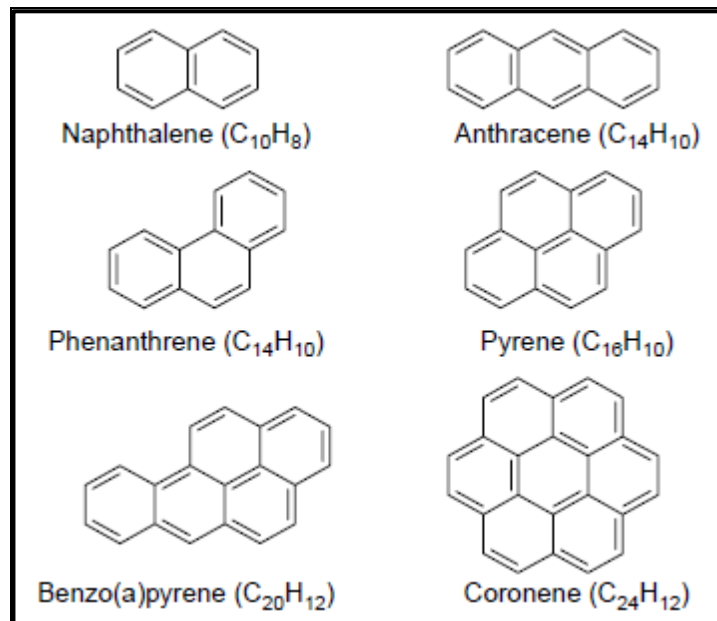


Figure 3: Structure de quelques hydrocarbures aromatiques polycycliques abondants (HAP) dans l'environnement (Sudip *et al*, 2002).

De nombreux HAP sont toxiques, mutagènes et / ou cancérogènes (Goldman *et al*, 2001 ; Mastrangelo *et al*, 1997). Les HAP les plus connus vont du naphthalène (C₁₀H₈) formé de deux cycles jusqu'au coronène (C₂₄H₁₂) formé de sept cycles (Kennish, 2001). Certaines molécules peuvent être composées jusqu'à plus de 9 noyaux benzéniques non substitués (Neff, 1979). Les HAP se divisent en deux groupes : les légers, dont la masse molaire est comprise entre 150 et 180 g.mol⁻¹ (HAP de moins de quatre cycles) et les lourds (au moins quatre cycles) ; dont les masses molaires varient de 200 à 280 g.mol⁻¹. Les HAP sont produits sous la forme de mélange de HAP dont la composition exacte dépend de la source et également des conditions de leur formation. Les principaux types de sources des HAP sont : anthropique (pétrole et combustibles) et naturelles (Wakleham *et al*, 1980 a et b).

La première source de HAP dans l'environnement contemporain est l'utilisation des combustibles fossiles. C'est-à-dire le pétrole et le charbon. Le pétrole brut contient de 20 à 45 % de HAP (Tissot et Welte, 1984). La composition du mélange varie selon la gamme de température de distillation (Haritash et Kaushik, 2009). De nombreux HAP sont considérés comme des polluants environnementaux qui peuvent avoir un effet néfaste sur la flore et la faune des milieux concernés, aboutissant à l'absorption et l'accumulation de produits chimiques toxiques dans les chaînes alimentaires et dans certains cas, aux graves problèmes de santé et/ou des défauts génétiques chez les humains. Par conséquent, l'U.S. Environmental Protection Agency a classé 16 HAP comme polluants fortement toxiques (Kunlei *et al*, 2001).

Dont l'étude est prioritaire sont présentés dans la figure 4.

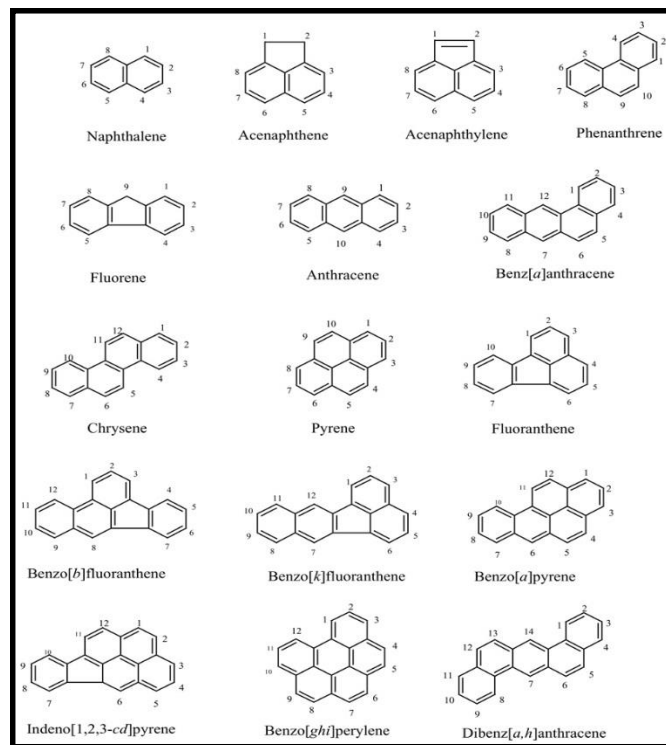


Figure 4: Structures et nomenclatures des 16 HAP figurant sur la liste des polluants prioritaires de l'US-EPA (Yana *et al*, 2004).

I.3.3. Les composés non-hydrocarbonés

I.3.3.1. Résines et asphaltènes

Les résines contiennent des structures aromatiques (polycondensées ou non) dont le nombre de cycles est supérieur à 6 (Speight, 2004). La définition générale présente les asphaltènes comme la fraction insoluble d'une matrice pétrolière dans un solvant paraffinique (n-heptane ou n-pentane) (Beens et Brinkman, 2000). Les composés appartenant à la fraction des résines et asphaltènes peuvent être complexés à d'autres éléments que l'hydrogène et le carbone tels que l'azote, l'oxygène et le soufre pour former des hétéroéléments. Ces éléments peuvent également être complexés à des métaux lourds, tels que le nickel et le vanadium, généralement présents à l'état de trace dans les pétroles (Tissot et Welte, 1984).

I.3.3.2. Les composés azotés, soufrés et oxygénés :

Ce sont, en général, des constituants mineurs d'un pétrole brut (Lefebvre, 1978), à l'exception des pétroles très lourds; les dérivés soufrés sont dans la plupart des cas plus

abondants que les composés oxygénés ou azotés (Bertrand et Mille, 1989).

I.3.3.3. Les métaux :

Les métaux sont présents dans les pétroles bruts à l'état de traces. Le vanadium, le nickel sont généralement les plus abondants mais le fer, le cuivre et l'uranium sont également détectés (Bertrand et Mille, 1989; Escobar *et al*, 2012).

I.4. Devenir des hydrocarbures dans l'environnement:

Le devenir est déterminé par les propriétés physicochimiques intrinsèques de la substance, les quantités et les vitesses d'émission dans l'écosystème et par les propriétés physiques, chimiques, biologiques de l'environnement. Parmi les propriétés intrinsèques, généralement considérés comme critiques dans l'évaluation du risque potentiel d'une substance, on peut citer la structure moléculaire, la solubilité dans l'eau et les solvants, la pression de vapeur, la taille des particules et le spectre d'adsorption (ultraviolet et visible), ainsi que les capacités d'adsorption sur les solides et l'effet éventuel d'agents dispersants. Parmi les différentes altérations que peut subir un hydrocarbure, on cite les facteurs environnementaux qui sont (figure 5) :

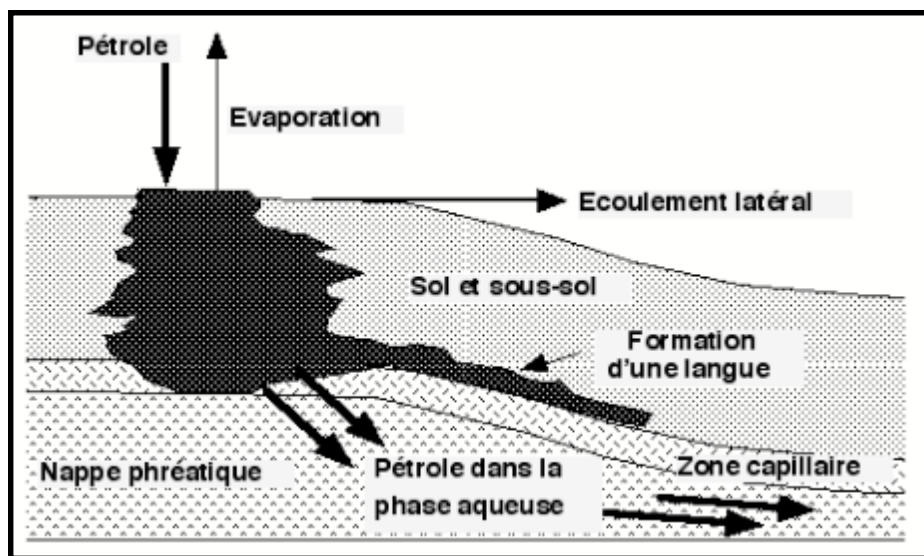


Figure 5 : Représentation schématique du devenir d'une pollution pétrolière à la surface du sol. (Morgan et Watkinson, 1989).

I.4.1. La transformation abiotique:

L'action simultanée des différents facteurs abiotiques (physique et chimique) aboutira à l'élimination des hydrocarbures (**Bertrand et Mille, 1989**). Elles sont responsables de la perte de 20 % des hydrocarbures aromatiques (à 2 et 3 cycles) dans les sols (**Park et al, 2001**). Les facteurs de transformation abiotique des hydrocarbures peuvent se traduire principalement par:

I.4.1.1. Evaporation :

L'évaporation est un processus qui débute immédiatement après un déversement d'hydrocarbures et peut se poursuivre pendant quelques jours. Elle correspond au transfert des composés volatils plus légers, comme les aliphatiques, les BTEX et les HAP de faible masse moléculaire, vers l'atmosphère (**Neff et al, 2000**). Cette perte des composés volatils entraîne la modification de certaines propriétés physiques des hydrocarbures, telles que la densité et la viscosité. Les principaux facteurs qui influent sur le processus d'évaporation sont la volatilité des composés présents et les conditions atmosphériques, telles que la température du milieu, la présence de vent ou de soleil.

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

I.4.1.2. Solubilisation :

La solubilité est la capacité d'une substance à se dissoudre dans la colonne d'eau. La solubilité des hydrocarbures dans l'eau est très faible. Un hydrocarbure est d'autant plus soluble que sa masse moléculaire est faible et que sa polarité est élevée tels que les composés aromatiques légers comme le benzène (**Fingas, 2013**). Il est important de noter que ces hydrocarbures solubles sont parmi les plus dangereux pour l'environnement. Ils sont difficiles à éliminer et sont assimilable par la faune et la flore (**Bouchez et al, 1995**).

I.4.1.3.Emulsification :

L'émulsification est un processus d'incorporation de gouttelettes d'eau dans les hydrocarbures pétroliers. Ceci augmente le volume du produit déversé et modifie certaines propriétés physiques des hydrocarbures, telles que la densité et la viscosité. Pour que le produit obtenu soit appelé « émulsion », il doit avoir une certaine stabilité (**Fingas, 2013**). Cette émulsion stable eau-pétrole est nommée « mousse au chocolat ».

I.4.1.4.Sédimentation :

La sédimentation est le passage du pétrole de la surface vers le fond. Les gouttelettes d'hydrocarbures dispersées peuvent interagir naturellement avec les matières en suspension (MES) présentes dans la colonne d'eau, tels que les minéraux argileux ou la matière organique, pour former des agrégats hydrocarbures-MES (**Gong et al, 2014 ; Fitzpatrick et al, 2015**). La formation d'agrégats hydrocarbures-MES est due à des interactions de charges électriques (ponts cationiques) entre les surfaces des particules et les composés polaires des hydrocarbures (**Bandara et al, 2011**). Notons que les hydrocarbures dissous peuvent également interagir avec les sédiments par agrégation directe pour former les agrégats hydrocarbures-MES ou par adsorption sur les sédiments (**Lee, 2002**). Ce phénomène est d'ailleurs capital en termes d'exportation de la surface vers le fond, notamment en eau océanique profonde (**Dachs et al, 2002**). La sédimentation conduit à la constitution d'agrégats de haute densité difficilement dégradables par voie naturelle.

I.4.1.5.Photo-oxydation :

La photo-oxydation, ou oxydation photochimique, est un processus d'altération des hydrocarbures qui est modulé par différents facteurs, notamment le spectre et l'intensité lumineuse du rayonnement solaire et la composition chimique des hydrocarbures déversés (**Prince et al, 2003**). Dans le cas des sols, ce phénomène n'a lieu que dans les premiers centimètres de la surface (**Park et al, 2001**). Sous l'action du rayonnement solaire, essentiellement les rayons UV, certains composés peuvent être oxydés. Les composés produits sont alors plus solubles (acides, alcools, cétones, peroxides et sulfoxides) que les composés initiaux et peuvent être plus toxiques pour les communautés microbiennes (**Payne and Phillips, 1985; Larson et al, 1979; Maki et al, 2001**). Les composés saturés ne sont pas affectés, mais la majorité des composés aromatiques qui sont plus photosensibles que les composés aliphatiques (**Rontani et Giusti, 1987**) sont convertis en résines ou en molécules

polaires (**Prince et al, 2003**). Par ailleurs, plus les composés aromatiques sont alkylés, plus ils sont sujets à la photooxydation (**Garrett et al, 1998**).

Rontani et al, (1987, 1992) ont montré l'existence d'interactions entre la photooxydation et la biodégradation pour l'élimination des alkylbenzènes et de l'anthracène. L'action simultanée de ces deux phénomènes permet une élimination plus rapide de ces deux familles de composés.

I.4.2. La transformation biotique (Biodégradation) :

Les hydrocarbures dans le sol sont principalement dégradés par voie microbienne. La biodégradation microbienne complète des hydrocarbures produits du dioxyde de carbone (CO₂), de l'eau ainsi que de petits alcanes et des hydrocarbures cycliques. Ces biodégradations peuvent survenir en conditions aérobies ou en conditions anaérobies, par utilisation des sulfures ou du méthane (**Caldwell et al, 1998; Heider et al, 1999; Spormann et Widdel, 2000**). Plus la structure moléculaire des hydrocarbures est complexe, plus le taux de biodégradation est faible. Les alcanes sont les hydrocarbures les plus facilement biodégradés, en particulier ceux qui ont un petit nombre d'atomes de carbone, soit de 12 à 20 (**Fingas, 2011**). Les composés aromatiques se dégradent à une vitesse beaucoup plus lente que les alcanes, la vitesse de dégradation diminue avec l'augmentation de la taille des molécules et la présence de groupements alkyles (**Prince et al, 2003**). Les composés polaires du pétrole, tels que les résines et les asphaltènes, sont les plus résistants à la dégradation microbienne (**Prince, 1993**). La biodégradation des hydrocarbures est influencée par plusieurs paramètres dont les principaux sont la texture du sol, ses caractéristiques biologiques, sa structure, la concentration et les caractéristiques physico-chimiques et la concentration des polluants ainsi que les facteurs environnementaux (p. ex., concentrations d'oxygène et de nutriments, température, salinité et pression) (**Kumar et Gopal, 2015**).

I.5. Les types de pétrole brut :

L'industrie pétrolière caractérise souvent les pétroles bruts en fonction de leur source géographique, par exemple Alaska North Slope Crude. Toutefois, le classement des types de pétrole brut par source géographique n'est pas un système de classification utile. Cette classification offre peu d'informations sur la toxicité générale, l'état physique, et les changements qui se produisent avec le temps.

Il existe différents types de pétrole brut classé en quatre catégories par l'agence américaine de protection de l'environnement (US-EPA) (<https://www.epa.gov/emergency-response/types-crude-oil>, 21 décembre 2016) :

- **La classe A** : regroupe les pétroles **légers**, volatils. Ils sont fluides, souvent clairs, s'étalent rapidement sur les solides et à la surface de l'eau, s'évaporent rapidement et sont inflammables. Ils pénètrent dans les surfaces poreuses telles que le sable où ils persistent. Ils n'adhèrent pas sur les solides tels que les rochers. Ces pétroles peuvent être fortement toxiques pour la flore et la faune. Beaucoup de produits légers de raffinage appartiennent à cette catégorie.

- **La classe B** : regroupe les pétroles dits « **non gluants** ». Ils ont un aspect cireux ou huileux. Ils sont moins toxiques que ceux de classe A et adhèrent plus aux surfaces solides telles que les rochers. Lorsque la température augmente, ils pénètrent dans les surfaces poreuses (sable). L'évaporation de la fraction légère de ces pétroles peut les transformer en pétrole de classe C ou D. Les pétroles moyennement ou fortement paraffinés appartiennent à cette catégorie.

- **La classe C** : regroupe les pétroles **lourds et gluants**. Ils sont de couleur marron ou noire, sont visqueux et gluants. Ils adhèrent aux surfaces solides (rochers) mais ne pénètrent pas les surfaces poreuses (sables). La densité de ces pétroles, proche de celle de l'eau fait qu'ils coulent souvent. L'évaporation et le lessivage de ces produits dans le milieu marin produit des résidus de type D retrouvés sur les côtes sous forme de boulettes de goudron. Ces pétroles présentent une toxicité faible. Cette catégorie regroupe les pétroles bruts moyens à lourds.

- **La classe D** : regroupe les pétroles non fluides. Ils sont généralement marron foncé ou noir, ne pénètrent pas les surfaces poreuses mais adhèrent fortement aux surfaces solides après liquéfaction sous l'effet du chauffage dû au rayonnement lumineux. Les résidus de pétrole, les pétroles bruts lourds et certains pétroles vieillis font partie de cette catégorie.

I.6. Le raffinage de pétrole :

Le raffinage du pétrole est un procédé industriel qui permet de transformer le pétrole brut en différents produits finis tels que l'essence, le fioul lourd ou le naphta. Le pétrole brut est un mélange hétérogène d'hydrocarbures, inutilisable en l'état. Ses composants doivent être séparés afin d'obtenir les produits finaux exploitables directement. On en distingue en général deux grands types :

- Les produits énergétiques, tels que l'essence, le diesel (gazole) ou le fioul ;
- Les produits non-énergétiques, tels que les lubrifiants, le bitume et les naphas utilisés en pétrochimie.

Le raffinage fait appel à une grande variété de procédés. Parmi ceux-ci, on distingue les grandes familles suivantes (Wauquier, 1994) (figure 6) :

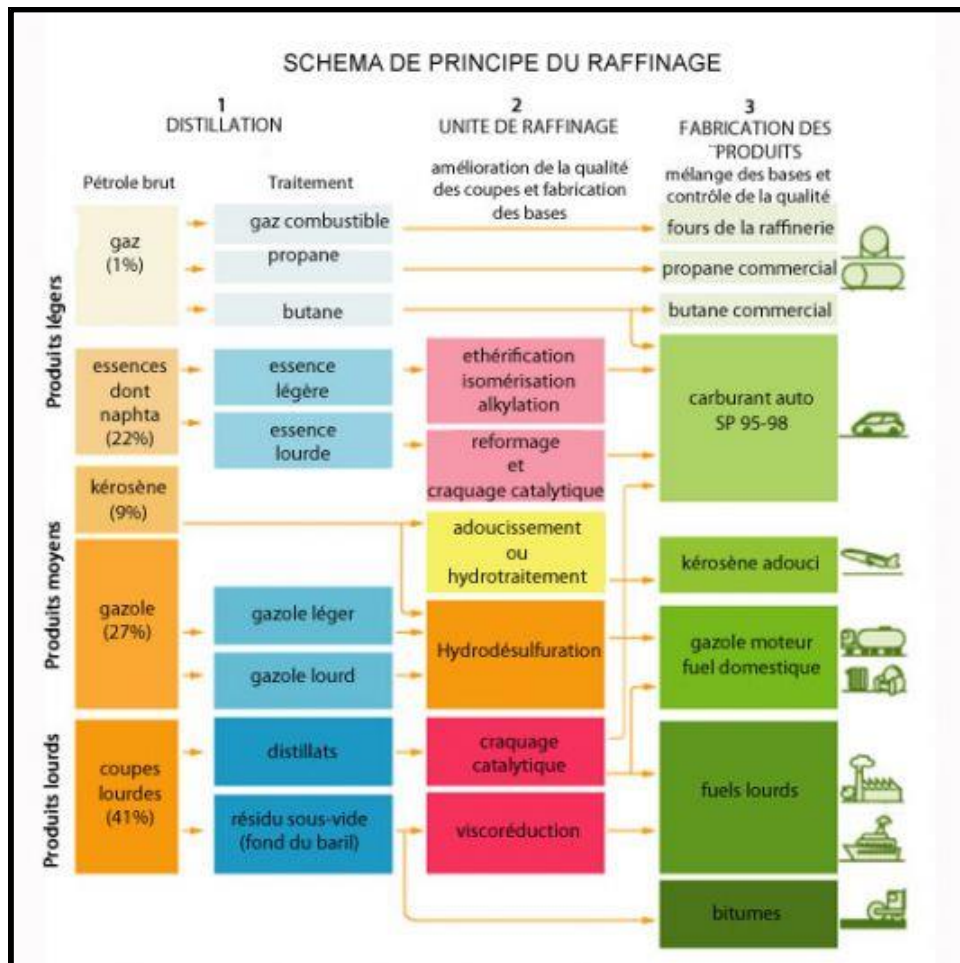


Figure 6 : Le principe de raffinage de pétrole (<http://www.ifpenergiesnouvelles.fr/Espace-Decouverte/Les-cles-pour-comprendre/Les-sources-d-energie/Le-petrole#11>).

- Procédés de séparation qui partagent une charge en fractions plus simples ou plus étroites.
- Procédés de transformations qui génèrent des molécules nouvelles, aux propriétés adaptées à l'usage du produit.
- Procédés de finition qui éliminent (le plus souvent par hydrogénation) des composés

indésirables.

- Procédés de protection de l'environnement qui traitent les gaz de raffinerie (fuel gaz), les fumés et les eaux résiduaires.

I.6.1. Les procédés de séparation : Le procédé de séparation par excellence est la distillation de pétrole brut.

La distillation atmosphérique : consiste à séparer les différents composants d'un mélange liquide en fonction de leur température d'évaporation. Le pétrole brut est injecté dans une grande tour de distillation, haute de 60 mètres et large de 8 mètres environ, où il est chauffé à environ 400 °C. Les différents hydrocarbures contenus dans le pétrole brut sont vaporisés : d'abord les légers, puis les moyens, et enfin une partie des lourds. La température décroît au fur et à mesure que l'on monte dans la tour, permettant à chaque type d'hydrocarbure de se liquéfier afin d'être récupéré. Les plus légers sont récupérés tout en haut, et les plus lourds restent au fond de la tour (**Wauquier, 1994**).

La distillation sous vide : l'opération consiste à séparer sur le même principe que la distillation atmosphérique les produits lourds des résidus de produits moyens en les soumettant à une deuxième phase de distillation dite « sous vide ». La colonne plus petite est fermée puis dépressurisée, ce qui fait diminuer la pression. Les produits les plus volatils, ont une température d'ébullition plus faible permettant ainsi aux produits lourds d'être plus facilement récupérable. En haut de la colonne on récupère du gazole et à sa base du fioul lourd. Les résidus de cette distillation sous vide sont récupérés en vue de produire des lubrifiants (**Wauquier, 1994**).

I.6.2. Procédés de transformations :

Afin de répondre notamment à la demande importante en produits légers sophistiqués (40 % de la demande totale de produits raffinés), les coupes subissent un certain nombre de transformations et d'améliorations qui s'effectuent au sein de plusieurs unités de raffinage.

▪ **Coupes lourdes (environ 40% du pétrole brut)**

- Les résidus sous vide sont transformés par viscoréduction ou « visbreaking ». Cette opération s'effectue en phase liquide entre 450 °C et 500 °C sous une pression entre 5 et 20 bars. Il s'agit d'un craquage thermique. Il permet d'obtenir des bitumes.

- Les distillats sont transformés par craquage catalytique. Cette opération s'effectue à haute température : 500 °C, en présence d'un catalyseur (substance favorisant les réactions chimiques). Ce traitement permet d'obtenir des fuels lourds.
- **Coupes moyennes (environ 35 % du pétrole brut)**
 - Le gazole léger, le gazole lourd mais aussi une partie des kérosènes sont améliorés par hydrodésulfuration. Cette opération est un traitement à l'hydrogène dont le but est de réduire la teneur en soufre de la coupe gazole.
 - La coupe de kérosène issue d'un brut contenant du soufre est améliorée par hydrotraitement. En présence de l'hydrogène contenu dans l'eau, de l'hydrogène sulfuré se forme et se sépare ainsi le soufre de la coupe de kérosène. Il permet d'obtenir du kérosène adouci.

Le traitement au Mérox, permet par un procédé à la soude, de rendre inoffensif le soufre des kérosènes peu sulfurés.

- **Coupes légères (entre 20 et 25 % du pétrole brut)**
 - Les essences lourdes sont améliorées par le procédé de craquage catalytique permettant d'obtenir des supercarburants pour automobile (Super, Super sans plomb 95, Super sans plomb 98).
 - Les essences légères, en vue d'obtenir ces mêmes supercarburants, sont améliorées par :
 - Isomérisation : procédé qui consiste à compenser une perte en indice d'octane due à la réduction légale de la teneur en plomb des essences;
 - Alkylation : procédé inverse du craquage qui conduit à l'augmentation du nombre d'atomes de carbone d'un composé organique.
 - Le naphta est amélioré par hydrotraitement afin d'en extraire le soufre. Les gaz qu'il contient sont ensuite éliminés dans un « stabilisateur » puis séparés en deux fractions. Le naphta léger est stocké pour servir de mélange à la fabrication de carburants et le naphta lourd permet d'alimenter l'unité de reformage catalytique. La coupe de naphta hydrotraitée peut également être envoyée dans un vapocraqueur si elle est utilisée pour la pétrochimie.

- Les gaz combustibles vont au four de la raffinerie.
- Le propane et le butane ne nécessitent pas de transformation ou amélioration particulière.

I.7. Les hydrocarbures en Algérie :

Depuis la découverte en 1956, de pétrole à Hassi-Messaoud, à 106 km au sud-est d'Ouargla, l'importance de l'exploitation d'hydrocarbures en Algérie a considérablement augmenté dans l'économie jusqu'à représenter 95% des recettes d'exportation, 30 % du produit intérieur brut et 60 % des recettes budgétaires (**Auzaias et Labourdette, 2010**).

L'outil de raffinage en Algérie dispose actuellement de six raffineries en cours d'exploitation (Alger, Arzew, Skikda, Hassi-Messaoud et Adrar). La capacité de traitement annuelle s'élève à 27 millions de tonnes. (<http://www.energy.gov.dz/francais/index.php>).

I.7.1. Présentation du pôle industriel d'Arzew

Le pôle industriel d'Arzew est situé à 42 Km à l'est d'Oran. Il s'étend sur environ 12 Km et comporte quatre communes : Arzew, Ain El Bia, Béthioua et Mers El Hadjadj (figure 7). Le pôle a eu pour objectif initial de structurer l'ensemble du territoire dans lequel il est inséré aussi bien au niveau international, national, que local. Avant la création de la zone industrielle, la côte est était bordée de plages et de dunes vives sur presque toute sa longueur et s'appuyait sur un riche arrière-pays agricole ; alors que la pêche côtière était pratiquée au port d'Arzew (**Kacemi, 2006**).

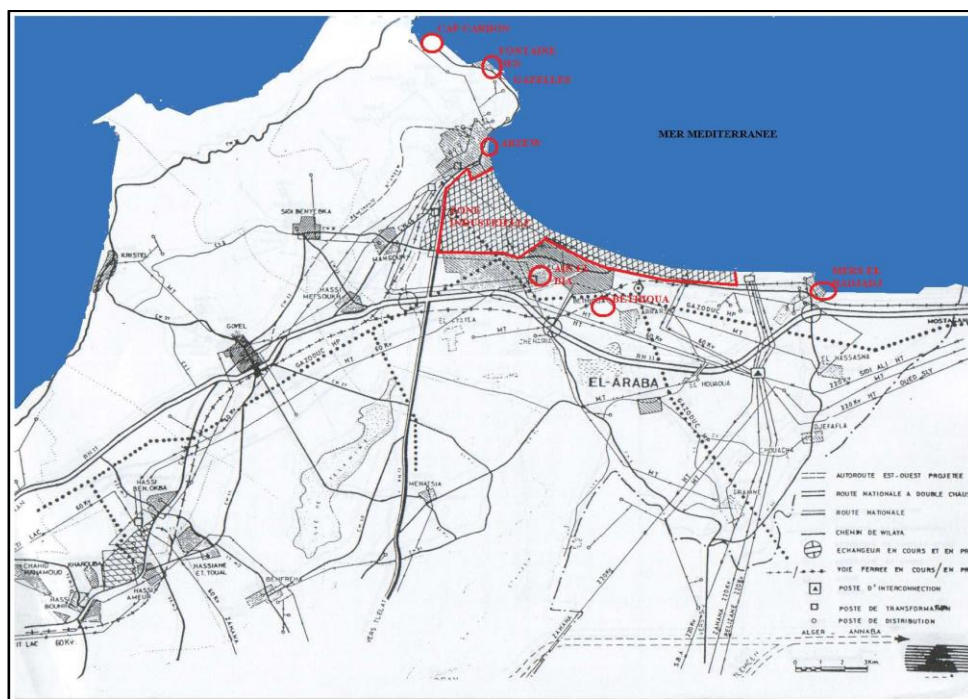


Figure 7 : Situation du pôle industriel d'Arzew (Kacemi, 2009).

La zone industrielle qui s'étend sur une superficie de 2800 hectares, comprend deux ports spécialisés et une plate-forme industrielle. Cette plate-forme industrielle comprend une concentration élevée de complexes pétrochimiques et de raffinage à haut risque (05 complexes de liquéfaction, une raffinerie, un complexe de production de méthanol et résines, un complexe d'ammoniac, etc.), une centrale électrique de capacité 960 MV, six unités de production (hélium, azote, engrais liquides, gaz industriel, emballage...), un réseau de pipe provenant des champs pétrolifères de Hassi Messaoud et Hassi Rmel et un ensemble d'unités de prestation de service dans les domaines de maintenance industrielle, de génie civil et de formation de personnel (Kacemi, 2006).

1.7.2. Raffinerie d'Arzew :

La raffinerie NAFTEC/RA1Z d'Arzew est l'une des quatre raffineries de SONATRACH (figure 14). Elle occupe 170 hectares, elle est construite dans le cadre du premier plan 1970-1974 par la société Japonaise (Japon Gazoline Corporation). La raffinerie est alimentée directement par du pétrole brut de la zone de stockage de Haoud-El-Hamra (Hassi Messaoud) par un pipeline (805 km). La capacité de production de cette raffinerie est de 7,2 millions de tonnes par an. Elle alimente l'ouest du pays avec un surplus exporté vers l'étranger via le terminal d'Arzew. Malgré ces chiffres, un premier problème provient du fait

que la raffinerie n'est exploitée qu'à 60 % de sa capacité (**Dossier spécial Algérie, 2002**). La raffinerie vise actuellement à augmenter sa cadence de production et améliorer ses performances.

I.7.3. Présentation générale des unités de la raffinerie :

La raffinerie est conçue pour le traitement de pétrole brut de Hassi Messaoud, satisfaction des besoins de consommation du marché national, en carburant, lubrifiants et bitumes, et l'exploitation de produits excédentaires (naphta kérosène, fuel, gas-oil et huile, GPL (Gaz de Pétrole Liquéfié), essences, lubrifiants et bitumes.

Le démarrage des unités est lancé, par la mise en exploitation de l'unité des utilités, à partir du mois de Juillet 1972. L'ensemble des unités de la raffinerie est entré en service en Mars 1973. Depuis, plusieurs travaux d'extension sont menés. D'une manière générale, la raffinerie d'Arzew est divisée en trois grandes unités, de production, de stockage et zone administrative. La raffinerie est constituée de plusieurs unités complémentaires et successives qui déterminent le cheminement du flux produit.

- **Les utilités**

Deux unités d'utilités (zone 3 et zone 19) produisent et assurent la distribution, pour les besoins de fonctionnement des différentes installations de : Eau distillée, Electricité, Air service et instrument, eau de refroidissement traitée, fuel gaz et vapeur. Ces zones ne reçoivent pas de matière première, elles ne produisent que les besoins des autres zones.

- **Les carburants**

L'Unité de distillation atmosphérique (U.11) est l'unité principale du complexe qui traite le pétrole brut algérien. Les produits obtenus au niveau de cette unité sont: gaz de pétrole liquéfié, naphta lourd, naphta léger, kérosène, gas-oil et le brut réduit, qui constitue la charge des unités de distillation sous-vide pour la production des huiles de base.

L'Unité de reforming catalytique (U.12) : Le Naphta lourd de l'unité de distillation atmosphérique est traité dans cette unité dont le but est de produire une base à indice d'octane élevé (réformat), des GPL et un gaz riche en hydrogène.

L'Unité de traitement de gaz (U.13) : Les gaz de pétrole liquéfiés obtenus dans les unités de

distillation atmosphérique et de reforming catalytique sont traités dans cette unité et séparés en produits suivants: propane, butane.

- **Les bitumes**

L'Unité de flash sous-vide (U.14) Le brut réduit importé et fractionné en gas-oil sous vide et en produit visqueux obtenu en fond de colonne lequel est traité dans la section de soufflage à l'air pour obtenir du bitume pur (direct) communément appelé bitume routier. Les asphaltes provenant des unités de dé-asphaltage au propane sont mélangés au bitume direct pour obtenir les bitumes routiers. L'expédition des bitumes purs se fait par camion ou par bateau. Une ligne chauffée électriquement relie la raffinerie au port à cet effet.

L'Unité de bitume oxydé (U.15) Du bitume direct mélangé avec du gazole sous vide constitue la charge de cette unité ou blown stock. Le bitume oxydé est obtenu par oxydation poussée avec de l'air. Ce bitume est conditionné dans des sacs plastiques de 25 Kg et dans des fûts de 200 litres.

- **Les lubrifiants**

La raffinerie d'Arzew dispose de:

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

Les deux chaînes de production d'huiles de base disposent respectivement des unités suivantes: distillation sous vide, dé-asphaltage au propane, extraction des aromatiques au furfural, déparaffinage à la méthyl-éthylcétone et au toluène et hydrofinishing des huiles. La 2^{ème} chaîne dispose d'une unité d'hydrotraitement de la paraffine.

Chapitre II :

**La pollution par les
hydrocarbures pétroliers**

II. La pollution par les hydrocarbures pétroliers :

De nos jours, l'exploitation du pétrole et les dommages qu'elle engendre ont atteint leur paroxysme. Alors que le 19^e siècle était celui du charbon, le 20^e siècle est celui du pétrole, une substance pouvant fournir jusqu'à deux fois plus d'énergie pour la même quantité. La découverte de « l'or noir » a résolument bouleversé notre mode de vie à tel point que la quasi-totalité de nos activités dépendent aujourd'hui de son exploitation. Le marché du pétrole représente à lui seul 35 % des transports mondiaux de marchandises. Inévitablement, la pollution marine engendrée par le commerce du pétrole est à la hauteur de celui-ci. On estime notamment que 70 % de la pollution pétrolière a pour récepteur terminal le milieu aquatique et les quantités de pétrole déversées dans les océans chaque année se chiffrent en millions de tonnes. Or les besoins en énergie et donc, pour l'heure en pétrole, ne cessent de s'accroître au fur et à mesure que la population mondiale augmente (**Sauret, 2011**).

II.1 La toxicité des hydrocarbures pétroliers :

La toxicité peut être définie comme l'ensemble des effets négatifs sur les organismes causés par leur exposition à une substance ou un produit chimique. La notion de biodisponibilité d'une substance doit également être prise en compte pour déterminer sa toxicité pour les organismes. Un effet toxique peut se présenter lorsque des substances biodisponibles sont absorbées par l'organisme et qu'elles interagissent avec des lieux d'action pour causer des dommages. Les caractéristiques chimiques et physiques d'une substance dans l'environnement déterminent sa disponibilité pour les organismes. Les niveaux et la durée d'exposition de ces organismes à cette substance sont des facteurs déterminants importants de la toxicité. Une exposition peut être aiguë (pour une courte période) ou chronique (pour une période prolongée) (**Dupuis et Ucan-Marin 2015**).

La persistance et la toxicité des hydrocarbures pétroliers varient grandement d'un composé à l'autre. En règle générale, la solubilité aqueuse des hydrocarbures décroît avec l'augmentation du nombre d'atomes de carbone, alors que la toxicité aquatique augmente. Les composés de faible poids moléculaire sont plus volatils que ceux ayant un poids moléculaire élevé. Ces derniers sont peu solubles dans l'eau et ont davantage d'affinités pour le carbone organique des sédiments et les lipides des cellules (**Boudreau et al, 2015**). Les données expérimentales disponibles chez l'animal ont montré que certains hydrocarbures aromatiques polycycliques pouvaient induire spécifiquement de nombreux effets sur la santé, des effets

systemiques (hépatiques, hématologiques, immunologiques et développement d'athéroscléroses), et/ou des effets sur la reproduction ainsi que des effets génotoxiques et cancérigènes (**Doornaert et Pichard 2005**). Parmi eux, le benzo[a]pyrène est le plus toxique de par sa capacité à former des adduits avec l'ADN ce qui peut induire des effets mutagènes et cancérigènes. Il a donc pendant longtemps été utilisé comme seul marqueur de la présence des hydrocarbures aromatiques polycycliques.

Cependant il a été montré récemment que son seul suivi était insuffisant et qu'il fallait également considérer la somme de benzo[a]pyrène, benz[a]anthracène, benzo[b]fluoranthène et chrysène (**Engel et al, 2014**). On estime que 75 % de la quantité totale absorbée d'HAP (en particulier le pyrène) pénètre dans l'organisme par la peau, ce qui constitue une voie importante d'exposition des HAP. L'absorption rapide des HAP par les humains se traduit par un potentiel élevé de bioamplification dans la chaîne alimentaire. La métabolisation des HAP peut permettre leur élimination de l'organisme par les systèmes biliaires et urinaires en rendant les métabolites plus solubles que la molécule initiale. Cependant, ces métabolites peuvent s'avérer plus néfastes que la molécule initiale après l'activation métabolique (**Gram, 1995**). En général, plus le nombre de cycles de benzène est important, plus la toxicité de l'HAP est élevée (**Cerniglia, 1992**). La toxicité relative des HAP peut être mesurée en utilisant les valeurs de DL₅₀ (dose létale dans 50 % des cas). Ils sont exprimés en milligrammes de matière toxique par kilogramme de poids corporel du sujet, qui entraîne la mort dans 50 % des cas. Il est important de préciser l'itinéraire par lequel la matière toxique a été administrée à l'animal d'essai (tel que par voie orale ou intra-péritonéale) et l'animal sur lequel la substance toxique a été testée (c.-à-d. rat, souris). Le tableau 1 représente les valeurs DL₅₀ de certains HAP (**Bamforth et Singleton, 2005**).

Les HAP sont rarement rencontrés seuls dans l'environnement, de nombreuses interactions se produisent dans un mélange d'HAP permettant de renforcer la puissance des HAP génotoxiques et cancérogènes connus (**Kaiser, 1997**). Par exemple, le 1-nitropyrène, un HAP nitré, est produit lors des réactions entre les cétones dans les produits de combustion du carburant automobile et les oxydes d'azote en suspension dans l'air qui se produisent à la surface des particules d'hydrocarbures dans les gaz d'échappement diesel. Dans le test d'Ames *Salmonella typhimurium*, le 1-nitropyrène s'est avéré hautement mutagène et cancérogène, alors que le composé parent, le pyrène, n'est pas cancérigène et seulement faiblement mutagène (**Pothuluri et Cerniglia, 1994**).

Tableau 1 : Valeurs de DL₅₀ de certains HAP (Bamforth et Singleton, 2005).

HAP	Nombre des cycles de carbone	Valeur DL ₅₀ (mg/kg)	L'animal d'essai	la voie d'exposition
Naphtalène	2	533-710	Les souris ♂/♀	Oral
Phénanthrène	3	750	Les souris	Oral
Anthracène	3	>430	Les souris	Intra-péritonéal
Fluoranthène	4	100	Les souris	Intraveineux
Pyrene	4	514	Les souris	Intra-péritonéal
Benzo[a]pyrène	5	232	Les souris	Intra-péritonéal

II.2 L'impact de la pollution pétrolière sur l'environnement :

II.2.1. Sur les sols et les eaux souterraines :

L'ère industrielle a engendré une pollution importante des sols et sous-sols par des mélanges complexes de substances organiques et inorganiques parmi lesquelles on retrouve les hydrocarbures, les solvants chlorés, les métaux, etc. ... Ces pollutions issues pour la plupart de déversements accidentels ou ponctuels résultant de comportements délibérés ou non, de fuites de réservoirs de stockage constituent un problème environnemental majeur notamment terme de risque de transfert d'hydrocarbures vers les nappes phréatiques, mais également un risque humain non négligeable (Gautier, 2007) (figure 8).

La pollution des sols par les hydrocarbures résulte généralement de l'infiltration à partir de la surface ou de l'enfouissement de produits pétroliers ou de résidus hydrocarbonés. La pollution des aquifères par des hydrocarbures solubles résulte d'un contact de la nappe d'eau avec un produit infiltré ou enfoui ou parfois provient d'une rivière polluée en charge par rapport à une nappe alluviale. En fonction du volume déversé, de sa nature, des caractéristiques géologiques et hydrogéologiques du sous-sol, le produit pétrolier en tant que phase liquide peut rester entièrement piégé au-dessus de la nappe phréatique ou atteindre

celle-ci si le volume infiltré est supérieur au volume piégé, le volume excédentaire s'étalant à la surface de la nappe (Bocard, 2006).

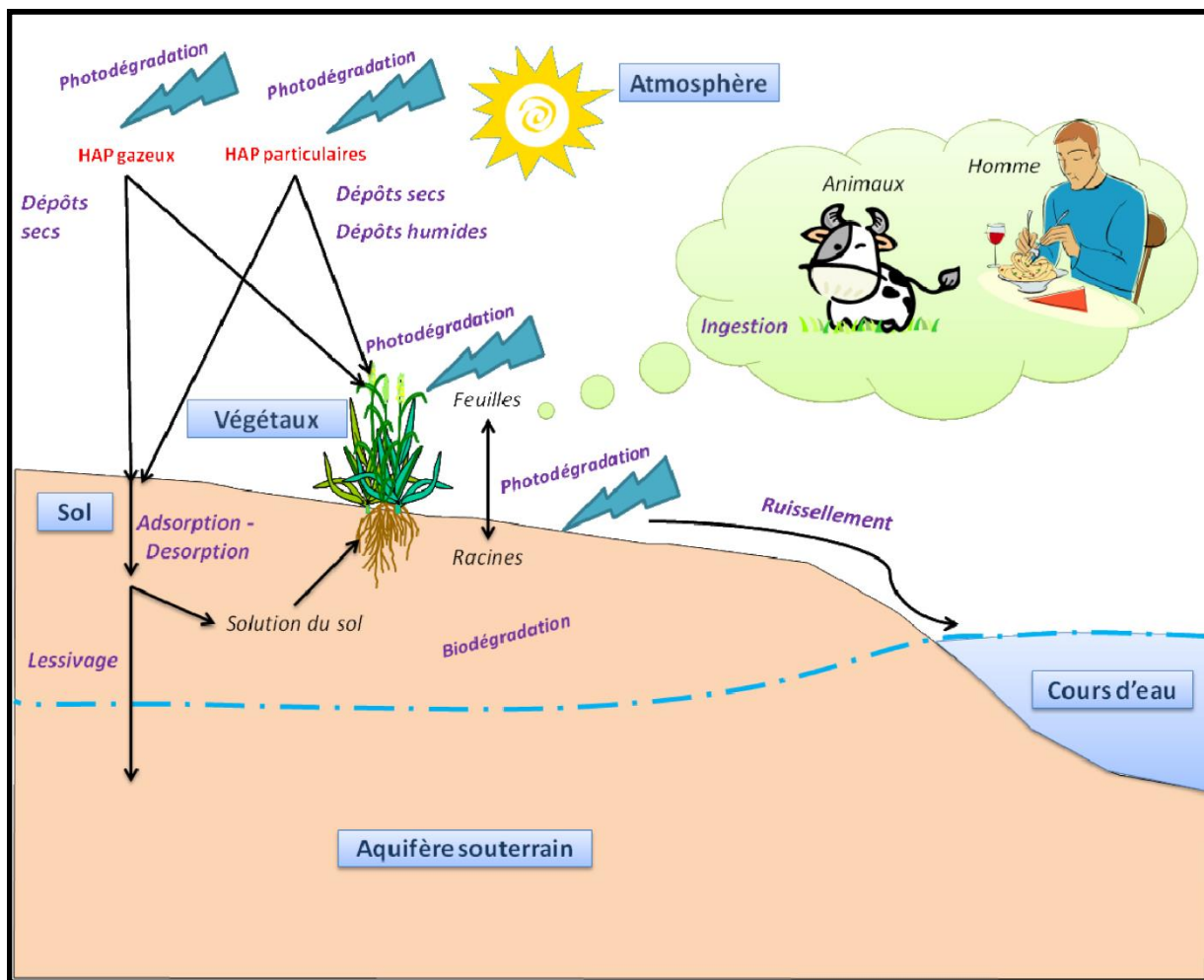


Figure 8 : Devenir des HAP dans les écosystèmes (Desalme, 2011).

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 (Gabet., 2004). Aux polluants transitant par les cours d'eau s'ajoutent ceux provenant des territoires proches de la mer. Ils peuvent avoir une origine diffuse (principalement agricole) ou ponctuelle (stations d'épuration industrielles ou urbaines).

II.2.2. Sur les végétaux et la chaîne alimentaire :

Les produits pétroliers rejetés dans l'environnement ont des répercussions sur les plantes, animaux et êtres humains. Les conséquences de la contamination dépendent des

organismes eux-mêmes et de la structure chimique des hydrocarbures. Les concentrations des hydrocarbures aromatiques polycycliques totales semblaient être plus élevées dans les huiles extraites des plantes (**Stevcevska et Jovanovic-Kolar, 1974**) que dans les tissus végétaux. Cette constatation, aurait des répercussions sur certaines cultures qui poussent près des sources d'HAP, parce que les organes végétaux tels que les graines sont importants dans l'alimentation humaine et contiennent aussi des concentrations relativement élevées d'huiles. Les quantités et les types d'HAP ingérés par les humains et d'autres animaux à partir de la végétation dépendent partiellement du fait que des HAP particulières sont absorbées par rapport à adsorbées et combien elles sont facilement rincées avec de l'eau. **Kveseth et al, (1981)** ont suggéré que les HAP de poids moléculaire faible sont adsorbés sur les feuilles, tandis que les composés particuliers de plus haut poids moléculaire sont éliminés par la pluie. **Kolar et al, (1975)** ont constaté que le lavage des légumes a enlevé un maximum de 25 % de la contamination par les HAP et en général moins. Le lavage à l'eau n'est pas une méthode très efficace pour éliminer les HAP de la végétation contaminée.

II.2.3. Sur les milieux marins :

Les risques localisés de la production pétrolière sont identifiables tout au long de la chaîne d'activité pétrolière, de l'exploitation-production jusqu'au transport de pétrole, à la pétrochimie et au raffinage. L'impact environnemental du transport des hydrocarbures peut également être considérable et constitue la face la plus célèbre et dangereuse de cette menace environnementale. Le réseau d'oléoducs constitue en lui-même un danger écologique, du fait des menaces de sabotages ou d'attentats et de défauts d'entretien des infrastructures. Le délabrement des têtes de pont et d'oléoducs dans l'ouest sibérien est source de fuites permanentes qui pourraient atteindre, selon Greenpeace, 15 millions de tonnes de pétrole par an soit une pollution quotidienne égale à deux Érika. Mais le principal danger dans les certitudes du transport maritime (**De Lestrangle et al, 2005**). En termes quantitatifs, le pétrole est l'un des polluants organiques les plus importants dans les milieux marins et il est estimé que dans le monde entier, entre 1,7 et $8,8 \times 10^6$ tonnes d'hydrocarbures pétroliers ont un impact annuel sur les eaux marines et les estuaires (**National Research Council, 2002**). L'étude statistique montre que les produits pétroliers les plus couramment déversés dans les eaux continentales et estuariennes sont les produits raffinés dits "produits blancs". Ces produits sont impliqués dans 40 % des pollutions d'hydrocarbures, avec notamment le gazole qui à lui seul représente 27 % des déversements d'hydrocarbures en eaux continentales. Les produits bruts viennent en deuxième position avec 21 % des pollutions. Enfin, les produits raffinés

lourds représentent 14 % des pollutions (figure 9) (Cedre, 2012).

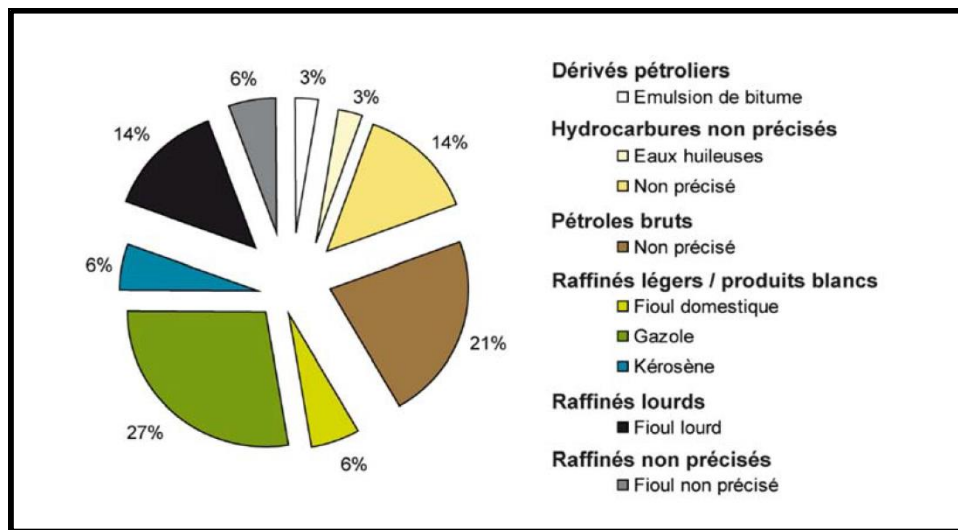


Figure 9 : Fréquence (%), par type d'hydrocarbures, des événements de déversements accidentels significatifs (ampleur > 7 tonnes) ayant entraîné une pollution d'eaux continentales ou estuariennes en Europe, pour la période 2005-2009 (Cedre, 2012).

Les déversements d'hydrocarbures peuvent avoir des impacts très divers sur l'environnement marin. Les marées noires sont présentées comme responsables de conséquences terribles pour la survie de la faune et la flore marines (Soltani, 2004). En cas d'accident majeur, l'impact environnemental à court terme peut être grave et frapper sérieusement les écosystèmes et les populations qui vivent à proximité du littoral contaminé, du point de vue tant de leurs moyens de subsistances que de leur qualité de vie.

Chapitre III :

**La bioremédiation des sols
pollués par les hydrocarbures
pétroliers**

III. La bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures pétroliers :

Toute substance introduite dans l'environnement en quantité anormale est considérée comme un contaminant. Un excès de contaminant peut aboutir à une contamination. Les effets délétères que les contaminants ont sur la faune et la flore conduisent à la pollution des écosystèmes. L'industrialisation intensive de ces deux derniers siècles est la source de nombreuses pollutions bien dommageables pour l'environnement. Les substances chimiques sont déversées dans l'environnement avec des dommages extrêmement importants sur les écosystèmes. Parmi les polluants les plus courants :

- les hydrocarbures aliphatiques, aromatiques (BTEX),
- les hydrocarbures chlorés
- les composés nitro-aromatiques et organophosphorés,
- les solvants
- les pesticides
- les métaux lourds
- les dérivés de produits pharmaceutiques...

Les produits pétroliers et leurs dérivés constituent les principaux polluants organiques des sols et des eaux souterraines. Cette situation est la conséquence d'un emploi massif qui s'accompagne du rejet des produits de combustion et des produits eux-mêmes par Le raffinage, les fuites des réservoirs de stockage et la distribution du pétrole brut (**Solano et al, 2001 ; Atlas et Philip 2005; Nogales et al, 2011**). Selon le degré de pollution des sols et du risque qu'ils représentent directement pour la santé humaine et les écosystèmes, des techniques particulières de dépollution doivent être mises en œuvre. Plusieurs paramètres sont à prendre en compte : type de polluant, contamination récente ou ancienne, extension en surface ou dans les couches profondes du sol, diversité des conditions locales (nature du sol, localisation des nappes phréatiques, proximité de zone urbaine...). Tout ceci nécessite un diagnostic préalable. La dépollution peut être mise en œuvre à travers quatre grands types de méthodes, associant éventuellement la combinaison de plusieurs techniques (**Naidu, 2003 ; Gan et al, 2009**) :

- les méthodes physiques consistent à transférer et concentrer les polluants, sans les modifier ou les détruire, en se servant de fluides (eau ou gaz) pour le transport.
- les méthodes thermiques consistent à chauffer le matériel contaminé pour en extraire le polluant et le détruire
- les méthodes chimiques, font appel à un principe réactionnel (action d'un solvant, oxydation, etc.) pour transformer le polluant en un composé moins toxique et inerte vis-à-vis de l'environnement.

Une technique alternative plus intéressante à ces méthodes physiques, thermique et chimiques est la bioremédiation qui s'appuient sur le métabolisme et l'activité des êtres vivants (bactéries, champignons, plantes). La bioremédiation a pour avantage indéniable qu'elle est naturelle, qu'elle n'implique aucune intervention humaine, et donc aucun effet supplémentaire sur la flore, et surtout qu'elle est moins chère (**Russell, 1992 ; Christopher *et al*, 2016**). Son inconvénient majeur est qu'elle peut être très lente. Le challenge est donc d'accélérer ce processus naturel (**Megharaj *et al*, 2011**).

III.1. Les principales méthodes de la bioremédiation :

Il existe deux principales méthodes de la bioremédiation: la bioaugmentation et la biostimulation

III.1.1. La bioaugmentation :

Cette technologie consiste à introduire des cultures de microorganismes au milieu contaminé dans l'objectif d'augmenter la biodégradation des hydrocarbures. La technique repose sur l'addition d'une souche bactérienne pure pré-adaptée; ajout d'un consortium pré-adapté; introduction de bactéries génétiquement modifiées; et l'addition de gènes pertinents de biodégradation conditionnés dans un vecteur à transférer par conjugaison dans des microorganismes indigènes (**El Fantroussi et Agathos, 2005**). Généralement les microorganismes sont sélectionnés sur la base de leur aptitude métabolique à dégrader les hydrocarbures et également sur leurs caractéristiques essentielles qui permettent aux cellules d'être fonctionnellement actives et persistantes dans les conditions environnementales souhaitées.

La meilleure approche pour la sélection des microorganismes compétents doit être basée sur la connaissance préalable des communautés microbiennes qui habitent sur le site à

dépollué (**Thompson et al, 2005; Van Der Gast et al, 2004**). L'utilisation d'un consortium microbien plutôt que d'une culture pure pour la bioremédiation est plus avantageuse car elle fournit la diversité métabolique et la résistance nécessaires aux applications sur le terrain (**Rahman et al, 2002a**). Les inoculants microbiens sont des suspensions cellulaires homogènes produites dans des conditions optimales qui subissent souvent un stress lorsqu'elles sont en contact avec la complexité des habitats naturels. Dans les cas réels, la population introduite commence à diminuer peu après avoir été ajoutée en raison de plusieurs stress abiotiques et biotiques.

En effet, les stress engendrés par les changements des paramètres abiotiques qui peuvent inclure les températures extrêmes, la teneur en eau, le pH, l'épuisement des nutriments et aussi des niveaux potentiellement toxiques de polluants dans le sol contaminé (**Gentry et al, 2004**) et des paramètres biotiques notamment les problèmes d'adaptation des micro-organismes inoculés; insuffisance de substrat; la compétition avec la microflore autochtone; utilisation d'autres substrats organiques de préférence au polluant; l'apparition de prédateurs comme les nématodes peuvent compromettre le maintien et la croissance des microorganismes introduits. Ainsi les souches microbiennes artificiellement ajoutées peuvent rapidement décliner (**Goldstein et al, 1985; Van Veen et al, 1997; Singer et al, 2005; Vinas et al, 2005**).

III.1.2. La biostimulation :

La biodégradation des hydrocarbures dans le sol peut être limitée par de nombreux facteurs, y compris les nutriments, le pH, la température, l'humidité, l'oxygène, les propriétés du sol et la présence de contaminants (**Atagana, 2008; Al Sulaimani, 2010; Bundy et al, 2002**).

La biostimulation implique la modification de l'environnement pour stimuler l'activité des populations microbiennes autochtones du sol par l'ajout des nutriments notamment l'azote, le phosphore, l'oxygène ou le carbone (par exemple sous forme de mélasse) au site contaminé, ils sont par ailleurs disponibles en quantités suffisamment faibles ce qui limite l'activité microbienne (**Guerin, 1999; Roling et al, 2002; Delille et al, 2004; Kalantary et al, 2014**). Il existe plusieurs autres facteurs qui déterminent en grande partie le taux de dégradation des hydrocarbures dans des conditions naturelles. Par exemple, on a observé que des facteurs tels que l'intensité du mélange physique, les pré-traitements (par exemple le

lavage à la côte, l'enlèvement manuel, le râtelage manuel, la bioremédiation à l'aide d'agents de biostimulation, le labourage mécanique) et la disponibilité des sources de carbone alternatives ont influencé le potentiel de minéralisation par les microorganismes après le déversement de pétrole (Sugai *et al*, 1997). La température a un impact considérable sur la biodégradation en raison de son effet sur la viscosité, la solubilité dans l'eau et la composition chimique d'hydrocarbures. Elle influence également le taux de dégradation des hydrocarbures et la composition de la communauté microbienne (Atlas, 1981; Horel et Schiewer, 2009).

La faible solubilité des hydrocarbures dans l'eau est un facteur limitant de la biodégradation par les microorganismes. L'utilisation de biosurfactants pour améliorer le taux de biodégradation est bien étudiée (Rahman *et al*, 2002a; Bordoloi et Konwar, 2009; Ron et Rosenberg, 2002). Nikolopoulou et Kalogerakis (2008) ont montré que la biostimulation utilisant un engrais N/P avec des biosurfactants permettait aux microorganismes naturels de s'adapter mieux et plus rapidement à la contamination du déversement d'hydrocarbures, assurant une phase de décalage relativement plus courte et des taux de dégradation plus rapides. La combinaison de bioaugmentation, biostimulation et l'addition de biosurfactant, selon les caractéristiques du site contaminé, pourrait être une stratégie prometteuse pour accélérer la bioremédiation (Baek *et al*, 2007). Le principal avantage de la biostimulation est que la bioremédiation nécessite des micro-organismes indigènes déjà présents qui sont bien adaptés à l'environnement sous-sol, et sont bien répartis spatialement dans la sous-surface (Adams *et al*, 2014).

III.2. La biodégradation des hydrocarbures par les micro-organismes:

La biodégradation est la transformation à l'aide des micro-organismes d'un composé organique métabolisable sous une autre forme plus simple, qui peut être moins ou plus toxique que le composé d'origine (biotransformation) et aboutit à un produit final qui est le dioxyde de carbone (minéralisation). La biodégradation se réalise soit en conditions aérobies, les composés organiques sont complètement oxydés en composés inorganiques solubles et l'oxygène agit comme un accepteur terminal d'électrons, soit en conditions anaérobies, les composés organiques sont oxydés de façon incomplète en acides organiques simples, le méthane et l'hydrogène comme sous-produits (conditions dénitrifiantes, sulfato-réductrices ou méthanogènes) par différents groupes de microorganismes. Contrairement au métabolisme aérobie, le nitrate, le sulfate et le bicarbonate jouent le rôle d'accepteurs terminaux (Kumar et Gopal, 2015).

III.2.1. Les microorganismes utilisés dans la dégradation des hydrocarbures :

La dégradation microbienne est un mécanisme naturel et primordial pour dépolluer les sites contaminés par le déversement des hydrocarbures pétroliers (**Lal et Khanna, 1996; Perelo, 2010**). Une grande variété de micro-organismes indigènes du sol et des eaux présente la capacité à dégrader les hydrocarbures pétroliers (**Dhaker et Jain, 2011; Jain et al, 2011**).

Les bactéries et les champignons sont des médiateurs primaires dans la dégradation des hydrocarbures, les plus étudiés et semblent les plus efficaces. En effet, ils sont capables de métaboliser une large gamme des hydrocarbures, les transformant partiellement en métabolites ou en les minéralisant complètement (**Chikere, 2011**). Les bactéries se sont avérées plus polyvalentes et actives que les champignons et peuvent donc jouer un rôle plus important au cours de la biodégradation des hydrocarbures (**Rahman et al, 2003, Brooijmans et al, 2009**).

L'exposition préalable aux hydrocarbures entraîne l'adaptation de la communauté microbienne à l'utilisation des hydrocarbures comme sources de carbone et d'énergie. Les trois moyens par lesquels l'adaptation peut se produire sont : l'induction d'enzymes spécifiques, les changements génétiques qui aboutissent à des voies métaboliques et l'enrichissement sélectif de microbes capables de transformer les hydrocarbures (**Leahy et Colwell, 1990**). Les microorganismes d'un sol non exposé à des composés contaminants ne possèdent pas forcément la capacité de les métaboliser. Cependant, lorsqu'ils sont exposés à de tels composés, ils sont souvent capables de s'adapter, c'est-à-dire d'acquérir le potentiel métabolique de dégradation de ces polluants par recrutement vertical ou horizontal de gènes spécifiques (**George et Hay, 2011**).

Le recrutement des voies métaboliques, présentes dans le génome non exprimées, peut se faire par des événements de mutation ponctuelle, de réarrangement génétique ou de transposition (**Habe et Omori, 2003**). Les microorganismes peuvent aussi acquérir des clusters de gènes cataboliques via des éléments mobiles transférés d'un hôte donneur à un hôte receveur (transfert horizontal).

Les bactéries présentent ces phénomènes plus que tout autre groupe microbien après une perturbation des hydrocarbures dans le sol. Chez les bactéries, les phénomènes de transferts les plus connus sont la conjugaison via des plasmides, la transformation ou la

transduction (**Juhas et al, 2009**). Ces phénomènes de transferts horizontaux augmentent les capacités métaboliques des bactéries, notamment en élargissant leur gamme de substrats, et permettent l'adaptation des populations microbiennes à de nouveaux contaminants (**van der Meer et al, 1992; van der Meer et Sentchilo, 2003**). Le transfert horizontal de gènes est plus répandu dans les bactéries, il est signalé comme l'un des principaux mécanismes responsables de l'évolution de la dégradation accrue des hydrocarbures (**Obayori et Salam, 2010**).

III.2.1.1. Les bactéries :

Les bactéries sont la classe des microorganismes activement impliqués dans la dégradation des hydrocarbures des sites contaminés. Un certain nombre d'espèces bactériennes sont connues pour la dégradation des HAP. La plupart d'entre eux, représentant l'efficacité de la biodégradation, elles sont isolées à partir de sols contaminés à long terme par les déchets pétrochimiques (**Haritash et Kaushik, 2009**).

Les différents genres bactériens fréquemment décrits pour leur capacité à dégrader les hydrocarbures dans les environnements de sol comprennent : *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Collimonas*, *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Flavobacterium*, *Gordonia*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Variovorax* et d'autres clones bactériens (**Leahy et Colwell, 1990 ; Cerniglia, 1992; Juhash et Naidu, 2000; Hamamura et al, 2006; Chikere et al, 2009a; Obayori et Salam, 2010**).

III.2.1.2. Les champignons :

De nombreuses études en sols ont démontré l'utilité et l'efficacité des champignons pour la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures (**Haemmerli et al, 1986, Sutherland et al, 1991; Eggen et Majcherczyk, 1998; Bogan et al, 1999**) parmi ces champignons les genres: *Amorphoteca*, *Neosartorya*, *Talaromyces*, *Graphium*, *Candida*, *Yarrowia*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Pencillium*, *Cunninghamella*, *Fusarium*, *Mucor*, *Phanerochaete*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* et *Trichoderma* (**Young et Cerniglia 1995, Chaillan et al, 2004; Singh, 2006**). Les avantages principaux des champignons par rapport aux bactéries sont leur capacité à se propager dans les sols grâce à leur mycélium et à produire des enzymes extracellulaires par exemple des oxydases à large spécificité de substrats qui permettent un meilleur contact avec les hydrocarbures (**Young et Cerniglia, 1995**).

III.2.2. Accession des microorganismes aux composés organiques hydrophobes :

Certains microorganismes utilisent les hydrocarbures comme source de carbone pour leur croissance. De ce fait, ils se sont adaptés en termes de résistance et d'équipement enzymatique pour utiliser ce type de substrat. Les hydrocarbures sont des composés hydrophobes dont la solubilité diminue à mesure que la masse moléculaire des composés augmente. Pour les hydrocarbures dont la solubilité est faible ($< 0,1 \text{ g.L}^{-1}$), les microorganismes ont développé des stratégies pour venir au contact du substrat. Afin d'expliquer l'assimilation des hydrocarbures par les microorganismes quatre modes d'accession, sont illustrés dans la figure 10 (Bouchez-Naitali *et al*, 1999; Hommel, 1994).

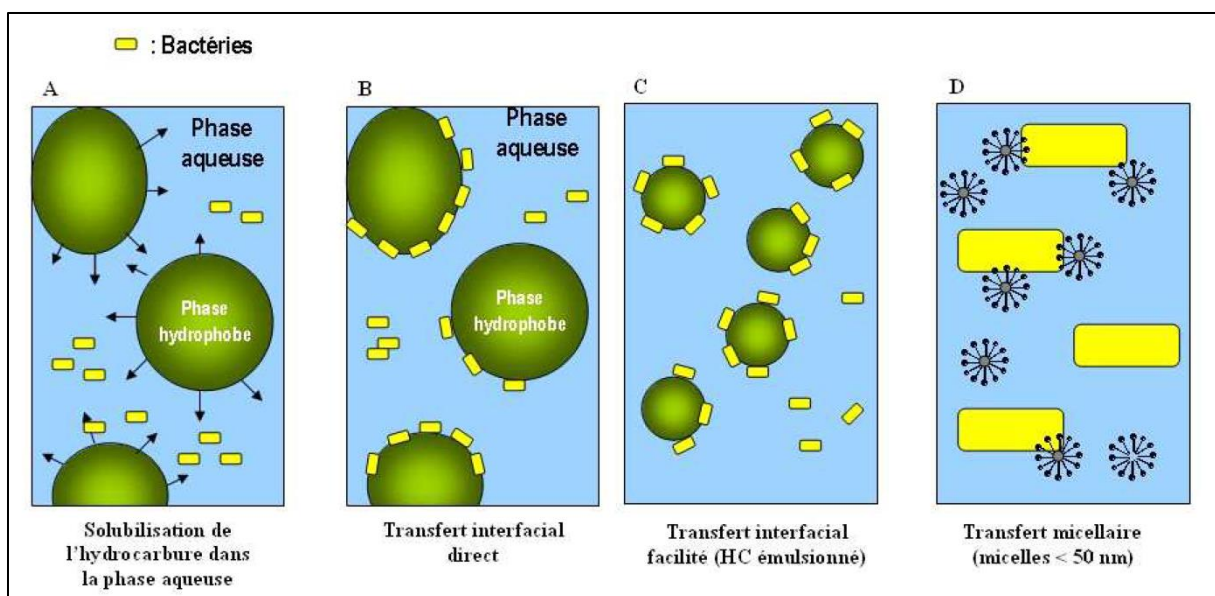


Figure 10 : Les mécanismes d'accession des microorganismes aux hydrocarbures
(Vandecasteele, 2005)

III.2.2.1. L'assimilation des hydrocarbures solubles

L'assimilation en phase aqueuse est surtout rapportée pour les hydrocarbures aromatiques suffisamment solubles et les alcanes légers (Bouchez *et al*, 1995; Goswami et Singh, 1991). C'est sous forme solubilisée que le substrat pénètre dans la cellule.

III.2.2.2. L'accession interfaciale

Les micro-organismes utilisant les alcanes peu solubles possèdent fréquemment une membrane externe hydrophobe (Miura, 1978; Rosenberg, 1986). L'hydrophobicité élevée de cette enveloppe permet l'adhésion du microorganisme aux gouttelettes de substrat présentes

dans le milieu aqueux, souvent de taille très supérieure à celle des bactéries. Le substrat pénètre directement dans la cellule par diffusion ou transport actif sans dissolution préalable dans la phase aqueuse. L'hydrophobicité des microorganismes concernés entraîne souvent une forte tendance à l'agrégation.

III.2.2.3. L'accession interfaciale facilitée (émulsification)

Dans ce cas, l'intervention de biosurfactants produits par les microorganismes accélère le transfert des hydrocarbures en augmentant l'aire interfaciale entre les phases hydrophobe et hydrophile. On parle de transfert interfacial assisté. L'action des biosurfactants est souvent complexe. Ils participent au pseudo solubilisation des alcanes nécessaires à la croissance tout en restant associés aux cellules bactériennes pendant la croissance, puis sont libérés massivement lorsque le microorganisme a cessé toute croissance (**Singer et Finnerty, 1984**).

III.2.2.4. Le transfert micellaire

Plusieurs auteurs ont montré que la solubilité apparente des n-alcanes est très largement supérieure à celle mesurée dans l'eau dans les cultures de levures sur n-alcanes (**Roy et al, 1978**) ou sur HAP (**Kim et al, 2001**). Cette augmentation de la solubilité apparente est liée à la formation d'une microémulsion résultant du pseudo solubilisation des hydrocarbures par des biosurfactants produits par le microorganisme. Les micelles ainsi formées, de taille très inférieure aux bactéries, entrent en contact avec la cellule (figure 11). Le mécanisme de transfert à travers l'enveloppe cellulaire n'est en réalité pas connu. Une protéine de transport membranaire Alk L a été cependant mise en évidence (**van Beilen et al, 1992b**).

Hommel (1994) a formulé une hypothèse sur l'existence des pores hydrophobes au niveau de l'enveloppe bactérienne. Il faut noter que la surface externe d'une micelle est majoritairement hydrophile et le transfert micellaire apparaît privilégié chez les microorganismes dont l'hydrophobicité de l'enveloppe micellaire est faible (**Bouchez-Naitali et al, 1999**). Les interactions hydrophobes entre substrat et cellule microbienne sont d'ailleurs complexes car les biosurfactants produits sont susceptibles d'affecter l'hydrophobicité cellulaire.

En effet, le rôle physiologique des biosurfactants est multiple. Ils interviennent dans la

formation de micro-colonies, ils facilitent l'association en surface des bactéries et de part ce fait la formation d'agrégats, ils assurent la formation d'une structure de type filamenteuse et jouent un rôle dans la dispersion des biofilms (**Pamp et Tolker-Nielsen, 2007**).

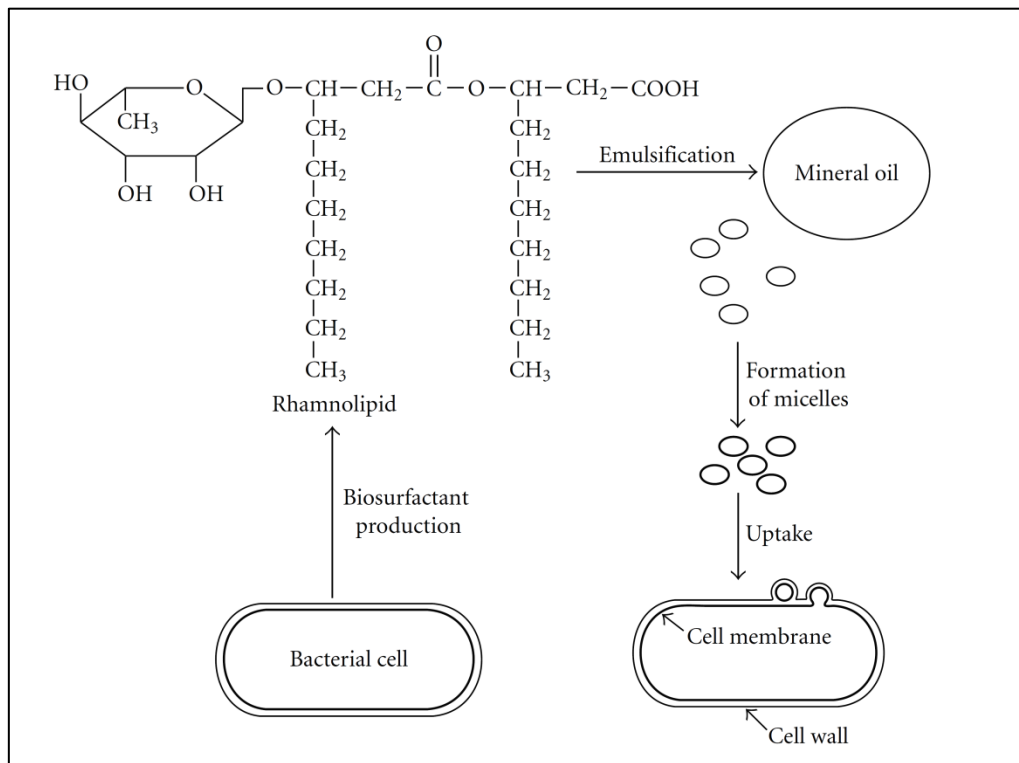


Figure 11 : Implication du biosurfactant (rhamnolipide) produit par *Pseudomonas* sp. dans l'absorption d'hydrocarbures (**Das et Preethy, 2011**).

III.2.3. Les voies métaboliques de la dégradation des hydrocarbures pétroliers :

III.2.1.1. La biodégradation aérobie :

En aérobiose, de nombreuses bactéries ont développé des stratégies enzymatiques qui leur permettent d'incorporer un ou deux atomes d'oxygène à la molécule ciblée. Cette réaction d'oxydation rend l'hydrocarbure plus hydrophile et par conséquent plus facilement dégradé par le métabolisme bactérien, en alcool primaire (alcanol) (dans le cas des hydrocarbures aliphatiques) ou en phénol (dans le cas de molécules aromatiques). Dans certaines espèces, un époxyde (oxacycloalcanes) est le premier intermédiaire. La réaction suivante nécessite de l'énergie, qui est typiquement générée par l'oxydation d'un intermédiaire biologique réduit tel que le NADH, qui est ré-oxylé par un accepteur d'électrons. Pour la dégradation des alcanes, on connaît différents systèmes enzymatiques qui effectuent l'attaque primaire. Un système oméga-hydroxylase composé de trois protéines (rubredoxine réductase,

rubredoxine et oméga-hydroxylase) est isolé et caractérisé à partir de *Pseudomonas* (Ensign, 2001).

Dans certaines espèces bactériennes ou fongiques ainsi que dans des cellules de mammifères, il existe des enzymes qui dépendent du cytochrome P450 agissant comme une oxydase terminale. Les intermédiaires principaux de la dégradation des alcanes sont les acides gras, qui sont produits à partir des alcanols via des aldéhydes. Ces acides peuvent être de plus décomposés par la voie typique de la dégradation de l'acide carboxylique, dans laquelle la molécule est raccourcie par étapes. Cependant, les acides gras peuvent également être excrétés par les cellules et s'accumuler dans l'environnement. Une fois libérés, ils peuvent produire des effets ambigus. D'une part, les acides gras peuvent servir de source de carbone pour les bactéries d'une communauté, améliorant ainsi la dégradation des hydrocarbures. D'autre part, les acides gras (longueur de chaîne 14 C) peuvent inhiber la croissance et le métabolisme des hydrocarbures car ils interfèrent avec la membrane cellulaire (Atlas et Bartha, 1973). Cela provoque un effet toxique et réduit la croissance.

III.2.1.2. Minéralisation complète ou voie de dioxygénase :

Les microorganismes ont des capacités enzymatiques qui leur permettent d'oxyder les composés aromatiques et polyaromatiques dont la taille peut varier du benzène au benzo(a)-pyrène (Cerniglia, 1984 b). Les hydrocarbures aromatiques sont attaqués par une dioxygénase dans le substrat pour former des dihydrodiols de configuration *cis* (Gibson *et al*, 1975). Le pyruvate est l'un des principaux intermédiaires de la voie. Les principaux produits finaux de cette voie sont la biomasse et le dioxyde de carbone. L'inconvénient de cette voie est que seuls les systèmes de quatre cycles sont minéralisés. Les systèmes avec un plus grand nombre de cycles semblent être récalcitrants (Maneerat et Kulnaree, 2007).

III.2.1.3. Cométabolisme :

Les hydrocarbures sont biodégradés soit directement en servant de source de carbone, soit indirectement par cométabolisme. Le cométabolisme est un processus au cours duquel des contaminants sont fortuitement dégradés par des microorganismes utilisant des enzymes ou des cofacteurs pendant le métabolisme d'un substrat de croissance ou d'un autre composé assimilable, sans que ceux-ci soient pour eux une source d'énergie et d'éléments nutritifs (Dalton et Stirling, 1982; Hazen, 2010). Les microorganismes ont besoin d'une source primaire de substrat, et le contaminant est considéré comme un substrat secondaire. Ainsi, les

produits de dégradation liés au cométabolisme ne stimulent pas la croissance bactérienne des populations concernées. Dans le cas d'un consortium microbien, il peut exister une forme de commensalisme, où une première espèce dégrade un substrat. Le métabolite produit n'étant pas utilisé par la bactérie, cette source d'énergie peut servir à une seconde espèce comme un champignon (**Bouchez et al, 1999**).

Les HAP de faible poids moléculaire peuvent être entièrement biodégradés, en revanche, les HAP de haut poids moléculaire, c'est-à-dire comportant plus de cycles, ne sont pas dégradés directement. Leur biodégradation nécessite l'intervention d'un cortège de microorganismes (**Chen et Aitken, 1999**) ainsi que la présence d'une source de carbone supplémentaire : cette dégradation se ferait par cométabolisme (**Heitkamp et al, 1988**).

III.2.1.4. La biodégradation anaérobie :

Les hydrocarbures sont maintenant reconnus comme une source potentielle de carbone et d'énergie permettant le développement de microorganismes en conditions anaérobie. La dégradation des hydrocarbures par les microorganismes dans des conditions aérobies est bien connue depuis plus d'un siècle, alors que l'utilisation de ces composés dans des conditions anoxiques (sédiments profonds et réservoirs de pétrole) n'a été étudiée que durant la dernière décennie. En effet, il est largement admis que pour les bactéries dégradant les hydrocarbures en aérobiose, la présence d'oxygène moléculaire est indispensable pour l'activation enzymatique initiale des hydrocarbures (**Britton, 1984; Gibson et Subramanian, 1984**). Cette activation se traduit par l'introduction d'un ou plusieurs groupements hydroxyles dans la molécule apolaire.

L'absence de l'oxygène moléculaire dans les environnements anoxiques implique une nouvelle stratégie d'activation enzymatique spécifique pour convertir les hydrocarbures apolaires en des composés contenant un groupement polaire (**Heider et al, 1999**) (hydroxyle, carbonyle ou carboxyle) dans les composés organiques est indispensable pour toute réaction d'oxydation ultérieure (**Spormann et Widdel, 2000; Widdel et Rabus, 2001**).

Plusieurs exemples sont décrits dans la littérature, tels que des hydrocarbures aliphatiques, des monoaromatiques comme le toluène (**Elshahed, et McInerney, 2001**), des alkylbenzènes la sous famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques comprenant le m-, o- et le p-xylène et les triméthylbenzènes (**Häner et al, 1997; Phelps et Young, 1999**), le benzène (**Burland et Edwards, 1999; Rooney-Varga et al, 1999**), Le naphthalène et le

phénanthrène (Zhang et Young, 1997; Meckenstock *et al*, 2000), le méthylnaphtalène et la tétraline (Annweiler *et al*, 2000; Annweiler *et al*, 2002), les alcanes ramifiés (Bregnard *et al*, 1997) et les mélanges d'hydrocarbures (Grishchenkov *et al*, 2000) peuvent être métabolisés dans des conditions anaérobies. Ces réactions peuvent avoir lieu sous des conditions réductrices du Fe (III), de dénitrification et de réduction des sulfates, par des bactéries photosynthétiques anoxygéniques ou dans des consortiums syntrophiques de bactéries réductrices de protons et méthanogènes (Van Hamme *et al*, 2003). Parmi les autres accepteurs terminaux d'électrons qui sont utilisés pendant le métabolisme des hydrocarbures anaérobies, citons les oxydes de manganèse (Langenhoff *et al*, 1997), les acides humiques du sol (Cervantes *et al*, 2001), et le fumarate dans un processus d'oxydation fermentative (Meckenstock, 1999). La dégradation anaérobie de toluène est la plus étudiée, cette dégradation est rapportée dans des conditions dé-nitrifiantes, ferro-réductrices, sulfato-réductrices et méthanogènes (Van Hamme *et al*, 2003).

III.2.2.5. La biodégradation de toluène :

Lorsqu'il est dégradé par les microorganismes, il se convertit alors en dioxyde de carbone et en eau. En dégradant le toluène, la croissance des microorganismes est plus rapide que lors de la dégradation d'autres hydrocarbures aromatiques (Widdel et Rabus, 2001).

- **La biodégradation aérobie de toluène :**

Une multitude de voies cataboliques pour la dégradation des composés aromatiques sont élucidées; Par exemple, le toluène est dégradé par les bactéries le long de cinq voies différentes. Sur la voie codée par le plasmide TOL, le toluène est successivement dégradé en alcool benzylique, benzaldéhyde et benzoate, qui est ensuite transformé en les intermédiaires du cycle TCA (tricarboxylique acid) en CO₂ et H₂O (Atlas et Bartha 1998; Van Hamme *et al*, 2003). La première étape de dégradation du toluène avec *P. putida* F1 est l'introduction de deux groupes hydroxyle en toluène, formant *cis*-toluène dihydrodiol. Cet intermédiaire est ensuite converti en 3-méthylcatechol. Avec *Pseudomonas mendocina* KR1, le toluène est converti en toluène-4-monooxygénase en *p*-crésol, suivi d'une formation de *p*-hydroxybenzoate par oxydation de la chaîne latérale méthylique. Avec *Pseudomonas pickettii* PKO1, le toluène est oxydé par la toluène-3-monooxygénase en *m*-crésol, qui est ensuite oxydé en 3-méthylcatechol par une autre monooxygénase. Avec *Bukholderia cepacia* G4, le toluène est métabolisé en *o*-crésol par la toluène-2-monooxygénase, cet intermédiaire étant transformé

par une autre monooxygénase en 3-méthylcatechol (figure 12) (Johnson et Olsen, 1997).

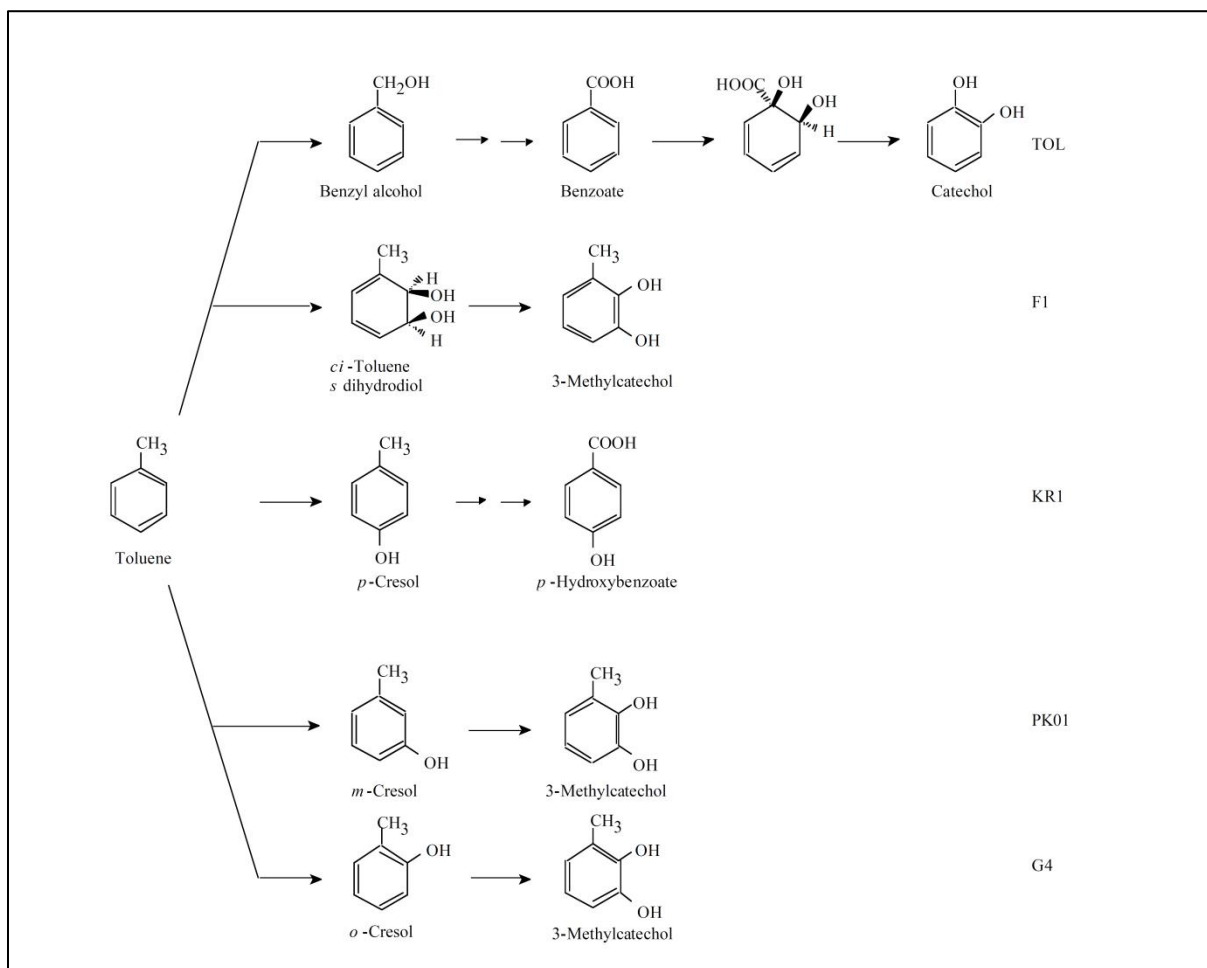


Figure 12 : Les différentes voies de dégradation aérobie du par les bactéries : *P. putida* (TOL), *P. putida* (F1), *P. mendocina* (KR1), *P. pickettii* (PKO1), et *B. cepacia* (G4) (Johnson et Olsen, 1997).

- **La biodégradation anaérobie de toluène :**

La biodégradation anaérobie du toluène est la plus étudiée. Le toluène peut être biodégradé avec nitrate, Mn (IV), Fe (III), sulfate ou CO₂ comme accepteurs terminaux d'électrons (Langenhoff *et al*, 1997; Chakraborty et Coates, 2004). Plus récemment, il a été démontré que la dégradation anaérobie du toluène peut également être couplée à la réduction des substances humiques (Cervantes *et al*, 2001), des oxyanions chlorés comme le perchlorate ou le chlorate (Chakraborty *et al*, 2005) ou l'arséniate (Liu *et al*, 2004). De plus, le toluène peut être utilisé comme source de carbone par des phototrophes anoxygéniques (Zengler *et al*, 1999). La dégradation anaérobie du toluène a été observée dans des études sur le terrain, des études de colonnes, des cultures d'enrichissement et des microcosmes et dans

des cultures pures (Phelps et Young, 2001). De nombreuses voies de dégradation anaérobie du toluène sont récemment proposées. Toutes ces voies transforment le substrat initial en intermédiaire commun, la benzoyl-coenzyme A (CoA). Avec *Thauera* sp. T1, l'oxydation du toluène est initiée par la formation de benzylsuccinate à partir de toluène et de fumarate. Les gènes des enzymes de la voie et des protéines régulatrices sont caractérisés. Après la formation du benzoyl-CoA, ce produit intermédiaire est réduit par la benzoyl-CoA réductase pour donner le cyclohex-1,5-diène-1-carboxyl-CoA. Les étapes suivantes, cependant, sont controversées. Avec *Rhodospseudomonas palustris*, l'intermédiaire diénique est réduit en cyclohex-1-ène-1-carboxyl-CoA, tandis qu'avec *Thauera aromatica*, il est hydraté en 6-hydroxycyclohex-1-ène-1-carboxyl-CoA (figure 13) (Egland et al, 1997; Breese et al, 1998).

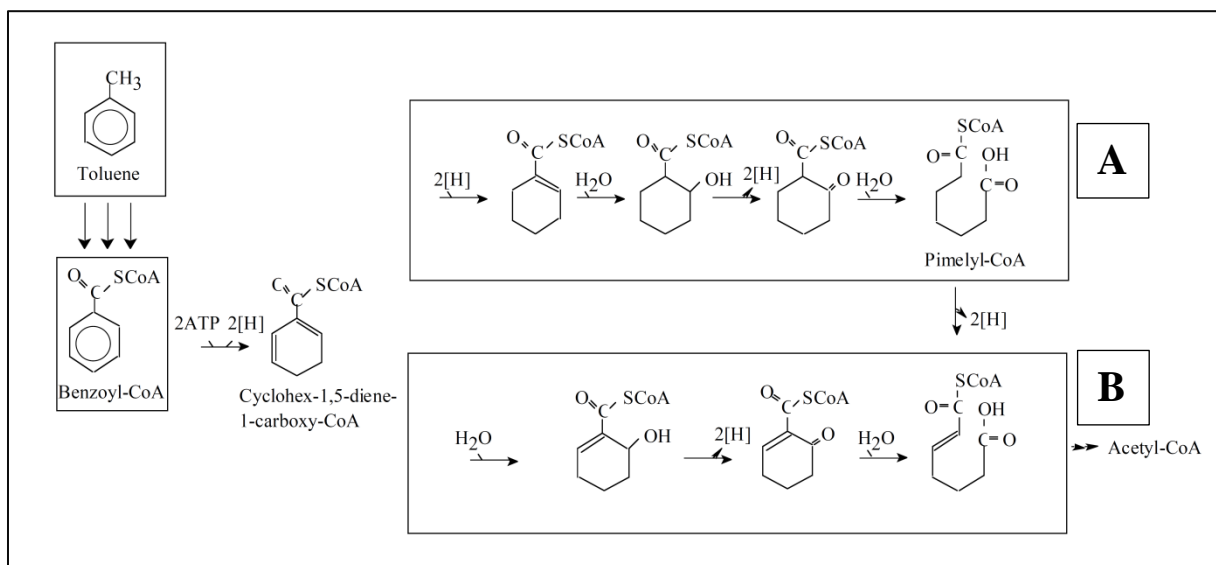


Figure 13 : La dégradation anaérobie de Toluène. Après la conversion du benzoyl-CoA en cyclohex-1,5-diène-1-carboxy-CoA, ce produit est traité différemment avec deux bactéries différentes, *R. palustris* (A) et *Thauera aromatica* (B) (Egland et al, 1997; Breese et al, 1998).

Partie 02 :

**PROCÉDURES
ÉXPÉRIMENTALES**

Chapitre I :
Matériel et méthodes

I. Matériel et méthodes :

Cette étude a été réalisée au laboratoire de Microbiologie et Biologie Végétale de l'Université de Mostaganem, elle a pour but d'isoler et de caractériser des micro-organismes impliqués dans la biodégradation des hydrocarbures (pétrole, diesel et isomérat) à partir d'un sol pollué et d'augmenter ce pouvoir de biodégradation par des améliorations génétiques.

I.1. Site de prélèvement d'échantillon :

L'échantillon du sol contaminé par les hydrocarbures pétroliers a été prélevé depuis la raffinerie d'Arzew (Sonatrach, Compagnie Algérienne de Pétrole) (figure 14). Le pétrole brut, le diesel et l'isomérat ont été utilisés séparément comme seule source de carbone en milieu minéral (BH) pour la croissance microbienne. L'isomérat est le composé obtenu après l'opération d'isomérisation qui permet la transformation d'une paraffine linéaire en paraffine isomérée dans le but d'augmenter son indice d'octane, et qui entre dans la composition des essences (Hsu et Robinson, 2006).

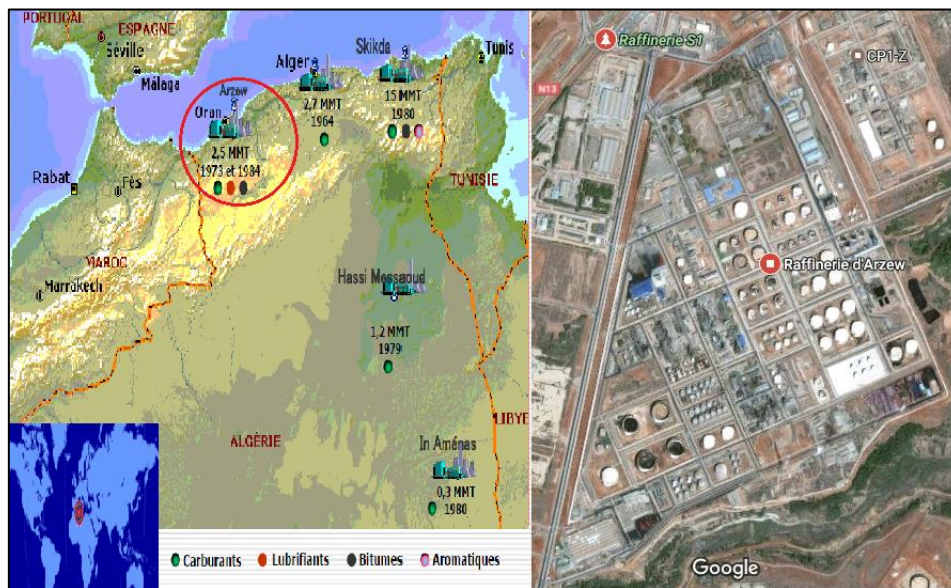


Figure 14 : Carte de l'Algérie, région d'échantillonnage du sol contaminé par les hydrocarbures pétroliers - raffinerie d'Arzew-Oran (Smail et Khalef, 2007).

I.2. Evaluation des hydrocarbures totaux dans le sol pollué :

I.2.1. Le prétraitement de l'échantillon du sol :

L'échantillon du sol prélevé sur le site pollué est préalablement séché pendant 48 heures, à température ambiante, il est ensuite broyé manuellement à l'aide d'un mortier, puis tamisé à 2 mm (qui permet d'éliminer les matériaux grossiers (pierres, débris végétaux, ...)) (Crone, 2001).

I.2.2. L'extraction et l'évaluation de pourcentage des hydrocarbures totaux :

L'appareillage d'extraction par soxhlet est constitué d'un ballon de 250 ml en verre, surmonté d'une cartouche de soxhlet en céramique de 100 ml et d'un réfrigérant. L'extraction consiste à utiliser une quantité de 10 g du sol pour 100 ml de dichlorométhane. Le thermostat du chauffe-ballon est réglé pour obtenir des cycles d'extraction de 15 minutes. La durée globale de l'extraction est fixée à 8 heures à partir du premier cycle. Évaporer le ballon sous vide jusqu'à l'élimination du solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif dont la température du bain ne dépasse pas 26 °C (Crone, 2001; Márquez-Rocha, 2001; MA. 400 – HAP 1.1, Rév, 2016).

Après l'évaporation complète, le résidu hydrocarboné obtenu a été pesé. Le pourcentage des hydrocarbures totaux a été déterminé à partir de la formule suivante (Márquez-Rocha, 2001):

$$\% \text{ hydrocarbures totaux (sol pollué)} = \frac{\text{le poids des hydrocarbures totaux} \times 100\%}{\text{le poids du sol (10 g)}}$$

I.3. Enrichissement et isolement des micro-organismes dégradants les hydrocarbures :

Les microorganismes ont été isolés sur le milieu minéral de Bushnell-Haas (BH) (Atlas, 2005), contenant par litre: 1.0 g KH_2PO_4 , 1.0 g K_2HPO_4 , 1.0 g NH_4NO_3 , 0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g FeCl_3 et 0.02 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (pH 7). Pour l'enrichissement, 10 g du sol pollué sont ajoutés à 100 ml de BH additionné d'hydrocarbure (pétrole ou diesel) à 2 % de chaque source de carbone séparément (Deziel *et al*, 1996).

Les cultures ont été maintenues en agitation (160 rpm) pendant une semaine à 30 °C et à l'obscurité, 2 ml de cette culture ont été utilisées pour inoculer un nouveau milieu de BH contenant la même concentration d'hydrocarbure (2 %) qu'au départ et en gardant les mêmes conditions expérimentales. Cette opération a été répétée quatre fois. Après les quatre

transferts consécutifs à de courts intervalles (1 semaine). Les microorganismes capables d'utiliser les hydrocarbures ont été isolées par l'étalement de 100 µl de la dernière culture sur le milieu BH agar additionné par l'hydrocarbure (pétrole ou diesel) comme source de carbone et d'énergie et incubées à 30 °C (Daane *et al*, 2001; Singh et Lin, 2008).

I.4. La purification et la conservation des souches isolées :

Les colonies différant morphologiquement ont été isolés et purifiés par la méthode de repiquage en stries et conservées à 4 °C sur GN incliné, pour une longue durée les isolats sont conservés dans le glycérol (30 %) à -50 °C.

I.5. L'identification des isolats dégradants les hydrocarbures :

L'étape de purification a permis de sélectionner 5 isolats, l'identification est réalisée en se basant sur les études morphologique, physiologique, biochimique et moléculaire.

I.5.1. Etude morphologique :

I.5.2.1. Aspect macroscopique :

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification. Les éléments d'identification macroscopique sont: La forme, la taille et le diamètre des colonies, la chromogénèse, l'élévation, la surface et l'opacité: opaque, translucide ou transparente.

I.5.2.2. Aspect microscopique :

➤ Etat frais:

Ce test permet de déterminer la forme, l'arrangement et la mobilité des bactéries. Il consiste en l'observation d'une goutte de suspension bactérienne, préparée avec de l'eau physiologique et placée entre lame et lamelle. L'observation se fait au microscope photonique.

➤ Coloration de Gram :

Les bactéries peuvent être groupées en 2 catégories selon la méthode de coloration de Gram. Cette technique a été mise au point en 1884 par Hans Christian Gram. Après coloration, les bactéries Gram+ deviennent violettes alors que les bactéries Gram- apparaissent en rose. La répartition des bactéries en Gram+ ou Gram- est un critère systématique important pour la classification des bactéries.

Le violet de gentiane se fixe sur des composants cytoplasmiques et après ce temps de coloration, toutes les bactéries sont violettes. Chez les bactéries à Gram négatif, la paroi, riche en lipides, laisse passer l'alcool qui décolore le cytoplasme alors que, chez les bactéries à Gram positif, la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool et le cytoplasme demeure coloré en violet.

➤ **Recherche de spores:**

- **Test de thermo-résistance :**

Diverses espèces bactériennes ont la faculté de former des cellules spécialisées montrant une résistance accrue à des facteurs d'environnement défavorables, notamment à une température élevée, à l'absence d'éléments nutritifs ou à la dessiccation. On prélève un échantillon de culture pure (environ 1 ml) et le fait chauffer pendant 10 minutes à 80 °C. On dépose ensuite un peu de cette préparation sur un milieu nutritif que l'on place à incuber à 30 °C pendant 24 h. Si on observe un développement de la culture, la souche est sporogène.

- **Coloration des spores par le procédé de Schaeffer-Fulton :**

Les spores ne sont pas bien colorées par la plupart des colorants, cependant une fois colorées, elles résistent à la décoloration. Cette propriété est à la base de la coloration des spores. Dans le procédé de Schaeffer-Fulton, les endospores sont d'abord colorées par chauffage des bactéries avec du vert de malachite, un colorant très puissant qui pénètre dans les endospores. Ensuite les cellules sont lavées à l'eau et contre-colorées à la fushine. Grâce à cette technique, la spore apparaît verte dans une cellule rose ou rouge (**Prescott *et al*, 2010**). Cette coloration permet la détermination de la position de l'endospore au sein du corps bactérien.

➤ **Test de chlamydosporulation :**

L'aptitude à la chlamydosporulation est observée à partir d'une cultureensemencée sur un milieu minéral composé de : glucose, $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/l), KH_2PO_4 (1 g/l) et agar (15 g/l). Quand la levure à examiner estensemencée, une lamelle a été déposée sur la gélose pour être incubé. L'observation microscopique se fait après une incubation pendant 48 h à 29 °C (grossissement x40) (**Braga de Souza *et al*, 2010**).

I.5.2. Etude biochimique :

Cette approche nous oriente vers le métabolisme suivit par ces microorganismes et les enzymes qu'ils possèdent. Ces tests ont été réalisés en utilisant quelques tests classiques et les galeries biochimiques ; Api 20E, Api 20NE pour les isolats bactériens et Api *Candida* pour les souches fongiques. Les épreuves biochimiques permettent en général de distinguer les espèces, même étroitement apparentées entre elles.

I.5.2.1.Étude du type respiratoire :

La détermination du type respiratoire s'effectue sur la gélose viande foie semi-solide. Le milieu est régénéré au bain-marie, refroidi à une température de 45 °C, coulé dans des tubes à essai stériles. Les tubes sont ensuite stérilisés et inoculés à l'aide d'une pipette pasteur et incubés à une température 30 °C pendant 24 heures (figure 15) (Prescott, 2002).

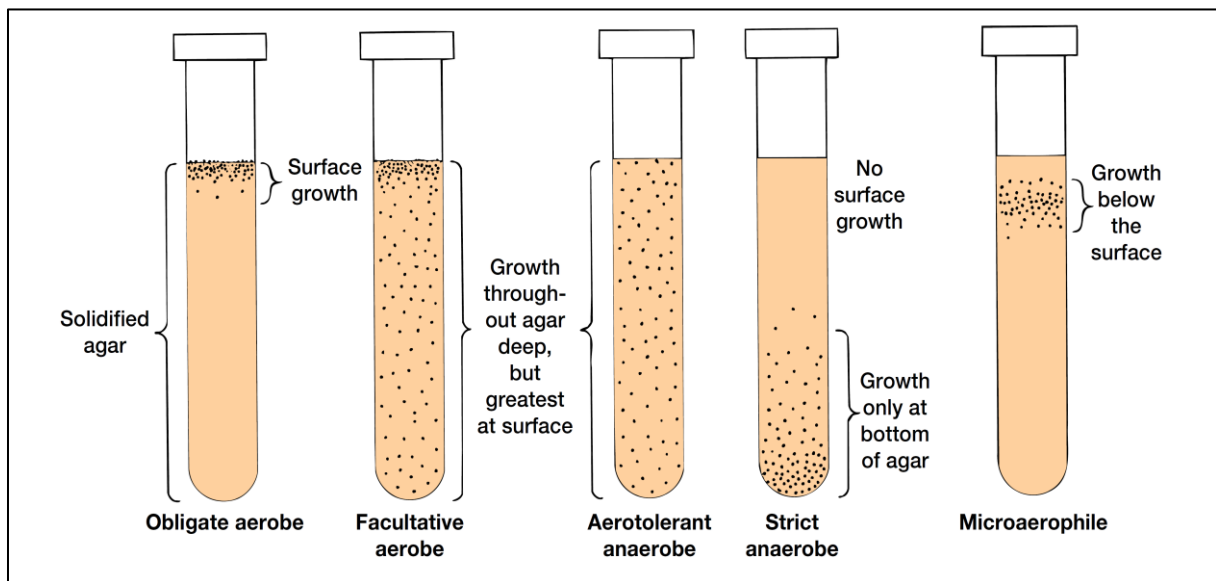


Figure 15 : Détermination du type respiratoire (Prescott, 2002).

I.5.2.2.Recherche de la catalase :

La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante :



Une réaction positive de la présence du catalase se manifeste par la production des bulles d'oxygène, après le mélange d'une culture bactérienne avec quelques gouttes d'eau oxygénée à 10 volumes.

I.5.2.3. Recherche d'une Cytochrome Oxydase :

Ce test met en évidence l'existence de la Cytochrome Oxydase, enzyme caractéristique d'un métabolisme respiratoire aérobie, spécifique de la réduction de l'oxygène moléculaire. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthyl-paraphénylène diamine qui forme un complexe violet au contact de cette enzyme. Ce réactif peut se trouver sous forme d'un disque pré-imprégné par ce dernier (Denis *et al*, 2011).

- Technique :

Ecraser avec une pipette pasteur une colonie à étudier sur le disque d'oxydase. La présence d'une Cytochrome Oxydase se traduit, en 20 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration violette.

I.5.2.4. Recherche du nitrate réductase:

En absence d'oxygène, certaines bactéries peuvent obtenir leur énergie par respiration anaérobie. Cette respiration anaérobie est liée à l'activité d'enzymes localisées dans la membrane plasmique bactérienne.

- Principe :

Au cours de ce test, on recherche la production d'une enzyme : la nitrate-réductase par la bactérie. Cette étude consiste à mettre en évidence le métabolite nitrite ou la disparition des nitrates initiaux. La réduction des nitrates par le nitrate réductase se traduit par la production de nitrites. Parfois, certaines bactéries peuvent poursuivre cette réduction, jusqu'à une dénitrification.



Ce test va consister à mettre en évidence la présence ou non des nitrites dans le milieu de culture. S'ils sont présents, ils donnent une réaction colorée rose en présence d'acide sulfanilique et de naphthylamine. Ces réactifs portent le nom de réactifs de GRIESS. En

l'absence de nitrites, on cherche la disparition des nitrates par addition de zinc : en effet le zinc réduit les nitrates en nitrites. Deux cas sont possibles :

⇒ Coloration rouge : les nitrates encore présents dans le milieu ont été réduits en nitrites par le zinc et ont réagi avec les réactifs, la nitrate réductase est donc négative.

⇒ Pas de coloration rouge : au contraire les nitrates du milieu ont été réduits par les bactéries et l'addition de zinc ne peut produire de nitrites. La nitrate réductase est donc positive jusqu'au stade azote.

I.5.2.5.La croissance sur les milieux King A et King B :

- Principe:

Les milieux King A et King B permettent de distinguer les espèces de *Pseudomonas* par la mise en évidence de leurs pigments spécifiques. La production des pigments est favorisée par la composition du milieu (**Marchal et Bourdon, 1982**).

Ensemencer une boîte de milieu King A et une boîte de milieu King B, en réalisant des stries puis les Incuber à 30 °C pendant 24 h. Sur le milieu King A, le pigment pyocyanine produit permet l'identification de *Pseudomonas aeruginosa*. Les cultures typiques sont colorées en bleu-vert. Alors que sur le milieu King B la production du pigment pyoverdine est favorisé, ce pigment jaune verdâtre fluorescent produit par *Pseudomonas aeruginosa* et d'autres *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*). La pyoverdine se manifeste par une coloration vert fluorescent du milieu de culture.

I.5.2.6.La croissance sur les milieux Sabouraud + chloramphénicol et PDA :

Les caractéristiques culturales sont observées, en examinant les cultures en milieu gélosé sabouraud + chloramphénicol et PDA, le chloramphénicol permet d'inhiber la plupart des bactéries telles que les Entérobactéries, les *Pseudomonas*, et les staphylocoques. L'ensemencement est fait en surface, par des stries (**Hammer et al, 1998**). Les boîtes sont ensuite incubées à 30 °C, pendant 24 à 72 h (**Harrigan et Mc Cance, 1976**).

I.5.2.7.L'utilisation de l'amidon :

Le but de ce test est de rechercher l'hydrolyse de l'amidon par l'amylase, afin de voir si la bactérie est capable ou non de dégrader l'amidon. Une colonie isolée, âgée de 24 h est

ensemencée par strie sur la surface du milieu de gélose à l'amidon, contenant la composition suivante g/l : 10 g d'amidon, 10 g de bouillon nutritif, 15 g d'agar-agar et l'eau distillée. Les boîtes sont incubées à 30 °C pendant 3 jours (**Jahir et Ruchika, 2011**). Après incubation les boîtes de pétri sont inondées avec une solution de lugol et l'activité amylolytique est évaluée par les zones d'hydrolyse formées autour de la colonie ensemencée par strie (**Wisdomkofi et al, 2006**).

I.5.2.8.L'hémolyse du sang :

L'activité hémolytique est mise en évidence par étalement sur gélose au sang et se manifeste par une zone de lyse caractéristique aux abords de la bactérie (**Guinebretiere et Sanchis, 2003**). La gélose au sang est une gélose rouge vif contenant des globules rouges, peu sélective, elle permet cependant d'apprécier l'hémolyse qu'effectuent certaines bactéries.

Les bactéries capables de détruire complètement les globules rouges (hémolyse bêta) forment des colonies entourées d'une zone claire facilement visible sur la gélose rouge; si l'hémolyse est incomplète (hémolyse alpha), la zone d'hémolyse est moins claire et verdâtre.

I.5.2.9.Test d'hydrolyse de la lécithine :

La lécithinase est une enzyme recherchée sur une gélose au jaune d'œuf coulée en boîte pétri ; elle produit une opacification par rupture de l'émulsion de jaune d'œuf. Le jaune d'œuf, substrat complexe est composé de lécithine, de triglycérides et d'une lipoprotéine. Il permet donc de rechercher deux enzymes : la lécithinase et les lipoprotéinases. Les observations effectuées autour des colonies sont rapportées dans le tableau 2 (**Delarras, 2014**).

Tableau 2 : Aspects des colonies sur la gélose au jaune d'œuf et enzymes détectées (**Delarras, 2014**).

Aspect des colonies sur boîtes de pétri	Enzymes détectées
Halo claire autour de la colonie apparaissant en premier	Lipoprotéinase +
Halo opaque blanc jaunâtre, bord net, sous la colonie ou en limite	Lécithénase +
Pas de halo	Lécithénase -

I.5.2.10. Test d'hydrolyse de la caséine :

La caséine est une protéine du lait, la recherche de l'activité caséolytique est notamment utile dans l'identification des *Bacillus*. Cette recherche est réalisée sur une gélose au lait. Les zones d'éclaircissement de milieu autour des colonies traduisent un résultat caséinolyse (+) ; l'absence de telles zones exprime un test caséinolyse (-) (Delarras, 2014).

I.5.2.11. Mannitol-Mobilité :

Il s'agit d'un milieu semi-solide contenant entre autres du mannitol, et du rouge de phénol comme indicateur de pH. Lorsque l'indicateur coloré passe du rouge au jaune, ce qui correspond à l'acidification du milieu, le mannitol est utilisé. Le caractère mobile est défini dans ce milieu par un trouble envahissant toute la largeur de la gélose de part et d'autre de la piqûre centrale, alors qu'une bactérie immobile ne se développe que le long de la piqûre centrale (Denis *et al*, 2011).

I.5.2.12. Galeries d'identification (Système API) :

➤ La galerie API 20E :

La galerie API 20E (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) composée de 20 microtubes contenant des milieux et substrats sous forme déshydratée est utilisée selon les recommandations décrite par le fabricant (figure 16). Les microtubes de la galerie API 20E sont inoculés avec une suspension bactérienne, incubées à une température de 30 °C à un intervalle temps de 48 h. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Emanuel et Lorrence, 2009). L'identification se fait par un programme d'identification microbienne.



Figure 16 : La galerie API 20E avant incubation.

➤ La galerie API 20NE :

La galerie API 20 NE (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) (figure 17) comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec

une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture des résultats et l'identification se fait par le logiciel de apiweb.



Figure 17 : La galerie API 20NE avant incubation

➤ **La galerie API *Candida* :**

API *Candida* (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) est un système standardisé pour l'identification en 18-24 heures des levures, La galerie API *Candida* comporte 10 tubes contenant des substrats déshydratés, pour réaliser 12 tests d'identification (acidification de sucres ou réactions enzymatiques) (figure 18). Les réactions produites durant l'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés. La lecture des réactions se fait à l'aide du tableau de Lecture et l'identification est obtenue en consultant un logiciel d'identification apiweb.



Figure 18 : La galerie API *Candida* avant incubation

I.5.2.13. Etude de la sensibilité des *Pseudomonas* aux antibiotiques :

La sensibilité des souches aux antibiotiques a été étudiée par la méthode conventionnelle de diffusion des disques en milieu gélosé de Mueller-Hinton (MH) (**Matuschek et al, 2014**) et les critères de lecture et d'interprétation sont ceux du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM) (www.sfm.asso.fr). 15 antibiotiques ont été testés : ciprofloxacine (CIP, 5 µg), céfépime (FEP, 30 µg/disc), imipénème (IMP, 10 µg/disc), pénicilline G (P, 10 µg), ticarcilline-clavulanate (TIM, 75/10

µg/disc), pipéracilline (PRL, 100 µg/disc), tobramycine (TOB, 10 µg/disc), nétilmicine (NET, 10 µg), amikacine (AK, 30 µg), colistine (COL, 10 µg), ceftazidime (CAZ, 10 µg), ticarcilline (TI, 75 µg/disc), fosfomycine (FF, 50 µg/disc), lévofloxacine (LE, 5 µg/disc) et gentamycine (CN, 15 µg).

- Technique :

- A partir d'une culture pure de 18-24 heures, réaliser une suspension de 0.5 McFarland ($\sim 10^8$ UFC/mL et l'absorbance à 625 nm doit être comprise entre 0,08 to 0,13) dans 5 ml d'eau physiologique (0,9 % NaCl).
- Réaliser une dilution de 1/100e ($\sim 10^6$ UFC/mL) dans l'eau physiologique à 0.9 %, puis homogénéiser la suspension bactérienne au vortex.
- Ensemencer cette dilution par écouvillonnage sur des boites de pétri contenant 20 ml de gélose Mueller-Hinton.
- Appliquer les disques d'antibiotiques à l'aide d'une pince stérile.
- Laisser les boites 20 mn à température ambiante pour permettre une pré-diffusion de l'antibiotique, puis les incuber pendant 24 h à 37 °C.

La lecture se fait en mesurant avec précision les différents diamètres des zones d'inhibition. Comparer ces résultats aux valeurs critiques figurant dans le CASFM et classer les bactéries dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire ou Résistante.

I.5.3. L'étude moléculaire :

I.5.3.1. Extraction de l'ADN génomique :

Dans le but d'extraire l'ADN, des pré-cultures ont été préparées par l'ensemencement des isolats dans un bouillon nutritif, ensuite incubées à une température de 30 °C pendant 24 heures. Une suspension bactérienne d'un volume de 2 ml est prélevée dans des eppendorfs stérile. La biomasse bactérienne est récupérée par centrifugation à une vitesse de 12000 rpm pendant 10 min. La biomasse est lavée dans un volume de 467 µl de la solution tampon TE (annexe 02) puis on ajoute 3 µl de 20 mg/ml de protéinase K et 30 µl de SDS à 10 %. Le mélange est incubé toute la nuit à 37 °C. Un volume égal de phénol/chloroforme (50:50) est ajouté au mélange. Les protéines dénaturées forment un précipité à l'interface phénol-eau, tandis que l'ADN reste en solution dans la phase aqueuse qui est récupérée par centrifugation

à 12000 rpm pendant 10 min. L'ADN est ensuite précipité par addition d'acétate de sodium et d'isopropanol dans la phase aqueuse, collecté par centrifugation à 13000 rpm pendant 10 min et dissout dans du tampon TE. Les solutions d'ADN sont stockés à -20°C (Maloy, 1990).

I.5.3.2. Vérification de la qualité d'ADN par le gel d'agarose :

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique de biologie moléculaire utilisée soit à des fins analytiques pour séparer et identifier des fragments d'ADN pour déterminer leur taille et estimer leur quantité, soit à des fins préparatifs, pour purifier un fragment d'ADN de taille connu (Loncle *et al*, 1993).

Un gel d'agarose est préparé en mélangeant 30 ml de tampon TBE (annexe 03) avec 0,3 g d'agarose. Le mélange est porté à ébullition dans une micro-onde jusqu'à ce que l'agarose soit complètement dissous et un liquide transparent soit obtenu. Après préparation de la cellule d'électrophorèse et mise en place du peigne, le gel est versé lentement sur une épaisseur de 3 à 5 mm, en s'assurant qu'il entoure doucement les dents du peigne. Après solidification de ce dernier, le peigne est retiré et le gel est immergé avec le tampon TBE, utilisé comme tampon de migration.

Les puits sont chargés par le marqueur (FERMENTAS, Lambda DNA/HindIII Marker) (annexe 04) et les échantillons d'ADN. Chaque échantillon (8 µl) est additionné de 2µl de tampon de charge (BIO LABS, DNA Gel Loading Dye (6X)). La manipulation est réalisée dans un appareil d'électrophorèse horizontale (BIO RAD, Mini-Sub Cell GT), à 100 V, pendant 30 minutes. Les gels ont été colorés par le bromure d'éthidium (BET) pendant 15 min. Le but ultime de cette étude était d'analyser la qualité de l'ADN extrait avant d'entamer des procédures d'étude plus approfondies.

I.5.3.3. Amplification de la région ADN_r 16S :

La PCR est une méthode permettant d'obtenir rapidement une quantité importante d'un segment précis d'ADN génomique grâce à l'utilisation de deux amorces de polarités opposées encadrant le fragment à amplifier, l'amplification de l'ADN étant exponentielle (Saiki *et al*, 1985; Mullis *et al*, 1986).

En vue de l'identification des bactéries biodégradantes des hydrocarbures, nous avons utilisé un couple d'amorces universelles dégénérées :

27F (forward): (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3')

1492R (reverse): (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3')

La réaction de PCR est préparée dans un volume réactionnel de 25 µl contenant 5 µl d'ADN génomique, un couple d'amorces utilisé chacune à un volume de 1 µl, 0,125 µl de Taq polymérase, 2,5 µl du tampon PCR, 2 µl de MgCl₂, 0,5 µl de dNTP. Les amplifications PCR sont effectuées dans un thermocycleur (Arktik™ Thermal Cycler - Thermo Fisher Scientific) programmé comme suit: une étape initiale de dénaturation de l'ADN de 5 min à 94 °C, dénaturation de l'ADN de 1 min à 94 °C, hybridation des amorces de 1min à 55 °C puis une élongation de 2 min à 72 °C avec 30 cycles. Enfin, une dernière étape de 10 min à 72 °C termine la réaction. Les produits PCR et le marqueur (100 bp DNA Ladder BIOLABS, England) (annexe 05) sont analysés par l'électrophorèse sur gel d'agarose. Chaque échantillon (8 µl) est additionné de 1,6 µl de tampon de charge (BIO LABS, DNA Gel Loading Dye (6X)). Après migration, les gels sont colorés au bromure d'éthidium (BET) et les acides nucléiques sont visualisés par fluorescence aux rayons UV.

I.5.3.1. Séquençage de l'ADN :

Le séquençage des produits de PCR est réalisé au laboratoire de SENTEGEN (<http://en.sentegen.com/>) (Ankara, Turquie), le laboratoire utilise l'analyseur génétique Illumina MiSeq.

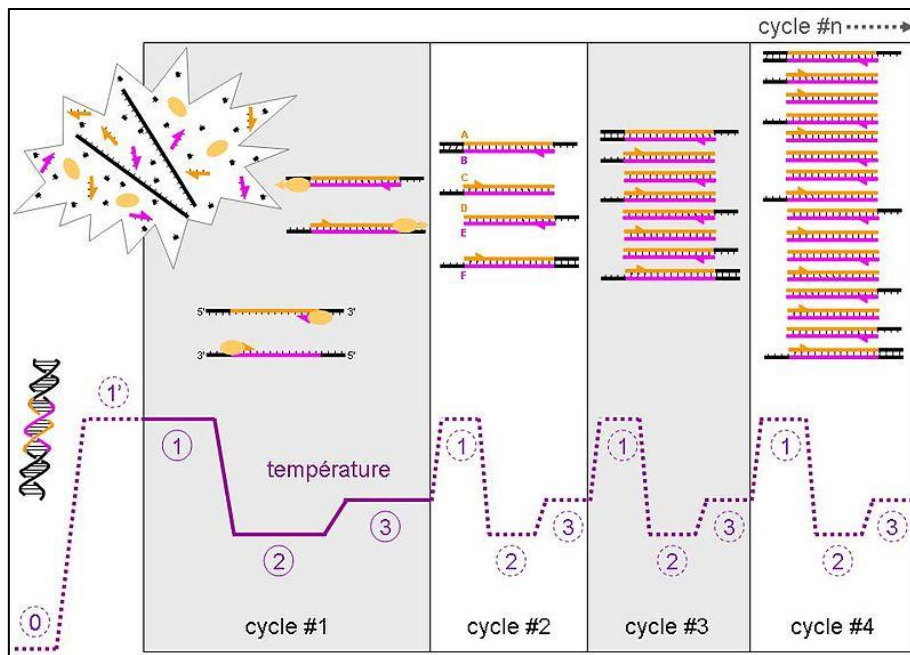


Figure 19 : Principe de PCR. Chaque cycle se décompose en trois temps auxquels correspondent trois températures (Denis *et al*, 2011).

I.5.3.2. Analyse phylogénétique des séquences :

Les séquences ont été comparées avec celles présentes dans la banque de données GenBank database du National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) grâce à l'outil d'alignement Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Cette étape permet l'identification de la séquence par homologie avec des séquences connues.

Une analyse par le logiciel Phylogeny.fr (www.phylogeny.fr/) a permis de générer une matrice de distance élaborée par comparaison des séquences d'ADN. Cette matrice est ensuite représentée sous forme d'un arbre phylogénétique. Par ailleurs, les séquences obtenues dans cette étude ont été déposées dans les banques de données DDBJ/EMBL/GenBank.

I.6. Biodégradation des hydrocarbures :

I.6.1. Le suivi de la biodégradation des hydrocarbures pétroliers:

La capacité de la dégradation de pétrole et de diesel est effectuée comme décrit par (Koolivand *et al*, 2013) avec des modifications. On prépare des Erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml de milieu BH liquide avec 2 ml (2 %) de pétrole ou de diesel. Les isolats ont

été incubés pendant une nuit dans 5 ml de bouillon nutritif à 30 °C. Après incubation, les cultures sont centrifugées à 6000 rpm pendant 15 minutes et les cellules sont recueillies, ensuite lavées trois fois avec du milieu liquide BH et remises en suspension dans un petit volume (5 ml) du même milieu (Coral et Karagöz, 2005) jusqu'à ce que la DO₆₀₀ soit équivalent à 0,91 (Mueller *et al*, 1990). 1 ml d'inoculum (0,91 OD₆₀₀) a été transféré dans les erlenmeyers, des flacons non inoculés ont été préparés comme témoins (Boonchan *et al*, 2000). Les cultures ont été incubées dans l'obscurité à 30 °C pendant 12 jours avec agitation (160 rpm) (Mueller *et al*, 1990). Les profils de croissance des isolats et de la dégradation des hydrocarbures ont été obtenus en mesurant :

I.6.1.1. La densité optique :

La densité optique des cultures est mesurée à 600 nm à des intervalles réguliers de 2 jours (Heitkamp *et al*, 1988).

I.6.1.2. La concentration microbienne (UFC/ml) :

Le dénombrement des colonies est effectué par la méthode des spots, à des intervalles réguliers de 2 jours, les dilutions (un volume précis de 10 µl) sont déposées à la surface de la gélose parfaitement sèche (Balba *et al*, 1998).

I.6.1.3. La Détermination de la dégradation des hydrocarbures par la concentration des hydrocarbures totaux (TPH, Total Petroleum Hydrocarbons) :

Les moyens clairs pour évaluer la dégradation des hydrocarbures par les microorganismes sont une mesure directe de la dissipation des hydrocarbures par la mesure du résidu de la biodégradation. Cependant, le succès d'un projet de bioremédiation peut souvent être estimé en mesurant la biodégradabilité des contaminants (Chioma *et al*, 2011). Tous les 2 jours, des échantillons ont été prélevés à partir des cultures (Viñas *et al*, 2005; Koolivand *et al*, 2013), la TPH est mesurée à l'aide d'un appareil spécifique de dosage des hydrocarbures totaux (spectroscopie infrarouge, HORIBA, OCMA -310) (Méthode de NF M07-203).

L'extraction des hydrocarbures peut se faire par polychloro-tri-fluoro-éthylène (Solvant HORIBA S-316).

I.6.1.4. Détermination de la demande chimique en oxygène (DCO) : (norme AFNOR T90-101)

Le principe est basé sur une ébullition à reflux dans les conditions définies de la présente norme d'une prise d'essai de l'échantillon, en milieu acide en présence d'une quantité connue de dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$), de sulfate d'argent (Ag_2SO_4) jouant le rôle d'un catalyseur d'oxydation et de sulfates de mercure, il permet de complexer les ions chlorures ; la détermination de l'excès de la dichromate avec une solution titrée de sulfates de fer et d'ammonium.

Nous introduisons dans l'appareil à reflux 10 ml de l'échantillon à l'aide d'une pipette jaugée puis 5 ml de $K_2Cr_2O_7$ à 0,04 mol/l, nous ajoutons lentement et avec précaution 15 ml d' Ag_2SO_4 en agitons soigneusement le ballon à fond plat d'un mouvement circulaire. Nous portons à ébullition à reflux pendant 2 h, puis nous laissons refroidir en complétant le contenu à environ 75 ml avec l'eau distillé, nous titrons l'excès de bichromate de potassium avec la solution de sulfate de fer et d'ammonium.

I.6.1.5. Détermination de la demande biochimique en oxygène (DBO5) (norme F T90-103)

La demande biochimique en oxygène est la quantité d'oxygène exprimée en mg/l qui est consommé dans les conditions de l'essai par incubation à 20 °C pendant 5 jours par la technique OXITOP pour assurer leur dégradation par voie biologique.

Le système de mesure est basé sur une différence de pression au moyen d'un indicateur digital. Nous prenons 164 ml d'échantillon avec la fiole de mesure que nous versions dans le flacon, nous ajoutons 3 gouttes de la solution de nitrification (solution d'inhibiteur de nitrification $C_4H_8N_2S$ à 5 g/l) et le barreau aimanté, nous mettons la capsule sur le flacon contenant 2 pastilles de soude et nous fermons le flacon avec le bouchon OXITOP. Nous mettons les échantillons dans l'incubateur avec agitation à 20 °C pendant 5 jours. Après incubation nous retirons les flacons de l'incubateur et nous lisons la mesure pour la multiplier par le facteur 10.

I.6.1.6. Test d'index d'émulsification (E₂₄) :

L'activité émulsionnante est déterminée en utilisant la méthode décrite par **Cooper et Goldenberg (1987)**. Elle permet de vérifier la capacité des souches à émulsionner une phase hydrophobe (pétrole ou diesel) dans une phase hydrophile (le milieu de culture).

Le test consiste à mélanger 3 ml d'une culture microbienne avec 3 ml d'hydrocarbures (pétrole ou diesel) dans des tubes stériles. Les tubes sont agités au vortex pendant 3 min. Puis après homogénéisation des deux phases, on procède au calcul de l'index d'émulsion, en les comparant au témoin qui est constitué de milieu de culture aseptique et d'hydrocarbures et soumis aux mêmes conditions (figure 20). Les tubes sont laissés au repos pendant 24 h à température ambiante. Puis le calcul d'E₂₄ est refait une deuxième fois pour vérifier la stabilité de l'émulsion.

➤ Calcul de l'index de l'émulsion E₂₄ :

C'est le rapport de la hauteur de l'émulsion formée sur la hauteur totale du mélange, multiplié par 100.

$$E_{24} = (he / ht) \times 100$$

he : hauteur d'émulsion.

ht : hauteur totale du mélange.

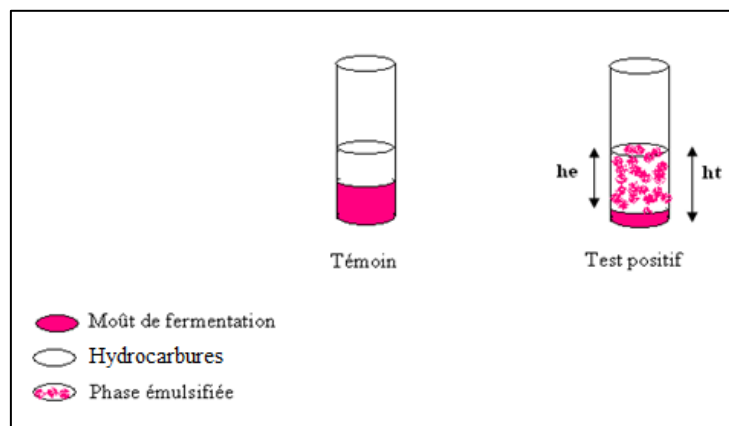


Figure 20 : Test d'émulsion.

I.6.1.7. Détermination de la biodégradation des hydrocarbures par la méthode gravimétrique:

Les hydrocarbures résiduels ont été récupérés par extraction liquide-liquide comme décrit par **Oudot *et al* (1987)**. 4 ml d'hexane et 2 ml d'acétone sont ajoutés à la culture de façon (**Daane *et al*, 2001**). Après élimination de la phase aqueuse à l'aide d'une ampoule à décantée, l'hexane et l'acétone ont été évaporés par un évaporateur rotatif à 50 °C (**Deborah *et al*, 2002; Liu *et al*, 2012**). Les erlenmeyers de témoins ont été également extraits de manière similaire. Après l'évaporation complète, le résidu hydrocarboné obtenu a été pesé et pris comme valeur gravimétrique pour un calcul ultérieur.

Le pourcentage d'hydrocarbure (pétrole ou diesel) dégradé est déterminé à partir de la formule suivante (**Oudot *et al*, 1987; Whyte *et al*, 1997; Liu *et al*, 2012**):

$$\text{Pourcentage d'hydrocarbures (Pétrole ou Diesel) dégradés} = (\text{Pt} - \text{Pr}) / \text{Pt} \times 100\%$$

Pr: poids du pétrole résiduel ou du diesel dans les cultures.

Pt: poids du pétrole résiduel ou du diesel dans les témoins.

I.6.2. Analyse de la biodégradation de l'isomérat par chromatographie en phase gazeuse :

La capacité des isolats à dégrader l'isomérat (Raffinerie d'Arzew, SONATRACH) a été examinée par l'ensemencement des erlenmeyers de 250 ml qui contiennent 100 ml de BH additionné par 2 % de l'isomérat, les cultures sont ensuite incubées à 30°C avec une agitation de 160 rpm, des erlenmeyers parallèles, qui n'ont pas été inoculés avec les isolats, considérés comme témoins pour surveiller la perte des hydrocarbures due à la volatilisation.

Après 15 jours d'incubation, l'isomérat résiduel des erlenmeyers inoculés et des témoins non inoculés sont extraits (**Whyte *et al*, 1997; Obire et Nwaubeta, 2001**). Les extraits sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (DANI Master GC Fast Gas Chromatograph System, DANI Instruments Sp. A., Milan), avec CP-Sil PONA CB Colonne (50 mm, 0,21 mm, 0,5 µm) et Flame Ionization Detector (FID). Tous les essais ont été effectués dans les conditions suivantes: température initiale 40 °C pendant 1 min; débit de la

température 10 °C/min et température finale 150 °C pendant 1 min; Injecteur (mode déversé / splitless) 250 °C; température FID 300 °C. Débit constant du gaz porteur (hélium) 40 ml/min.

I.7. La bioremédiation des sols pollués par le pétrole et le diesel :

La contamination des sols par les hydrocarbures pétroliers est une préoccupation environnementale particulière car ils présentent des propriétés cancérigènes et mutagènes.

L'une des méthodes de la décontamination du sol est la bioaugmentation, définie comme une technique d'amélioration de la capacité de dégradation des zones contaminées par l'introduction de compétences spécifiques des souches ou des consortiums de microorganismes. Afin d'appliquer nos isolats dans la bioaugmentation des sols pollués, nous avons remédié un sol artificiellement contaminé par le pétrole et diesel par l'introduction de nos microorganismes.

I.7.1. Le prélèvement et la préparation de l'échantillon du sol :

I.7.1.1.Site d'échantillonnage :

L'échantillon du sol provient d'une parcelle de terre située à la région de Kharrouba (Mostaganem, Algérie) à l'Est de Mostaganem. Le prélèvement correspond à la couche superficielle du sol (0 – 25 cm). Environ 10 kg du sol ont été prélevés du site et amenés au laboratoire dans des sacs en plastique.

I.7.1.2.Le prétraitement des échantillons du sol :

La préparation des échantillons pour les analyses physico-chimique et pour le test de bioaugmentation doit se faire après leur prélèvement. Les échantillons sont séchés à l'air libre. Les échantillons du sol sont ensuite broyés et tamisés à 2 mm. Les majeures parties des résidus végétaux sont éliminés au cours de l'étape de tamisage (Wu *et al*, 2016).

I.7.1.3.La stérilisation des échantillons de sol :

La stérilisation a pour but d'éliminer toute la population microbienne indigène du sol, qu'elle peut probablement altérer la croissance et l'effet de nos isolats au cours de l'incubation. Les échantillons du sol sont stérilisés trois fois par autoclavage à 121°C pendant 30 minutes (à 24 h d'intervalle) (Ghazali *et al*, 2004; Bento *et al*, 2005).

I.7.2. Les analyses physico-chimiques des sols :

Les analyses ont pour objectif de caractériser la composition et les qualités physicochimiques du sol utilisé durant la procédure de la bioaugmentation, elles ont été effectuées au niveau du Laboratoire Régional de l'analyse de sol et de l'eau d'irrigation INSID (Matmar -Relizane).

I.7.2.1. Les analyses physiques :**I.7.2.1.1. Mesure du pH et de la conductivité électrique (CE):**

Les mesures du pH et de la conductivité électrique sont estimées par méthode électrométrique à l'aide d'un pH mètre et d'un conductimètre, sur des extraits aqueux dont le rapport sol/eau est de 1/5 (Aubert, 1978; AFNOR, 1999).

I.7.2.2. Les analyses chimiques :

Le but de ces analyses est d'évaluer les quantités d'éléments nutritifs du sol. Elles comportent le dosage de quelques anions (chlorures, sulfates, carbonates et bicarbonates), le dosage de la matière organique et de carbone.

I.7.2.2.1. Dosage du calcaire total (CaCO_3)

Il se détermine par calcimétrie volumétrique à l'aide d'un calcimètre de Bernard. Il utilise la propriété du carbonate de calcium de se décomposer sous l'action d'un acide, en eau et gaz carbonique, ce dernier est recueilli, dans un tube gradué en millilitres (Aubert, 1978).

I.7.2.2.2. Dosage de calcaire actif (CaCO_3 actif) :

La mesure de calcaire actif, CaCO_3 actif, est réalisée selon la méthode **Drouineau-Galet (1951)**, Il s'agit de déterminer la fraction de calcium insolubilisée après agitation du sol avec une solution d'oxalate d'ammonium.

I.7.2.2.3. Dosage de carbone organique (Méthode d'Anne) :

Le carbone se trouve, dans les sols, sous forme minérale (carbonates p. ex.) et sous forme organique (débris végétaux, colloïdes humiques). Le dosage du carbone organique du sol sert à apprécier une partie du taux de matière organique totale de ce sol. La méthode Anne combine l'oxydation de la matière organique d'un échantillon du sol par un excès de

dichromate de potassium en milieu sulfurique à ébullition et la titration (solution de sels de Mohr) en retour de l'excès de dichromate de potassium en présence d'un indicateur. La teneur en carbone organique est exprimée en % (100 g/g sol), Il est possible de convertir la quantité de carbone organique obtenue en teneur de matière organique à l'aide d'un facteur correctif. En général, on admet que : Matière Organique ou MO (%) = C-org (%) x 1.72

I.7.2.2.4. Dosage de carbonates CO_3^{2-} et bicarbonate HCO_3^{-1} :

Leur dosage se fait par titrimétrie à l'aide de l'acide sulfurique (H_2SO_4). La méthode consiste à titrer les carbonates en présence de la phénolphthaléine, et de la même façon pour les bicarbonates en présence de l'orange de méthyle (AFNOR, 1999).

I.7.2.2.5. Dosage de chlore :

Ils sont dosés par titrimétrie au nitrate d'argent (AgNO_3) en présence de chromate de potassium (Méthode de MOHR) (AFNOR, 1999).

I.7.2.2.6. Dosage des sulfates (SO_4^{2-}) :

Les sulfates sont dosés par méthode gravimétrique au BaCl_2 qui consiste à précipiter les ions SO_4^{2-} sous forme de sulfate de Baryum (BaSO_4) en présence de BaCl_2 à 10 % (AFNOR, 1999).

I.7.2.2.7. Dosage de phosphore (Méthode de Joret Hébert, 1955):

La méthode Joret-Hébert (norme NF X31-161) consiste en une extraction à l'oxalate d'ammonium à 0.2 N en milieu neutre, Le dosage du phosphore extrait s'effectue par colorimétrie à 650 nm.

I.7.3. Préparation de l'inoculum :

Afin d'obtenir un inoculum standard, des bactéries individuelles sont cultivées dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de BN pendant 24h à 30 °C dans un agitateur orbital à 160 rpm. Ensuite, les cellules sont récoltées par centrifugation, rincées trois fois dans du BH stérile avant d'être remises en suspension dans du BH stérile pour donner une lecture d'absorbance de 0,5 à 600 nm. Lorsqu'il est utilisé comme inoculum à 10 % (v/p) (Ghazali *et al*, 2004). L'inoculum de consortium est préparé par le mélange d'un volume de 10 ml de l'inoculum de chaque isolat.

I.7.4. Description de l'expérience (préparation des microcosmes):

Les microcosmes sont réalisés en plaçant 500 g du sol stérilisé artificiellement contaminé par les hydrocarbures (le pétrole et le diesel à 10 %) dans des boîtes en plastique d'une surface de 200 cm² et d'un volume de 1000 cm³ dans le but d'une inoculation par 50 ml de chacune des isolats et par le consortium (mélange des cinq isolats). Les microcosmes sont maintenus à une température de 30 °C pendant 3 mois. Pour des raisons d'aération le sol est mélangé chaque semaine à l'aide d'une spatule stérile et humidifié en ajoutant 20 ml d'eau distillée stérile jusqu'à la fin de l'expérience. Les boîtes témoins non inoculés et pollués par le pétrole et le diesel sont mises dans les mêmes conditions que les boîtes inoculées (**Ghazali et al, 2004; Bento et al, 2005; Wu et al, 2016**).

I.7.5. Le suivi de la bioremédiation des sols pollués :

Afin d'estimer la dégradation des hydrocarbures et la croissance de nos isolats introduites dans les sols artificiellement contaminés, nous avons effectué des prélèvements de 1g pour mesurer la concentration bactérienne évaluée par simple dénombrement sur le milieu GN et de 10 g pour mesurer les hydrocarbures résiduels (TPH) (la méthode dans l'étape de l'Evaluation des hydrocarbures totaux dans le sol pollué), à partir des microcosmes inoculés et non inoculés (les témoins) à des intervalles de 15, 30, 60 et 90 jours.

I.7.6. L'évaluation de l'effet de la bioremédiation:

Les tests écotoxicologiques sont utilisés comme un outil pour surveiller la bioremédiation des hydrocarbures pétroliers. Ces tests ont été développés dans le but d'estimer l'impact toxicologique des produits chimiques sur les récepteurs écologiques tels que les vers de terre, les plantes et les bactéries (**Saterbak et al, 1999; D'Annibale et al, 2006**). Dans le but d'évaluer les effets écotoxicologiques de la contamination des sols par les hydrocarbures, on a utilisé le test de germination des graines.

I.7.6.1. Matériel végétal :

Pour l'évaluation des risques des sols contaminés par les hydrocarbures come polluants organiques vis-à-vis des plantes. Les différents instituts de normalisation (**ISO 11269-2, 2005; OECD, 2006**) préconisent d'étudier la toxicité chez les plantes supérieures terrestres, en plus des invertébrés. Les plantes modèles généralement étudiées sont l'avoine, le blé, le chou, la laitue, le maïs, l'oignon, l'orge, le ray-grass, le soja, la tomate ... ou bien alors

des plantes d'importance économique ou écologique vis-à-vis du site impacté. Les principaux paramètres mesurés chez les plantes sont la germination, la croissance, l'élongation racinaire ou foliaire.

Nous avons choisi le blé dur (*Triticum durum* Desf.) comme matériel végétal pour les tests de germination vu que le blé appartient à des plantes modèles des tests de toxicité et d'un autre côté il représente une grande importance agro-économique en Algérie. Les graines de blé sont entreposées à 4 °C et à l'obscurité avant les tests de germination, elles sont conservées pour une durée maximale de un an (Saterbak *et al*, 1999). Avant leur utilisation les graines ont été examinées et sélectionnées. Les graines endommagées ou anormalement petites sont mises de côté. Elles sont ensuite désinfectées dans un bain de solution d'hypochlorite de sodium à 5 % pendant 5 min, puis rincées à l'eau distillée plusieurs fois pour éliminer toute trace de chlore. Le pourcentage de germination des témoins dans le sol non pollué devrait être connu et égal ou supérieur à 90 % (Plaza *et al*, 2005).

I.7.6.2. Test de germination :

Pour le test de germination 450 semences de blé sains et uniforme sont disposées dans des boîtes de Pétri stériles contenant 20 g du sol, les boîtes sont divisées en 15 lots, chaque lot comporte 30 graines, soit 3 répétitions de 10 graines par boîte pétri (annexe 06). Ces derniers sont ensuite placés dans un incubateur réglé à 25 ± 1°C dans l'obscurité pendant sept jours (Plaza *et al*, 2005).

I.7.6.3. Paramètres biologiques mesurés :

Trois paramètres sont retenus pour évaluer l'effet de la bioremédiation des sols contaminés par le pétrole et le diesel sur la germination de blé, à savoir le taux de germination, la longueur des racines et l'indice de germination.

I.7.6.1.1. Taux de germination :

Le taux de germination ou le pourcentage de germination, montre dans quelle proportion le lot de graines a complété sa germination (Saterbak *et al*, 1999 ; Rahman *et al*, 2002). Il est exprimé par la formule suivante :

$$\text{Taux de germination (\%)} = \frac{\text{le nombre des graines germés}}{\text{le nombre total de graines semées}} \times 100 \%$$

I.7.6.1.2. La longueur racinaire :

Les racines sont extraites en plaçant les boîtes dans de l'eau et les longueurs de racines sont mesurées. Le blé produit de multiples racines, et seul le plus long qui est mesuré (Saterbak *et al*, 1999; Rahman *et al*, 2002).

I.7.6.1.3. L'indice de germination (Ig):

L'indice de germination est un chiffre compris entre 0 et 1, indique la capacité de blé à germer dans un milieu donné. Le taux de germination des graines et la longueur des racines ont été combinés en un indice de germination (Ig) selon l'équation suivante (D'Annibale *et al*, 2006 ; Graj *et al*, 2013):

$$\text{Indice de germination (Ig)} = \frac{G_e \times L_e}{G_t \times L_t} \times 100 \%$$

Où :

Ge et Gt : sont le nombre de graines germées dans l'échantillon et le témoin,

Le et Lt : sont la longueur des racines dans l'échantillon et le témoin.

I.8. L'amélioration de pouvoir de dégradation des isolats par la mutagenèse :

La capacité des microorganismes à s'adapter à la dégradation des hydrocarbures s'explique davantage par l'acquisition de gènes cataboliques et par des modifications géniques résultant de l'accumulation de mutations ponctuelles (Leahy et Colwell, 1990). Les mutations ponctuelles correspondent à la substitution d'une base par une autre (SNP pour Single Nucleotide Polymorphism) ou à l'insertion/délétion d'une ou plusieurs bases (indel). Elles résultent souvent des erreurs lors de la réplication de l'ADN par l'ADN polymérase ou lors de la réparation de l'ADN. En effet bien que l'ADN polymérase ait une activité de relecture (proof-reading) et qu'il existe des systèmes de correction/réparation, des erreurs arrivent à subsister (Wielgoss *et al*, 2011). Cependant toutes les substitutions n'ont pas la même probabilité : par exemple, chez les bactéries, il a été montré que les transitions G→A et C→T sont les mutations ponctuelles plus fréquentes (Hershberg et Petrov, 2010; Hildebrand *et al*, 2010). Les mutations ponctuelles peuvent aussi être induites par des agents

chimiques (EMS, agents alkylants, analogue de base ...) ou physiques (UV, radiations ionisantes ...).

Le rayonnement ultraviolet (UV) est la méthode d'induction de mutation la plus fréquemment employée et l'un des moyens les plus simples et les plus commodes pour obtenir des mutants dans divers organismes, y compris les bactéries (**Friedberg, 1985**). Il induit des changements potentiellement mortels dans la structure de l'ADN à une longueur d'onde d'environ 260 nm (**Hillen, 1999**) qui est connu pour induire des mutations dans les bactéries. Dans le but de l'amélioration et l'augmentation du pouvoir de la dégradation des hydrocarbures par nos isolats, nous avons choisis les isolats L1, B2 et P4 pour la mutagenèse à l'aide de l'ultraviolet.

I.8.1. Préparation d'inoculum :

5 ml du milieu BN sontensemencés à partir des colonies à partir d'une culture jeune des isolats, après incubation (30 °C/ 24 heures), 1 ml de la culture est utilisé pourensemencer des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de milieu BN, ces derniers ont été incubés à 30°C (160 rpm) pendant 24 heures (**Suribabu et al, 2014**). La DO₆₀₀ des cultures a été ajusté à 10⁸ UFC/ml (**Lin et Wang, 2001**)

I.8.2. Traitements mutagènes par rayonnement ultraviolet (UV) :

On a utilisé le protocole de **Miller (1992)** avec quelques modifications. Les cultures sont ensuite utilisées pour l'irradiation ultraviolette en plaçant 10 ml de ces dernières dans des boîtes de Pétrie. Les boîtes sont maintenues dans une boîte noire avant et après irradiation. Tous les rayonnements UV sont réalisés dans une chambre à UV où la lampe UV (lampe Philips UVC, 15W, 254 nm) est fixé à une distance de 10 cm de la culture à irradiées. La majorité des expériences ont été effectuées dans l'obscurité pour éviter la photo-réactivation. Avant chaque irradiation, la lampe UV a été allumé pendant au moins 30 minutes pour stériliser la chambre à UV. Pour chaque temps d'exposition aux UV, une boîte de chaque culture est placée au centre de la chambre et irradiée pendant un temps fixé (0sec, 30 secs, 1 min, 5 min, 10 min et 15 min). Ceci a été fait en utilisant une minuterie numérique. Les couvercles des boîtes de Petrie ont été enlevés avant de les placer dans la chambre UV. Après irradiation, les couvercles sont remplacés et les cultures irradiées ont été diluées en séries de dilutions 10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ et 10⁻⁷ puis étalées sur la gélose (GN ou King B) puis elles sont

incubées à 30 °C pendant 24 heures pour dénombrer les cellules survivantes, déterminer les pourcentages de survie et réaliser la courbe de survie.

I.8.3. Sélection de mutants :

Les mutants sont sélectionnés pour le test de biodégradation du pétrole et diesel selon l'étude macroscopique des colonies (taille, forme et couleur déférente).

I.8.4. La biodégradation des hydrocarbures par les mutants sélectionnés (la méthode gravimétrique) :

Des erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml de milieu BH liquide additionnés par 2 ml (2 %) du pétrole ou du diesel sontensemencés par les mutants sélectionnés puis incubés à 30 °C/160 rpm pendant 12 jours. Après incubation, les hydrocarbures ont été extrais et pesés pour déterminer le pourcentage de biodégradation de chaque mutant.

Chapitre II :

Résultats et Discussion

II. Résultats et Discussion :**II.1. Résultats :****II.1.1. Evaluation des hydrocarbures totaux dans le sol pollué :**

Dans le but d'évaluer le taux de contamination de l'échantillon du sol provenant de la raffinerie d'ARZEW- ORAN, nous avons dosé les hydrocarbures totaux (TPH), le résultat en TPH est de 82 g/kg du sol, en effet le pourcentage d'hydrocarbures dans cet échantillon du sol est de 8,2 %.

II.1.2. Isolement des souches dégradantes d'hydrocarbures:

Avec une étape d'enrichissement et de purification en utilisant le pétrole et le diesel comme source de carbone et d'énergie, 5 colonies microbiennes au total ont été sélectionnés pour leur capacité à dégrader les hydrocarbures ; L1, B2, P1, P3 et P4.

II.1.3. L'identification des isolats dégradants les hydrocarbures :**II.1.3.1. L'étude morphologique :****II.1.3.1.1. Aspect macroscopique :**

L'observation macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation. Le repiquage des cinq isolats sur la GN, nous a permis d'étudier l'aspect des colonies, les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 3.

II.1.3.1.1. Aspect microscopique :

L'observation microscopique a été réalisée suivant 3 étapes : à l'état frais, coloration de gram, recherche et coloration de spores au vert de malachite, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 4.

Tableau 3 : Aspect macroscopique de l'ensemencement des isolats sur GN après purification.

Isolat	L1	B2	P1	P3	P4
Diamètre	2mm	2 à 5mm	1mm	1mm	1mm
Chromogènes	Blanchâtre	Beige	Bleu vert	Bleu vert	Beiges
Forme	Ronde	Circulaire	Ovale	Ovale	Ronde
Élévation	Convexe	Convexe	Convexe	Convexe	Convexe
Contour	Régulier	Irrégulier	Irrégulier	Irrégulier	Irrégulier
Opacité	Opaque	Opaque	Translucide	Translucide	Translucide
Surface	Lisse	Lisse	Brillante	Brillante	Brillante
Consistance	Crémeuse	Visqueuse	Muqueuse	Muqueuse	Muqueuse
Odeur	Absence	Absence	Odeur fruitée	+ ou - Odeur fruitée	+ ou - Odeur fruitée

Tableau 4: Les Différents aspects microscopiques des isolats.

Isolat	Mobilité	Gram	Forme	Arrangement	Présence de Spores
L1	-	+	Ovales allongés (bourgeonnement)	Isolées	-
B2	+	+	Bacilles	En chainettes	+ sub-terminale non déformante
P1	+	-	Petites bacilles	Isolées	-
P3	+	-	Petites bacilles	Isolées	-
P4	+	-	Petites bacilles	Isolées	-

D’après nos observations (tableau 4), il ressort que les bactéries isolées présentent 3 différentes formes : bacille, petite bacille et ovale et qu’elles sont, soient mobiles ou immobiles avec une paroi de type positive ou négative. En revanche, la spore n’est pas révélée chez tous les isolats sauf B2.

II.1.3.2. L’étude biochimique des isolats :

Les résultats des tests biochimiques des cinq isolats sont regroupés dans les tableaux 5, 6 et 7.

Tableau 5 : Résultats des tests biochimiques de l’isolat L1.

Tests	Sabouraud + chloramphenicol	PDA	GLU	GAL	SAC	TRE	RAF	β MAL	α AMY	β XYL	β GUR	URE	β NAG	β GAL
L1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 6 : Résultats des tests biochimiques de l’isolat B2.

Tests	Oxydase	Catalase	Respiration	NO ₃	GLU	ADH	URE	GEL	ONPG	ARA	MAN	LDC	ODC	TDA	IND	VP	INO	CIT	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	H ₂ S	L’hémolyse du sang	Amylase	Lecithinase	Caseïne
B2	-	+	Aéroanaérobie	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Gamma	-	-	+

Tableau 7: Résultats des tests biochimiques des isolats P1, P3 et P4.

	P1	P3	P4
Oxvdase	+	+	+
Catalase	+	+	+
Type Respiratoire	Aérobie stricte	Aérobie stricte	Aérobie stricte
KingA	+	+/-	-
KingB	+	+	+
Mcc	-	-	-
NO₃	+	+	+
TRP	-	-	-
GLU (fermentation)	-	-	-
ADH	+	+	+
URE	+	+	-
ESC	-	-	-
GEL	+	+	-
PNPG	-	-	-
GLU	+	+	+
ARA	-	-	+
MNE	-	-	+
MAN	+	+	+
NAG	+	+	+
MAL	-	-	+
GNT	+	+	+
CAP	+	+	+
ADI	+	+	+
MLT	+	+	+
CIT	+	+	+
PAC	-	-	-

L'identification biochimique a pu être réalisée à l'échelle du genre ou de la famille. En effet, parmi les cinq microorganismes isolées, nous avons pu affilier les isolats selon Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (**Brenner et al, 2009; De Vos et al, 2009**) comme appartenant aux genres suivants :

a. *Candida* :

Sur milieu sabouraud-chloramphénicol solide qui est recommandé pour la culture de levures et de moisissures et qui inhibe la croissance des bactéries grâce à la présence de l'antibiotique (chloramphénicol), les cellules appartenant aux colonies obtenues sont ovale assez allongée bourgeonnant (figure 21c). Sur le plan macroscopique, elle se présente comme une colonie de consistance crémeuse à la surface lisse (figure 21a et 21b). Nous avons noté l'absence de chlamydospore et la présence de pseudo mycélium (figure 21d). Les résultats des tests biochimiques sont présentés dans le tableau 5. L'étude biochimique a conduit que cette souche est affiliée au genre *Candida* sp, en se basant sur les résultats traités et fournis par le site de apiweb.

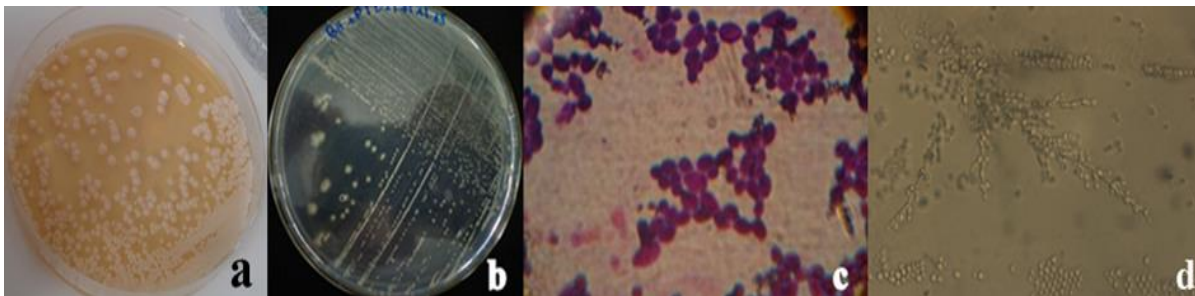


Figure 21 : L'aspect macroscopique (a : Sabouraud chloramphénicol, b : BH+ pétrole) et microscopique (c : G x 100 et d : G x 40) de l'isolat L1.

b. *Bacillus* :

La souche B2 est affiliée au genre *Bacillus* en raison de la morphologie de ses cellules en forme de bâtonnets droits (figure 22), mobile, gram positive, capable de former des endospores, aéro-anaérobie facultatif et qui possède une catalase. En effet, ceux sont des caractères spécifiques du genre *Bacillus*. Les résultats des tests biochimiques obtenus suite à l'inoculation par l'isolat B2 de la galerie API 20 E avec les tests de l'hémolyse du sang, l'hydrolyse de la lécithine et l'hydrolyse de la caséine (tableau 6), montrent que l'isolat B2 appartient au genre *Bacillus*.

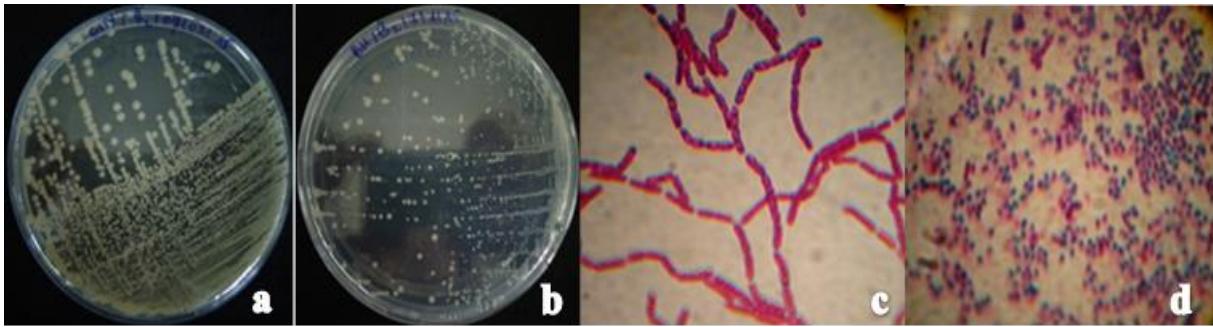


Figure 22 : L'aspect macroscopique (a : GN, b : BH+ pétrole) et microscopique (G x 100) (c : coloration de GRAM et d : coloration de spores) de l'isolat B2.

c. *Pseudomonas* :

D'après leur aspect microscopique (tableau 4), les souches P1, P3 et P4 sont rattachées au genre de *Pseudomonas*. Ces souches ont une forme bacillaire, isolées ou en amas avec les caractéristiques suivantes : Gram négatif, oxydase positive, catalase positive, non sporulées. Ceci nous a orientés vers la culture de ces souches sur milieux King A et King B spécifiques des *Pseudomonas*. La révélation d'une couleur bleu verte sur King A et un jaune verdâtre fluorescent sur King B confirme l'appartenance au genre *Pseudomonas* (Figure 23, 24 et 25). Ces bactéries ont un caractère aérobie strict, ADH et citrate positif. Une identification biochimique par les galeries API 20NE (tableau 7) a permis de différencier ces souches bactériennes et de les identifier au tant que : *Pseudomonas aeruginosa* (P1 et P3) et *Pseudomonas fluorescens* (P4).

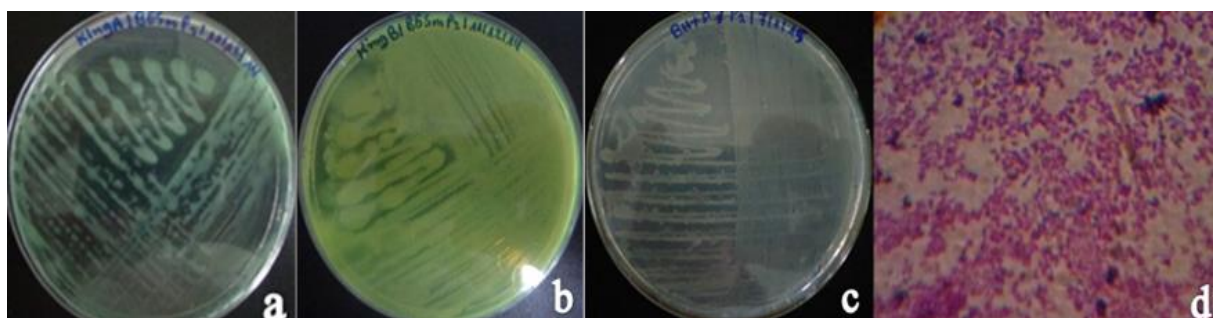


Figure 23 : L'aspect macroscopique (a : King A, b : King B et c : BH+ pétrole) et microscopique (d) (G x 100) de l'isolat P1

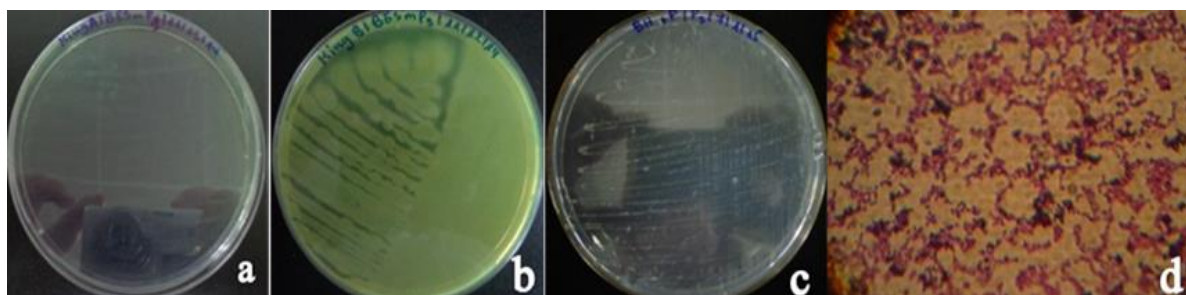


Figure 24 : L'aspect macroscopique (a : King A, b : King B et c : BH+ pétrole) et microscopique (d) (G x 100) de l'isolat P3

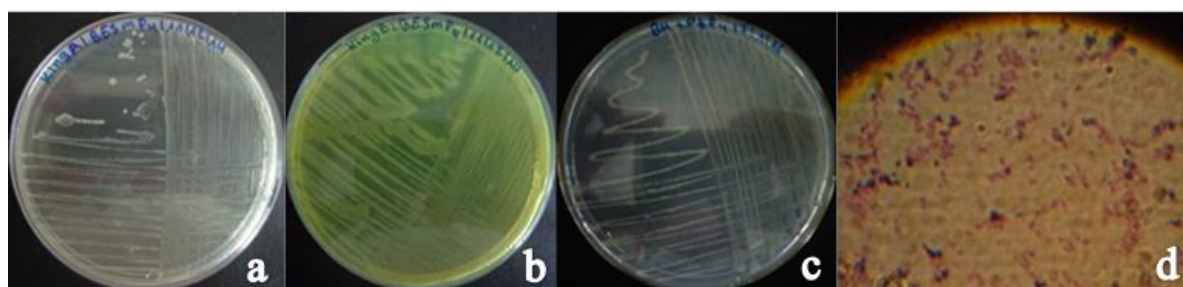


Figure 25 : L'aspect macroscopique (a : King A, b : King B et c : BH+ pétrole) et microscopique (d) (G x 100) de l'isolat P4

II.1.3.3. Etude de la sensibilité des *Pseudomonas* aux antibiotiques :

Le profil de résistance des isolats bactériennes (P1, P3 et P4) a été déterminé par la méthode de diffusion sur milieu Mueller Hinton (tableau 8), on a déposé par la suite les différents disques d'antibiotiques à tester. Des antibiotiques communément utilisés en thérapie humaine sont retenus. Le nombre d'antibiotiques actifs contre les *Pseudomonas* est limité. Il s'agit surtout des pénicillines anti-pseudomonales, céphalosporines de troisième génération, carbapénèmes, fluoroquinolones, particulièrement la ciprofloxacine et les aminoglycosides. Les isolats de *Pseudomonas* ont montré différents niveaux de résistance vis-à-vis des antibiotiques.

En effet, nous avons observé que les deux isolats P1 et P3 présentent un profil de résistance aux antibiotiques testés identique. Ces deux isolats sont résistantes aux antibiotiques ; céfépime, imipénème, pénicilline G, ticarcilline-clavulanate, nétilmicine, colistine, fosfomicine, et elles présentent une sensibilité remarquable aux antibiotiques ; ciprofloxacine, lévofloxacine, gentamicine, ceftazidime, ticarcilline, amikacine, pipéracilline et tobramycine. La souche P4 présente une seule sensibilité différente par rapport aux autres

isolats, les isolats P1 et P3 sont résistantes au nétilmicine par contre l'isolat P4 est sensible à cet antibiotique.

Tableau 8: Le profil de résistance des isolats de Pseudomonas (P1, P3 et P4).

Les antibiotiques	Charge du disque	Isolat P1		Isolat P3		Isolat P4	
		Diamètres (mm)	Sensibilité	Diamètres (mm)	Sensibilité	Diamètres (mm)	Sensibilité
Ciprofloxacine	5 µg	30	S	33	S	31	S
Céfépime	30 µg	0	R	0	R	0	R
Imipénème	10 µg	6.5	R	9	R	15	R
Pénicilline G	10 µg	0	R	0	R	0	R
Ticarcilline-clavulanate	75/10 µg	0	R	0	R	0	R
Pipéracilline	100 µg	15	S	14.5	S	8	S
Tobramycine	10 µg	22	S	22.5	S	25	S
Nétilmicine	10 µg	13	R	11.5	R	16	S
Amikacine	30 µg	26	S	25	S	28	S
Colistine	10 µg	12	R	12	R	12	R
Ceftazidime	10 µg	18	S	22.5	S	21	S
Ticarcilline	75 µg	24	S	28	S	25	S
Fosfomicine	50 µg	0	R	0	R	0	R
Lévofloxacine	5 µg	28	S	33	S	24	S
Gentamicine	15 µg	23	S	23.5	S	23	S

R : résistante
S : sensible

II.1.3.4. L'étude moléculaire :

II.1.3.4.1. Résultats de la vérification de la qualité d'ADN par le gel d'agarose :

L'électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN génomique des 4 bactéries étudiés (P1, P3, P4 et B2) a été réalisée dans l'objectif de vérifier l'efficacité du protocole de l'extraction, et la qualité de l'ADN extrait.

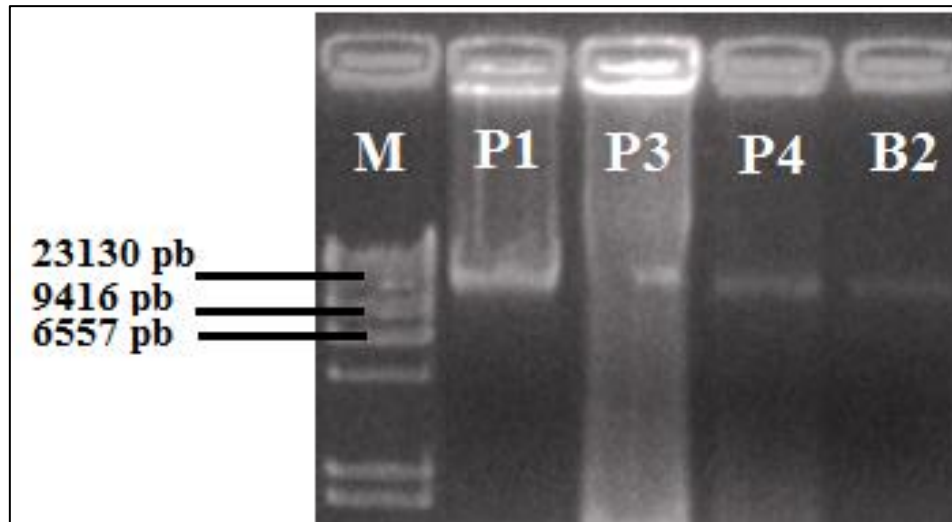


Figure 26 : Electrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN génomique des quatre bactéries isolées.

Cette électrophorèse révèle des bandes uniques (figure 26) et intactes, il peut donc être utilisé pour l'étape de l'amplification de la région ADNr 16S.

II.1.3.4.2. Résultats de l'amplification de l'ADNr 16S :

L'ARN ribosomal (ARNr 16S) est le constituant ARN de la petite sous-unité ribosomale du 30S des procaryotes. Le gène codant pour cet ARNr est le « 16S rDNA gene » (Clarridge, 2004), présent dans l'ensemble des espèces bactériennes en un nombre variable de copies (Petti, 2007; Woese, 1987). Il est composé d'environ 1500 nucléotides et est constitué de sept régions conservées et de neuf régions hypervariables (Chakravorty *et al*, 2007). L'ensemble permet donc théoriquement d'utiliser ce gène pour identifier et détecter toute espèce bactérienne.

Les souches isolées B2, P1, P3 et P4 sont retenues pour une éventuelle identification moléculaire. A cet effet, la région d'ADN, codant la molécule ARNr 16S est amplifiée par la

technique de la PCR. Les fragments amplifiés obtenus sont séparés selon leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel d'agarose. Les résultats de la comparaison des fragments d'ADN amplifiés avec le marqueur de taille ont montré que la taille de ces fragments avoisine les 1500 pb (figure 27).

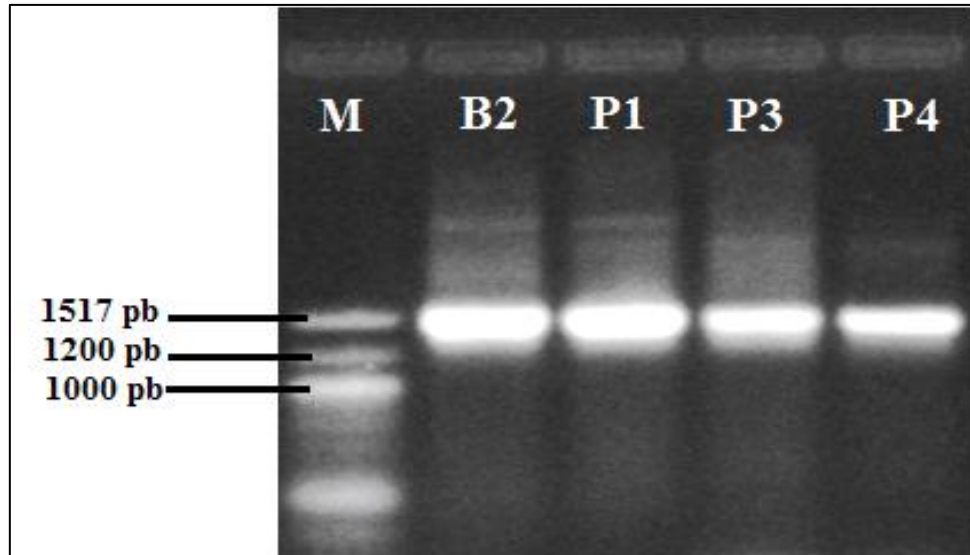


Figure 27 : L'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments d'ADN amplifiés, codant l'ARNr 16S des bactéries isolées B2, P1, P3 et P4.

II.1.3.4.3. Résultats de séquençage de l'ADN amplifié :

L'identification moléculaire des isolats sélectionnés est basée sur l'amplification et le séquençage des régions d'ADN codantes la molécule ARNr 16S. Les séquences brutes obtenus sont corrigées, assemblées afin d'obtenir un consensus (annexe 07).

II.1.3.4.4. La construction de l'arbre phylogénétique :

Les séquences obtenues ont été soumises à une analyse de type BLAST via la base de données NCBI. Ces séquences sont regroupées et analysées par le logiciel de Phylogeny.fr (www.phylogeny.fr/) qui réalise et construit l'arbre phylogénétique des souches étudiées (les figures 28, 29, 30 et 31). Avec une similarité de 99-100 % comparée avec les séquences de la banque de données dans Genbank-BLASTn, l'analyse d'affiliation génétique a révélé que la souche B2 présente 99 % de similarité de séquence avec *Bacillus megaterium* et *Bacillus aryabhatai* (figure 28). Ceci permet la classification de B2 comme souche au genre *Bacillus* sp.

En outre, l'analyse phylogénétique a indiqué que P1 présente 100 % de similarité de séquence avec la souche *Pseudomonas aeruginosa* (figure 29). Le séquençage du gène ADNr 16S a permis d'identifier deux *Pseudomonas putida* P3 et P4, présentent 99 % de similarité de séquence avec *Pseudomonas putida* (figure 30 et 31).

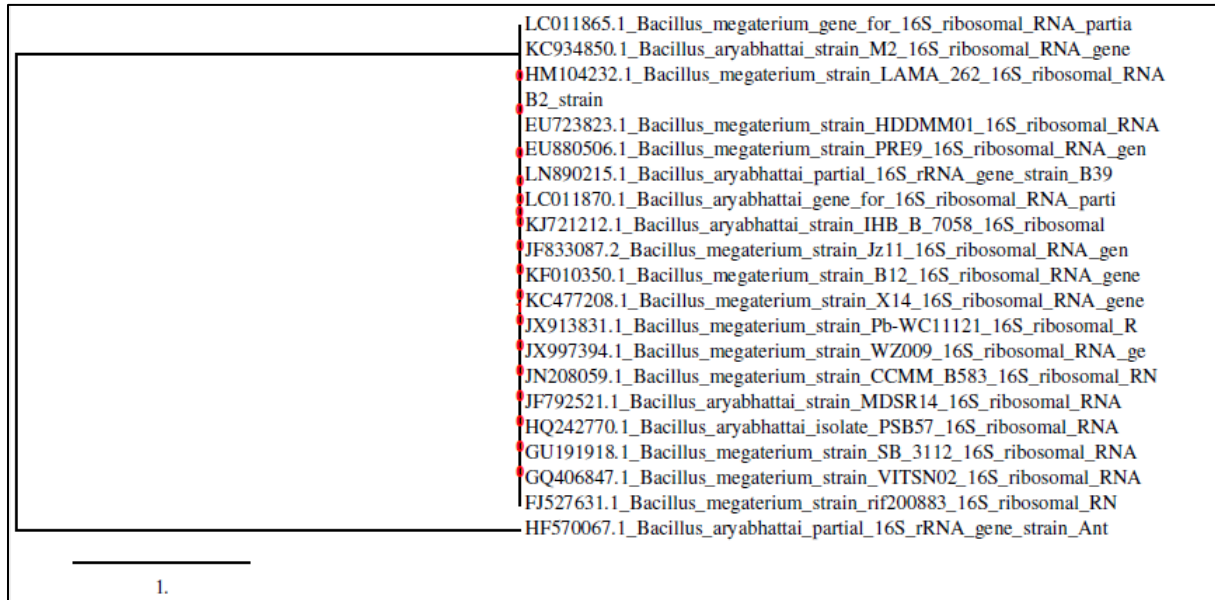


Figure 28 : Arbre phylogénétique basée sur les séquences d’ADNr 16S de la souche *Bacillus* sp. (B2) et des espèces apparentées du BLAST database.

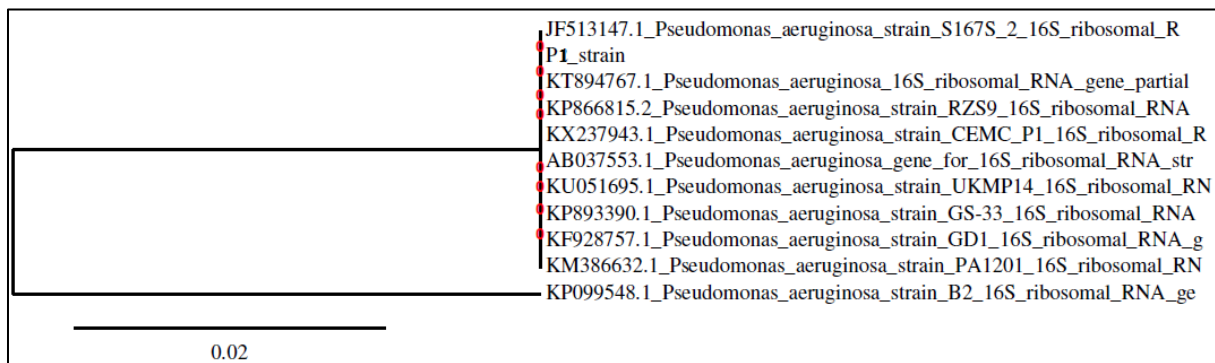


Figure 29 : Arbre phylogénétique basée sur les séquences d’ADNr 16S de la souche *Pseudomonas aeruginosa* (P1) et des espèces apparentées du BLAST database.

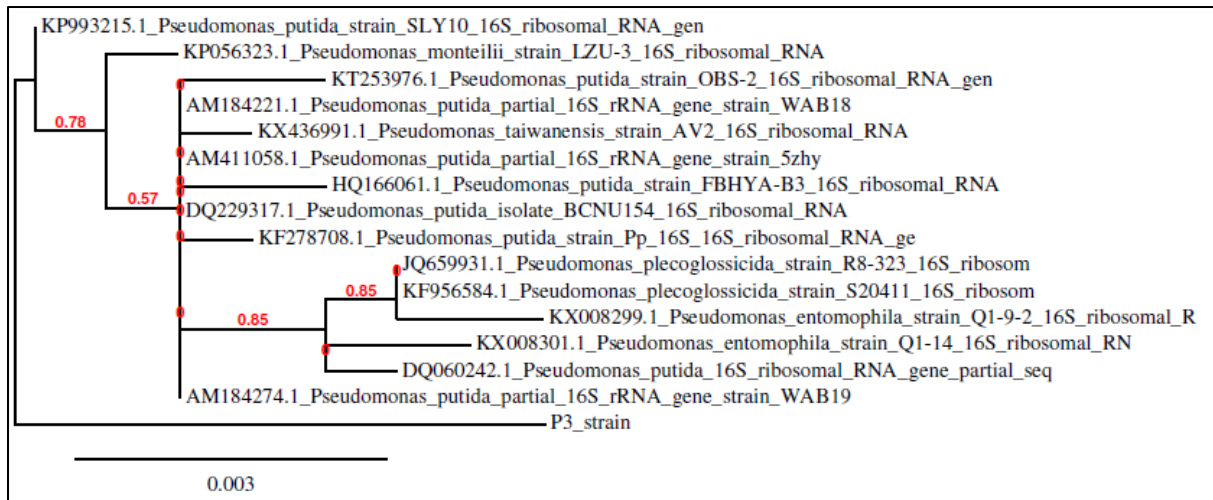


Figure 30 : Arbre phylogénétique basée sur les séquences d’ADNr 16S de la souche *Pseudomonas putida* (P3) et des espèces apparentées du BLAST database.

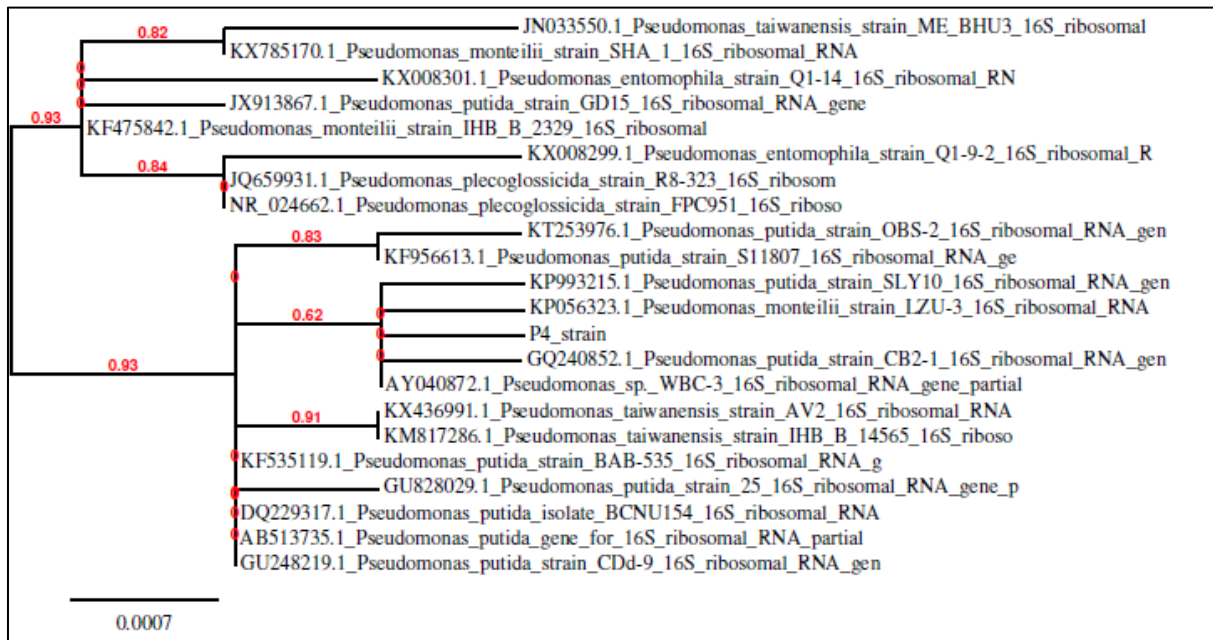


Figure 31 : Arbre phylogénétique basée sur les séquences d’ADNr 16S de la souche *Pseudomonas putida* (P4) et des espèces apparentées du BLAST database.

II.1.3.4.5. Numéros d’accession des séquences nucléotidiques :

Les séquences déterminées dans cette étude sont enregistré dans la base de données Genbank database du National Center for Biotechnology Information (NCBI) afin d’avoir des numéros d’accessions. La comparaison avec la totalité des séquences nucléotidique indexées dans la base de données NCBI, a permis d’établir l’identité des souches sélectionnées et

l'indication du degré d'homologie. Les numéros d'accèsion, l'identité et le degré d'homologie des souches sélectionnées sont illustrés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Présentation des numéros d'accèsion, l'identité des souches et le pourcentage de similarité.

souche	Numéro d'accèsion	Identité de la souche	Similarité
B2	KY548814	<i>Bacillus</i> sp.	99 %
P1	KY548815	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100 %
P3	KY548816	<i>Pseudomonas putida</i>	99 %
P4	KY548817	<i>Pseudomonas putida</i>	99 %

II.1.4. La biodégradation des hydrocarbures :

II.1.4.1. La cinétique de croissance des isolats purifiés :

La cinétique de croissance des cinq isolats en présence de 2% de pétrole et de diesel comme la seule source de carbone a été suivi en mesurant la DO à 600 nm et la concentration microbienne en fonction de temps, les résultats de la DO et le dénombrement des colonies sont illustrés par les figures 32, 33 et 34, 35.

L'augmentation de la densité optique mesurée à intervalle régulier (tous les 2 jours) montre la capacité des isolats étudiés à utiliser et à dégrader les hydrocarbures (pétrole ou diesel) en tant que source unique de carbone et d'énergie (figures 32 et 33). Plus précisément, la croissance est linéaire entre le 4^{ème} et 8^{ème} jour d'incubation et elle est limitée après le 8^{ème} jour d'incubation.

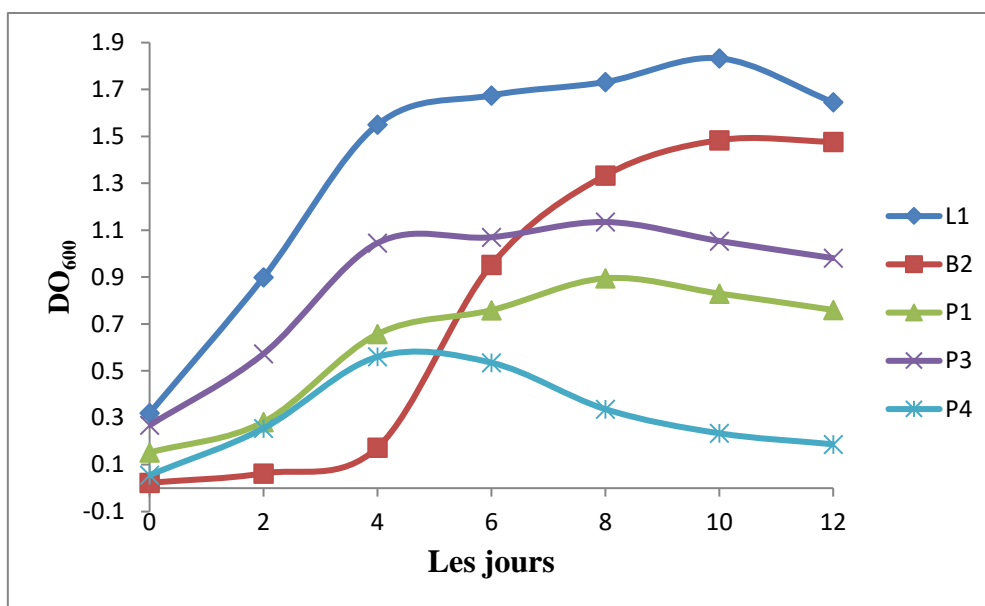


Figure 32 : Le suivie de la DO des isolats en présence du pétrole pendant 12 jours d'incubation.

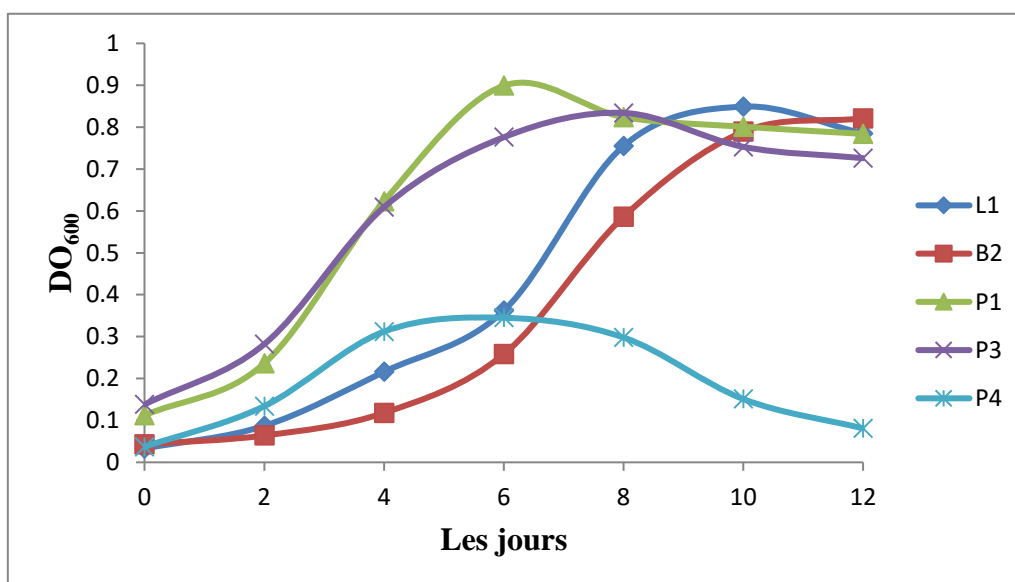


Figure 33 : Le suivie de la DO des isolats en présence du diesel pendant 12 jours d'incubation.

La concentration microbienne des isolats capables de croître sur le milieu BH liquide additionné par le pétrole ou le diesel a augmenté rapidement pendant l'incubation. Les concentrations microbiennes au début de l'incubation sont $7,5 \times 10^3$, $1,11 \times 10^4$, 4×10^5 , $1,3 \times 10^5$ et $1,32 \times 10^5$ UFC/ml (dans le BH + 2 % de pétrole) et $9,8 \times 10^3$, $2,3 \times 10^3$, 7×10^4 , 5×10^4 et $1,8 \times 10^4$ UFC/ml (dans le BH + 2% de diesel) respectivement dans les cultures L1, B2, P1, P3 et P4, ces valeurs ont augmentés jusqu'à $3,7 \times 10^7$ CFU/ml en 4^{ème} jour, $2,26 \times 10^8$ UFC/ml en 6^{ème} jour, $6,2 \times 10^9$ UFC/ml en 6^{ème} jour, 2×10^9 UFC / ml en 4^{ème} jour et $1,5 \times 10^9$ UFC/ml

en 4^{ème} jour (dans le BH + 2 % de pétrole) et $3,5 \times 10^7$ UFC/ml en 6^{ème} jour, $3,4 \times 10^8$ UFC / ml en 8^{ème} jour, $5,9 \times 10^9$ UFC/ml en 8^{ème} jour, $2,7 \times 10^9$ UFC/ml en 4^{ème} jour et $1,6 \times 10^9$ UFC/ml en 6^{ème} jour d'incubation (dans le BH + 2 % de diesel), respectivement pour les isolats L1, B2, P1, P3 et P4 (figures 34 et 35).

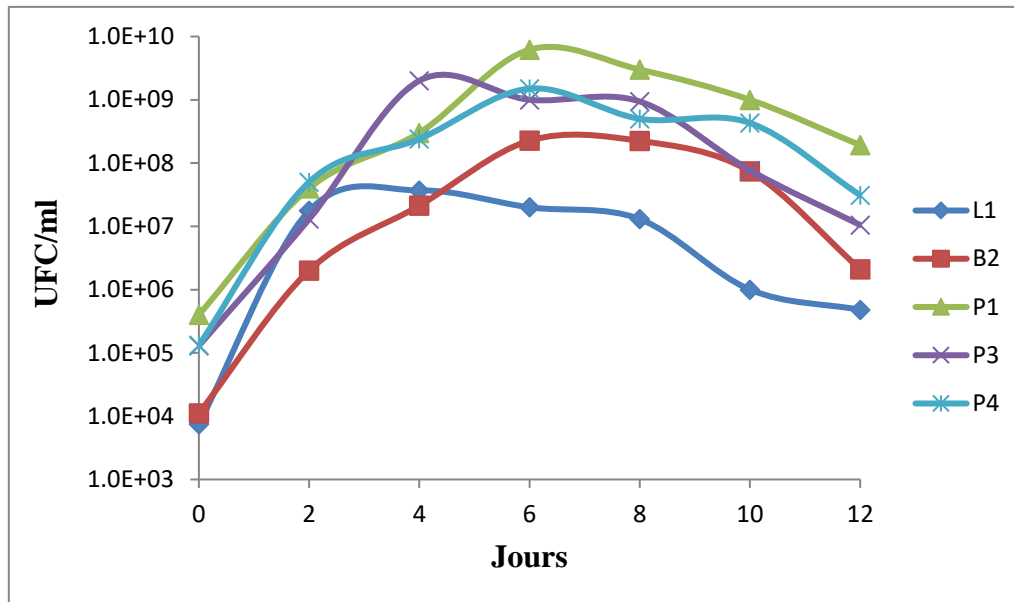


Figure 34 : Le suivi de la concentration microbienne des isolats en présence du pétrole pendant 12 jours d'incubation.

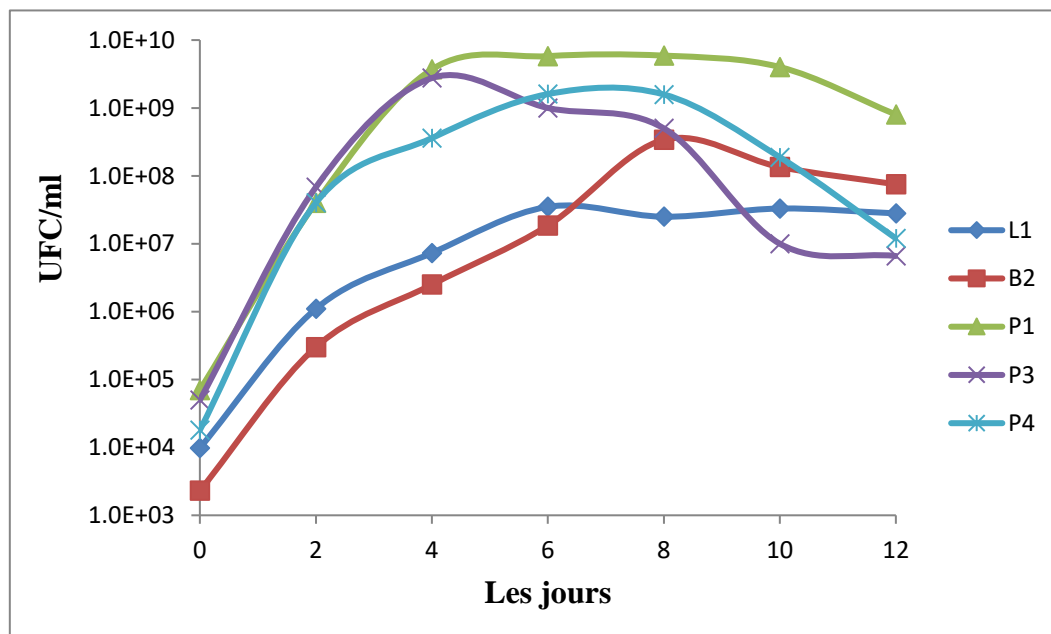


Figure 35 : Le suivi de la concentration microbienne des isolats en présence du diesel pendant 12 jours d'incubation.

II.1.4.2. Détermination de la dégradation des hydrocarbures par la concentration des hydrocarbures totaux (TPH, Total Petroleum Hydrocarbons) :

Le dosage des hydrocarbures totaux dans les cultures microbiennes en présence de pétrole et de diesel est effectué à l'aide d'une spectroscopie infrarouge (HORIBA, OCMA - 310), avec un intervalle de 2 jours. Les résultats obtenus sont présentés dans les courbes (figures 36 et 37). La croissance des isolats a augmenté progressivement avec une diminution d'hydrocarbures tout au long la période d'incubation (12 jours). Les concentrations des hydrocarbures totaux au premier jour d'incubation sont 272, 264, 236, 260 et 262 mg/l dans le milieu BH additionné par 2 % de pétrole et 418, 352, 400, 398 et 408 mg/l dans le milieu BH additionné par 2 % de diesel respectivement pour les isolats L1, B2, P1, P3 et P4. La concentration initiale des hydrocarbures dans les témoins non inoculés était ; 282 mg/l de pétrole et de 428 mg/l de diesel. Les courbes des concentrations de TPH indiquent l'utilisation et la dégradation du pétrole et du diesel par les cinq isolats pendant la période d'incubation, car la concentration de TPH a diminué jusqu'à la valeur de 141, 122, 690, 490 et 169 mg/l dans le milieu BH additionné par le pétrole et jusqu'à la valeur 174, 141, 630, 570 et 148mg/l dans le milieu BH additionné par le diesel respectivement pour les isolats L1, B2, P1, P3 et P4.

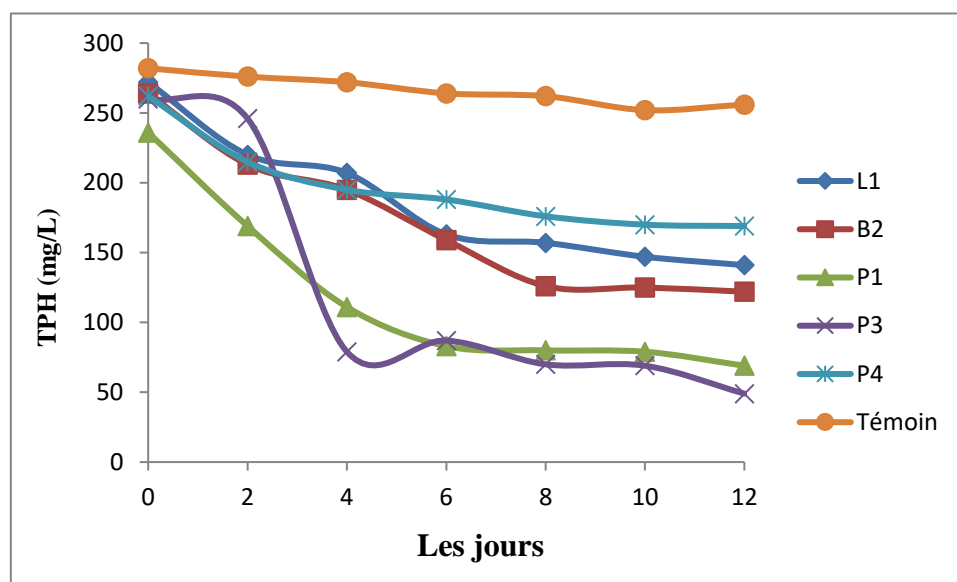


Figure 36 : Le suivi de la concentration de TPH des cinq isolats dans le milieu BH additionné par 2 % de pétrole pendant la période d'incubation.

Ichor et al, (2014) rapportent que la diminution de la concentration de TPH en présence des microorganismes dégradants les hydrocarbures est le résultat de l'utilisation et de la dégradation de ce substrat par ces microorganismes.

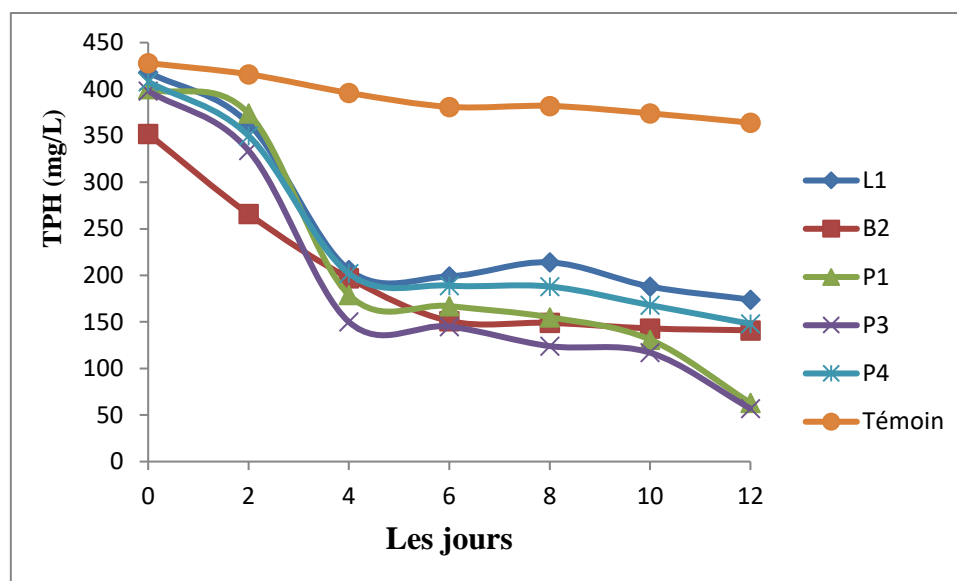


Figure 37 : Le suivi de la concentration de TPH des cinq isolats dans le milieu BH additionné par 2 % de diesel pendant la période d'incubation.

II.1.4.3. Détermination de la demande chimique en oxygène (DCO) :

C'est la quantité d'oxygène nécessaire à l'oxydation de l'ensemble des matières minérales et organiques biodégradables ou non, présentes dans un milieu. Soit donc à la fois les matières oxydables par les processus purement chimique et celles oxydables par les processus biochimiques. La DCO est obtenue à l'aide d'un agent oxydant puissant comme le dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$). La quantification de la charge polluante biodégradable ou non de l'inoculum est déterminée par sa DCO. Les figures 38 et 39 représentent la variation de la DCO en fonction de temps, nous observons une diminution de la DCO au cours de l'incubation des cinq isolats dans le milieu BH additionné par 2 % de pétrole et de diesel. La concentration de DCO dans les cultures contenant le pétrole a diminué de 504.8, 460.8, 528, 584 et 522,4 mg/l à 124.8, 128.8, 28.8 mg/l, 86.4 et 148 mg/l respectivement pour les isolats L1, B2, P1, P3 et P4. La concentration de DCO dans les cultures contenant le diesel est diminuée de 583.2, 606.4, 622.4, 608.3 et 626.4 mg/l à 109.6, 134, 28.8, 25.3 et 144 mg/l respectivement pour les isolats L1, B2, P1, P3 et P4.

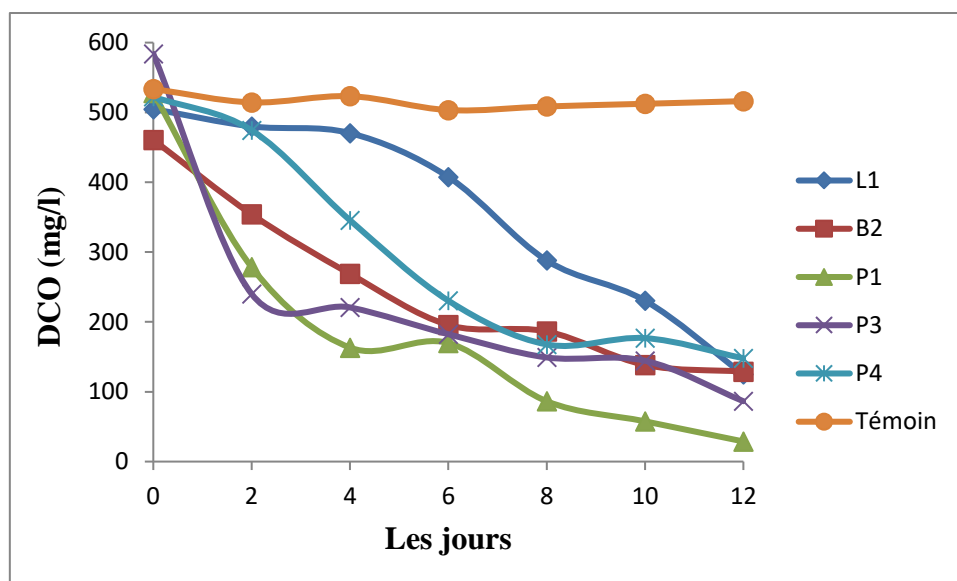


Figure 38 : Les concentrations de la DCO pendant l’incubation des isolats dans le milieu BH additionné par 2 % de pétrole.

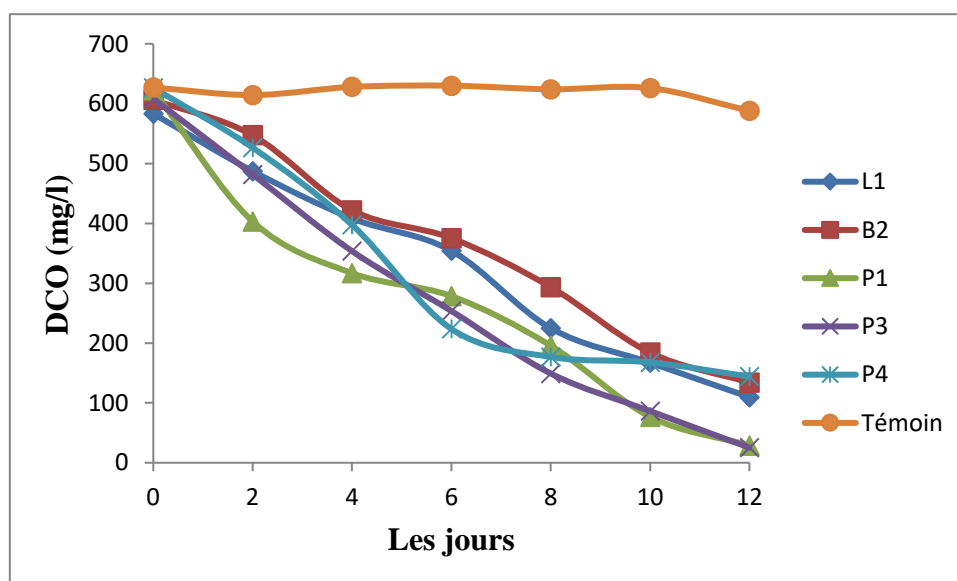


Figure 39 : Les concentrations de la DCO pendant l’incubation des isolats dans le milieu BH additionné par 2 % de diesel.

II.1.4.4. Détermination de la demande biochimique en oxygène (DBO₅) :

Sa détermination consiste à mesurer la quantité totale de l’oxygène consommé, par des processus biochimiques, au cours de l’oxydation des matières organiques dans un échantillon donné. La DBO a été standardisée en DBO₅, mesurée au bout de 5 jours, considérée comme

une période significative du processus global de biodégradation qui prend des semaines. Elle permet aussi d'avoir indirectement une idée de la contamination organique globale d'un échantillon. La demande biologique en oxygène a été mesurée chaque deux jour pendant l'incubation. Les figures 40 et 41 montrent que les valeurs de la DBO₅ sont élevées au début de l'incubation, dans les cultures en présence de pétrole étaient 198.2, 204, 200.3, 198 et 203.7 mg/l et dans les cultures contenant le diesel les concentrations de DBO₅ sont ; 297.2, 304.4, 306.4, 298.7 et 303.1 mg/l respectivement pour les isolats L1, B2, P1, P3 et P4. Une importante réduction de la DBO₅ est observée à la fin de la période de l'incubation jusqu'à 114.8, 147.6, 65.6, 65.6 et 122 mg/l dans les cultures contenant le pétrole et jusqu'à 164, 180.4, 147.6, 131.2 et 196.8 mg/l dans les cultures contenant le diesel, respectivement pour les isolats L1, B2, P1, P3 et P4.

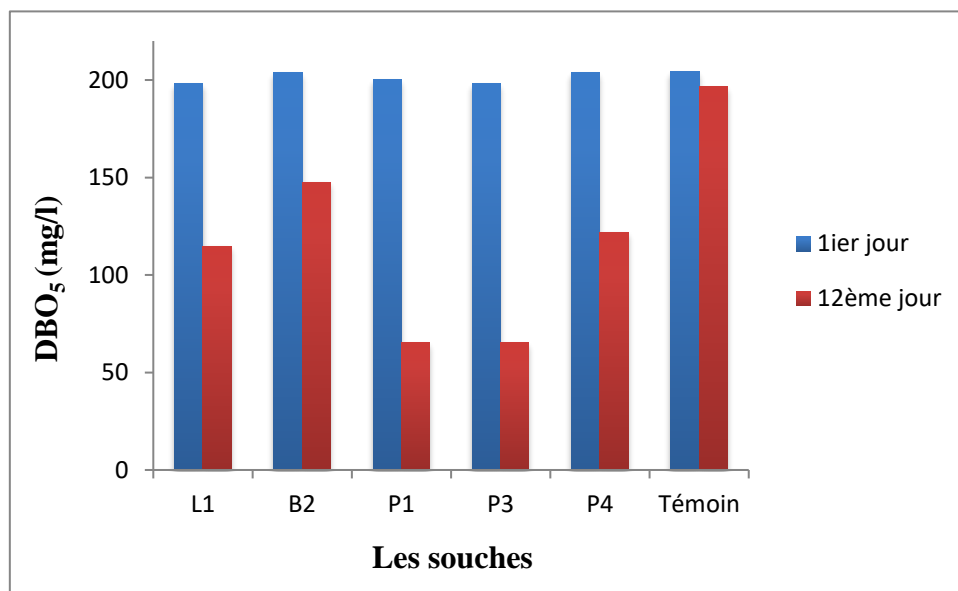


Figure 40 : Les concentrations de la DBO₅ au début et à la fin de l'incubation des souches dans le milieu BH additionné par 2 % du pétrole.

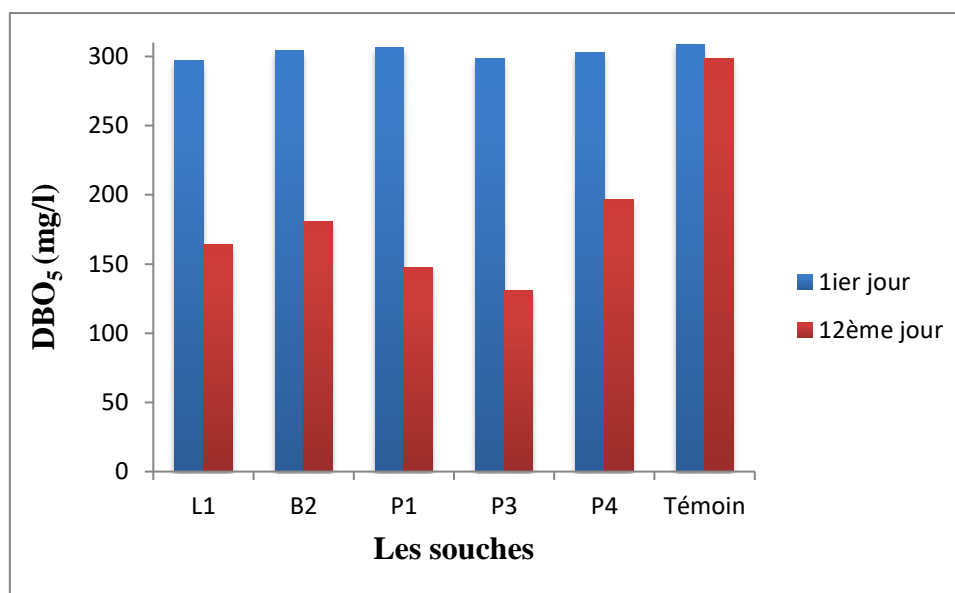


Figure 41 : Les concentrations de la DBO_5 au début et à la fin de l'incubation des souches dans le milieu BH additionné par 2 % de diesel.

II.1.4.5. Index d'émulsification (E_{24}) :

La stratégie biologique qui peut améliorer le contact entre les bactéries et les hydrocarbures insolubles dans l'eau est l'émulsification. Par conséquent, les bactéries qui poussent sur les hydrocarbures produisent généralement des émulsifiants qui stimulent leurs croissance et accélèrent la bioremédiation (**Ron et Rosenberg, 2002**). Les biosurfactants sont souvent produits par des bactéries capables de croître sur des hydrocarbures. Afin de confirmer et d'estimer la production des biosurfactants par les isolats L1, B2, P1, P3 et P4, nous avons réalisé le test d'émulsification (E_{24}) qui consiste à homogénéiser 3ml de la culture microbienne avec 3ml de l'hydrocarbure (pétrole et diesel). La figure 42 montre que les isolats présentent des valeurs variables d'émulsification du pétrole ou du diesel, indiquant la production de composés biosurfactants. L'activité d'émulsification des isolats L1, B2, P1, P3 et P4 est de 30, 33.3, 43.33, 43.33 et 40% avec le pétrole; et 43, 43, 53, 53 et 50% avec le diesel.

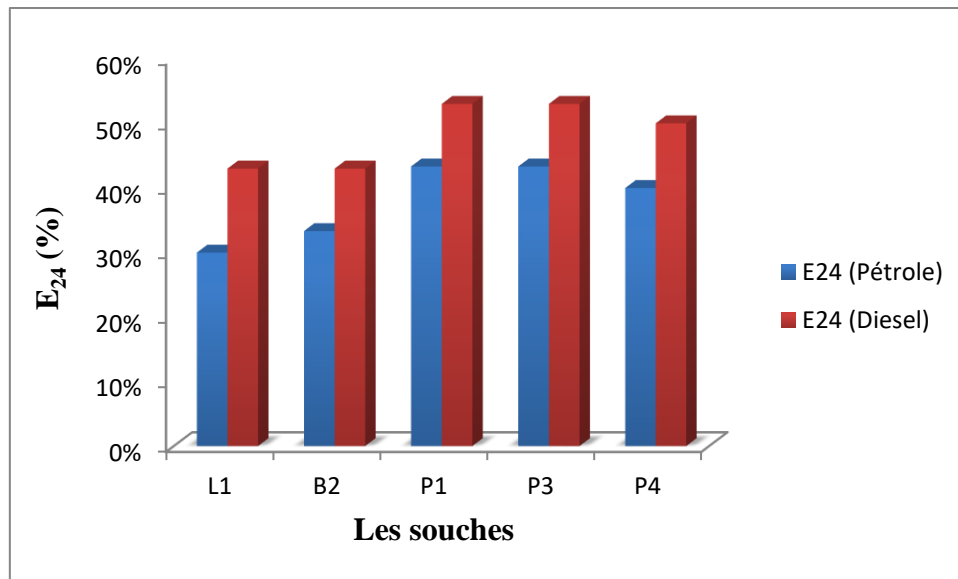


Figure 42 : Le pourcentage de l'index d'émulsion (E_{24}) des souches en présence de pétrole et de diesel.

II.1.4.6. Estimation de potentiel de biodégradation des hydrocarbures par la méthode gravimétrique:

Le test de biodégradation est effectué pour déterminer les capacités de dégradation du pétrole et diesel de nos cinq isolats indigènes qui ont été isolées à partir de sol contaminé. Pour estimer le potentiel de biodégradation, les isolats sont inoculés séparément dans le milieu BH liquide contenant 2 % du pétrole ou du diesel comme seule source de carbone (figure 43). D'après les résultats de ces essais, les isolats ont un pourcentage de dégradation du pétrole entre 9.70-45.45 % et du diesel entre 4.09-52.5 %. On a montré que ces isolats présentent une bonne capacité de dégradation du pétrole et diesel parce que leur pourcentage est supérieur à 5 % (Oudot *et al*, 1987).

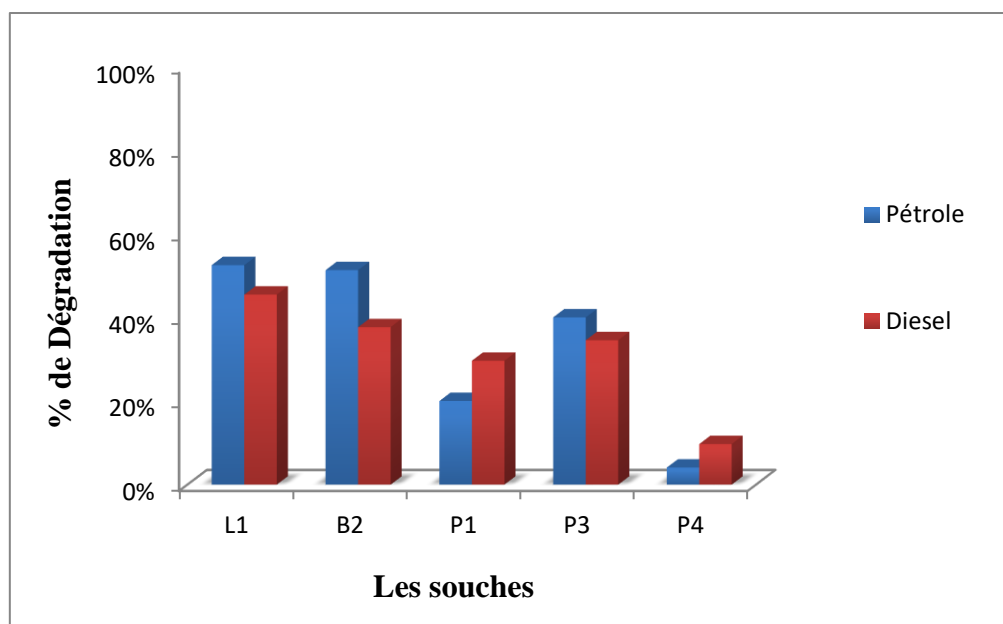


Figure 43 : Le pourcentage de dégradation du pétrole et du diesel par les souches microbiennes par la méthode gravimétrique.

II.1.4.7. L'analyse de la biodégradation de l'isomérat par CPG :

Les hydrocarbures résiduels sont donnés par CPG-FID en fin de test de dégradation. C'est l'analyse fine du chromatogramme qui nous permet de quantifier ces hydrocarbures résiduels. Les chromatogrammes de l'isomérat inoculé avec nos isolats et non inoculé (témoin) sont illustrés dans les figures 44, 45, 46, 47, 48 et 49. La figure 48 montre que C3, I-C4, le cyclopentane, l'éthyl benzène et O-xylène ne sont plus visibles après traitement avec l'isolat P3. D'autre part, l'incubation avec l'isolat P1 (figure 47) a produit la disparition complète de C3, I-C4, celle de 2-3diméthylbutane et de toluène. Les hydrocarbures qui ont disparu dans l'isomérat inoculé avec l'isolat P4 (figure 49) sont l'I-C4 et l'hexane, pour l'isolat L1 (figure 45) étaient le cyclopentane et le toluène, et l'hexane pour l'isolat B2 (figure 46).

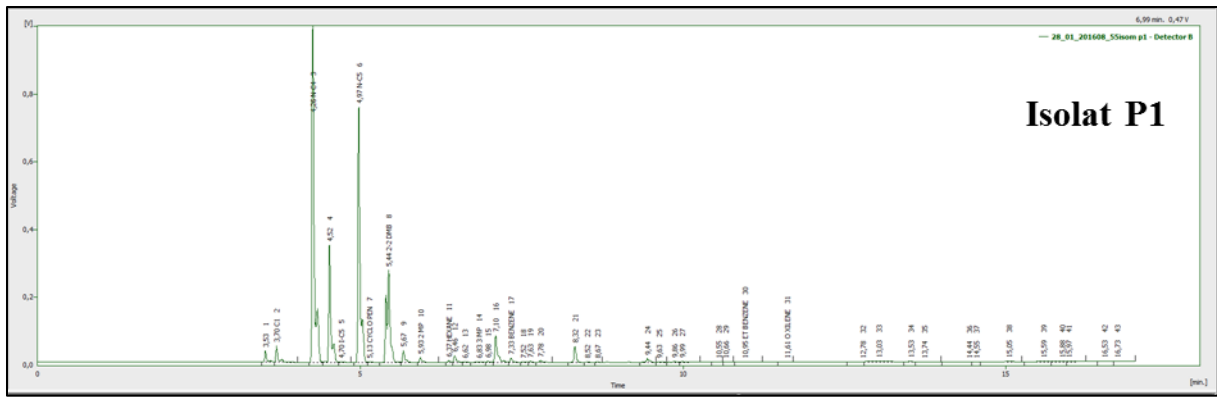


Figure 47 : Le chromatogramme de l'Isomérat inoculé par l'isolat P1 à la fin de l'incubation.

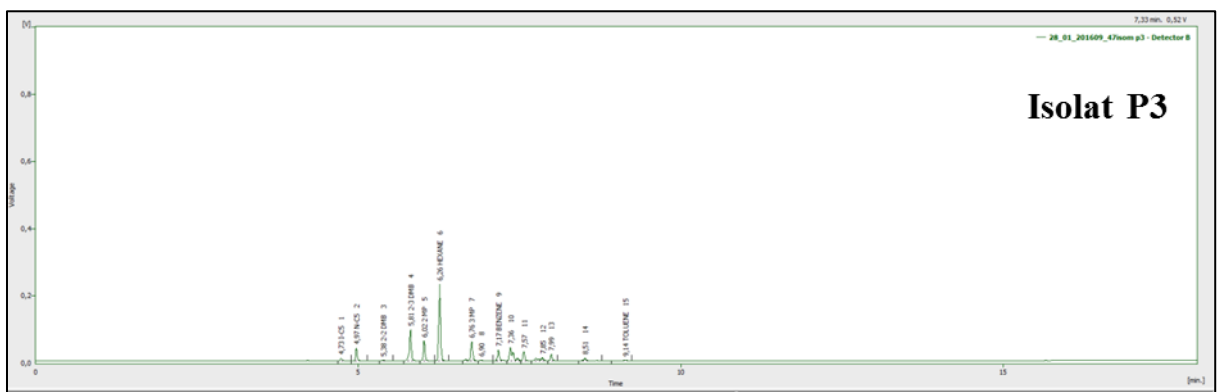


Figure 48 : Le chromatogramme de l'Isomérat inoculé par l'isolat P3 à la fin de l'incubation.

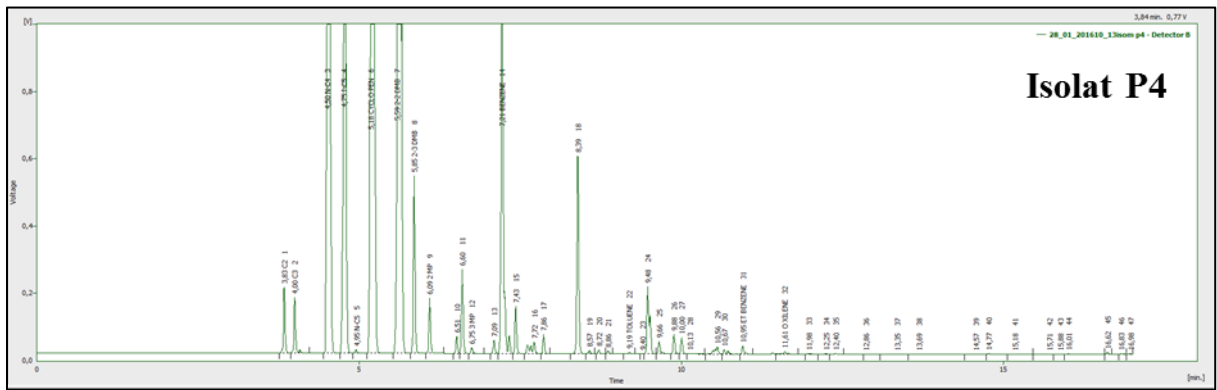


Figure 49 : Le chromatogramme de l'Isomérat inoculé par l'isolat P4 à la fin de l'incubation.

La différence des quantités de chaque composant résiduel de l'isomérat dans les témoins et dans les cultures microbiennes à la fin de test, nous a permis d'accéder aux pourcentages de biodégradation des composants (figure 50).

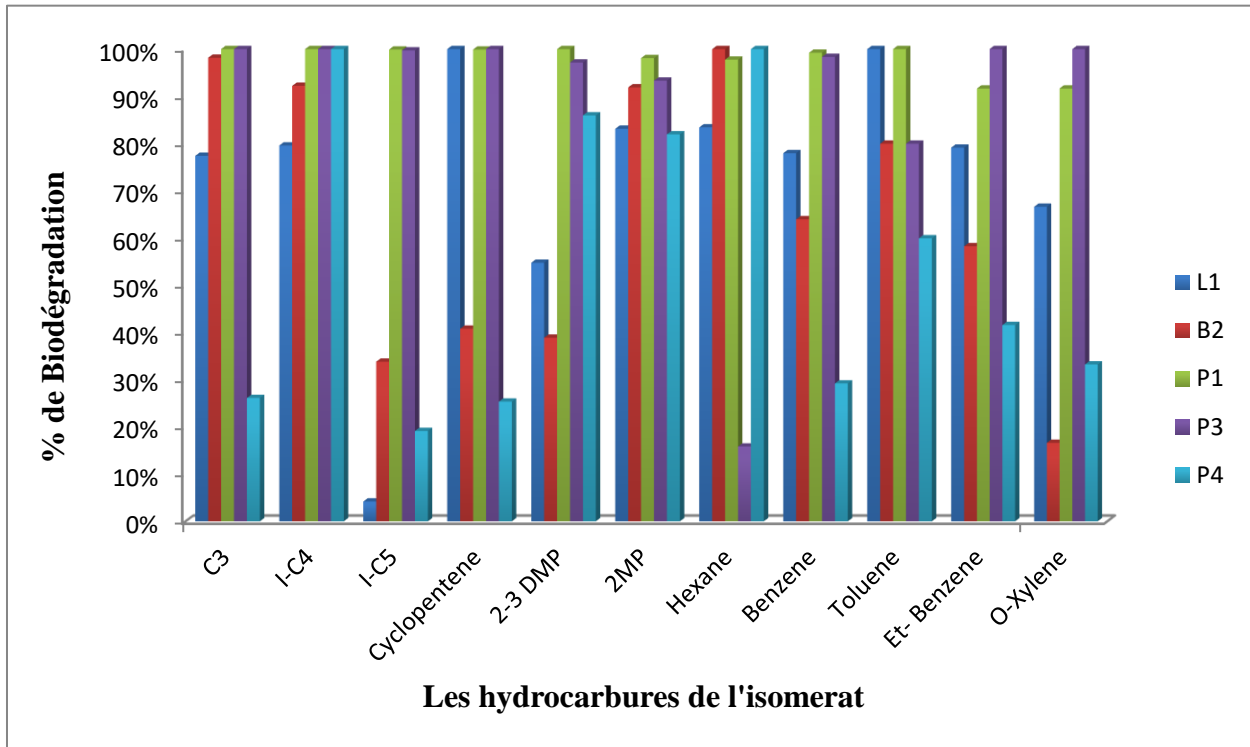


Figure 50 : Le pourcentage de la biodégradation des hydrocarbures de l'isomérat par les isolats L1, B2, P1, P3 et P4.

II.1.5. Bioremédiation des sols artificiellement pollués par le pétrole et le diesel :

Dans le but d'introduire les isolats dans la dépollution des sites contaminés par les hydrocarbures plutôt que les accumuler dans l'environnement, nous avons suivi ces approches expérimentales :

- a. De contaminer artificiellement un sol en pétrole et diesel.
- b. Dépolluer le sol contaminé par introduction des souches isolées pendant une période d'incubation de 3mois.
- c. Vérifier la biodégradation des hydrocarbures par l'évolution de la croissance microbienne dans le sol, le dosage des hydrocarbures résiduels et les tests de germination.

II.1.5.1. Les analyses physico-chimiques du sol :

Neuf paramètres physico-chimiques de sol prélevé pour le test de bioremédiation: pH, la conductivité électrique, calcaire total (CaCO₃), calcaire actif (CaCO₃ actif), carbone organique, carbonates CO₃⁻² et bicarbonate HCO₃⁻¹, chlore, sulfates et phosphore ont été effectuées. Les résultats sont présentés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Les résultats des analyses physico-chimiques de l'échantillon du sol.

Les paramètres physico-chimiques	Mesure
pH	7.78
CE ds/m	0.095
CaCO₃ T%	5.94
CaCO₃ A%	0.37
C%	0.69
MO%	1,19%
P₂₀ 5 ppm	39.79
CO₃⁻² Meq/l	0
HCO₃⁻¹ Meq/l	2.9
Cl Meq/l	0.6
SO₄ Meq/l	12.01

La salinité globale du sol peut être exprimée par la conductivité électrique (CE) déterminée sur l'extrait de pâte saturée, les résultats montrent que le sol prélevé est non salé (CE =0.095 ds/m) d'après l'échelle de la salinité (**Richard et al, 1954**), le pH est alcalin (**Soltner, 1989**), pauvre en matière organique (1.19 %), faiblement calcaire (calcaire total

5.94 %), riche en phosphore (39.79 ppm) qui est l'un des éléments majeurs indispensables à la croissance et au développement des végétaux.

II.1.5.2. Le suivi de la bioremédiation des sols pollués :

Pour évaluer la dégradation de pétrole et de diesel par les isolats nous avons mesuré la concentration microbienne (UFC/g) et doser les hydrocarbures totaux dans un échantillon du sol :

II.1.5.1. L'évolution de la concentration microbienne dans les sols pollués :

Les résultats de l'évolution de la concentration microbienne des isolats en fonction de temps dans les sols contaminés par le pétrole et le diesel pendant 90 jours d'incubation sont présentés dans les figures 51 et 52.

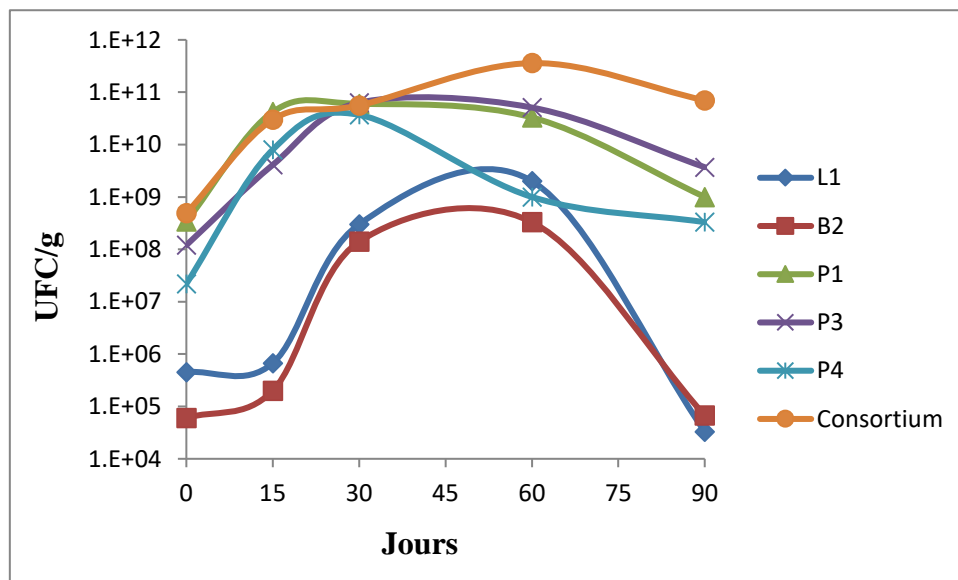


Figure 51 : L'évolution de la concentration microbienne de chaque isolat et le consortium dans les sols contaminés par le pétrole.

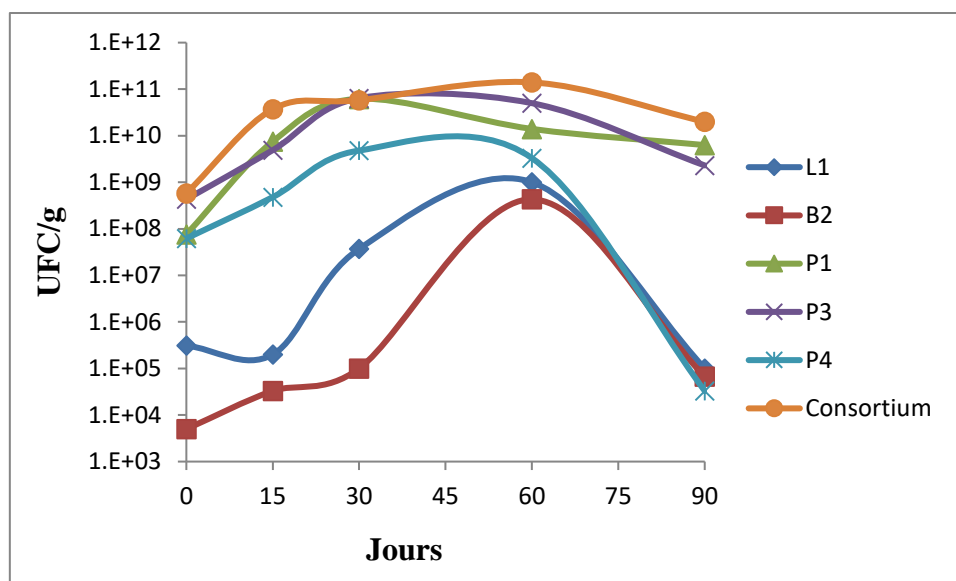


Figure 52 : L'évolution de la concentration microbienne de chaque isolat et le consortium dans les sols contaminés par le diesel.

Les concentrations microbiennes obtenues pendant 90 jours d'incubation de nos isolats L1, B2, P1, P3, P4 et le consortium dans les microcosmes contenant le sol pollué par le pétrole et le diesel, sont supérieures à celles observées dans les microcosmes au début de l'incubation. Pour les isolats P1, P3, P4 et le consortium, les phases de latence observées sont très courtes. Ce résultat démontre une adaptation plus ou moins rapide de ces bactéries à la source de carbone utilisée (pétrole et diesel).

Cependant, la phase de latence observée pour les isolats L1 et B2 est plus longue entre 0 et 15 jours dans les sols contaminés par le pétrole et le diesel. On a constaté que la concentration microbienne a augmenté dès les premiers jours de l'incubation respectivement pour les isolats L1, B2, P1, P3, P4 et le consortium jusqu'à atteindre des valeurs maximales de 2×10^9 UFC/g au 60^{ème} jours, 3.30×10^8 UFC/g au 60^{ème} jours, 6×10^{10} UFC/g au 30^{ème} jours, 6.3×10^{10} UFC/g au 30^{ème} jours, 3.7×10^{10} UFC/g au 30^{ème} jours et 3.6×10^{11} UFC/g au 60^{ème} jours dans les sols contaminés par le pétrole et de 1×10^9 UFC/g au 60^{ème} jours, 4.30×10^8 UFC/g au 60^{ème} jours, 6.2×10^{10} UFC/g au 30^{ème} jours, 6.4×10^{10} UFC/g au 30^{ème} jours, 4.8×10^9 UFC/g au 30^{ème} jours et 1.4×10^{11} UFC/g au 60^{ème} jours dans les sols contaminés par le diesel. Cette augmentation correspond à la phase exponentielle, phase durant laquelle la dissolution des hydrocarbures suffit aux besoins métaboliques des isolats.

En comparant les résultats des isolats étudiées , il s'avère que les isolats P1, P3, P4 ainsi que le consortium sont celles qui possèdent la phase exponentielle la plus courte (15jours) alors que les isolatsL1 et B2 possèdent la phase exponentielle la plus longue (30jours). Autrement dit, les isolats P1, P3, P4 et le consortium présentent la croissance la plus rapide et par conséquent l'élimination des hydrocarbures la plus rapide. Au-delà de 60^{ème} jour la concentration microbienne tend à diminué pour atteindre des valeurs de 3.3×10^4 UFC/g, 6.7×10^4 UFC/g, 1×10^9 UFC/g, 3.7×10^9 UFC/g, 3.3×10^8 UFC/g et 7×10^{10} UFC/g dans les sols contaminés par le pétrole et de 1×10^5 UFC/g, $6,7 \times 10^4$ UFC/g, 6.3×10^9 UFC/g, 2.3×10^9 UFC/g, 3.3×10^4 UFC/g et 2×10^{10} UFC/g dans les sols contaminés par le diesel respectivement pour les isolats L1, B2, P1, P3, P4 et le consortium.

II.1.5.2. Suivi de la biodégradation de pétrole et diesel par dosage des hydrocarbures totaux :

Afin d'évaluer la dégradation des hydrocarbures par nos isolats dans les sols contaminés par 10 % de pétrole et de diesel, des échantillons du sol de chaque microcosme ont été prélevé à des intervalles de temps de 0, 15, 30, 60 et 90 jours de l'incubation pour doser les hydrocarbures totaux résiduels. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 53 et 54.

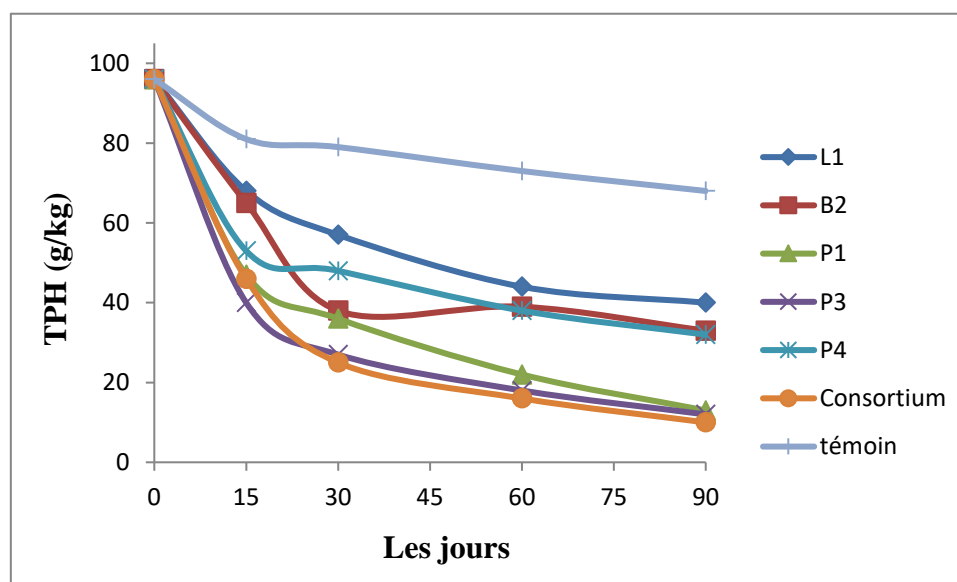


Figure 53 : La dégradation des hydrocarbures totaux par l'introduction des isolats L1, B2, P1, P3, P4 et le consortium dans les sols pollués par le pétrole.

L'accélération de la décontamination des sols pollués due à la dégradation des hydrocarbures par les isolats inoculés est apparue dès les premiers jours de l'incubation. Au début de l'incubation, la concentration des hydrocarbures totaux est de 96 g/kg dans les sols contaminés par le pétrole et de 102 g/kg dans les sols contaminés par le diesel. La bioaugmentation par l'introduction de nos isolats dans les sols contaminés a entraîné des diminutions de la concentration des hydrocarbures totaux jusqu'à 40, 33, 13, 12, 32 et 10 g/kg dans les sols contaminés par le pétrole et 42, 47, 34, 36, 46 et 20 g/kg dans les sols contaminés par le diesel respectivement pour les isolats L1, B2, P1, P3, P4 et le consortium.

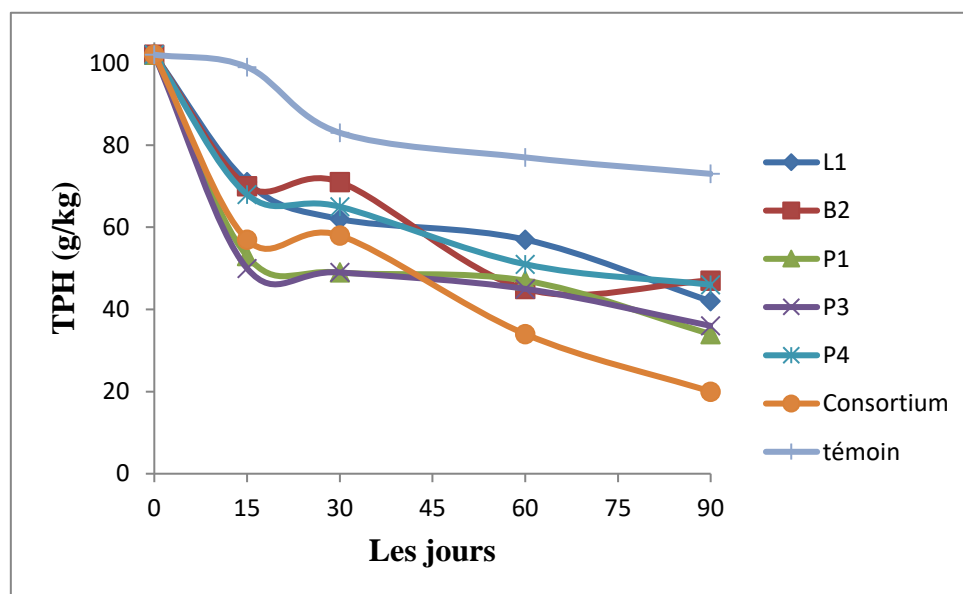


Figure 54 : La dégradation des hydrocarbures totaux par l'introduction des isolats L1, B2, P1, P3, P4 et le consortium dans les sols pollués par le diesel.

II.1.5.3. Les tests de germination :

Pour évaluer l'effet de la bioremédiation des sols contaminés par le pétrole et le diesel par nos isolats et le consortium, des tests de germination de blé dur (*Triticum durum* Desf.) ont été étudiés en mesurant le taux de germination, La longueur racinaire et l'indice de germination.

II.1.5.3.1. Le taux de germination :

La germination des graines est un indicateur de la qualité biologique du sol. Elle est estimée par le calcul du taux de germination.

Les résultats exprimés dans la figure 55 montrent les changements des taux de germination des graines conduites dans les sols contaminés et non contaminés par le pétrole. Dans le milieu non contaminé le taux de germination est de (96.67 %), ce taux chute rigoureusement dans le sol contaminé (23.33 %), une augmentation remarquable des taux est observée chez les graines mise dans les sols traités par les isolats L1, B2, P1, P3, P4 et le consortium (60, 80, 90, 90, 76 et 93.33 %).

L'analyse statistique révèle un effet significatif des isolats étudiés sur le taux de germination de blé dans les sols contaminés par le pétrole ($p < 0.005$). Selon le test de Newman-Keuls ($P = 5\%$) (Tableau 11).

Tableau 11 : L'analyse de la variance ANOVA des taux de germination des graines de *Triticum durum* Desf. dans les sols contaminés par le pétrole.

Effet	DDL	Test F	Probabilité
Isolats	7	26.77	0.000

Les taux de germination des graines semées dans les sols contaminés par le pétrole traités par les isolats et le consortium est hautement significatif par rapport au sol contaminé non traité. Par ailleurs, à l'exception de l'isolat L1 aucune déférence significative des taux de germination n'est observée par rapport au témoin non contaminé (annexe 8).

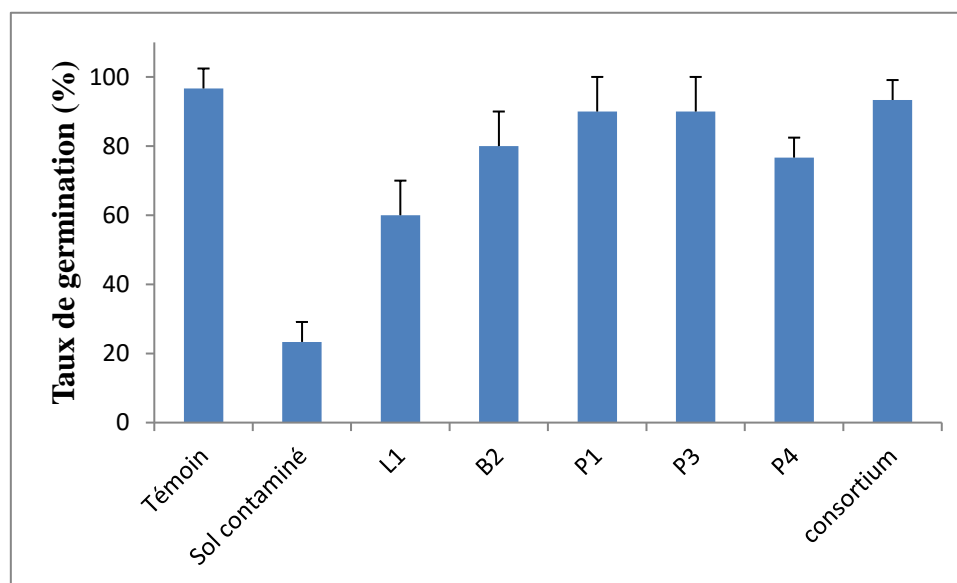


Figure 55 : Le taux de germination des graines de blé dans les sols contaminés par le pétrole non traités et traités par les isolats et le consortium (Témoin : sol non contaminé)

Les résultats illustrés dans la figure 56 montrent une chute de taux de germination dans le sol contaminé par le diesel non traité (6.67 %) par rapport au témoin. Cette diminution est moins rigoureuse dans les sols contaminés traités par les isolats L1, B2, P1, P3, P4 et le consortium avec des taux de germination de 26.67, 46.67, 66.67, 50, 40 et 70 % respectivement.

L'analyse statistique révèle un effet significatif des isolats étudiés sur le taux de germination de blé dans les sols contaminés par le diesel ($p < 0.005$) (Tableau 12).

Tableau 12 : L'analyse de la variance ANOVA des taux de germination des graines de *Triticum durum* Desf. dans les sols contaminés par le diesel.

Effet	DDL	Test F	Probabilité
Isolats	7	26.17	0.000

Le test de Newman-Keuls ($P=5\%$) indique une augmentation significative des taux de germination des graines dans les sols contaminés traités par les isolats L1, B2, P1, P3, P4 et le consortium en comparant avec les sols contaminés non traités (annexe 9).

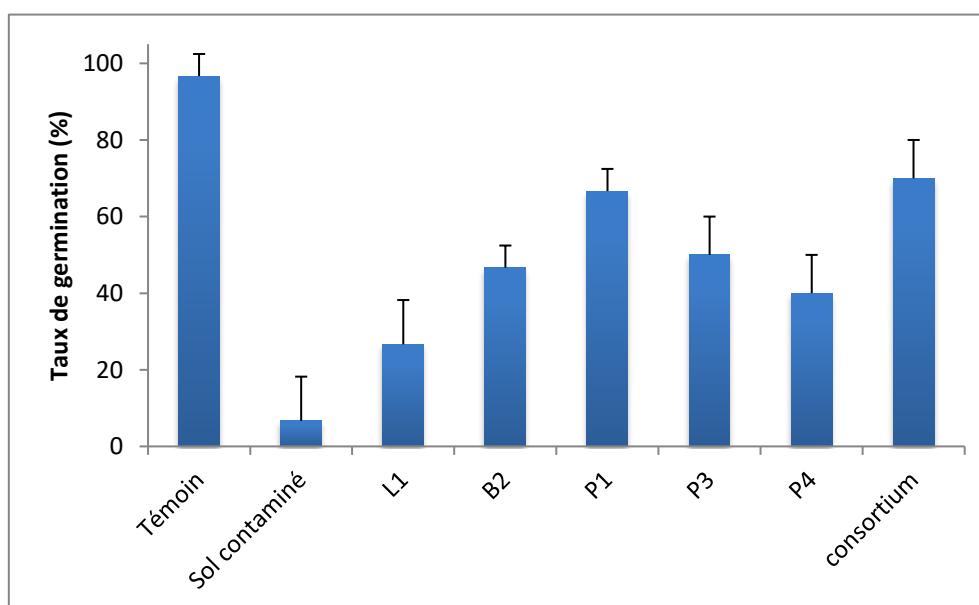


Figure 56 : Le taux de germination des graines de blé dans les sols contaminés par le diesel non traités et traités par les isolats et le consortium (Témoin : sol non contaminé)

II.1.5.3.2. La longueur racinaire :

La longueur racinaire est de 46.67 mm chez les graines germées dans le sol témoin non contaminé, du même dans les sols contaminés traités par les l'isolat P3 et le consortium, elle est de l'ordre de 44 mm et de 44.67 mm respectivement (figure 57).

L'analyse statistique révèle un effet significatif des isolats étudiés sur la longueur racinaire des graines de blé germées dans les sols contaminés par le pétrole ($p < 0.005$) (tableau 13).

Tableau 13 : L'analyse de la variance ANOVA de la longueur racinaire des graines de *Triticum durum* Desf. dans les sols contaminés par le pétrole.

Effet	DDL	Test F	Probabilité
Isolats	7	148.98	0.000

La comparaison des moyennes d'après le test de Newman-Keuls ($P=5\%$) montre des différences significatives entre la longueur racinaire de témoin contaminé non traité et des sols contaminés traités par les isolats et le consortium (annexe 10).

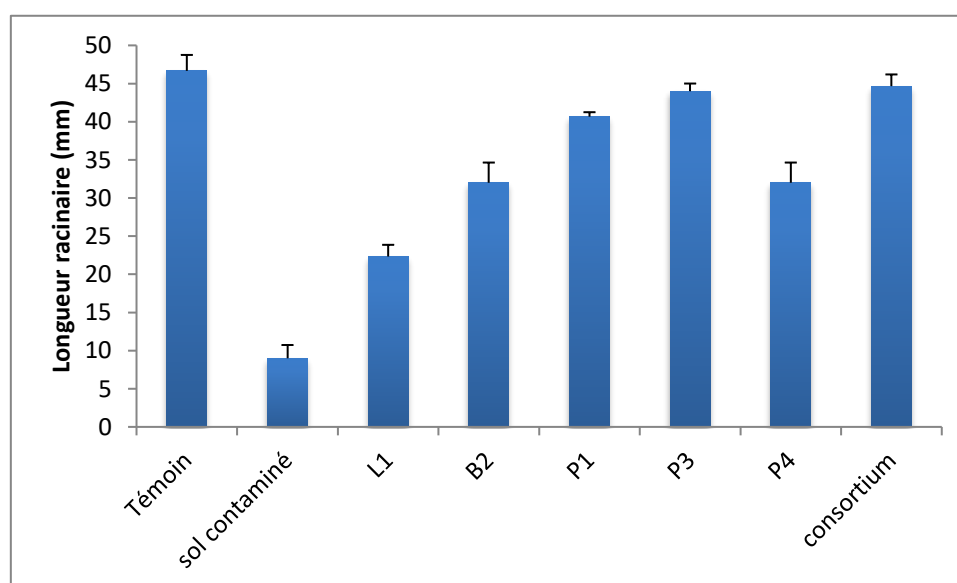


Figure 57 : La longueur racinaire des plantules de blé dans les sols contaminés par le pétrole non traités et traités par les isolats et le consortium (Témoin : sol non contaminé).

La figure 58 relative à la variation de la longueur racinaire des graines germées dans les sols étudiés montre une fluctuation de ce paramètre en fonction de milieu utilisé, en effet, les racines les plus longues sont observées chez les graines germées dans le sol témoin (46.67 mm), par contre la plus faible chez les graines germées dans le sol contaminé par le diesel non traité (0,67 mm). Dans les sols traités par les isolats L1, B2, P1, P3, P4 et le consortium les longueurs racinaires sont respectivement 3.67, 9, 16, 11.33, 9 et 21.33mm

L'analyse statistique révèle un effet significatif des isolats étudiés sur la longueur racinaire des graines de blé germées dans les sols contaminés par le diesel ($p < 0.005$) (tableau 14).

Tableau 14 : L'analyse de la variance ANOVA la longueur racinaire des graines de *Triticum durum* Desf. dans les sols contaminés par le diesel.

Effet	DDL	Test F	Probabilité
Isolats	7	474.63	0.000

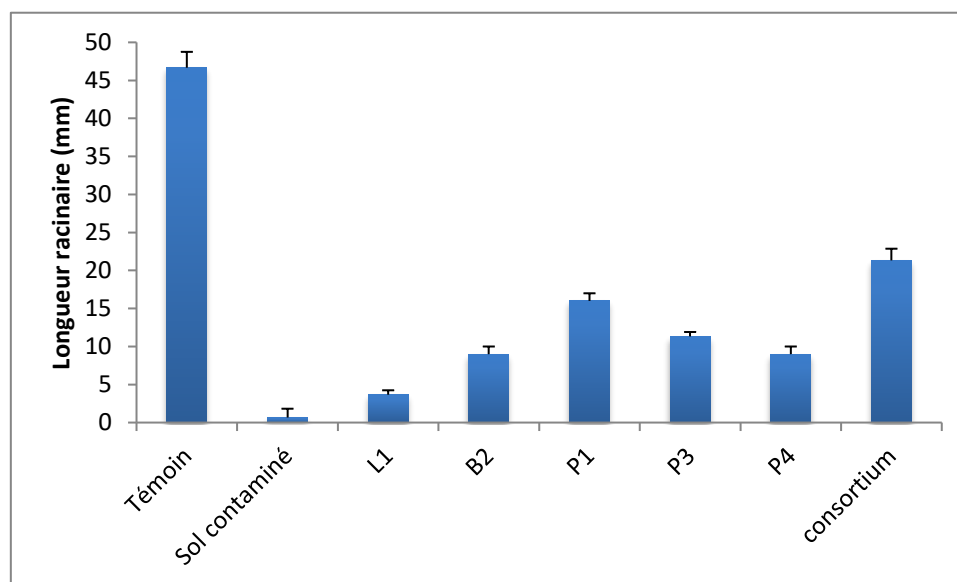


Figure 58 : La longueur racinaire des plantules de blé dans les sols contaminé par le diesel non traités et traités par les isolats et le consortium (Témoin : sol non contaminé)

D'après le test de Newman-keuls ($P=5\%$), il existe une différence significative entre la longueur racinaire des graines germées dans les sols contaminés traités par les isolats L1,

B2, P1, P3, P4 et le consortium et celle des graines germées dans le sol non contaminé. Une augmentation significative de la longueur racinaire est notée chez les graines des sols traités par rapports aux sols non traité (annexe 11).

II.1.5.3.3. L'indice de germination :

L'indice de germination permet l'évaluation de la capacité de germination des graines de blé dans les différents sols les figures 59 et 60. Le sol non contaminé (témoin) présente la valeur la plus élevée 1. En comparant avec ce dernier la capacité de germination la plus proche est enregistrée dans les sols contaminés par le pétrole traités par le consortium (0.92), suivi par celle traités par les isolats P1 et P3 (0.88 et 0.81 respectivement), avec une capacité de germination moyenne chez les graines conduite dans les sols traité par l'isolat B2 (0.56) et P4 (0.54). Tandis que, celle enregistrés dans le sol contaminé par le pétrole reste la plus faible (0.04).

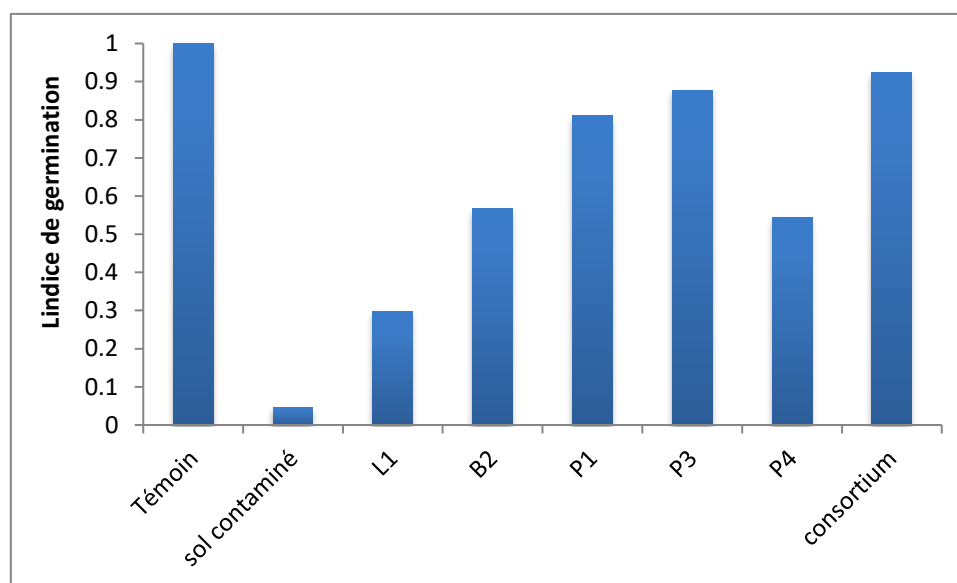


Figure 59: L'indice de germination des graines de blé cultivées dans les sols contaminé par le pétrole non traités et traités par les isolats et le consortium (Témoin : sol non contaminé)

En ce qui concerne le diesel, la capacité de germination traduite par l'indice de germination demeure faible dans tous les sols. Néanmoins, les graines cultivées dans les sols contaminés traités par les L1, B2, P1, P3, P4 et le consortium présentent des capacités plus

importantes (0.02, 0.09, 0.23, 0.12, 0.07 et 0.33) en comparant avec celles cultivées dans les sols contaminés non traités (0,001).

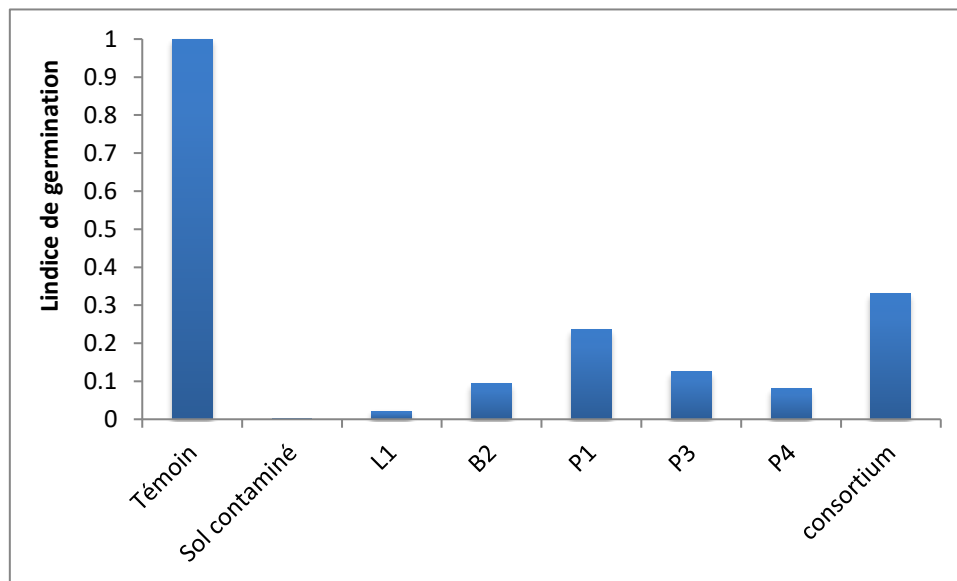


Figure 60 : L'indice de germination des graines de blé cultivées dans les sols contaminé par le diesel non traités et traités par les isolats et le consortium (Témoin : sol non contaminé)

II.1.6. L'amélioration de pouvoir de dégradation des isolats par la mutagénèse :

II.1.6.1. L'effet de l'exposition des souches étudiées aux UV :

Le protocole de mutagénèse consiste à irradier par l'ultraviolette les cellules des trois souches L1, B2 et P4 dans une chambre UV. Les temps d'exposition aux UV sont fixés (0sec, 30sec, 1min, 5min, 10min et 15min). Afin d'apprécier l'effet des UV, les cellules survivantes sont dénombrées pour déterminer le pourcentage de survie.

Les pourcentages des cellules survivantes après l'exposition aux UV pour les trois isolats L1, B2 et P4 sont présentés par la courbe de survie dans la figure 61.

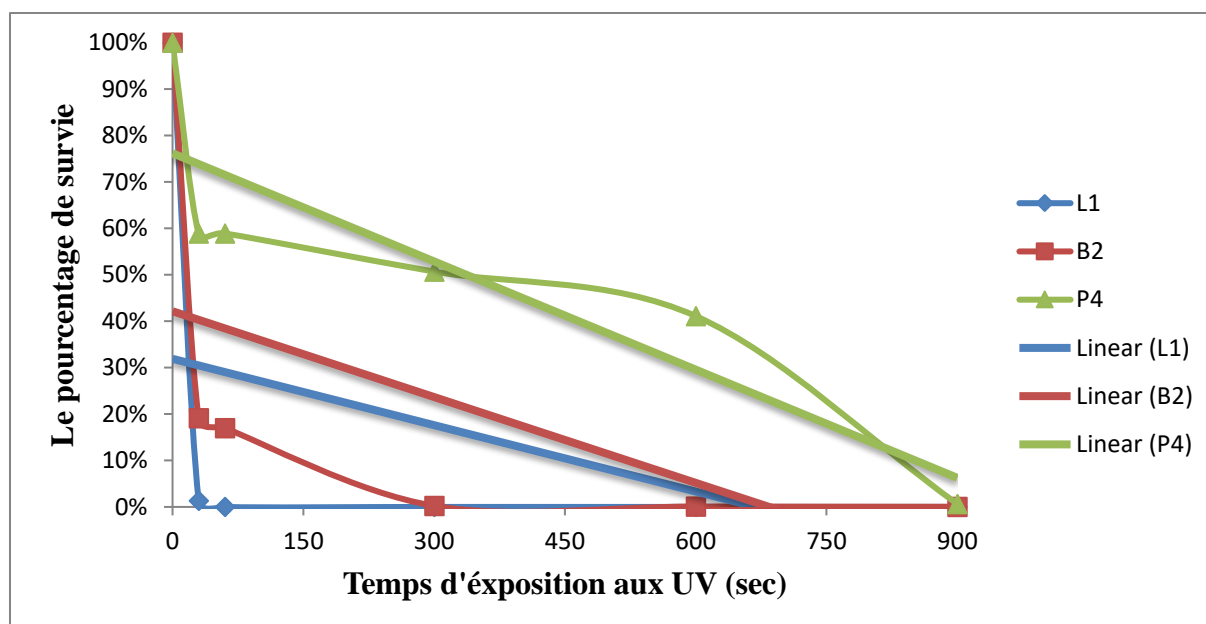


Figure 61 : La courbe de survie après l'exposition aux UV des isolats L1, B2 et P4.

D'après les résultats obtenus, le pourcentage des cellules survivantes dans les cultures de 10^8 UFC/ml (100 % de survie) a été réduit par l'effet des UV, il arrive jusqu'à 1 % de survie après ; 30 secs d'exposition aux UV pour la souche L1, 60 secs d'exposition aux UV pour la souche B2 et 600 secs d'exposition pour la souche P4.

II.1.6.2. Sélection de mutants :

Après irradiation par l'exposition aux UV, les colonies survivantes sont sélectionnées selon l'aspect macroscopique (taille, forme et couleur déférente). Le nombre des mutants sélectionnés pour le test de biodégradation de pétrole et de diesel est ; trois mutants pour la souche L1, deux mutants pour les deux souches B2 et P4.

II.1.6.3. La biodégradation des hydrocarbures par les mutants sélectionnés (la méthode gravimétrique) :

Les mutants sélectionnés ont été inoculés dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100ml de milieu BH liquide additionné par 2 % de pétrole ou de diesel. Après une incubation pendant 12 jours, le pétrole et le diesel résiduel est extrait et pesé pour calculer le pourcentage de biodégradation de chaque mutant. Les résultats des pourcentages de biodégradation de pétrole et de diesel par les mutants sélectionnés et par les trois isolats avant mutagénèse sont illustrés par les figures 62 et 63.

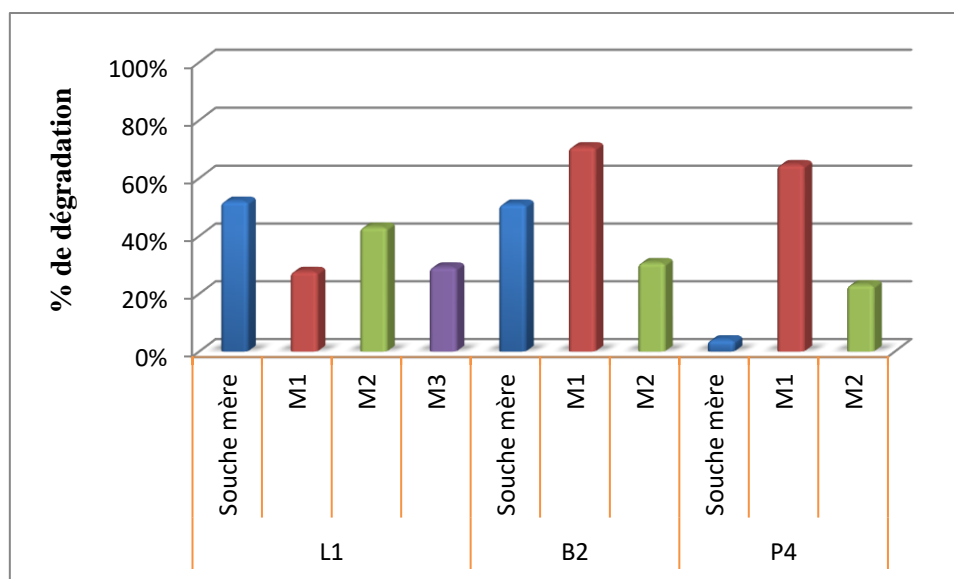


Figure 62: Le pourcentage de dégradation du pétrole par les souches mères L1, B2 et P4 et leurs mutants respectif sélectionnés après la mutagenèse (M).

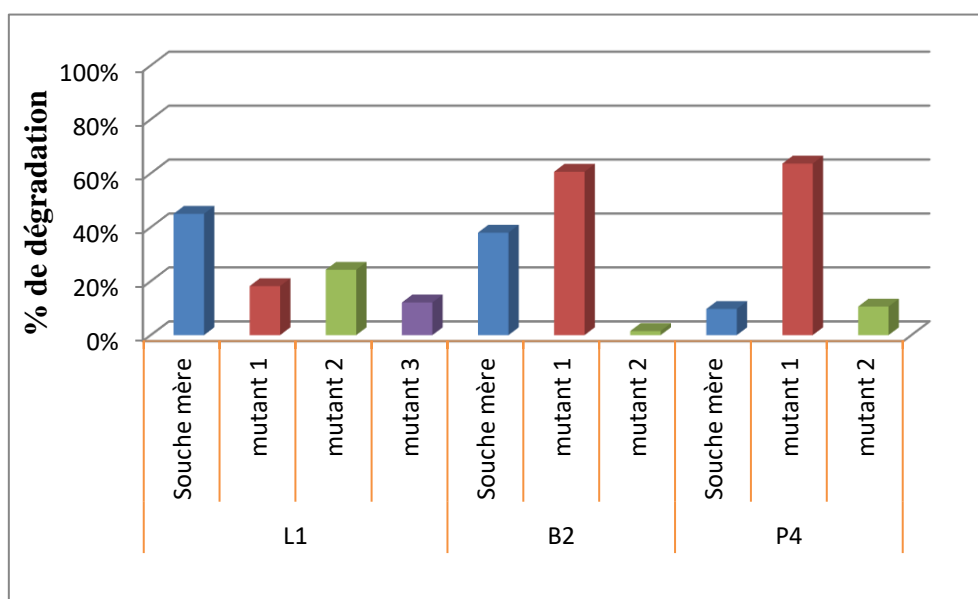


Figure 63 : Le pourcentage de dégradation du diesel par les souches mères L1, B2 et P4 et leurs mutants respectif sélectionnés après la mutagenèse (M).

Les résultats présentés dans la figure 62 montrent que le taux de dégradation de pétrole dans les trois mutants (M1, M2 et M3) de l'isolat L1 (27.69, 43.07 et 29.23% respectivement) est moins important en comparant avec le taux de dégradation chez la souche mère (52%). Chez l'isolat B2, le taux de dégradation le plus important est noté dans le mutant 1 (70.76%) et le faible taux est marqué dans le mutant 2 (30.76%). Cependant, chez l'isolat

P4 le taux de dégradation des mutants a augmenté remarquablement avec des taux de 63.63 % pour le mutant 1 et 10.6 % pour le mutant 2.

En ce qui concerne le diesel (figure 63), le taux de dégradation des souches mères L1, B2 et P4 est de 45, 38 et 9.7% respectivement, après mutagenèse ce taux diminue dans les trois mutants de l'isolat L1 (18.18, 24.24 et 12,12% respectivement). Par contre dans Les isolats B2 et P4 le mutant 1 montre un taux de dégradation (60.6 et 63.63% respectivement) plus important que la souche mère.

II.2. Discussion:

Avec l'accélération du développement économique, l'homme est de plus en plus responsable de la pollution de l'environnement. La diversité des produits d'origine industrielle conduit à une augmentation considérable du nombre de substances totalement étrangères au monde vivant, dites xénobiotiques. Parmi ces polluants, les hydrocarbures pétroliers qui contaminent les sols par les décharges, les installations industrielles, les accidents de transport ou encore par le biais des rejets urbains et industriels ou des pratiques agricoles. Les hydrocarbures peuvent migrer vers les eaux de surface ou souterraines ou pénétrer la chaîne alimentaire via les végétaux pour se retrouver dans les animaux et éventuellement dans l'homme. Lorsque le risque pour les écosystèmes et l'homme est très élevé, la dépollution des sols s'impose. La bioremédiation, c'est-à-dire l'emploi de procédés biologiques pour éliminer les hydrocarbures qui contaminent les sols. Elle consiste à utiliser des microorganismes capables de dégrader ces polluants (**Ron et Rosenberg, 2002 ; Das et Chandran, 2011**).

Dans cette présente étude cinq microorganismes ont été isolées par l'application de la technique d'enrichissement, à partir du sol contaminé de la raffinerie d'Arzew (Oran, Algérie), afin d'étudier la capacité des isolats à dégrader et à utiliser le pétrole et le diesel comme seule source de carbone et d'énergie. La teneur en hydrocarbures totaux de l'échantillon de sol (82 g/kg) est largement supérieure aux valeurs fixées par des laboratoires d'analyse ISO/IEC 17025:2005 (100 mg/kg HT, 50 mg/kg HAP) (**Gabet, 2004**). Ce résultat confirme bien la pollution de ce sol par les hydrocarbures qui peut être attribuée à l'historique de site contaminé.

L'identification morphologique et biochimique des isolats nous a permis de différencier ; une levure (L1) qui appartient au genre *Candida* et des bactéries qui appartiennent aux genres *Bacillus* (B2) et *Pseudomonas* (P1, P3 et P4). A cet effet, les bactéries (B2, P1, P3 et P4) sélectionnées pour leur capacité à dégrader les hydrocarbures ont fait l'objet d'une identification génétique par le séquençage des gènes codants l'acide ribonucléique ARNr16S et la construction de l'arbre phylogénétique de ces isolats.

Le séquençage du gène codant ARNr 16S offre un outil de choix pour l'identification génétique des bactéries, car cette région persiste très stable et à l'abri des mutations (**Emanuel**

et **Lorrence, 2009**). De nombreuses études ont accordé une importance spéciale à l'identification génétique des bactéries (**Adley et al, 2009; Wu et al, 2006**).

Avec l'accumulation des données indispensables sur ces gènes et leurs publications dans les banques de données, la notion des amorces universelles de la région ADNr 16S est engendrée. Dans ce présent travail, le choix des amorces universelles 27F et 1492R est opté, car lors de la réalisation des analyses bioinformatiques et les simulations *in Silico*, il semble que ces amorces s'hybrident avec la majorité des membres du règne bactérien (**Arzu et al, 2011**). Après l'amplification des gènes codant ARNr16S par la technique PCR, le séquençage des gènes amplifiés a été réalisé et révèle des informations cruciales à propos les quatre bactéries sélectionnées.

Dans un premier temps, une attention particulière est portée sur l'identité des souches sélectionnées. La comparaison des séquences nucléotidiques acquises avec la totalité des gènes séquencés et publiés dans la base de données NCBI, a montré que les isolats appartiennent au genre *Bacillus* (B2) et *Pseudomonas* (P1, P3 et P4). Dans un second temps, l'analyse bioinformatique des données issues du séquençage a indiqué un taux de similitude de 99 % de l'isolat B2 avec *Bacillus* sp. Cependant l'isolat P1 présente un taux de similitude de 100 % avec *Pseudomonas aeruginosa*. Le degré d'homologie des deux isolats P3 et P4 est équitable à 99 % avec la souche de *Pseudomonas putida*

Après la comparaison avec la totalité des séquences nucléotidique indexées dans la base de données NCBI. Les séquences ont été publiées dans cette base de donnée, afin d'avoir des numéros d'accessions. Les numéros d'accession des souches B2, P1, P3 et P4 sont respectivement KY548814, KY548815, KY548816 et KY548817. Différents groupes de micro-organismes ont été isolées à partir des sites contaminés par les hydrocarbures et identifiés, ils sont capables de dégrader les hydrocarbures pétroliers en les utilisant comme seules sources de carbone et d'énergie. **Tabatabaee et Assadi (2013)** ont isolés et identifiés génétiquement une souche de *Bacillus cereus* à partir d'un sol pollué par du pétrole à l'unité de distillation de la raffinerie de Téhéran (Iran). Dans une autre étude réalisée par **Das et Mukherjee (2007)** ont isolés deux souches *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa* à partir d'un échantillon du sol contaminé par le pétrole provenant du Nord-Est de l'Inde. L'isolat de levure utilisé dans l'étude réalisée par **Farag et Soliman (2011)** a été isolé d'une zone polluée par l'huile de moteur du golfe Abou-Qir, à Alexandrie, en Égypte, le séquençage de l'ADN 18S de la levure permet de l'identifier comme *Candida tropicalis*.

La dégradation du pétrole et du diesel est observée par une augmentation significative de la concentration microbienne des cinq souches (L1, B2, P1, P3 et P4) cultivés dans le milieu BH additionné par 2 % d'hydrocarbure. Cependant, le taux de croissance le plus élevé a été observé dans les cultures contenant le pétrole ou le diesel des souches P1, P3 et P4 comparativement aux souches L1 et B2. Les études réalisées par **Xu (2012)** pour évaluer la biodégradation de pétrole brut par les bactéries isolées à partir d'un échantillon du sol contaminé par les hydrocarbures. Les résultats montrent que la concentration des bactéries en présence de pétrole comme source de carbone a augmenté progressivement, à mesure que le temps de bioremédiation progresse. Les résultats obtenus dans cette présente étude se concordent avec les observations de **Rahman et al, (2002b)**; **Kayode-Isola et al, (2008)**; **John et al, (2011)** que les souches *Pseudomonas* sp présentent les plus grandes concentrations bactériennes et les plus grandes capacités à dégrader le pétrole et le diesel.

Les résultats de la dégradation de pétrole et de diesel par les cinq souches évalués par la concentration des hydrocarbures totaux résiduels montrent une utilisation rapide des substances pétrolières. De ces résultats, il était clair que les cinq souches ont la capacité de dégrader et d'utiliser le pétrole et le diesel comme seule source de carbone et d'énergie, puisqu'il y avait également une chute de la concentration des hydrocarbures totaux (TPH) en fonction de temps. La meilleure réduction de la concentration de pétrole et de diesel a été observée pour les souches *Pseudomonas aeruginosa* (P1) et *Pseudomonas putida* (P3) suivis par les souches *Bacillus* sp, *Candida* sp et *Pseudomonas putida* (P4) comparativement au témoin.

Cette constatation est en accord avec les résultats de **Das et Mukherjee (2007)**; **Mandri et Lin (2007)**; **Salam et al, (2011)**; **Bak et al, (2015)**, qui rapportent que plusieurs souches de *Pseudomonas* isolées à partir des sols contaminés, sont capables de pousser et de dégrader les hydrocarbures pétroliers ainsi que de remédier les sols contaminés par le diesel et ou le pétrole. La croissance des souches étudiées dans le milieu BH additionné par 2 % du pétrole et diesel a augmenté progressivement avec une diminution de la TPH tout au long de la période de 12 jours de l'incubation. **Xu et al, (2011)**, **Xu (2012)** et **Ichor et al, (2014)** ont rapporté une corrélation entre les baisses significatives de la concentration de TPH à une augmentation de la biomasse bactérienne indiquant que les microorganismes étaient responsables de la dégradation qui corrobore nos résultats.

La quantification de la charge polluante biodégradable ou non des cultures est déterminée par sa DCO et DBO₅. Une diminution de la DCO et de la DBO₅ a été observée pendant les 12 jours de l'incubation pour les cinq souches en présence de pétrole et de diesel, montrant une minéralisation de la matière organique. Cependant, il semble raisonnable de supposer que le pétrole et le diesel ont été minéralisés lors de l'incubation. En effet comme la DCO et la DBO₅ diminuent, on peut supposer que les hydrocarbures ont été dégradés par les cinq souches.

De plus durant ces expériences, la diminution maximale de DCO et DBO₅ a été observée pour les souches *Pseudomonas aeruginosa* (P1) et *Pseudomonas putida* (P3) en présence de pétrole ou de diesel. Les résultats obtenus par **Singh et Fulekar, (2007) et Zahed et al, (2010)** ont montrés que la diminution de la DCO et DBO₅ est en corrélation avec la diminution de la concentration des hydrocarbures pétroliers résiduels pendant l'incubation. Cette corrélation peut être expliquée par la dégradation et l'utilisation des hydrocarbures par les souches étudiées.

L'utilisation d'hydrocarbures comme substrats pour la croissance microbienne pose des problèmes particuliers aux micro-organismes qui les utilisent comme source de carbone et d'énergie et aux chercheurs dans le domaine de la microbiologie pétrolière. Il existe deux caractéristiques essentielles qui définissent les microorganismes oxydants d'hydrocarbures: les oxygénases liées à la membrane et les mécanismes d'optimisation du contact entre les microorganismes et les hydrocarbures insolubles dans l'eau (**Chikere et al, 2011**). Les biosurfactants jouent un rôle clé dans l'émulsion des hydrocarbures.

L'activité d'émulsification (E₂₄) du biosurfactant produit par les souches étudiées a été mesurée en présence du pétrole et du diesel. D'après les résultats obtenus, l'index d'émulsification (E₂₄) en présence de pétrole et de diesel variait entre 30 et 53% pour les cinq souches. Le diesel était le substrat le plus approprié pour les souches *Pseudomonas aeruginosa* (P1) et *Pseudomonas putida* (P3 et P4) avec un E₂₄ maximum de 53, 53 et 50% respectivement. Les résultats obtenus par **Carlos et al, (2011)** ont montré que l'utilisation des biosurfactants rhamnolipidiques produites par la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925 pour la dégradation des alcanes a amélioré significativement leur biodégradation.

Le potentiel de biodégradation de pétrole et de diesel par la méthode gravimétrique indique que les cinq souches ont la capacité d'utiliser le pétrole et le diesel comme source nutritive. Le pourcentage de dégradation étaient plus élevés pour les souches *Candida* sp (L1), *Bacillus* sp (B2), *Pseudomonas aeruginosa* (P1) et *Pseudomonas putida* (P3).

La dégradation du pétrole et du diesel pour plusieurs espèces fongiques et bactériennes a été analysée, **Mandri et Lin, (2007)** ont observé que le pourcentage de dégradation du pétrole par les souches : *Acinetobacterium calcoaceticum*, *Flavobacterium* sp et de *Pseudomonas aeruginosa* isolées des sols contaminés, recueillis auprès d'ENGEN, Amanzimtoti, Afrique du Sud, étaient de 84, 60 et 71%, respectivement, après 28 jours d'incubation. D'autres travaux réalisés par **Chithra et Hema, (2014)** utilisant *Pseudomonas* sp. qui dégrade le pétrole mieux que d'autres espèces isolées avec le pourcentage le plus élevé de dégradation de 92.3%, après 25 jours d'incubation, suivis par 83.7% de dégradation par la souche *Bacillus* et 35,5% de dégradation par les espèces de *Micrococcus*.

Dans la présente étude, les deux souches *Pseudomonas aeruginosa* (P1) et *Pseudomonas putida* (P3) se sont révélés être les meilleurs dégradants des hydrocarbures que les autres souches isolées. Les résultats de l'analyse de la chromatographie en phase gazeuse montre une dégradation complète en quinze jours d'incubation de quatre dérivés d'hydrocarbures C3, I-C4, 2-3 diméthyl butane et le benzène par la souche *Pseudomonas aeruginosa* (P1) et cinq dérivés C3, I-C4, cyclopentène, éthylbenzène et o.xylène ont été dégradés par la souche *Pseudomonas putida* (P3). Ainsi que la souche *Pseudomonas putida* (P3) a dégradé plus de 80% des produits suivants; I-C5, 2-3diméthylbutane, 2-méthylbutane, benzène et toluène. Le benzène peut être utilisé comme seule source de carbone et d'énergie pour la croissance aérobie par de nombreuses bactéries, en particulier des espèces de *Pseudomonas* (**Weelink et al, 2010**).

Whyte et al, (1997) ont isolé trois bactéries dégradant les hydrocarbures dans des sols arctiques contaminés par le pétrole et ont caractérisé deux souches, identifiées comme *Pseudomonas* sp capables de dégrader les n-alcanes C5 à C12, le toluène et le naphtalène. Les résultats obtenus par l'étude de **Sutton et al, (2011)** indiquent que la capacité de *Pseudomonas* sp. d'utiliser des hydrocarbures comme les seules sources d'énergie et de carbone a été expliquée par la production de biosurfactant lipidique qui augmente la capacité de la biodégradation.

La souche *Bacillus* sp. (B2) a complètement dégradé l'hexane et plus de 80% de C3, I-C4, 2 méthylbutane et le toluène. Les souches Gram-positifs appartenant aux genres *Bacillus* ont été jugés capables d'utiliser le pétrole brut et une large gamme d'hydrocarbures (**Nazina et al, 2002**). Cependant, la souche *Candida* sp. (L1) a dégradé le cyclopentène et le toluène complètement avec une dégradation de plus de 70 % de six hydrocarbures C3, I-C4, 2-méthylbutane, 3-méthylbutane, benzène et éthyle-benzène. Des espèces de *Candida* isolées de l'eau contaminée sont capables de dégrader les composés pétroliers (**Das et Chandran, 2011**), la souche de *Candida tropicalis* isolée de la zone polluée du golfe Abou-Qir (Alexandrie, Égypte) a dégradé 78 % de naphthalène et 49,9 % phénol (**Farag et Soliman, 2011**).

L'introduction des microorganismes dégradants les hydrocarbures serait essentielle pour éliminer de manière efficace tous les hydrocarbures dans un mélange complexe de pétrole (**Atlas, 1977**). La survie des microorganismes dans les hydrocarbures pétroliers après leur inoculation est un facteur décisif clé dans le taux de biodégradation des hydrocarbures dans le sol ou en phase liquide (**Ramos et al, 1991**). Étant donné que toutes les microorganismes de la présente étude ont été isolées à partir d'un échantillon de sol contaminé par le pétrole, elles ont survécu et ont adopté très facilement le sol artificiellement contaminé par le pétrole ou le diesel, comme l'ont également indiqué d'autres auteurs (**Sugiura et al, 1997; Rahman et al, 2003**).

Ceci était évident à partir de l'augmentation dans la population de *Candida* sp (L1), *Bacillus* sp (B2), *Pseudomonas aeruginosa* (P1), *Pseudomonas putida* (P3 et P4) et le consortium dans le sol contaminé par rapport au début de l'incubation. Cependant, le taux de croissance plus élevé des trois souches de *Pseudomonas* (P1, P3 et P4) par rapport aux autres souches de *Candida* sp (L1) et *Bacillus* sp (B2) pourrait être lié à une répartition et une utilisation plus élevée des hydrocarbures pétroliers par les souches de *Pseudomonas* (P1, P3 et P4).

Le consortium composé des cinq souches étudiées a montré la plus grande concentration de cellules. Ceci peut être expliqué du fait que les micro-organismes en culture simple peuvent métaboliser une gamme limitée de substrats, tandis qu'en culture mixte, les souches microbiennes ont un cométabolisme plus large et attribue une plus grande capacité de dégradation des mélanges complexes d'hydrocarbures (**Mueller et al, 1997**).

Le taux de dégradation le plus élevé de TPH dans les sols contaminés par le pétrole et le diesel a été observé par les deux souches *Pseudomonas aeruginosa* (P1) et *Pseudomonas putida* (P3) dans les quinze premiers jours d'incubation. Au cours de cette période, plus de 50 % de la TPH a été dégradée, avec une diminution légère et continue de la dégradation jusqu'à la fin de l'expérience (90 jours). Au début, les souches étudiées dégradant le pétrole et le diesel ont été stimulés par des sources d'hydrocarbures labiles (probablement des hydrocarbures linéaires et à chaîne ouverte) qui ont induit un pourcentage élevé de dégradation. À mesure que ces formes diminuaient, les populations microbiennes devaient utiliser les hydrocarbures plus récalcitrants (probablement les hydrocarbures à masse moléculaire plus élevée) moins efficacement. Avec la diminution des sources de carbone labiles, les éléments nutritifs étaient très probablement limités dans le soutien de la croissance microbienne (**Bento et al, 2005**).

Des études sur la biodégradation des sols contaminés par des hydrocarbures dans différentes conditions ont été menées en utilisant principalement des bactéries gram négatives. Par exemple, l'application de la culture pure de *Pseudomonas putida* ZWL73 dans le sol contaminé par le 4-chloronitobenzène (4CNB) a accéléré la dégradation du 4CNB dans les microcosmes du sol (**Niu et al, 2009**). **Stallwood et al, (2005)** ont utilisé *Pseudomonas* sp. ST41 dans des études de microcosme de bioremédiation à basse température des sols contaminés par de le pétrole. Les expériences de microcosmes ont montré que, l'addition de *Pseudomonas* sp. ST41 a augmenté le taux de dégradation du pétrole, par rapport aux témoins. Dans une autre étude, **Ueno et al, (2006)** ont vérifié la dégradation des n-alcanes de pétrole et de diesel par la souche de *Pseudomonas aeruginosa* WatG dans les microcosmes du sol. Le niveau total de dégradation des hydrocarbures pétroliers (TPH) dans deux échantillons de bioaugmentation était de 51 % et de 46 % pendant 1 semaine dans les microcosmes du sol stérilisés et non stérilisés.

La plus grande diminution de TPH dans les sols contaminés par le pétrole et le diesel après 90 jours d'incubation a été remarquée par la culture mixte des cinq souches de *Candida* sp (L1), *Bacillus* sp (B2), *Pseudomonas aeruginosa* (P1) et *Pseudomonas putida* (P3 et P4), par rapport aux ces souches inoculées séparément dans les sols contaminés. Dans de nombreux cas, les consortiums étaient plus efficaces que les souches simples par le fait que les intermédiaires d'une voie catabolique d'une souche pourraient être encore dégradés par d'autres souches possédant une voie catabolique appropriée (**Heinaru et al, 2005**).

De nombreux rapports récents ont montré un succès dans l'élimination des hydrocarbures dans des sols utilisant des consortiums microbiens. **Jacques *et al*, (2008)** ont évalué la capacité d'un consortium microbien défini de *Mycobacterium fortuitum*, *Bacillus cereus*, *Microbacterium sp.*, *Gordonia polyisoprenivorans*, de bactéries de *Microbacteriaceae* et de *Fusarium oxysporum* pour dégrader et minéraliser l'antracène, le phénanthrène et le pyrène dans le sol. Chaque composé a été dégradé en moyenne de 96 % à 99 % des doses initiales (250, 500 et 1000 mg/kg) par ce consortium dans les 70 jours. L'observation principale était que le consortium microbien était plus efficace par rapport aux isolats bactériens et fongiques inoculés séparément dans le sol.

De même, **Yu *et al*, (2005)** ont signalé l'efficacité élevée de la dégradation des hydrocarbures par un consortium dans les sédiments contaminés. Ils ont étudié la biodégradation d'un mélange de fluorène, de phénanthrène et de pyrène par un consortium bactérien composé de trois souches de *Rhodococcus sp.*, *Acinetobacter sp.* et *Pseudomonas sp.* Leurs résultats ont montré que l'ajout de ce consortium dans les sédiments a considérablement amélioré l'efficacité de la biodégradation du fluorène et du phénanthrène mais pas celle du pyrène. Après 2 semaines d'incubation, le taux d'élimination a atteint les valeurs de 97 % et 99 % pour le phénanthrène et le fluorène, respectivement. Cependant, seulement environ 10 % du pyrène a été dégradé. La dégradation totale de tous les hydrocarbures a été réalisée après 4 semaines.

Des cultures mixtes de bactéries dégradant les hydrocarbures ont également été appliquées pour remédier les sols contaminés par le diesel, le pétrole brut et l'huile de moteur (**Ghazali *et al*, 2004**). Dans ces études, deux consortiums (consortium 1 et 2) ont été réalisés en mélangeant des cultures bactériennes pures isolées à partir de sols contaminés par des hydrocarbures. Les auteurs ont prouvé que le deuxième consortium qui est consisté principalement en *Bacillus* et *Pseudomonas sp.* est plus efficace pour éliminer les alcanes à chaîne moyenne et longue dans les sols contaminés par le diesel et l'huile de moteur.

Le présent travail nous a permis de déduire que la présence de pétrole et de diesel dans les sols artificiellement contaminés inhibe la germination des graines de blé dur (*Triticum durum* Desf.) et réduit leur croissance au niveau de la longueur racinaire. La germination et le développement des plantes cultivées sont liés à la structure chimique des carburants testés, leur concentration dans le sol et l'espèce elle-même (**Chaineau *et al*, 1996**).

La germination des graines et la longueur racinaire ont été affectées d'une manière significative par le pétrole et le diesel à une concentration de 10 % par rapport au sol témoin. Le pétrole et le diesel semblent être toxiques pour le blé. L'effet inhibiteur de diesel sur l'émergence de blé dur a été spectaculaire, il s'est manifesté essentiellement par un retard de germination et la pourriture de la majorité des graines. L'explication la plus probable est sa propriété physique hydrophobe ; le film de carburant diesel qui se forme autour des graines peut agir comme une barrière physique, réduisant à la fois le transfert de l'eau et de l'oxygène assimilés par les graines. Cela inhibe la réponse de la germination et explique le retard de levée, de croissance et de développement des plantules (Adam et Duncan, 2002). Une autre explication peut être envisagée, du fait que la fraction volatile du carburant diesel peut donner lieu à un effet néfaste sur le pourcentage de germination (Adam et Duncan, 2002).

Saterbak *et al*, (1999) ont étudié l'effet des sols contaminés par des hydrocarbures (5000 à 30000 mg/kg d'hydrocarbures pétroliers totaux) sur la germination, la longueur des racines et la croissance de maïs (*Zea mays* var 'Favorite'), de laitue (*Lactuca sativa* var 'Great Lakes'), de moutarde (*Brassica rapa* var 'Curé géant du Sud') et de blé (*Triticum aestivum* var 'Taylor'). Ils ont constaté que la germination de blé et de maïs sur des sols contaminés était semblable au contrôle. D'après cette étude, la germination des graines de moutarde a été réduite à des concentrations d'asphaltène de 200 à 1000 mg/kg de sol tandis que la germination des graines de blé a été réduite à des concentrations d'asphaltène de 4000 à 7000 mg/kg de sol. Ce résultat confirme que la moutarde est plus sensible que le blé.

La moutarde est utilisée dans l'étude de plusieurs processus impliqués dans la phytoremédiation (Kümar *et al*, 1995), elle constitue une alternative prometteuse pour la dépollution des sols et a fait l'objet d'un certain nombre d'études (Krämer et Chardonens, 2001; Lasat, 2002; McGrath et Zhao, 2003; Do Nascimento et Xing, 2006; Smits et Freeman, 2006). Il est surprenant que les résultats de Saterbak *et al*, (1999) ne soit pas en concordance avec nos résultats, ce qui a montré une sensibilité significative de la germination de blé dans les sols contaminés par le pétrole et le diesel par rapport aux sols non contaminés.

La germination des graines de blé dans les sols contaminés par le pétrole et le diesel après leur bioremédiation par les souches *Candida sp* (L1), *Bacillus sp* (B2), *Pseudomonas aeruginosa* (P1), *Pseudomonas putida* (P3 et P4) et le consortium étaient meilleures et significative par rapport aux sols contaminés non remédiés. L'utilisation des microorganismes dans la bioremédiation des sols pollués a peut-être permis un meilleur contact des graines

avec l'eau en émulsifiant le pétrole et le diesel. Elle a pu aussi engendrer la protection des embryons la plus efficace contre l'impact toxique du pétrole et du diesel par leurs dégradations.

En outre, il a été observé que le processus de bioaugmentation par les souches étudiées détoxifiait la propriété phytotoxique des sols contaminés et restaurait sa fertilité perdue. Plusieurs études ont rapporté que la bioremédiation des sols contaminés par les hydrocarbures stimule la germination des graines. **Millioli et al, (2009)** ont observé que la bioremédiation a augmenté l'indice de germination atteignant une valeur supérieure au sol naturel et elle a diminué la toxicité aiguë de *Lactuca sativa* améliorant la fertilité du sol. **Graj et al, (2009)** ont appliqué le consortium M10 qui contient les souches *Rhodococcus equi*, *Betaproteobacterium*, *Enterobacter* sp., *Acinetobacter calcoaceticus*, *Comamonas* sp., et *Pseudomonas alcaligenes* pour la bioaugmentation des sols contaminés par le diesel. Ils ont constaté que le consortium M10 a augmenté l'indice de germination à 6000 mg/kg de diesel dans le cas de la moutarde indienne et la luzerne.

La longueur racinaire dans les sols contaminés et inoculés avec les souches étudiées et le consortium était également plus élevée et significativement supérieure à celles germés dans les sols contaminés non inoculés. Il nous a semblé qu'avec l'application de l'inoculum, un déclin de l'IG et la longueur des racines des plantes exposées au sol contaminé a été compensé par des interactions microbiennes positives (**Huang et al, 2004**).

Afin d'améliorer le potentiel de dégradation de pétrole et de diesel, les souches de *Candida* sp (L1), *Bacillus* sp (B2) *Pseudomonas putida* (P4) ont été traités par le rayonnement UV. Les résultats indiquent que, la mutagenèse par l'exposition à l'UV a mené des augmentations de pourcentages de dégradation de pétrole et de diesel pour les mutants M1 de *Bacillus* sp (B2), M1 et M2 de *Pseudomonas putida* (P4), et des diminutions pour les mutants M1, M2 et M3 de *Candida* sp (L1) et M2 de *Bacillus* sp (B2). L'amélioration génétique par mutagenèse des souches étudiées dégradantes les hydrocarbures a rapporté des mutants présentant une capacité plus importante ou réduite de dégradation de pétrole et de diesel.

La biodégradation des hydrocarbures a été largement étudiée et de nombreuses souches microbiennes ont été isolées pour leur capacité à métaboliser les hydrocarbures avec des taux de dégradation variables. La pré-exposition d'une communauté microbienne aux hydrocarbures, soit à partir de sources anthropiques, soit à partir de sources naturelles est

importante pour déterminer le taux de dégradation des hydrocarbures. Ce phénomène, qui entraîne une augmentation du potentiel d'oxydation des hydrocarbures de la communauté sur la pré-exposition à de fortes doses de contaminants, est connu sous le nom d'adaptation (**Haritash et Kaushik, 2009**). L'amplification, par l'enrichissement sélectif, le transfert et la mutation de gènes ont été définis comme trois mécanismes d'adaptation des communautés microbiennes aux contaminants chimiques (**Spain et van Veld, 1983; Barkay et Pritchard, 1988 ; Leahy et Colwell, 1990**).

Plusieurs études ont rapporté une adaptation et une augmentation du taux de dégradation des hydrocarbures. **Caparello et La Rock, (1975)** ont étudié la minéralisation de l'hexadécane et la dégradation des mélanges de n-alcanes par des bactéries dans plusieurs échantillons d'eau de surface et de sable et ont conclu que les zones à charges accrues d'hydrocarbures présentaient une activité oxydante hydrocarbonée plus élevée. **Saylor et al, (1983)** ont montré que l'exposition des sédiments d'eau douce à une huile synthétique a accéléré le taux de minéralisation des hydrocarbures polyaromatiques (HAP).

II.3. Conclusion et perspectives :

Les hydrocarbures pétroliers se présentent comme un mélange complexe d'hydrocarbures. Leur dégradation implique une microflore diversifiée du fait de la spécificité des fonctions dégradatives. Ils sont caractérisés par l'hydrophobicité de ses molécules très peu solubles dans l'eau, ce qui réduit leur biodisponibilité.

Cette étude a été menée sur les microorganismes présents dans les sols de la raffinerie de la région d'Arzew, Algérie. Ces sols sont soumis depuis plusieurs décennies à une contamination en hydrocarbures chronique et élevée. Ils constituent ainsi un modèle de choix pour comprendre les mécanismes microbiens impliqués dans la réponse à la présence d'hydrocarbures. En effet, ces populations bactériennes sont supposées posséder les systèmes enzymatiques permettant de répondre à la contamination. Notre objectif consistait à étudier et évaluer la capacité de biodégradation des hydrocarbures pétroliers (pétrole et diesel) à l'aide de microorganismes isolés à partir de la station de raffinerie d'Arzew.

Dans la première partie de ce travail, cinq souches microbiennes ont été isolées à partir du sol contaminé par les hydrocarbures provenant de la raffinerie d'Arzew. Elles ont été identifiées, après examen des colonies, des cellules, de leurs réponses aux tests biochimiques et génétiquement par le séquençage du gène codant la sous unité ARNr16S comme étant *Candida* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas aeruginosa* et deux souches de *Pseudomonas putida*.

La deuxième partie ayant porté sur le suivi de la biodégradation par la cinétique de croissance des cinq souches microbiennes identifiées dans le milieu BH liquide contenant 2 % de pétrole ou de diesel. La cinétique de croissance a révélé que les souches *Pseudomonas aeruginosa* (P1) et *Pseudomonas putida* (P3) sont les plus dégradantes des hydrocarbures et donc les plus performantes pour la bioremédiation.

Afin de mesurer la capacité de dégradation des microorganismes sélectionnés en réponse à l'effet polluant ou stimulant de l'hydrocarbure, plusieurs méthodes ont été utilisées. Le dosage des hydrocarbures totaux résiduels, la détermination de la demande chimique en oxygène (DCO), la détermination de la demande biochimique en oxygène (DBO₅), l'index d'émulsification (E₂₄), la détermination de pourcentage de biodégradation par la méthode gravimétrique et l'analyse de la biodégradation de l'isomérat par chromatographie en phase gazeuse. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence que les cinq souches isolés

ont la capacité de dégrader et d'utiliser le pétrole et le diesel comme seule source de carbone et d'énergie.

Le genre de *Pseudomonas* (P1 et P3) était le principal acteur de cette dégradation, il est le plus connue pour être utilisé dans la biodégradation des hydrocarbures à cause de sa production de biosurfactants, qui vont solubiliser les hydrocarbures hydrophobes adsorbés sur les particules des sols et les rendant, par conséquent, plus disponibles pour les autres bactéries et faciliter, par la suite, leur dégradation.

Dans le but d'appliquer les cinq souches isolées dans la dépollution des sites contaminés par les hydrocarbures. Nous avons réalisé un essai de bioaugmentation d'un sol agricole, artificiellement contaminé avec du pétrole brut et de diesel en introduisant l'inoculum des souches isolées et le consortium (culture mixte). La bioaugmentation est évaluée par le suivi de la concentration microbienne, le dosage des hydrocarbures totaux résiduels et les tests de germination des graines de blé qui sont des indicateurs de la qualité biologique du sol.

Il en ressort que l'introduction des cinq souches et le consortium dans les sols artificiellement contaminés a amélioré la biodégradation du pétrole et du diesel, estimée par la quantité de TPH résidu dans le sol. Le consortium composé des cinq souches étudiées a montré le plus grand effet de dégradation des hydrocarbures. En outre, la bioremédiation des sols contaminés par les souches étudiées a eu un effet significatif sur la germination des graines de blé en comparant avec les sols contaminés non traités.

Dans la dernière partie, une amélioration de pouvoir de dégradation a été effectuée par la mutagenèse qui consiste à irradier à l'aide d'ultraviolette les cellules des trois souches *Candida* sp. (L1), *Bacillus* sp. (B2) et *Pseudomonas putida* (P4) dans une chambre UV. Les résultats obtenus indiquent que la mutagenèse des souches étudiées dégradant les hydrocarbures a rapporté des mutants présentant une capacité plus importante ou réduite de dégradation de pétrole et de diesel.

De ce qui précède, il est assez judicieux que ces souches isolées présentent des capacités potentielles pour la bioremédiation des sites pollués par les hydrocarbures, cette étude fournit un aperçu d'une meilleure compréhension de l'adaptation des bactéries vivant dans des environnements pollués et d'élaborer une solution de mettre en œuvre des bio-stratégies

adéquates à l'avenir pour intervenir, contribuer et améliorer le bon fonctionnement au niveau des sites de traitement biologique des raffineries.

A la base des résultats obtenus précédemment, nous pouvons à la fois tirer quelques recommandations et mesures prioritaires à mettre en avant, et souligner un nombre de perspectives pour la suite de notre étude.

- Une approche moléculaire par le séquençage du gène codant l'ARN 18S pour la souche *Candida* sp., aiderait à déterminer de façon précise l'affiliation de l'espèce microbienne.
- L'identification de l'ensemble des gènes fonctionnels impliqués dans la dégradation des hydrocarbures chez les souches sélectionnées afin de mettre en évidence des mécanismes adaptatifs mis en place par certains microorganismes en réponse à la contamination.
- Il serait intéressant de caractériser les biosurfactants produites par les souches étudiées qui ont un grand pouvoir dans la remobilisation des hydrocarbures et l'accélération de leur biodégradation.
- La microflore indigène de sol sur laquelle survient un déversement constitue l'acteur principal du processus d'atténuation naturelle. C'est la raison pour laquelle, il est important d'essayer d'appliquer au niveau national les microorganismes dégradants les hydrocarbures dans le traitement des sols contaminés par les hydrocarbures pétroliers et d'améliorer l'efficacité du traitement par bioremédiation.

Références Bibliographiques

- Adam G. et Duncan H. (2002).** Influence of diesel fuel on seed germination. *Environ Pollut.* 120(2): 363-70.
- Adams G.O., Tawari-Fufeyin P. et Igelenyah E. (2014).** Bioremediation of spent oil contaminated soils using poultry litter. *Research Journal in Engineering and Applied Sciences.* 3(2): 124-130
- Adley C., Khalil A., Camila M., Kamila O. et Vijayalakshmi V. (2009).** Design of specific DNA primers to detect the *Bacillus cereus* group species. *IEEE Sensors Applications Symposium.* 9:17-19.
- AFNOR. (1999).** Qualité des sols. Ed. AFNOR, vol. 1 et 2, Paris, pages: 973.
- Agarry Samuel E. et Ogunleye Oladipupo O. (2012).** Box-Behnken design application to study enhanced bioremediation of soil artificially contaminated with spent engine oil using biostimulation strategy. *International Journal of Energy and Environmental Engineering.* 3(31): 1-14
- Al-Sulaimani Y., Al-Wahaibi S. N. et Al-Bahry S.N. (2010).** Experimental investigation of biosurfactants produced by *Bacillus* species and their potential for MEOR in Omani oil field, *In: Proceedings of the SPE EOR Conference at Oil and Gas West Asia 2010 (OGWA '10)*, pp. 378-386, Muscat, Oman.
- Annweiler E., Materna A., Safinowski M., Kappler A., Richnow H. H., Michaelis W. et Meckenstock R.U. (2000).** Anaerobic degradation of 2-methylnaphthalene by a sulfate-reducing enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (12):5329–5333.
- Annweiler E., Michaelis W., et Meckenstock R. U. (2002).** Identical ring cleavage products during anaerobic degradation of naphthalene, 2-methylnaphthalene, and tetralin indicate a new metabolic pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(2):852–858.
- Aouad Linda et Abbouni Bouziane. (2012).** Petroleum-oil biodegradation by *Corynebacterium aquaticum* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from the industrial rejection of the refinery of ARZEW-Algeria. *World Applied Sciences Journal.* 18(8) : 1119-1123.
- Arshad Rubina., Farooq Shafqat. et Shahid Ali Syed. (2012).** Bacterial strain improvement by mutagenesis isolation, characterization and improvement of bacterial strains for enhanced production of penicillin acylase. LAP LAMBERT Academic Publishing, pages: 261.
- Arzu C.C., Nilgun T., Birgul O. et Cumhuri C. (2011).** The genetic diversity of genus *Bacillus* and the related genera revealed by 16S rRNA gene sequences and ARDRA analyses isolated from geothermal regions of Turkey. *Brazilian Journal of Microbiology.* 309-324.
- Atagana H.I. (2008).** Compost bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil inoculated with organic manure. *African Journal of Biotechnology.* 7(10): 1516-1525.
- Atlas R.M. (1981).** Microbial-degradation of petroleum-hydrocarbons— an environmental perspective. *Microbiol Rev.* 45(1):180–209
- Atlas R.M. et Bartha R. (1998).** Microbial ecology: fundamentals and applications. 4th edn. Addison Wesley Longman, New York, pp 556–588
- Atlas R.M. et Bartha R. (1973).** Inhibition by fatty acids of the biodegradation of petroleum. *Antonie van Leeuwenhoek.* 39(1): 257– 271.
- Atlas R.M. (1977).** Stimulated petroleum biodegradation. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 5: 371–386.
- Atlas R.M., et Philp J. (2005).** Bioremediation: applied microbial solutions for real-world environmental cleanup. American Society for Microbiology (ASM) Press, Washington, DC, pp 78–105
- Atlas R. M., (2005).** Handbook of Media for Environmental Microbiology (2 Ed.). *Boca Raton: Taylor & Francis Group*, pages: 664.

- Aubert G. (1978).** Méthodes d'analyses des sols. Ed. CRDP, Marseille, pages: 191
- Auzaias Dominique et Labourdette Jean-Paul. (2010).** Algérie. Petit Futé., pages: 410
- Baek K.H., Yoon B.D., Kim B.H., Cho D.H., Lee I.S., Oh H.M. et Kim H.S. (2007).** Monitoring of microbial diversity and activity during bioremediation of crude OH-contaminated soil with different treatments. *J Microbiol Biotechnol.* 17(1): 67–73.
- Bak Frederik., Lise Bonnichsen., Jørgensen Niels O.G., Mette H. Nicolaisen., et Ole Nybroe. (2015).** The biosurfactant viscosin transiently stimulates n-hexadecane mineralization by a bacterial consortium, *Appl Microbiol Biotechnol.* 99: 1475–1483.
- Balba M.T., Al-Awadhi N. et Al-Daher R. (1998).** Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiological Methods.* 32 : 155–164.
- Bamforth Selina M., et Singleton Ian. (2005).** Review Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *J Chem Technol Biotechnol.* 80:723-736. DOI: 10.1002/jctb.1276
- Bandara U. C., P. D. Yapa et H. Xie. (2011).** Fate and transport of oil in sediment laden marine waters. *Journal of Hydro-Environment Research.* 5(3): 145-156.
- Barkay T. et Pritchard H. (1988).** Adaptation of aquatic microbial communities to pollutant stress. *Microbiol. Sci.* 5:165-169.
- Beens J. et Brinkman U.A.T. (2000).** The role of gas chromatography in compositional analyses in the petroleum industry. *TrAC. Trends in Analytical Chemistry.* 19:260– 275.
- Bento Fatima M., Camargo Flavio A.O., Okeke Benedict C. et Frankenberger W.T. (2005).** Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology.* 96: 1049–1055.
- Bergue Jean-Michel et Mérienne Danielle. (1986).** La pollution des sols par les hydrocarbures. Bull, liaison Labo P. et Ch. 146.Réf: 314: 57-66.
- Bertrand J.C. et Mille G. (1989).** Devenir de la matière organique exogène. Un modèle: les Hydrocarbures. Microorganismes dans les écosystèmes océaniques. Bianchi M., Marty D., Bertrand J.C., Caumette P., Gauthier M.J. et al.éds. Masson publ., Paris: 343-385.
- Bocard Christian. (2006).** Marées noires et sols pollués par des hydrocarbures: enjeux environnementaux et traitement des pollutions. Editions Technip-Paris. Pages : 150
- Bogan B.W., Lamar R.T., Burgos W.D. et Tien M. (1999).** Extent of humification of anthracene, fluoranthene and benzo (a) pyrene by *Phanerochaete chrysosporium* during growth in PAH-contaminated soils. *Lett. in Appl. Microbiol.* 28: 250-254.
- Boonchan Sudarat, Britz Margaret L. et Stanley Grant A. (2000).** Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Applied and Environmental Microbiology.* 66 (3): 1007–1019.
- Bordoloi N.K. et Konwar B.K. (2009).** Bacterial biosurfactant in enhancing solubility and metabolism of petroleum hydrocarbons. *J Hazard Mater.*170:495–505. Doi:10.1016/j.jhazmat.2009.04.136
- Bouchez M., Blanchet D., et Vandecasteele J. P. (1995).** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 156-164.
- Bouchez-Naïtali M., Rakatozafy H., Marchal R., Leveau J.Y., et Vandecasteele JP. (1999).** Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *J Appl Microbiol.* 86(3):421-8.
- Boudreau L., Sinotte M. et Defo M.A. (2015).** Développement de critères de qualité d'eau de surface pour les hydrocarbures pétroliers, Québec, ministère du Développement

- durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, Direction du suivi de l'état de l'environnement, ISBN 978-2-550-74762-8 (PDF), 34 p.
- Braga de Souza J.V., C. Talhari, D. Reinel et S. Talhari. (2010).** Utilization of experimental design and surface response methodology to study the influence of glucose and ammonium sulphate in the chlamydosporulation of *Candida albicans* FMT123-05. *Journal of Yeast and Fungal Research.* . 1(2) : 30-34.
- Breese K., Boll M., Alt-Morbe J., Schagger H. et Fuchs G. (1998).** Genes coding for the benzoyl-CoA pathway of anaerobic aromatic metabolism in the bacterium *Thauera aromatica*. *Eur. J. Biochem.* 256(1): 148-154.
- Bregnard T. P.-A., Höhener P., Häner A. et Zeyer J. (1997).** Anaerobic degradation of pristane in nitrate-reducing microcosms and enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(5): 2077–2081.
- Brenner Don J., Noel R. Krieg. et James T. Staley. (2009).** Bergey's Manual of systematic bacteriology (2 ed., Vol. II), Springer Dordrecht Heidelberg London New York, pages:1106.
- Britton L., (1984).** Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. In: Gibson, T.D. (Ed.), Microbial, degradation of organic compounds, pp. 89-129. *Marcel Dekker, New York, Basel.*
- Brooijmans R.J.W., Pastink M.I. et Siezen R.J. (2009).** Hydrocarbon-degrading bacteria: The oil-spill clean-up crew. *Microbial biotechnology.* 2(6): 587–594. doi:10.1111/j.1751-7915.2009.00151.x
- Bundy J.G., Paton G.I., et Campbell C.D., (2002).** Microbial communities in different soils types do not converge after diesel contamination. *J. Appl. Microbiol.* 92 (2): 276-288.
- Burland S. et Edwards E. (1999).** Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (2): 529–533.
- Caldwell M. E., R. M. Garrett R. C. Prince. et J. M. Suflita. (1998).** Anaerobic biodegradation of long-chain n-alkanes under sulfate-reducing conditions. *Environmental Science & Technology.* 32(14): 2191-2195.
- Caparello D.M. et Larock P.A. (1975).** A radioisotope assay for the quantification of hydrocarbon biodegradation potential in environmental samples. *Microb. Ecol.* 2(1): 28–42.
- Carlos Rocha A., Ana M. Pedregosa and F. Laborda. (2011).** Biosurfactant-mediated biodegradation of straight and methyl-branched alkanes by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925. *AMB Express.* 1(9): 1-10.
- Cedre. (2012).** Gouriou V analyse réglementaire de l'alerte et de la gestion des crises liées aux déversements accidentels d'hydrocarbures dans les eaux continentales et estuariennes en Europe". Technical Report.
- Cerniglia C.E. (1984 a).** Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv Appl Microbiol.* 30:31–71.
- Cerniglia C.E. (1992).** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* .3:351–368
- Cerniglia C.E. (1984 b).** Microbial transformation of aromatic hydrocarbons. In: Atlas, R.M. (Ed.), Petroleum Microbiology. pp. 99-128. Macmillan Publishing Company, New York.
- Cervantes F. J., Dijksma W., Duong-Dac T., Ivanova A., Lettinga G., et Field J. A. (2001).** Anaerobic mineralization of toluene by enriched sediments with quinones and humus as terminal electron acceptors. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(10): 4471–4478. Doi: 10.1128/AEM.67.10.4471-4478.2001

- Chaillan F., Le Flèche A., Bury E. et al (2004).** Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon degrading microorganisms. *Research in Microbiology*. 155 (7): 587–595.
- Chaineau C.H., Morel J.L. et Oudot J. (1996).** Land treatment of oil-based drill cutting in an agricultural soil. *J. environ. Quality*. 25: 858-867.
- Chakraborty R., O'Connor S.M., Chan E. et Coates J.D. (2005).** Anaerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene by *Dechloromonas* strain RCB. *Appl Environ Microbiol*. 71(12): 8649–8655. DOI: 10.1128/AEM.71.12.8649-8655.2005.
- Chakraborty R. et Coates J.D. (2004).** Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol*. 64(4): 437–446. DOI: 10.1007/s00253-003-1526-x.
- Chakravorty S., Helb D., Burday M., Connell N. et Alland, D. (2007).** A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods*. 69: (2) 330-339.
- Chen S.H. et Aitken M. D. (1999).** Salicylate stimulates the degradation of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15. *Environ. Sci. Technol*. 33 (3): 435–439. DOI: 10.1021/es9805730
- Chikere C.B., Okpokwasili G.C., Chikere B.O. (2009).** Bacterial diversity in a tropical crude oil-polluted soil undergoing bioremediation. *Afr J Biotech*. 8:2535–2540
- Chikere C. B., G. Chijioke Okpokwasili and B. O. Chikere. (2011).** Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. *Biotech* . 1: 117–138 .
- Chithra S. et Hema Shenpagam N. (2014).** Isolation and identification of oil degrading bacteria from oil contaminated soil and comparison of their bioremediation potential. *Gjra-Global Journal for Research Analysis*. 3 (8): 181-184.
- Christopher C. A., Chioma B. C., et Gideon C. O.. (2016).** Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World J Microbiol Biotechnol*. 32(180) : 1-18. DOI 10.1007/s11274-016-2137-x.
- Clarridge J. E., (2004).** Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. 17: 840-862. Doi: 10.1128/CMR.17.4.840-862.2004
- Colombano, S., V. Guerin, A. Saada, D. Hiez et H. Bomer. (2008).** Journée technique d'information et de retour d'expérience de la gestion des sols pollués. Les Diagnostiques Objectifs, enjeux & moyens. IN Gouvernement de France, ministère de l'Écologie, du Développement durable et de l'Énergie. http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/etude_de_cas_TAUW.pdf .
- Cooper D.G. et Goldenberg B.G. (1987).** Surface active agents from *Bacillus* species. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*.53(2): 224-229.
- Coral G. et Karagöz S. (2005).** Isolation and characterization of phenanthrene-degrading bacteria from a petroleum refinery soil, *Annals of Microbiology*. 55(4): 255-259.
- Crone Magalie. (2001).** Diagnostic de sols pollués par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) a l'aide de la spectrophotométrie UV. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne; INSA de Lyon, pages : 166.
- D'Annibale A., Rosetto F., Leonardi V., Federici F. et Petruccioli M. (2006).** Role of autochthonous filamentous fungi in bioremediation of a soil historically contaminated with aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(1): 28–36
- Daane L.L., Harjono I., Zylstra G.J. et Häggblom M.M. (2001).** Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants, *Applied and Environmental Microbiology*. 67(6): 2683–2691.

- Dachs, J., Lohmann, R., Ockenden, W.A., Méjanelle, L., Eisenreich, S.J. et Jones, K.C. (2002).** Oceanic biogeochemical controls on global dynamics of persistent organic pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 36 (20): 4229-4237.
- Dalton, H., et Stirling D. I. (1982).** Co-metabolism. *Phil. Trans. R. Soc. London B.*297 (1088):481-96.
- Das Kishore et Mukherjee Ashis K. (2007).** Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology.* 98: 1339–1345.
- Das Nilanjana et Chandran Preethy. (2011).** Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International.* 2011:1-13. doi:10.4061/2011/941810
- De Lestrangle C., Paillard C.A. et Zelenko P. (2005).** Géopolitique du pétrole: un nouveau marché, de nouveaux risques, des nouveaux mondes. Éditions Technip, Paris. Pages : 233.
- De Vos P., G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K.H. Schleifer et W. B. Whitman. (2009).** Bergey's manual of systematic bacteriology (2 ed., Vol. III). Springer Dordrecht Heidelberg London New York, pages : 1422.
- Deborah D.R., Moody J. et Cerniglia C.E. (2002).** Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment. *FEMS Microbiology Ecology.* 41: 1-7.
- Delarras Camille. (2014).** Pratique en microbiologie de laboratoire. Recherche de bactéries et de levures-moisissures. Lavoisier, Paris, pages 757.
- Delille D., Coulon F., et Pelletier E. (2004).** Effects of temperature warming during a bioremediation study of natural and nutrient-amended hydrocarbon-contaminated sub-antarctic soils. *Cold Reg Sci Technol.* 40:61–70. doi:10.1016/j.coldregions.2004.05.005
- Denis F., Ploy M.C., Martin C., É. Bingen. et Quentin R. (2011).** Bactériologie médicale. 2eme édition. Elsevier Masson. Paris, pages : 191.
- Desalme D. (2011).** Contamination atmosphérique par les hydrocarbures aromatiques polycycliques : toxicité et devenir du phénanthrène dans des systèmes sol-plante-microorganismes. Thèse de doctorat. Université de Franche-Comté-France. Pages : 125.
- Deziel E., Paquette G., Villemur R., Lepine F. et Bisailon J. (1996).** Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental microbiology.* 62(6): 1908.
- Dhaker A.K., et Jain P.K. (2011).** Sewage pollutants and their bioremediation by using different microorganism. In: Recent advances in environmental biotechnology, Jain P.K., Gupta V.K. and Bajpai V. (Eds.). LAP Lambert Academic Publishing AG and Co. KG, Germany, pp 189-204.
- Do Nascimento C.W.A. et Xing B. (2006).** Phytoextraction : A review on enhanced metal availability and plant accumulation. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.).* 63 : 299-311.
- Doornaert, B. et Pichard A. (2005).** Analyse et proposition de méthodes d'évaluation de la relation dose-réponse des effets cancérigènes induits par un mélange d'hydrocarbures aromatiques polycycliques. *Environnement Risques Santé.* 4(3): 204-220
- Dossier spécial Algérie. (2002).** (2ème partie), Pétrole et techniques, No.440.
- Dupuis A., et Ucan-Marin, F. (2015).** Analyse documentaire de la toxicologie aquatique des huiles de pétrole : un aperçu des propriétés du pétrole et de ses effets sur le biote aquatique. Secr. can. de consult. sci. du MPO. Doc. de rech. 2015/007. vi + 55 p.
- Eggen T. et Majcherczyk A. (1998).** Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in contaminated soils by the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Int. Biodeter. Biodegr.* 41: 111-117.

- Egland P.G., Pelletier D.A., Dispensa M., Gibson J. et Harwood C.S. (1997).** A cluster of bacterial genes for anaerobic benzene ring biodegradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94(12): 6484-6489.
- El Fantroussi S., et Agathos S.N. (2005).** Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr Opin Microbiol*. 8:268–275. doi:10.1016/j.mib.2005.04.011
- Elshahed M. S., et McInerney M. J. (2001).** Is interspecies hydrogen transfer needed for toluene degradation under sulfate-reducing conditions?. *FEMS Microbiol. Ecol*. 35:163–169.
- Emanuel G. et Lorrence H.G. (2009).** Practical handbook of microbiology. CRC press. USA, pages : 853.
- Encyclopaedia Universalis. (2015).** Algérie (les grands articles d'universalis) .ENCYCLOPAEDIA UNIVERSALIS France 2016. ISBN 9782852299337. 109p.
- Engel E., Meurillon M., Planche C., et Peyret P. (2014).** Devenir des contaminants toxiques des aliments dans l'environnement digestif. *Innovations Agronomiques*. 36 :135-149
- Ensign SA. (2001).** Microbial metabolism of aliphatic alkenes. *Biochemistry*. 40: 5845-5853.
- Erikson M., Sodersten E., Yu Z., Dalhammar G., Mohn W. W. (2003).** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons at low temperature under aerobic and nitrate-reducing conditions in enrichment cultures from northern soils. *Appl. Environ. Microbiol*. 69(1) : 275-284.
- Escobar M., Márquez G., Azuaje V., Da silva A., Tocco R. (2012).** Use of biomarkers, porphyrins, and trace elements to assess the origin, maturity, biodegradation, and migration of Alturitas oils in Venezuela. *Fuel* . 97: 186-196.
- Farag Soha et Soliman Nadia A. (2011).** Biodegradation of crude Petroleum oil and environmental pollutants by *Candida tropicalis* strain. *Brazilian Archives of biology and Technology*. 5 (4): 821-830.
- Fingas M. (2013).** The Basics of oil spill cleanup. CRC Press, États-Unis.
- Fingas Merv. (2011).** Oil spill science and technology, 1st Edition. Gulf Professional Publishing, États-Unis, ISBN 978-1-85617-943-0, 1192 p.
- Fitzpatrick F.A., M.C., Boufadel R., Johnson K., Lee T.P., Graan A.C., Bejarano Z., Zhu D., Waterman D.M., Capone E., Hayter S.K., Hamilton T., Deffer M.H., Garcia, Et J.S., Hassan. (2015).** Oil-particle interactions and submergence from crude oil spills in marine and freshwater environments – Review of the science and future science needs. U.S. Geological Survey Open-file report 2015-1076, 33 p.
- Friedberg E.C. (1985).** DNA Repair. W.H. Freeman and Co., New York, pages: 520 .
- Gabet S. (2004).** Remobilisation d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. Thèse de doctorat de l'université de Limoges. Pages : 177.
- Gan S., Lau E.V., et Ng H.K. (2009).** Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials*. 172(2-3): 532-549. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.07.118
- Garrett, R. M., I. J. Pickering, C. E. Haith et R. C. Prince. (1998).** Photooxidation of crude oils. *Environmental Science & Technology*. 32(23): 3719-3723.
- Gautier Céline. (2007).** Biodégradation Des Hydrocarbures En Milieu Poreux Insaturé. Thèse de Doctorat de l'université de Pau Et Des Pays De L'ADOUR Institut Français Du Pétrole. Pages : 248
- Gentry T.J., Rensing C., et Pepper I.L. (2004).** New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Crit Rev Environ Sci Technol*. 34:447-494. Doi:10.1080/10643380490452362

- George K.W. et Hay A.G. (2011).** Bacterial strategies for growth on aromatic compounds. *Adv. Appl. Microbiol.* 74: 1-33. Doi: 10.1016/B978-0-12-387022-3.00005-7
- Ghazali F. M., Abdul Rahman R.N.Z., S. Abu Bakar, et Mahiran B.. (2004).** Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 54:61-67.
- Gibson D.T., Mahadevan V., Jerina D.M., Yagi H. et Yeh H.J.C. (1975).** Oxidation of the carcinogens benzo(a)pyrene and benz(a)anthracene to dihydrodiols by a bacterium. *Science.* 189: (4199) 295-297.
- Gibson T.D. et Subramanian, V. (1984).** Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In: Gibson, T.D. (Ed.), *Microbial degradation of organic compounds*, pp. 181-252. *Marcel Dekker, New York, Basel.*
- Goldman R., Enewold L., Pellizzari E., Beach J.B., Bowman E.D., Krishnan S.S. et Shields P.G. (2001).** Smoking increase carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in human lung tissue. *Cancer Res.* 61(17): 6367–6371
- Goldstein R.M., Mallory L.M., et Alexander M. (1985).** Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. *Appl Environ Microbiol.* 50(4): 977–983
- Gong, Y., X. Zhao, Z. Cai, S. E. O'Reilly, X. Hao et D. Zhao. (2014).** A review of oil, dispersed oil and sediment interactions in the aquatic environment: Influence on the fate, transport and remediation of oil spills. *Marine Pollution Bulletin.* 79(1-2): 16-33.
- Goswami P. et Singh H. D. (1991).** Different modes of hydrocarbon uptake by two *Pseudomonas* species. *Biotechnology and Bioengineering.* 37(1): 1-11. DOI: 10.1002/bit.260370103
- Graj Weronika, Piotr Lisiecki, Alicja Szulc, Łukasz Chrzanowski et Joanna Wojtera-Kwiczor. (2013).** Bioaugmentation with petroleum-degrading consortia has a selective growth-promoting impact on crop plants germinated in diesel oil-contaminated soil. *Water Air Soil Pollut .* 224:1676. DOI 10.1007/s11270-013-1676-0
- Gram T. E. (1995).** Metabolic activation and toxicity of some chemical agents to lung tissue and cells. *Biochemical Pharmacology.* 49: 1721-1727.
- Grishchenkov V. G., Townsend R. T., McDonald T. J., Autenrieth R. L., Bonner J. S., et Boronin A. M. (2000).** Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. *Process Biochem.* 35:889–896.
- Guerin T. F. (1999).** Bioremediation of phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in creosote contaminated soil using ex-situ landtreatment. *J. Hazard. Mater.* B(65):305-315.
- Guermouche M.A., Bensalah F. and Gray N. (2013).** Application of molecular methods as a biomarker in bioremediation studies, *International Journal of Biotechnology Applications.* 5(1): 147-154.
- Guinebretiere M.H. et Nguyen-The C. (2003).** Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini puree processing line, differentiated by two PCR-based methods. *FEMS Microbiol Ecol.* 43: 207-215.
- Habe H. et Omori T. (2003).** Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Biosci Biotech Biochem.* 67(2): 225-243. DOI: 10.1271/bbb.67.225
- Haemmerli S.D., Mattis S.A.L., Sanglard D. et Fiechter A. (1986).** Oxidation of benzo(a)pyrene by extracellular ligninases of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 261: 6900-6903.
- Hamamura N., Olson S.H., Ward D.M., et Inskeep W.P. (2006).** Microbial population dynamics associated with crude oil biodegradation in diverse soils. *Appl Environ Microbiol .* 72:6316–6324

- Hammer E ., Krowas D., Schafer A ., Specht M ., Franche W. et Schauer F. (1998).** Isolation and characterization of a dibenzofuran-degrading yeast: identification of oxidation and ring cleavage products. *Appl Environ Microbiol.* 64: 2215-2219.
- Häner A., P. Höhener, et Zeyer J. (1997).** Degradation of trimethylbenzene isomers by an enrichment culture under N₂O-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(3) :1171-1174
- Harayama Shigeaki, Kishira Hideo, Kasai Yuki et Shutsubo Kazuaki.(1999).** Petroleum biodegradation in marine environments. *J. Molec. Microbiol. Biotechnol.* 1(1): 63-70.
- Haritash A.K. et Kaushik C.P. (2009).** Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials.* 169: 1–15.
- Harrigan W.F. et Mc Cance M.E. (1976).** Laboratory methods in food and dairy microbiology. *Sci. Food Agric London. Academic Press.* 32: 1145-1150
- Hassanshahian M. et Cappello S. (2013).** Crude oil biodegradation in the marine Environments. *Biodegradation - Engineering and Technology*
[.http://dx.doi.org/10.5772/55554](http://dx.doi.org/10.5772/55554) .
- Hazen T.C. (2010).** Cometabolic bioremediation. In: Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology (cordonné par Kenneth N. Timmis). pp 2505-2514. *Springer Verlag Berlin Heidelberg.*
- Heider J., A. M. Spormann, H. R. Beller Et F. Widdel. (1999).** Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews.* 22(5): 459-473.
- Heinaru E., Merimaa M., Viggor S., Lehiste M., Leito I., Truu J. (2005).** Biodegradation efficiency of functionally important populations selected for bioaugmentation in phenol- and oil-polluted area. *FEMS Microbiol Ecol.* 51:363–73.
- Heitkamp M.A., Franklin W. et Cerniglia C.E. (1988).** Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2556-2565.
- Hershberg R., Petrov D.A. (2010).** Evidence that mutation is universally biased towards aT in bacteria. *PLoS Genet.* 6(9): e1001115. doi:10.1371/journal.pgen.1001115
- Hildebrand F, Meyer A, Eyre-Walker A. (2010).** Evidence of selection upon genomic GC-content in bacteria. *PLoS Genet.* 6(9): e1001107. doi:10.1371/journal.pgen.1001107
- Hillen W. (1999).** The genetic information. In: Biology of the Prokaryotes (ed. J.W. Lengeler, G. Drews and H.G. Schlegel). *Georg Thieme Verlag, Stuttgart*, pages : 376-385.
- Hommel R. K. (1994).** Formation and function of biosurfactant for degradation of waterinsoluble substrate. In: Biochemistry of microbial degradation, pp. 63-87. Edited by C. Raledge. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Horel A., et Schiewer S. (2009).** Investigation of the physical and chemical parameters affecting biodegradation of diesel and synthetic diesel fuel contaminating Alaskan soils. *Cold Reg Sci Technol.* 58:113–119. doi:10.1016/j.coldregions.2009.04.004
- Hsue S.C. et Robinson P.R. (2006).** Pratical advances in petroleum processing Volume 1 *Springer Science USA*, pages: 377.
- Huang X.D., El-Alawi Y., Penrose D.M., Glick B.R. et Greenberg, B.M. (2004).** A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Environmental Pollution*, 130(3): 465–476.
doi:10.1016/j.envpol.2003.09.031.
- Ichor T., Okerentugba P.O. et Okpokwasili G.C. (2014).** Biodegradation of total petroleum hydrocarbon by aerobic heterotrophic bacteria isolated from crude oil contaminated brackish waters of bodo creek. *J Bioremed Biodeg.* 5 (5): 1-6.
- International Organization for Standardization (ISO 11269-2). (2005).** Qualité du sol – détermination des polluants sur la flore du sol - Partie 2: Effets des substances chimiques sur la germination et la croissance des plantes supérieures.

- Jacques R.J.S., Okeke B.C., Bento F.M., Teixeira A.S., Peralba M.C.R. et Comargo F.A.O. (2008).** Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. *Bioresour Technol.* 99(7): 2637–43. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.04.047
- Jahir A. K., Ruchika P. (2011).** A study on partial purification and characterization of extracellular amylases from *Bacillus subtilis*. *Pelagia Research Library.* 2 (3):509- 519.
- Jain P.K., Gupta V.K., Gaur R.K., Lowry M., Jaroli D.P. et Chauhan U.K. (2011).** Bioremediation of petroleum oil contaminated soil and water. *Research Journal of Environmental Toxicology.* 5(1): 1-26.
- John R.C., Itah A.Y., Essien J.P. et Ikpe D. I. (2011).** Fate of nitrogen-fixing bacteria in crude oil contaminated wetland ultisol. *Bull Environ Contam Toxicol.* 87: 343–353.
- Johnson, G.R. et Olsen, R.H. (1997).** Multiple pathways for toluene degradation in *Burkholderia* sp. strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(10): 4047-4052.
- Joret G. et Hebert J. (1955).** Contribution à la détermination du besoin des sols en acide phosphorique. *Ann. Agron.* 2: 233-299
- Juhas M, van der Meer J.R., Gaillard M., Harding R.M., Hood D.W. et Crook D.W. (2009).** Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS. Microbiol. Rev.* 33(2): 376-393. Doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00136.x
- Juhasz A.L., Britz M.L. et Stanley G.A. (1997).** Degradation of pyrene, benz(a)anthracene and dibenz(a, h)anthracene by *Burkholderia cepacia*. *J. Appl. Microbiol.* 83(): 189-198.
- Kacemi Malika. (2006).** Protection du littoral en Algérie entre politiques et pouvoirs locaux : le cas du pôle industriel d'Arzew (Oran- Algérie). *Vertig O.* 17(3) : 1-9.
- Kacemi Malika. (2009).** Protection du littoral en Algérie entre gestion et législation. Le cas du pôle industriel d'Arzew (Oran, Algérie). *Droit et société.* 3 (73): 687-701.
- Kaczorek E. and Olszanowski A. (2011).** Uptake of Hydrocarbon by *Pseudomonas fluorescens* (P1) and *Pseudomonas putida* (K1) Strains in the presence of surfactants: a cell surface modification. *Water Air Soil Pollut.* 214:451-459. DOI 10.1007/s11270-010-0436-7
- Kaiser, J. (1997).** Endocrine disrupters: Synergy paper questioned at toxicology meeting. *Science.* 275: 1879–1880
- Kalantary R. R., Anoushiravan M., A. Esrafilii., S. Nasserii., F. R. Ashmogh., S. Jorfi., et M. Ja'fari. (2014).** Effectiveness of biostimulation through nutrient content on the bioremediation of phenanthrene contaminated soil. *Journal of Environmental Health Science & Engineering.* 12(143): 1-9. DOI 10.1186/s40201-014-0143-1
- Kayode-Isola T.M., Eniola K.I.T., Olayemi A.B. et Igunnugbemi O.O. (2008).** Response of resident bacteria of a crude oil-polluted river to diesel oil. *American-Eurasian Journal of Agronomy.* 1 (1): 06-09.
- Kennish M.J. (2001).** Practical handbook of marine science, 3rd edition CRCP press, Boca Raton, FL (USA), 879 p.
- Khemili-Talbi S., Kebbouche-Gana S., Akmoussi-Toumi S., Angar Yassmina and Gana M.L. (2015).** Isolation of an extremely halophilic archaeon *Natrialba* sp. C21 able to degrade aromatic compounds and to produce stable biosurfactant at high salinity, *Extremophiles.* 19: 1109–1120 .
- Kim I. S., Park, J.-S. et Kim, K.-W. (2001).** Enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons using nonionic surfactants in soil slurry. *Applied Geochemistry.* 16:1419-1425.
- Kolar L., Ledvina R., Ticha J., and Hanus F. (1975).** Contamination of soil, agricultural crops, and vegetables by 3,4-benzopyrene in the vicinity of Ceske Budejovice. *Cesk. Hyg.* 20(3): 139.

- Koolivand A., K. Naddafi., R. Nabizadeh., S. Nasser., A. J. Jafari., M. Yunesian., et K. Yaghmaeian. (2013).** Degradation of petroleum hydrocarbons from bottom sludge of crude oil storage tanks using in-vessel composting followed by oxidation with hydrogen peroxide and Fenton. *J Mater Cycles Waste Manag.*15: 321–327.
- Krämer U. et Chardonnes A.N. (2001).** The use of transgenic plants in the bioremediation of soils contaminated with trace element. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55 : 661-672.
- Kumar A. , Bisht B.S. , Joshi V.D. and Dhewa T. (2011).** Review on bioremediation of polluted environment: a management tool. *International Journal Of Environmental Sciences.* 1(6): 1079-1093
- Kumar Baduru Lakshman et Gopal Sai D. V. R. (2015).** Effective role of indigenous microorganisms for sustainable environment. *Biotech.* 5:867–876. DOI 10.1007/s13205-015-0293-6
- Kunlei Liu, Wenjun Han, Wei-Ping Pan et John T. Riley. (2001).** Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) emissions from a coal fired pilot FBC system. *J. Hazard. Mater.* 84: 175–188
- Kveseth K., Sortland B. et Stobet M.B. (1981).** Polycyclic aromatic hydrocarbons in leafy vegetables, a comparison of the Nordic results. Nordic PAH-project. Report no. 8. Central Inst. for Industrial Research, Oslo, Norway.
- Lal B. et Khanna S. (1996).** Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans*. *Journal of Applied Bacteriology.* 81(4): 355–362.
- Langenhoff A. A. M., Brouwers-Ceiler D. L., Engelberting J. H. L., Quist J. J., Wolkenfelt J. G. P. N., Zehnder A. J. B. et Schraa G. (1997).** Microbial reduction of manganese coupled to toluene oxidation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22:119–127.
- Larson, R.A., Bott, T.L., Hunt, L.L. et Rogenmuser, K. (1979).** Photooxidation products of a fuel oil and their antimicrobial activity. *Environmental Science and Technology* .13:965-969.
- Lasat M.M. (2002).** Phytoextraction of toxic metals : A review of biological mechanisms. *J. Environ. Qual.* 31 : 109-120.
- Leahy Joseph G. and Colwell Rita R. (1990).** Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews.* 54(3): 305-315
- Lee K. (2002).** Oil–particle interactions in aquatic environments: influence on the transport, fate, effect and remediation of oil spills. *Spill Science & Technology Bulletin.* 8(1) : 3-8.
- Lefebvre G., 1978.** Chimie des hydrocarbures. Publication de l’Institut Français du Pétrole. 284 p.
- Lin Kevin. et Wang Alice. (2001).** UV mutagenesis in *Escherichia coli* K-12: Cell survival and mutation frequency of the chromosomal genes lacZ, rpoB, ompF, and ampA. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology.*1:32-46
- Lipińska Aneta, Kucharski Jan et Wyszowska Jadwiga. (2014).** Activity of arylsulphatase in soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Water Air Soil Pollut .* 225(9): 2097.DOI 10.1007/s11270-014-2097-4
- Liu A., Garcia-Dominguez E., Rhine E.D. et Young L.Y. (2004).** A novel arsenate respiring isolate that can utilize aromatic substrates. *FEMS Microbiol Ecol.* 48(3):323–332. DOI: 10.1016/j.femsec.2004.02.008
- Liu Wuxing., Wang Xiaobing., Wu Longhua., Chen Mengfang., Chen Tu, Luo Yongming. et Christie Peter. (2012).** Isolation, identification and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* BZ-6, a bacterial isolate for enhancing oil recovery from oily sludge, *Chemosphere.* 87: 1105-1110.
- Loncle D., Jacoty C. et Amaudric M. (1993).** Génie génétique. Ed. Doin, Paris, pages: 456.
- MA. 400 – HAP 1.1, Rév. (2016).** Centre D’expertise En Analyse Environnementale Du Québec. Détermination des hydrocarbures aromatiques polycycliques: dosage par

- chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse. 4, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, pages: 21.
- Maki, H., Sasaki, T.S. and Harayama, S. (2001).** Photo-oxidation of biodegraded crude oil and toxicity of the photo-oxidized products. *Chemosphere*. 44(5) :1145-1151.
- Maloy, S.R. (1990):** Experimental techniques in bacterial genetics. Series in Biology. Jones & Bartlett, Boston.
- Mandri T. et Lin J. (2007).** Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. *African Journal of Biotechnology*. 6(1): 023-027
- Maneerat S. et Kulnaree P. (2007).** Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. *Songklanakar J. Sci. Technol*. 29 (3): 783-791.
- Marchal N. et Bourdon J.L. (1982).** Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed. Doin. Paris, pages : 482.
- Márquez-Rocha F.J., Vanessa H-R et Teresa Lamela M.A. (2001).** Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. *Water, Air, and Soil Pollution*. 128: 313-320.
- Mastrangelo G, E Fadda, et V Marzia. (1997).** Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Environ. Health Perspect*. 104(11):1166–1170.
- Matuschek E., Brown D. F. J. et Kahlmeter G. (2014).** Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect*. 20: 0255–0266. DOI: 10.1111/1469-0691.12373
- McGrath S.P., Zhao F.J. et Lombi E. (2002).** Advances in phytoremediation of metals, metalloids and radionuclides. *Adv. Agron*. 75 : 1-56.
- Meckenstock R. U. (1999).** Fermentative toluene degradation in anaerobic defined syntrophic cocultures. *FEMS Microbiol. Lett*. 177:67–73.
- Meckenstock R. U., Annweiler E., Michaelis W., Richnow H. H., et Schink B. 2000.** Anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol*. 66 (7):2743–2747.
- Megharaj Mallavarapu, Balasubramanian Ramakrishnan, Kadiyala Venkateswarlu, Nambrattil Sethunathan, et Ravi Naidu. (2011).** Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environment International*. 37: 1362–1375
- Mesbaiah Fatma Zohra, Eddouaouda Kamel, Badis Abdelmalek, Chebbi Alif, Hentati Dorra, Sayadi Sami, and Chamkha Mohamed. (2016).** Preliminary characterization of biosurfactant produced by a PAH-degrading *Paenibacillus sp.* under thermophilic conditions. *Environmental Science and Pollution Research*. DOI 10.1007/s11356-016-6526-3.
- Miller J.H. (1992).** A short course in bacterial genetics. A laboratory Manual and Handbook for *E. coli* and Related Bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pages: 456.
- Millioli V.S., Servulo E.-L.C., Sobral L. et de Carvalho D.D. (2009).** Bioremediation of crude oil-bearing soil: evaluating the effect of rhamnolipids addition to soil toxicity and to crude oil biodegradation efficiency. *Global NEST Journal*. 11(2), 181–188.
- Miura Y. (1978).** Mechanism of liquid hydrocarbon uptake by micro-organisms. *J Microbiol Methods*. 6 : 99-112.
- Morgan P. et Waykinson R.J. (1989).** Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment. *CRC Crit. Rev. Biotechnol*. 8:305- 333.

- Mueller J. G., Devereux R., Santavy D. L., Lantz S. E., Willis S. G. et Pritchard P. H. (1997).** Phylogenetic and physiological comparisons of-degrading bacteria from geographically diverse soils. *Antonie van Leeuwenkoek*. 71:329-343.
- Mueller James G., Chapman Peter J., Blattmann Beat O., et Pritchard P. Hap. (1990).** Isolation and characterization of a fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*, *Applied and Environmental Microbiology*. 56(4): 1079-1086.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., et Erlich H. (1986).** Specific Enzymatic Amplification of DNA in Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 51(1): 263–273.
- Naidu R. (2003).** Treatment of contaminated soil: fundamentals, analysis, applications. *Geoderma*. 111(1-2): 151-153.
- National Research Council. 2002.** Oil in the Sea III: Inputs, Fates and Effects. National Academy of Sciences Washington DC.
- Nazina T. N., Grigor'yan A. A., Yan-Fen Xue, D. Sh. Sokolova, E. V. Novikova, T. P. Tourova, A. B. Poltarau, S. S. Belyaev, et M. V. Ivanov .(2002).** Phylogenetic diversity of aerobic saprotrophic bacteria isolated from the daqing oil field. *Microbiology*. 71(1): 91–97.
- Neff J.M. 1979.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: source, fates and biological effects. *Applied Science Publishers LTD*.262p.
- Neff, J. M., S. Ostazeski, W. Gardiner et I. Stejskal. (2000).** Effects of weathering on the toxicity of three offshore Australian crude oils and a diesel fuel to marine animals. *Environmental Toxicology and Chemistry*.19 (7):1809-1821.
- Nikolopoulou M., et Kalogerakis N. (2008).** Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers combined with biosurfactants and molasses. *Mar Pollut Bull*. 56:1855-1861. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.07.021
- Niu G.L., Zhang J.J., Zhao S., Liu H., Boon N. et Zhou N.Y. (2009).** Bioaugmentation of a 4-chloronitrobenzene contaminated soil with *Pseudomonas putida* ZWL73. *Environ Pollut*. 157:763–71.
- Nogales B., Lanfranconi M.P., Piña-Villalonga J.M., et Bosch R. (2011)** Antropogenic perturbations in marine microbial communities. *FEMS Microbiol Rev*. 35(2):275-98. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00248.x.
- Obayori S.O. et Salam L.B. (2010).** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: role of plasmids. *Sci Res Ess*. 5(25):4093–4106
- Obire O. et Nwaubeta O. (2001).** Biodegradation of refined petroleum hydrocarbons in soil. *J. Appl. Sci. Environ. Mgt*. 5 (1): 43-46.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). (2006).** OECD guidelines for the testing of chemicals, Test No. 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test.
- Oudot J., Fusey P., Abdelouahid D.E., Haloui S., et Roquebert M.F. (1987).** Capacités dégradatives de bactéries et de champignons isolés d'un sol contaminé par un fuel. *Canadian Journal of Microbiology*. 33: 232-243.
- Pamp S. J. et Tolker-Nielsen, T. (2007).** Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 189(6): 2531-2539.Doi:10.1128/JB.01515-06
- Park J.H., Zhao X. et Voice T.C. (2001).** Biodegradation of non-desorbable naphthalene in soils. *Environmental Science and Technology*.35: 2734-2740.
- Payne J.R. et Philipps, C.R. (1985).** Photochemistry of petroleum in water: Photooxidation causes changes in oil and enhances dissolution of its oxidized products. *Environmental Science and Technology*. 19 (7): 569-579.

- Perelo L. W. (2010).** Review: *In situ* and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *Journal of Hazardous Materials* .177: 81 – 89.
- Petti C. A. (2007).** Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical Infectious Diseases*. 44: 1108-1114.
- Phelps C.D et Young L.Y. (2001).** Biodegradation of BTEX under anaerobic conditions: a review. *Advances in agronomy*. 70:329–357
- Phelps C. D. et Young L. Y. (1999).** Anaerobic biodegradation of BTEX and gasoline in various aquatic sediments. *Biodegradation* 10 (1): 15–25.
- Plaza Grazyna., Grzegorz Nalecz-Jawecki., Krzysztof Ulfi. et Robin L. Brigmon. (2005).** The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. *Chemosphere*. 59: 289–296.
- Pothuluri, J.V. et Cerniglia, C.E. (1994).** Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. in biological degradation and bioremediation of toxic chemicals (Chaudhry, G.R., ed.), pp. 92–124, Chapman and Hall
- Prescott Harley. (2002).** Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth Edition. The McGraw–Hill Companies, pages: 466
- Prescott Lansing M., Sherwood Linda M. et Woolverton Christopher J. (2010).** Microbiologie. 3e édition .Française. Edition de boeck. Bruxelles, pages: 1216.
- Prince, R. C. 1993.** Petroleum spill bioremediation in marine environments ». *Critical Reviews in Microbiology*. 19(4): 217-240.
- Prince R. C., R. M. Garrett, R. E. Bare, M. J. Grossman, T. Townsend, J. M. Suflika, K. Lee, E. H. Owens, G. A. Sergy, J. F. Braddock, J. E. Lindstrom et R. R. Lessard. (2003).** The roles of photooxidation and biodegradation in long-term weathering of crude and heavy fuel oils ». *Spill Science & Technology Bulletin*. 8(2): 145-156.
- Rahman K.S.M., Banat I.M., Thahira J., Thayumanavan T., et Lakshmanaperumalsamy P. (2002a).** Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith, and rhamnolipid biosurfactant. *Bioresour Technol*. 81(1): 25–32
- Rahman K.S.M., Rahman T.J., Kourkoutas Y., Petsas I., Marchant R. et Banat I.M. (2003).** Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology*. 90(2) : 159–168.
- Rahman, K.S.M., Thahira Rahman J., Lakshmanaperumalsamy P. et Banat I.M. (2002b).** Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource Technology*. 85 (3) : 257-261.
- Ramos J.L., Duque E. et Ramos-Gonzalez M.I. (1991).** Survival in soils of an herbicide-resistant *Pseudomonas putida* strain bearing a recombinant TOL plasmid. *Appl. Environ. Microbiol*. 57: 260–266.
- Roling W. F. M., Milner M. G., Jones D. M., Lee K., Daniel F., Swannell R. J. P., et Head I. M. (2002).** Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Appl Environ Microbiol*. 68 (11): 5537-5548.
- Ron E.Z., et Rosenberg E. (2002).** Biosurfactants and oil bioremediation. *Curr Opin Biotechnol* 13:249–252. Doi:10.1016/ S0958-1669(02)00316-6
- Ron E. Z. et Rosenberg Eugene. (2002).** Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*. 13:249–252. DOI 10.1016/S0958-1669(02)00316-6.
- Rontani J.F. and Bonin, P. (1992).** Utilization of n-alkyl-substituted cyclohexanes by a marine Alcaligènes. *Chemosphere* 24: 1441-1446.

- Rontani, J.F. and Giusti, G. (1987).** Photosensitized oxidation of pristine in sea water: effect of photochemical reactions on tertiary carbons. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 40(A): 107-120.
- Rooney-Varga J. N., Anderson R. T., Fraga J. L., Ringelberg D., et Lovley D. R. (1999).** Microbial communities associated with anaerobic benzene degradation in a petroleum-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(7): 3056–3063.
- Rosenberg, E. (1986).** Microbial surfactants. *Crit Rev Biotechnol.* 3(2) : 109-132.
- Roy, P. K., Singh, H. D. et Baruah, J. N. (1978).** Metabolism of n-alkane in *Endomycopsis lipolytica* (*Saccharomycopsis lipolytica*): Part IV--Characteristics of lipid formation from n-alkanes by non-proliferating cells. *Indian J Biochem Biophys.* 15: 456-461.
- Russell D.L., (1992).** Remediation manual for petroleum-contaminated sites, Technomic Publishing Co., Lancaster, PA., USA. ISBN 0-87762-876-9. Pages: 175.
- Sadouk Z., Tazerouti A., et Hacene H. (2009).** Biodegradation of diesel oil and production of fatty acid esters by a newly isolated *Pseudomonas citronellolis* KHA. *World J Microbiol Biotechnol.* 25: 65–70 .
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., et Arnheim N. (1985).** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732) : 1350–1354.
- Salam Lateef Babatunde, Oluwafemi Sunday Obayori, Omokorede Sulikurnaini Akashoro and Genevieve Olubunmi Okogie. (2011).** Biodegradation of bonny light crude oil by bacteria isolated from contaminated soil. *International journal of Agriculture & Biology.* 13 (2): 245-250.
- Saterbak Ann, Toy Robin J., Wong Diana C.L., Mcmain Bruce J., Williams M. Patty, Dorn Philip B., Brzuzy Louis P., Chai Eric Y. et Salanitro Joseph P. (1999).** Ecotoxicological and analytical assessment of hydrocarbon-contaminated soils and application to ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 18 (7) :1591–1607.
- Sauret Caroline. (2011).** Ecologie des communautés bactériennes marines soumises à une pollution pétrolière influence des facteurs environnementaux, de la prédation et de la récurrence des pollutions. Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie. Pages : 287
- Sayler G.S., Perkins R.E., Sherrill T.W., Perkins B.K., Reid M.C., Shields M.S., Kong H.L. et Davis J.W. (1983).** Microcosm and experimental pond evaluation of microbial community response to synthetic oil contamination in freshwater sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 46(1): 211–219.
- Singer A. C., van der Gast C. J., et Thompson I. P. (2005).** Perspectives and vision for strain selection in bioaugmentation. *Trends Biotechnol.* 23(2): 74-77.
- Singer, M. E. et Finnerty, W. R. (1984).** Microbial metabolism of straight-chain and branched alkanes. In: Petroleum microbiology. Atlas RM, editor. New York: Macmillan Publisher.
- Singh C. et Lin J. (2008).** Isolation and characterization of diesel oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. *African Journal of Biotechnology.* 7(12): 1927-1932.
- Singh Dipty et Fulekar M. H. (2007).** Bioremediation of phenol using microbial consortium in bioreactor. *Innovative Romanian Food Biotechnology.* 1: 31-36.
- Singh H. (2006).** Mycoremediation: fungal bioremediation, Wiley- Interscience, New York, NY, USA.
- Smail N. et Khalef R. (2007).** Production de gas-oil et perspectives à court et moyen terme. Journée d'étude sur la consommation du gas- oil- Alger. Groupe SONATRACH-Société Nationale de Raffinage de Pétrole NAFTEC Spa.

- Smits E.A.H.P. et Freeman J.L. (2006).** Environmental cleanup using plants: Biotechnological advances and ecological considerations. *Front. Eco. Environ.* 4 : 203-210.
- Soltani M. (2004).** Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse de doctorat de l'université Paris 6. Pages : 284.
- Spain J. C. et van Veld P.A. (1983).** Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure time, inoculum, and chemical structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:428-435.
- Speight J.G. (2004).** Petroleum asphaltenes - part 1 - asphaltenes, resins and the structure of petroleum. *Oil & Gas Science and Technology - Rev.IFP*, 59(5):467-477.
- Spormann A., et F. Widdel. (2000).** Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation.* 11(2-3): 85-105.
- Stallwood B., Shears J., Williams P.A. et Hughes K.A. (2005).** Low temperature bioremediation of oil-contaminated soil using biostimulation and bioaugmentation with a *Pseudomonas* sp. from maritime Antarctica. *J Appl Microbiol.* 99: 794-802. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02678.x
- Stevcevska V., et Jovanovic-Kolar J. (1974).** Influence of air pollution on the content of 3,4-benzopyrene in non-refined oil obtained from sunflower seeds grown in differently polluted areas. *Arh. Hig. Rada.* 23:191-196.
- Sudip K. Samanta, Om V. Singh et Rakesh K. Jain. (2002).** Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *TRENDS in Biotechnology.* 20(6):243-248.
- Sugai S.F., Lindstrom J.E., et Braddock J.F. (1997).** Environmental influences on the microbial degradation of Exxon Valdez oil on the shorelines of Prince William Sound, Alaska. *Environ Sci Technol.* 31:1564-1572
- Sugiura K., Ishihara M., Shimauchi T. et Harayama S. (1997).** Physiochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environ. Sci. Technol.* 31 : 45-51.
- Suribabu K., Lalitha Govardhan T. et Hemalatha K.P.J. (2014).** Strain Improvement of *Brevibacillus borostelensis* R1 for Optimization of α -Amylase Production by Mutagens. *Microbial & Biochemical Technology.* 6 (3): 123-127.
- Sutherland J.-B., Selby A.L., Freeman J.-P., Fu P.P., Evans F.E. et Cerniglia C.E. (1991).** Metabolism of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3310-3316.
- Sutton Nora B., J. Tim C. Grotenhuis , Alette A. M. Langenhoff , et Huub H. M. Rijnaarts. (2011).** Efforts to improve coupled *in situ* chemical oxidation with bioremediation: a review of optimization strategies. *J Soils Sediments* . 11: 129-140 .
- Syakti A.D. (2004).** Biotransformation des hydrocarbures pétroliers et effets sur les acides gras phospholipidiques de bactéries hydrocarbonoclastes marines. Thèse de doctorat, (Aix Marseille III), Marseille, France.
- Tabatabaee M.S. et Assadi M.M. (2013).** Vacuum distillation residue upgrading by an indigenous *Bacillus cereus*. *Journal of Environmental Health Sciences & Engineering.* 11 (18): 1-7.
- Thompson I.P., van der Gast C.J., Ciric L., et Singer A.C. (2005).** Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environ Microbiol.* 7(7): 909-915. Doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00804.x
- Tissot B.P. et Welte D.H. (1984).** Petroleum formation and occurrence. A new approach to oil and gas exploration. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp 120-128

- Ueno A., Hasanuzzaman M., Yumoyo I. et Okuyama H. (2006). Verification of degradation of n-alkanes indiesel oil by *Pseudomonas aeruginosa* strain WatG in soil microcosms. *Curr Microbiol.* 52:182–5.
- Van Beilen, J. B., Penninga, D. et Witholt, B. (1992). Topology of the membrane-bound alkane hydroxylase of *Pseudomonas oleovorans*. *J Biol Chem.* 267(13): 9194-9201.
- Van Der Gast C.J., Whiteley A.S., et Thompson I.P. (2004). Temporal dynamics and degradation activity of an bacterial inoculum for treating waste metal-working fluid. *Environ Microbiol.* 65(3): 254–263. Doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00566.x
- Van der Meer J.R. et Sentchilo V. (2003). Genomic islands and the evolution of catabolic pathways in bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14(3): 248-254.
- Van der Meer J.R., Devos W.M, Harayama S. et Zehnder A.J.B. (1992). Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* 56(4): 677-694.
- Van Hamme Jonathan D., Ajay Singh, et Owen P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology And Molecular Biology Reviews.* 67(4): 503–549 DOI: 10.1128/MMBR.67.4.503–549.2003
- Van Veen J., van Overbeek L. S., et van Elsas J. D. (1997). Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 61(2): 121-135.
- Vandecasteele, J. P. (2005). Biodegradation des hydrocarbures aliphatiques et alicycliques. *In: Microbiologie Pétrolière*, pp. 173-239. Edited by E. Technip. Paris.
- Vinas M., Sabaté J., Espuny M. J., et Solanas A. M. (2005). Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of Heavily creosote-contaminated soil. *Appl Environ Microbiol.* 71(11): 7008-7018.
- Wakleham S.G., Schaffner C. et Giger W. (1980a). Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent lake sediments-I. Compounds having anthropogenic origins. *Geochim.Cosmochim. Acta* 44,403-413.
- Wakleham S.G., Schaffner C. et Giger W. (1980b). Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent lake sediments-II. Compounds derived from biogenic precursors during early diagenesis. *Geochim.Cosmochim. Acta* 44,415-429.
- Wauquier Jean-Pierre. (1994). Raffinage du pétrole (Le). Tome 1. Pétrole brut. Produits pétroliers.Schémas. Editions Technip-Paris. Pages 461.
- Weelink Sander A. B., Miriam H. A. van Eekert, and Alfons J. M. Stams. (2010). Degradation of BTEX by anaerobic bacteria: physiology and application. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 9: 359–385 .
- Whyte Lyle G., Bourbonnière Luc, and Greer Charles W. (1997). Biodegradation of Petroleum hydrocarbons by psychrotrophic pseudomonas strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways. *Applied and Environmental Microbiology.* 63(9): 3719–3723.
- Widdel F. et Rabus, R. (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology.*12:259-276.
- Wielgoss S., J.E. Barrick, O. Tenailon, S. Cruveiller, B. Chane-Woon-Ming, C. Médigue, R.E. Lenski, et D. Schneider. (2011). Mutation rate inferred from synonymous substitutions in a long-term evolution experiment with *Escherichia coli*. *G3 : Genes, Genomes, Genetics.* 1(3) :183-186.
- Wisdomkofi A.A., Terlabie N.N., Esther S.D. (2006). Screening of 42 Bacillus isolates for ability to ferment soybeans into dawadawa. *International journal of microbiology.* 106: 343-347.
- Woese C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51(2): 222-270.
- Wu Manli , Dickb Warren A., Li Wei, Wang Xiaochang, Yang Qian , Wang Tingting, Xu Limei, Zhang Minghui, et Chen Liming. (2016). Bioaugmentation and

- biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 107: 158-164
- Wu X.Y., Mark J., Walkerb M. H. et James C. (2006).** Development of a groups pecific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. *Journal of Microbiological Methods*. 64(1):107-119.
- Xu Jinlan. (2012).** Bioremediation of crude oil contaminated soil by petroleum-degrading active bacteria, introduction to enhanced oil recovery (eor) processes and bioremediation of oil-contaminated sites, Dr. Laura Romero-Zerón (Ed.), ISBN: 978-953-51-0629-6, <http://www.intechopen.com/books/>
- Xu Ying, Gao Dongmei, Liu Judong, and Wang Zhenyu. (2011).** Plant-microbe interactions to improve crude oil degradation. *Energy Procedia*. 5: 844–848.
- Yadav B. K. and Hassanizadeh M. S. (2011).** An overview of biodegradation of Inapls in coastal (semi)-arid environment. *Water Air Soil Pollut.* 220:225–239. DOI 10.1007/s11270-011-0749-1
- Yana Jian, Wanga Lei, Fub Peter P., et Yu Hongtao . (2004).** Photomutagenicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from the US EPA priority pollutant list. *Mutat Res.* 557(1): 99–108. doi:10.1016/j.mrgentox.2003.10.004.
- Young L.Y. et Cerniglia C.E. (1995).** Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. Wiley, New York, pp: 77–125
- Yu S.H., Ke L., Wong Y.S. et Tam N.F.Y. (2005).** Degradation of polycyclic aromatic (PAHs) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Environ Int.* 32 (2): 149–54. DOI: 10.1016/j.envint.2004.09.008
- Zahed M. A., Hamidi A., M. Hasnain Isa et L. Mohajeri. (2010).** Effect of initial oil concentration and dispersant on crude oil biodegradation in contaminated seawater. *Bull Environ Contam Toxicol.* 84:438–442. DOI 10.1007/s00128-010-9954-7.
- Zengler K., Heider J., Rossello-Mora R. et Widdel F. (1999).** Phototrophic utilization of toluene under anoxic conditions by a new strain of *Blastochloris sulfovirdis*. *Arch Microbiol.* 172(4): 204–212
- Zhang, X., et Young L. Y. (1997).** Carboxylation as an initial reaction in the anaerobic metabolism of naphthalene and phenanthrene by sulfidogenic consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(12):4759–4764.
- United States Environmental Protection Agency.** Types of crude oil. Disponible sur : <https://www.epa.gov/emergency-response/types-crude-oil>. 21 décembre 2016.
- IFP Energies nouvelles.** Le principe de raffinage de pétrole. Disponible sur : <http://www.ifpenergiesnouvelles.fr/Espace-Decouverte/Les-cles-pour-comprendre/Les-sources-d-energie/Le-petrole#11>. 21 Décembre 2016.
- Ministère de l'Energie.** Rafinage. Disponible sur : <http://www.energy.gov.dz/francais/index.php?page=raffinage>. 01 Janvier 2017.

Annexes

Annexes

Annexe 01: Composition des milieux de culture utilisés

Milieu BH (Bushnell and Haas)

KH ₂ PO ₄	1g/l
FeCl ₃	0.05g/l
NH ₄ NO ₃	1g/l
CaCl ₂ , 2H ₂ O.....	0.02g/l
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0.2g/l

Milieu GN (gélose nutritive)

Extrait de viande.....	1g/l
Extrait de levure.....	2g/l
Peptone.....	5g/l
NaCl.....	5g/l
Agar agar.....	15g/l

Milieu bouillon nutritif

Extrait de viande.....	1g/l
Extrait de levure.....	2g/l
Peptone.....	5g/l
NaCl.....	5g/l

Annexes

Milieu KingA

Proteose peptone.....	20g/l
Glycerol.....	10g/l
Sulfate de potassium (K_2SO_4).....	10g/l
Chlorure de magnésium ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$).....	3.5g/l
Agar.....	15g/l
pH.....	7.2± 0.2

Milieu KingB

Proteose peptoneNo. 3.....	20g/l
Glycerol.....	15ml
Hydrogenophosphate de potassium (K_2HPO_4).....	1.5g/l
Sulfate de magnésium héptahydraté ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)...	1.5g/l
Agar.....	20g/l
pH.....	7.2± 0.2

Annexes

Annexe 02: Préparation des solutions pour l'extraction de l'ADN :

Tampon TE, pH 8.0

Tampon TE	Concentration	Volume
Tris- HCl	10M	10ml
EDTA	1M	1ml

Annexe 03 : Préparation du gel d'agarose pour l'électrophorèse de l'ADN:

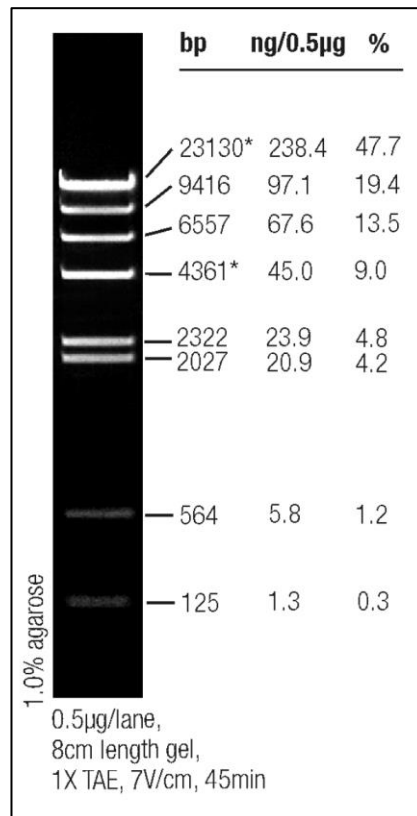
0.3g agarose+ 30ml tampon TBE.

Tampon TBE, pH 8.3 (5X):

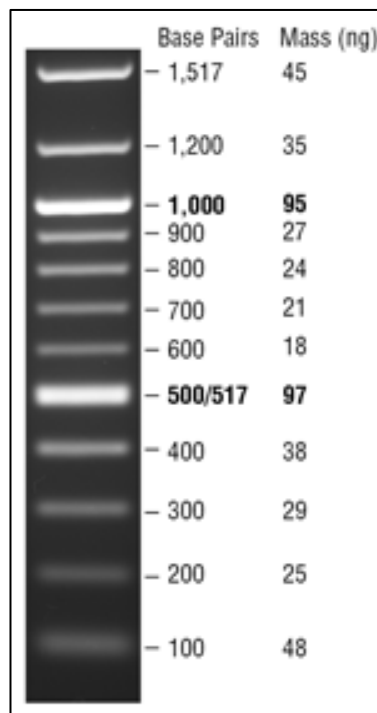
Tampon TE	Masse ou volume
Tris- HCl	54g
Boric Acide	27.5g
EDTA	20ml (0.5M)

Annexes

Annexe 04 : le marqueur d'ADN (FERMENTAS, Lambda DNA/HindIII Marker)



Annexe 05 : le marqueur d'ADNr 16S (100 bp DNA Ladder BIOLABS, England)



Annexes

Annexe 06 : Dispositif expérimentale adopté pour les tests de germinations de blé :

Sols	Hydrocarbures	Souches	Lots
Sol témoin	Absence	Absence	Lot 1
Sol contaminé	Pétrole	Absence	Lot 2
	Diesel	Absence	Lot 3
Sol contaminé traité	Pétrole	L1	Lot 4
		B2	Lot 5
		P1	Lot 6
		P3	Lot 7
		P4	Lot 8
		Consortium	Lot 9
	Diesel	L1	Lot 10
		B2	Lot 11
		P1	Lot 12
		P3	Lot 13
		P4	Lot 14
		Consortium	Lot 15

Annexe 07 : La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s pour les souches étudiées.

➤ Pour la souche *Bacillus* sp. (B2)

```
GATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACTGA
TTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGC
CTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACC'GAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTC
ATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTACACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTA
GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGA
TCGGCCACACTGGGACTGAGACACG'GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC
TTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACG'CCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGT
CGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAACTGCTCGTACCTTGACGGT
ACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA
AGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTG
AAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAG
AAAAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGC
GAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAAC'TGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGG
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCG
CCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGGTCCGCAAGACT
GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAA
GCAACGCCAAGAACC'TTACCAGTCTTGACATCCTCTGACAACTCTAGAGATAGAGCGTT
CCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTG'CATGTTGTGTCAGCTCGTGTGCGTATGAT
GTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGG
CACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCA
TGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGAC
CGCGAGGTCAAGCCAATCCATAAAACCA'TTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGC
CTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC
GGCCCTTGACACACCGCCCGTCAACACGAGAGTTTGTAAACCCCGAAGTCGGTGGAG
TAACCGTAAGGAGCTAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAG
G
```

➤ Pour la souche *Pseudomonas aeruginosa* (P1)

```
TGTTACGACTTCACCCAGT CATGAATCACTCCGTGGTAACCGTCCCCCTTGCGTTAGA
CTAGCTACTTCTGGAGCAACC'ACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGCCCCG
GAACGTATTCACCGTGACATTCTGATTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTC
GAGTTGCAGACTGCGATCCGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGC
TTGGCAACCTTTGTACCGACCATGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAAGGCCATG
ATGACTTGACGTATCCCCACCTTCTCCGTTTTGTACC'GGCAGTCTCCTTAGAGTGCC
CACCCGAGGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCAACA
TCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCTGAGTTC'CCGAAGGCACC
AATCCATCTCTGAAAGTTCTCAGCATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTC
GAATTAACCACATGCTCCACCGTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAAC
CTTGGCGCCGTA'CTCCCCAGGCGGTGCACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCA
AGGATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTG
TTTGCTCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGT'GAGTATCAGTCCAGGTGGTCCGCTTCGCCA
CTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCACCACCTCT
ACCGTACTCTAGCTCAGTAGTTTTGGATGCAGTTC'CCAGGTTGAGCCCGGGATTTACA
TCCAAC'TTGCTGAACCACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTTGCA
CCCTTCGATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGTGTATTCTGTTGGTAACG
TCAAAACAGCAAGGTATTA'ACTTACTGCCCTTCTCCCAACTAAAGTGCTTTACAATCC
GAAGACCTTCTTACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATT
CCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTC'AGTGTGACTGATCAT
CCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTGCCTTGGTAGGCCTTACCCCACTAGCTAAT
CCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGTGAGGTCCGAAGATCCCCACTTCTCCCTCAGGAC
GTATCGGGTATTAGCGCCGTTTTCCGACGTTATCCCCACTACCAGGCAGATTC'TAGG
CATTACTACCCGTC'CGCCGCTGAATCCAGGAGCAAGCTCCCTTCATCCGCTCGACTTGC
ATGTGTTAGGCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCAGGATC
```

Annexes

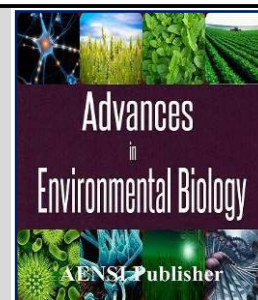
➤ Pour la souche *Pseudomonas putida* (P3)

```
GATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGT CGAGCGGATGAC
GGGAGCTTGCTCCTTGATT CAGCGGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGT
AGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAGCGCTAATACCGCATACTCTACGGGAGAAAAGCA
GGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGG
TAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGA
ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCG
AAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTA
AGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTAATACCTTGCTGT TTTGACGTTACCGACAGAATAAG
CACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAA
TTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTC
AACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTC
CTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACACCT
GGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTTG
TAGTCCACGCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCA
GCTAACCGCATTAAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTAAAATGAAT
TGACGGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACC
TTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCT
GACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGT
AACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCACTCTAAGGAGACT
GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC AAGTCATCATGGCCCTTACGGCCA
GGCTACACACGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTA
ATCCATAAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGA
ATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTGCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACAC
CGCCCGTACACCCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGA
CGGTTACCACGGTGTGATTGACTGGGGTGAAGTCGTAACA
```

➤ Pour la souche *Pseudomonas putida* (P4)

```
GTGTTACGACTTCACCCAGT CATGAATCACACCGTGGTAACCGTCTCCCGAAGGTTAGA
CTAGCTACTTCTGGTGAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGG
GAACGTATTACC CGCGACATTTGATTCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACG CAGTCG
AGTTGCAGACTCGGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTT
GGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGCCGTAAGGGCCATGAT
GACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCTCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCAC
CATTACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCT
CACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTGAGAGTTCCCGAAGGCACCAAT
CCATCTCTGGAAAGTTCTCTGCATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAAT
TAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGC
GGCCGTA CTCCCGAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATT
CCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTC
CCCACGCTTTTCGACCTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGTGGTCCGCTTCGCCACTGGTGT
CCTTCCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCACCACCCTCTACCGTACTCT
AGCTTGCCAGTTTTGGATGCAGTTCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCCAACCTAAC
AAACCACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCGATTAACGCTTGCACCCTCTGTATTA
CCGCGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGTCTTATTCTGTGCGTAACGTCAAAACAGCAA
GGTATTA ACTTACTGCCCTTCTCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCA
CACACGCGCATGGCTGGATCAGGCTTTTCGCCATTGTCCAATATTCGCCACTGCTGCCTC
CCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGACTGATCATCCTCTCAGACCAGTTA
CGGATCGTCGCCCTTGGT GAGCCATTACCCCACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCT
GATAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCTGCTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCGCT
CCTTTCGAAACGTTGTCCCCACTACCAGGCAGATTCTTAGGCATTACTACCCGTCGCC
GCTGAATCAAGGAGCAAGCTCCCGT CATCCGCTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCA
CGGTTCAATCTGAGCCAGGATC
```


Publication



Biodegradation of diesel and isomerate by *Pseudomonas aeruginosa* and *Brevibacillus laterosporus* isolated from hydrocarbons contaminated soil.

¹BENCHOUK Amina and CHIBANI Abdelwaheb

¹Laboratory of Microbiology and Plant Science, Department of Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, University of Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, Algeria.

Address For Correspondence:

BENCHOUK Amina, Laboratory of Microbiology and Plant Science, Department of Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, University of Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, Algeria.
E-mail : abenchouk2011@gmail.com

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Received 12 June 2016; Accepted 28 July 2016; Available online 25 August 2016

ABSTRACT

Biodegradation of petroleum hydrocarbons is more effective, powerful and economical provided than physical and chemical techniques. The most important process uses newly isolated indigenous microorganisms from contaminated sites. Our study aims to isolate, characterize the diversity of microbial communities specifically involved in the biodegradation of diesel within polluted soil. Two bacterial strains were isolated from hydrocarbons-contaminated soils collected from the refinery of Arzew, Northern Algeria, using the enrichment technique. The morphological characteristics of the colonies, the cell structure, Gram staining and the observation of the bacterial spore were studied, the biochemical characterization were performed by the use of biochemical galleries. The bacterial strains were identified as *Pseudomonas aeruginosa* (P1) and *Brevibacillus laterosporus* (B2). The ability of *P. aeruginosa* (P1) and *B. laterosporus* (B2) to degrade diesel was performed by measuring the optical density, colony forming unit counts (CFU/ml), gravimetric method. The degradation of Isomerate by the two isolates was analyzed by gas chromatography with flame ionization detector (FID). Results indicated that the isolates can use diesel as sole source of carbon. Biodegradation of diesel by P1 and B2 was indicated by an increase in the optical density of culture and colony forming unit counts (CFU/ml) from 7×10^4 and 2.3×10^3 CFU/ml to 5.9×10^9 CFU/ml and 3.4×10^8 CFU/ml on day 8 respectively. The biodegradation potential of diesel was 20% (for P1) and 51.35% (for B2) during 12 days of incubation. Isolate P1 has the highest capability of diesel degradation, this was consistent with the complete degradation in five days of four components of Isomerate (C3, I-C4, 2-dimethylbutane and toluene) and more than 90% of 8 other components (I-C5, cyclopentane, 2-methylpentane, 3-methylpentane, hexane, benzene, Et. Benzene and O. Xylene). Isolate B2 completely degraded hexane and more than 80% of C3, I-C4, 2-methylpentane and toluene.

KEYWORDS: Biodegradation, diesel, Isomerate, *Pseudomonas aeruginosa*, *Brevibacillus laterosporus*.

INTRODUCTION

One of the major environmental problems today is hydrocarbon contamination resulting from the activities related to the petrochemical industry [31]. Hydrocarbon components are imposing serious threats to human health and are constantly affecting the surrounding environment due to their prolonged existence in the environment [17]. Hydrocarbons compounds belong to organic compounds with strong toxic, mutagenic, carcinogenic properties and can accumulate in the environment with persistence. Most PAHs (about 90 %) are accumulated in soil, which receives PAHs from combustion of wood and fossil fuels, emission of fumes from

motor vehicles, or soil application of sewage sludge. Despite such high accumulation of PAHs in soil, it is possible to remove these contaminants with increasingly advanced methods, including physicochemical, chemical, photocatalytic degradation, electrokinetic remediation, thermal, or biological pathway. Among the latter methods, next to phytoremediation, most attention is paid to bioremediation, as it is perceived to be a safe and economically viable method [26].

Biodegradation using microorganisms is usually the preferred and major route of hydrocarbons removal from contaminated environments because of its cost effectiveness and complete clean-up [23]. Bacteria and fungi are primary mediators in hydrocarbon degradation; bacteria have been shown to be more versatile than fungi and therefore may play a greater role during biodegradation of hydrocarbons [8], 79 bacterial genera that can use hydrocarbons as carbon and energy sources, as well as 9 cyanobacterial genera, 103 fungal genera and 14 algal genera that are able to degrade or transform hydrocarbons [19]. Bacteria and fungi are primary mediators in hydrocarbon degradation; bacteria have played a greater role during biodegradation of hydrocarbons. The most important hydrocarbon-degrading bacterial genera in soil environments include *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Collimonas*, *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Flavobacterium*, *Gordonia*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Variovorax*. Among the fungi, *Aspergillus*, *Candida*, *Cunninghamella*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* and *Trichoderma* are hydrocarbon degrading genera frequently isolated from soil [8].

Various studies have isolated microorganisms able to degrade oil compounds from different locations in Algeria, including *Corynebacterium aquaticum* and *Pseudomonas aeruginosa* [2], *Natrialba* sp. [24], *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Enterobacter* and *Serratia* [18], *Paenibacillus* sp [28] and *Pseudomonas citronellolis* KHA [36]. But there are not enough reports of biodegradation of Isomerate (Naphtha petroleum, Swigert et al. [39], which is a complex combination of hydrocarbons obtained by the fractional distillation of petroleum. This fraction boils in a range of approximately 20–135 °C [39]. The aim of the present work was to isolate the hydrocarbon degrading bacteria from oil-contaminated soil. In addition, the diesel degradation capacity of selected bacterial strains was assessed by measuring the optical density, colony forming unit counts (CFU/ml), gravimetric method and the Isomerate biodegradation ability of the isolates was characterized by GC/FID.

MATERIAL AND METHODS

Soil samples:

Oil contaminated soil samples were collected from two sites in a refinery in Arzew, Northern Algeria (Sonatrach, Algerian Petroleum Company).

Isolation and characterization of microorganisms from contaminated soil:

Hydrocarbons-degrading bacteria were isolated on Bushnell-Haas medium (BH) [3], which contained per liter: 1.0g KH_2PO_4 , 1.0g K_2HPO_4 , 1.0g NH_4NO_3 , 0.2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05g FeCl_3 and 0.02g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (pH 7). For enrichment, 10g contaminated soil sample was added to 100 ml of BH medium containing 2% (v/v) petroleum or diesel [15]. Cultures were incubated in the dark at 30°C on a rotary shaker 150 rpm. After one week, 2ml of enriched media was transferred into fresh BH medium and incubated at the same conditions. After three consecutive transfers (each including a short incubation interval of 1 week), 100µl of culture were plated on BH agar, which were covered with 100 µl of petroleum or diesel and incubated at 30°C [11,37,18]. Colonies were isolated, purified and stored at 4° C on nutrient agar. For long duration, the isolates are stored in glycerol (30%) at -20° C.

Purecultures of bacterial isolates were identified on the basis of their colonial morphology, cellular morphology and biochemical characteristics by using API20 NE and API 20E (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) according to the taxonomic scheme of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology [14,6].

Diesel degradation assays:

Ability to degrade diesel was performed as described by [25] with modifications. Erlenmeyer Flasks of 250ml containing 100 ml of BH liquid medium with 2 ml of diesel were prepared. The isolates were incubated overnight in 5ml nutrient broth at 30°C. Then the cultures were centrifuged at 6000 rpm for 15min and cells collected. These were washed three times with BH liquid medium and re-suspended in a 5ml of the same medium [10], until OD_{600} was equivalent to 0.91 [29]. One ml of inoculum (0.91 OD_{600} equivalent) was transferred into the flasks and Non-inoculated flasks were prepared as controls [5]. The cultures were grown in the dark at 30°C for 12 days with constant shaking (160 rpm) [29].

The growth patterns were obtained by measuring the optical density at 600 nm [20] and total viable counts (CFU/ml) of the isolates at 2 day intervals [4].

Gravimetric method:

Residual oil was extracted by liquid-liquid extraction as described by [33]. 4 ml of hexane and 2 ml of acetone were added to broth culture in flask and shaken thoroughly [11]. After removing the aqueous phase with separating funnel, hexane and acetone was evaporated using rotary evaporator at 50°C [13,27]. Control flasks were also extracted similarly. After the complete evaporation, the hydrocarbon residue obtained was weighed and taken as the gravimetric value for further calculation. The percentage of diesel oil degraded was determined from the following formula [41,33,27]:

$$\text{Percentage of degraded diesel} = (W_c - W_r) / W_c \times 100\%$$

W_r: weight of residual diesel in cultures

W_c: weight of residual diesel in controls

Analysis of Isomerate biodegradation by gas chromatography:

The ability of isolates to degrade Isomerate (Naphtal Petroleum, Refinery of Arzew, SONATRACH) in BH at 30°C with agitation at 160rpm was examined. Erlenmeyer flasks containing 100ml of BH, supplemented with 2% of Isomerate, were inoculated with strains to a final OD₆₀₀ of 0.91, parallel Erlenmeyer flasks, which were not inoculated with strains, were set up as controls to monitor loss of the hydrocarbons due to volatilization. After 5 days of incubation, inoculated flasks and un-inoculated controls were extracted [41, 32].

The extracts were analyzed by Gas Chromatography (DANI Master GC Fast Gas Chromatograph System, DANI Instruments Spa., Milan), with CP-Sil PONA CB Column (50mm, 0.21mm, 0.5µ m) and Flame Ionization Detector (FID). All runs were carried out under the following conditions: initial temperature 40°C for 1min; temperature rate 10°C/min and final temperature 150°C for 1min; injector (split/splitless mode) temperature 250°C; FID temperature 300°C. Carrier gas constant flow rate (helium) 40ml/min.

Results:**Isolation and characterization of isolates:**

Two strains were isolated from the contaminated soil (P1 and B2) with diesel degrading capabilities. The isolates were respectively identified as *Pseudomonas aeruginosa* and *Brevibacillus laterosporus*. Tables 1 and 2 show the characterization of isolates and the closest strains with similarity percentage of identity.

Table 1: characteristics of the P1 isolate from contaminated soil

	GRAM	oxidase	Catalase	Respiration	Motility	KingA	KingB	Mcc	NO3	TRP	GLU (fermentation)	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	Tentative identity	% Similarity (%)
P1	-	+	+	Obligate aerobic	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.9	

Table 2: characteristics of B2 isolate from contaminated soil

	GRAM	oxidase	Catalase	Respiration	Motility	NO3	GLU (fermentation)	ADH	URE	GEL	ONPG	ARA	MAN	LDC	ODC	TDA	IND	VP	INO	CIT	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	H2S	hemolysis on blood	Amylase	Lecithinase	Caseine	Spore forming	Tentative identity	% Similarity (%)
B2	+	-	+	Facultative anaerobe	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Gamma	-	-	+	+	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	94.1

Determination of hydrocarbons degradation by turbidometry and bacterial counts:

Microorganism's growth in BH broth medium supplemented with 2% diesel was evident from the significant increase in cell density at 600 nm and alternate colony counting after 12 days of incubation (figure 1 and 2). The increase in optical density indicates the ability of cultures strains to utilize and degradediesel as source of carbon and energy (figure 1). More specifically, this was observed between day 4 and 8 after which growth became limited.

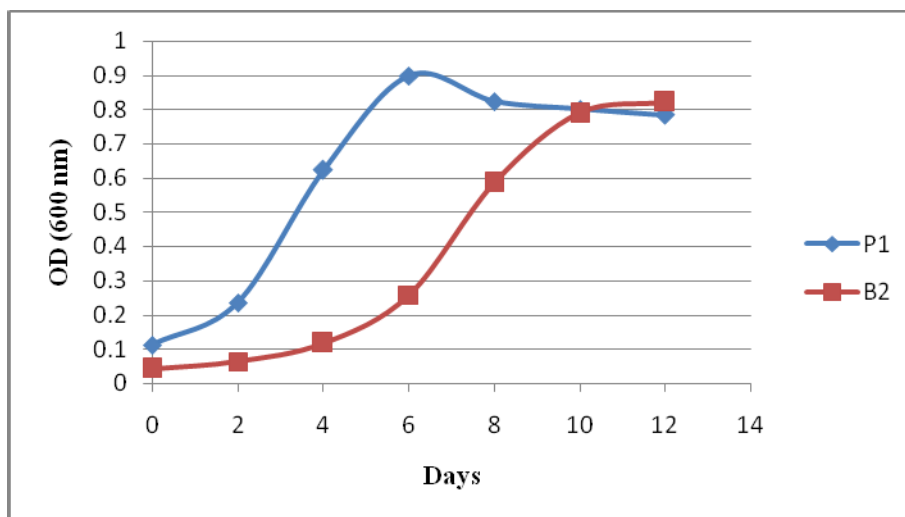


Fig. 1: Growth curve of the isolates P1 and B2 in BH broth medium supplemented with 2% diesel.

The cell count of P1 and B2 isolates on BH broth supplemented with 2% diesel increased from 7×10^4 and 2.3×10^3 CFU/ml in day 1 to 5.9×10^9 CFU/ml and 3.4×10^8 CFU/ml respectively after 8 days of incubation (figure 2).

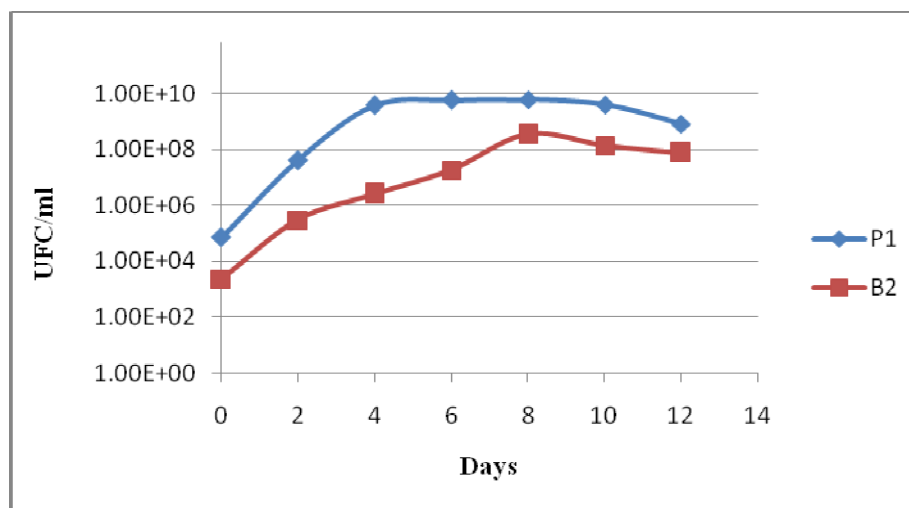


Fig. 2: Growth rate of the isolates P1 and B2 in BH broth medium supplemented with 2% diesel

Gravimetric method:

The biodegradation assay was carried out to determine the diesel degradation capabilities of the indigenous microbial cultures that were isolated from contaminated soil. The isolates were separately inoculated in BH broth containing 2% diesel as sole of carbon source to estimate the potential of biodegradation (figure 3). According to our results B2 had a high degradation rate of 51.35%, compared to P1 having a degradation rate of 20%. According to Oudot et al. [33] a microorganism is considered as petroleum and diesel degrading if the rate of its degradation is superior or equal to 5%.

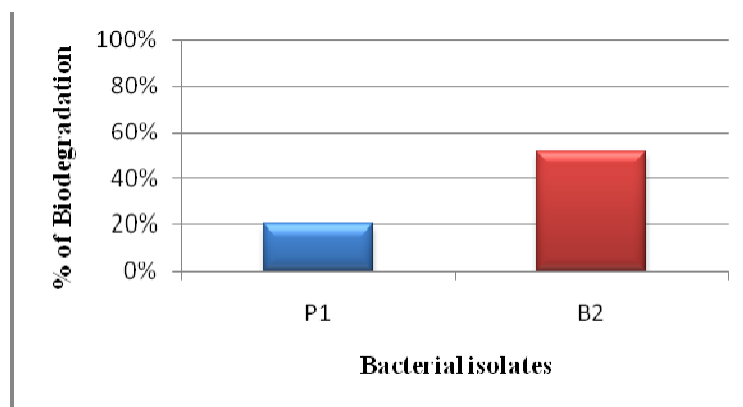
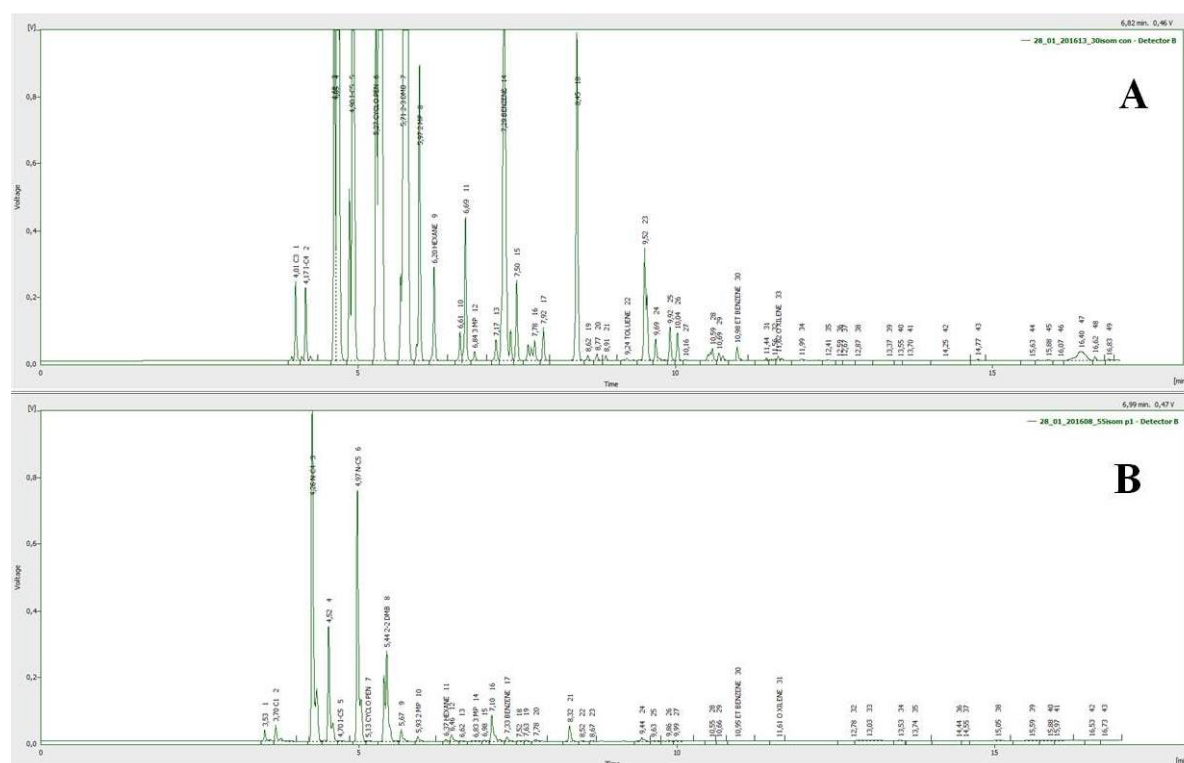


Fig. 3: The rate of diesel degradation by the bacterial isolates after 12 days of incubation

Gas chromatography analysis of Isomerate:

The two isolates were incubated in BH medium supplemented with 2% Isomerate for 5 days. Gas chromatography analysis results of P1 isolate showed that the level of Isomerate has been significantly reduced accompanied with the appearance of degradation products (C1, N-C4, N-C5 and 2-2 dimethyl-butane)(Figure 4B);these compounds could possibly be the results of the enzymatic degradation induced by the microbial strains. Figure 4Bshows also the disappearance of C3, I-C4, 2-3dimethylbutane and toluene. On the other hand, B2 isolate caused the total disappearance of hexane and a decrease in the other Isomerate components (Figure 4C).



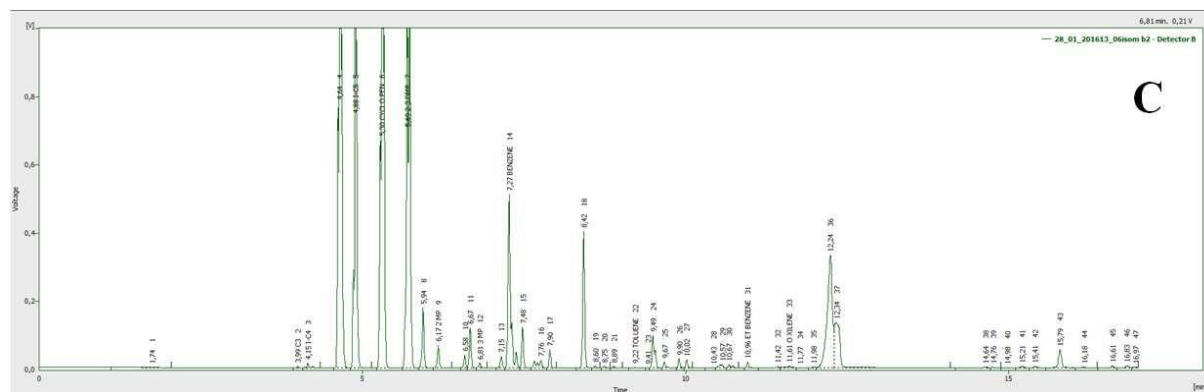


Fig. 4: the GC-FID analysis of Isomerate obtained before (A) and after treatment with microbial isolates for 5 days of incubation: P1 (B) and B2 (C).

Discussion:

Biodegradation of petroleum hydrocarbons is a complex process that depends on the nature and on the amount of the hydrocarbons present. Microbial degradation is the major and ultimate natural mechanism by which one can clean-up the petroleum hydrocarbon pollutants from the environment [31].

Many microbial isolates from hydrocarbons contaminated soil have been found to degrade petroleum and diesel. They include *Bacillus cereus* [40], *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Bosea*, *Azospirillum*, *Nitratireductor* [1], *Candida tropicalis* [16], *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* [33]. In our study, two bacterial strains were isolated from oil-polluted soil from the refinery of Arzew, Northern Algeria, by the application of an enrichment technique. After morphological identification and number of biochemical tests, these isolates were included; *Pseudomonas aeruginosa* (P1) and *Brevibacillus* sp(B2).

In this study, the degradation of diesel was observed by the significant increase in the population of the strains in BH medium supplemented with 2% of diesel. The growth rate observed in P1 (5.9×10^9 UFC/ml) agree with the observation of John et al. [22] that *Pseudomonas aeruginosa* exhibited greater ability to degrade hydrocarbons.

The results indicate that the isolates have the capability to utilize diesel (2%) as carbon source. B2 (51.35%) and P1 (20%) have the best levels of diesel biodegradation after 12 days of incubation. Petroleum and diesel degradation has been analyzed for several fungal and bacterial species, Panda et al. [34] have observed that percentage of diesel degradation of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the contaminated soils, collected from Oil Jetty, Paradip Port (Orissa), was 49.93% after 20 days incubation period. Other work (Chithra and Hema, 2014) using *Pseudomonas* sp. found that its degradation rate of oil (92.3%) was better than other isolated species including *Bacillus* (83.7%) and *Micrococcus* (35.5%) after 25 days of incubation period.

In the present study, isolate P1 proved to be better hydrocarbon degraders than the isolate B2. In the presence of P1 four Isomerate components (C3, I-C4, 2-3dimethylbutane and toluene) were completely degraded in five days of incubation. Moreover, isolate P1 has degraded more than 90% of the following components; I-C5, cyclopentane, 2methylpentane, 3methylpentane, hexane, benzene, Et. Benzene and O. Xylene. Benzene can be used as sole carbon and energy source for aerobic growth by many bacteria especially *Pseudomonas* species [42]. *Pseudomonas* species was successfully used to degrade various components of BTEX, such as benzene, toluene, ethylbenzene, and mixture of xylenes [7]. The results obtained in the study of Sutton et al. [38] indicated that the capability of *Pseudomonas* sp. to use hydrocarbons as the only sources of energy and organic carbon was explained by the production of lipidic biosurfactant that increase the ability of biodegradation. Biosurfactants are a structurally diverse group of surface-active substances produced by microorganisms that exhibit the ability to reduce surface and interfacial tension. They may enhance hydrocarbon bioremediation by two mechanisms. The first includes the increase the substrate availability for microorganisms, while the second involves interaction with the cell surface, which increases the hydrophobicity of the surface, allowing hydrophobic substrates to associate more easily with bacterial cells [35].

Isolate B2 has completely degraded hexane and more than 80% of C3, I-C4, 2 methylpentane and toluene. Gram-positive isolates belonged to the genera *Brevibacillus* were found to be able to utilize diesel and a wide range of hydrocarbons [30].

Conclusion:

In conclusion, in this study we have isolated and identified two hydrocarbon-degrading bacteria from oil-contaminated soil. The degradation capacity of isolated bacterial strains was proven by the growth on diesel-containing media as sole carbon source and by their capacities to deplete or reduce the Isomerate components. The results of this study showed that isolate P1 (*Pseudomonas aeruginosa*) have the highest capability of diesel

and isomerase degradation compared to isolate B2 (*Brevibacillus laterosporus*). However, further studies are still required to confirm the environmental significance of *Pseudomonas* sp. and its bioremediation potential. Overall, this study provides that these isolates could be useful in hydrocarbon degradation, bioremediation strategies of contaminated soil, because of their wide range of oil derivatives degradation. The knowledge of the efficiency and the activities of bacteria in oil-polluted sites may be helpful for the bioremediation of oil spills and can be planned in order to clean up oil pollution in soil and water.

REFERENCES

- [1] Al-Bahry Saif, N., M. Yahya, Al-Wahaibi, Balqees Al-Hinai¹, Sanket J. Joshi¹, Abdulkadir E. Elshafie, Ali S. Al-Bemani and Jamal Al-Sabah, 2016. Potential in heavy oil biodegradation via enrichment of spore forming bacterial consortia. *J Petrol Explor Prod Technol.* DOI 10.1007/s13202-016-0228-8.
- [2] Aouad Linda and Abbouni Bouziane, 2012. Petroleum-Oil Biodegradation by *Corynebacterium aquaticum* and *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from the Industrial Rejection of the Refinery of ARZEW-Algeria. *World Applied Sciences Journal.*, 18(8): 1119-1123.
- [3] Atlas, R.M., 2005. *Handbook of Media for Environmental Microbiology* (2 Ed.). Boca Raton: Taylor & Francis Group. pp:664.
- [4] Balba, M.T., N. Al-Awadhi and R. Al-Daher, 1998. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Methods Microbiological.*, 32: 155-164.
- [5] Boonchan Sudarat, Margaret L. Britz and Grant 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.
- [6] Brenner Don, J., Noel R. Krieg and James T. Staley, 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2 ed., Vol. II). Springer Dordrecht Heidelberg London New York. p: 1106.
- [7] Brijesh, K., Yadav, Shristi R. Shrestha and S. Majid Hassanizadeh, 2012. Biodegradation of Toluene Under Seasonal and Diurnal Fluctuations of Soil-Water Temperature. *Water Air Soil Pollut.*, 223: 3579-3588.
- [8] Chikere Chioma Blaise, Gideon Chijioke Okpokwasili and Blaise Ositadinma Chikere, 2011. Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. *3 Biotech.*, 1: 117-138.
- [9] Chithra, S. and N. Hema Shenpagam, 2014. Isolation and Identification of Oil Degrading Bacteria From Oil Contaminated Soil and Comparison of Their Bioremediation Potential. *Gjra-Global Journal for Research Analysis*, 3(8): 181-184.
- [10] Coral Gökhan and Karagöz Serap, 2005. Isolation and characterization of phenanthrene-degrading bacteria from a petroleum refinery soil, *Annals of Microbiology*, 55(4): 255-259.
- [11] Daane, L.L., I. Harjono, G.J. Zylstra and M.M. Häggblom, 2001. Isolation and Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria Associated with the Rhizosphere of Salt Marsh Plants, *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6): 2683-2691.
- [12] DasKishore and K. MukherjeeAshis, 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India, *Bioresource Technology*, 98: 1339-1345.
- [13] Dean-Ross Deborah, Joanna Moody and C.E. Cerniglia, 2002. Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment, *FEMS Microbiology Ecology*, 41: 1-7.
- [14] De VosPaul, George M. Garrity, Dorothy Jones, Noel R. Krieg, Wolfgang Ludwig, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer and William B. Whitman, 2009. *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology* (2 ed., Vol. III). Springer Dordrecht Heidelberg London New York, pp: 1422.
- [15] Deziel, E., G. Paquette, R. Villemur, F. Lepine and J. Bisailon, 1996. Biosurfactant Production by a Soil *Pseudomonas* Strain Growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Applied and Environmental microbiology*, 62(6): 1908.
- [16] Farag Soha and A. Soliman Nadia, 2011. Biodegradation of Crude Petroleum Oil and Environmental Pollutants by *Candida tropicalis* Strain. *Brazilian Archives of biology and Technology*, 5(4): 821-830.
- [17] Ganesan Bhuvanewari, 2013. Molecular Characterization of camphor utilizing bacterial isolates from refinery sludge and detection of target loci-Cytochrome P-450 cam mono oxygenase (cam C gene) by PCR and gene probe. *Springer Plus.*, 2(170): 9.
- [18] Guermouche, M.A., F. Bensalah and N. Gray, 2013. Application of molecular methods as a biomarker in bioremediation studies, *International Journal of Biotechnology Applications*, 5(1): 147-154.
- [19] Hassanshahian Mehdi and Cappello Simone, 2013. Crude Oil Biodegradation in the Marine Environments. *InTech*, Available from: (<http://dx.doi.org/10.5772/55554>). 101-135.
- [20] Heitkamp, M.A., W. Franklin and C.E. Cerniglia, 1988. Microbial Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Isolation and Characterization of a Pyrene-Degrading Bacterium, *Applied and Environmental Microbiology*, 54(10): 2549-2555.

- [21] Ileri V Robles-González, Fabio Favaan and Héctor M. Poggi-Varaldo, 2008. A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and sediments. *Microbial Cell Factories*, 7(5): 16.
- [22] John, R.C., A.Y. Itah, J.P. Essien and D.I. Ikpe, 2011. Fate of Nitrogen-Fixing Bacteria in Crude Oil Contaminated Wetland Ultisol, *Bull Environ Contam Toxicol.*, 87: 343-353.
- [23] John, R.C., J.P. Essien, S.B. Akpan and G.C. Okpokwasili, 2012. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-degrading Bacteria from Aviation Fuel Spill Site at Ibeno, Nigeria. *Bull Environ Contam Toxicol.*, 88: 1014-101.
- [24] Khemili-TalbiSouad, Salima Kebbouche-Gana, Siham Akmoussi-Toumi, Yassmina Angar and Mohamed Lamine Gana, 2015. Isolation of an extremely halophilic archaeon *Natrialba* sp. C21 able to degrade aromatic compounds and to produce stable biosurfactant at high salinity, *Extremophiles.*, 19: 1109-1120.
- [25] Koolivand Ali, Kazem Naddafi, Ramin Nabizadeh, Simin Nasseri, Ahmad Jonidi Jafari, Massoud Yunesian and Kamyar Yaghmaeian, 2013. Degradation of petroleum hydrocarbons from bottom sludge of crude oil storage tanks using in-vessel composting followed by oxidation with hydrogen peroxide and Fenton. *J Mater Cycles Waste Manag.*, 15: 321-327.
- [26] Lipińska Aneta, Jan Kucharski and Jadwiga Wyszowska, 2014. Activity of Arylsulphatase in Soil Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Water Air Soil Pollut.* DOI 10.1007/s11270-014- 2097-4. 225: 2097.
- [27] Liu Wuxing, Xiaobing Wang, Longhua Wu, Mengfang Chen, Chen Tu, Yongming Luo and Peter Christie, 2012. Isolation, identification and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* BZ-6, a bacterial isolate for enhancing oil recovery from oily sludge, *Chemosphere.*, 87: 1105-1110.
- [28] Mesbaiah Fatma Zohra, Kamel Eddouaouda, Abdelmalek Badis, Alif Chebbi, Dorra Hentati, Sami Sayadi and Mohamed Chamkha, 2016. Preliminary characterization of biosurfactant produced by a PAH-degrading *Paenibacillus* sp. under thermophilic conditions. *Environ Sci Pollut Res.* DOI 10.1007/s11356-016-6526-3.
- [29] Mueller James G., Peter J. Chapman, Beat O. Blattmann and P. Hap Pritchard, 1990. Isolation and Characterization of a Fluoranthene-Utilizing Strain of *Pseudomonas paucimobilis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 56(4): 1079-1086.
- [30] Nazina, T.N., A.A. Grigor'yan, Yan-Fen Xue, D. Sh. Sokolova, E.V. Novikova, T.P. Tourova, A.B. Poltarus, S.S. Belyaev and M.V. Ivanov, 2002. Phylogenetic Diversity of Aerobic Saprotrophic Bacteria Isolated from the Daqing Oil Field. *Microbiology*, 71(1): 91-97.
- [31] Nilanjana Das, and Preethy Chandran, 2011. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*. doi:10.4061/2011/941810. 2011: 13 pages.
- [32] Obire, O., and O. Nwaubeta, 2001. Biodegradation of Refined Petroleum Hydrocarbons in Soil. *J. Appl. Sci. Environ. Mgt.*, 5(1): 43-46.
- [33] Oudot, J., P. Fusey, D.E. Abdelouahid, S. Haloui and M.F. Roquebert, 1987. Capacités dégradatives de bactéries et de champignons isolés d'un sol contaminé par un fuel. *Canadian Journal of Microbiology*, 33: 232-243.
- [34] Panda, S.K., R.N. Kar and C.R. Panda, 2013. Isolation and identification of petroleum hydrocarbon degrading microorganisms from oil contaminated environment. *International journal of environmental sciences*, 3(5): 1314-1321.
- [35] Pacwa-Płociniczak Magdalena, Grażyna Anna Płaza, Anna Poliwoda and Zofia Piotrowska-Seget, 2014. Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil. *Environ Sci Pollut Res.*, 21:9385-9395.
- [36] Sadouk Z., A. Tazerouti and H. Hacene, 2009. Biodegradation of diesel oil and production of fatty acid esters by a newly isolated KHA. *World J Microbiol Biotechnol.*, 25: 65-70.
- [37] Singh, C., and J. Lin, 2008. Isolation and characterization of diesel oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. *African Journal of Biotechnology*, 7(12): 1927-1932.
- [38] Sutton Nora, B., J. Tim C. Grotenhuis, Alette A.M. Langenhoff and Huub H.M. Rijnaarts, 2011. Efforts to improve coupled in situ chemical oxidation with bioremediation: a review of optimization strategies, *J Soils Sediments.*, 11: 129-140.
- [39] Swigert, P., James, Carol Lee, Diana C. L. Wong and Paula Podhasky, 2014. Aquatic hazard and biodegradability of light and middle atmospheric distillate petroleum streams. *Chemosphere*. 108: 1-9.
- [40] Tabatabaei Mitra Sadat and Assadi Mahnaz Mazaheri, 2013. Vacuum distillation residue upgrading by an indigenous *Bacillus cereus*, *Journal of Environmental Health Sciences & Engineering*, 11(18): 1-7.
- [41] Whyte Lyle, G., Luc Bourbonnière and Charles W. Greer, 1997. Biodegradation of Petroleum

Hydrocarbons by Psychrotrophic *Pseudomonas* Strains Possessing Both Alkane (alk) and Naphthalene (nah) Catabolic Pathways, Applied and Environmental Microbiology, 63(9): 3719-3723.

[42] WeelinkSander, A.B., Miriam H.A. van Eekert and Alfons J.M. Stams, 2010. Degradation of BTEX by anaerobic bacteria: physiology and application. Rev Environ Sci Biotechnol., 9: 359-385.

**PETROLEUM-HYDROCARBONS BIODEGRADATION BY *Pseudomonas* STRAINS
ISOLATED FROM HYDROCARBON-CONTAMINATED SOIL**

A. Benchouk* and A. Chibani

Laboratory of Microbiology and Plant Science, Department of Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, University of Abdulhamid Ibn Badis, Mostaganem, Algeria.

Received: 18 January 2017 / Accepted: 15 April 2017 / Published online: 01 May 2017

ABSTRACT

Many indigenous microorganisms in water and soil are capable of degrading hydrocarbon contaminants. In this study, two bacterial strains were isolated from a contaminated soil of a refinery of Arzew (Oran). The isolated strains were identified as *Pseudomonas aeruginosa* (P3) and *Pseudomonas fluorescens* (P4). The capability of these isolates to degrade petroleum was performed by measuring the optical density, colony forming unit counts (CFU/ml) and concentration of total petroleum hydrocarbons (TPH). Degradation of Isomerate by these isolates was analyzed by gas chromatography with flame ionization detector (FID). Results indicated that the isolates can use petroleum as carbon source. Isolates P3 has the highest capability of hydrocarbons degradation (80.86% of biodegradation).

Keywords: Biodegradation, contaminated soil, Petroleum, Isomerate, *Pseudomonas* sp.

Author Correspondence, e-mail: abenchouk2011@gmail.com

doi: <http://dx.doi.org/10.4314/jfas.v9i2.7>



1. INTRODUCTION

Pollution with petroleum hydrocarbons and their derivatives represent a serious problem for the environment and human health. Many petroleum hydrocarbons components are toxic, mutagenic and carcinogenic [1]. The refining, storage and distribution of crude oil and derivatives are important sources of soil and water pollution [2]. Petroleum hydrocarbons can be divided into four classes: The saturates, the aromatics, the asphaltenes, and the resins [3]. Soil is a key component of natural ecosystems because environmental sustainability depends largely on a sustainable soil ecosystem. When soil is polluted, the ecosystem is altered, and agricultural activities are affected. The soil remediation processes leading to the eventual removal of petroleum hydrocarbon and heavy metal, involve physical, chemical and biological techniques [4; 5]. However, physicochemical technologies are complex, expensive, environmentally unfriendly, and do not always result in complete neutralization of pollutants. On the other hand bioremediation technology has been recognized to be a valuable alternative for the detoxification and disposal of toxic substance. This is because of their simplicity, cost-effectiveness, environmental friendliness, and conservation of soil texture and characteristics [4]. The process of bioremediation is an evolving method for the removal and degradation of many environmental pollutants including petroleum hydrocarbons. Biodegradation by microorganisms represents one of the primary mechanisms by which petroleum hydrocarbons pollutants can be removed from the environment [1]. Many environmental factors affect the rate of biodegradation process, which are soil moisture and pH, availability of oxygen and nutrients, contaminant concentration [6]. The key role in bioremediation is played by microorganisms which are very diverse in nature and comprise bacteria, fungi, and yeast [5]. A number of bacterial species are known to degrade hydrocarbons including *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Mycobacterium* spp., *Haemophilus* spp., *Rhodococcus* spp., *Paenibacillus* spp. [9]. The biodegradation of petroleum hydrocarbons is carried under aerobic and anaerobic conditions. There are two main strategies of bioremediation: bioaugmentation and biostimulation. In the first, the addition of oil-degrading microorganisms increases the rates of biodegradation, while in the second, the growth of indigenous hydrocarbon-degraders is stimulated by the addition of nutrient salts, surfactant or organic matter [6]. However, only very few Algerian works have

been reported in the literature on the biodegradation of petroleum hydrocarbons with microorganisms isolated from contaminated soil [7; 8; 9].

The aim of the present work was to explore the hydrocarbon degradation capacity of microorganisms isolated from petroleum contaminated soil of a petroleum refinery. The identification of bacterial isolates was performed by biochemical analyses. In addition, the degradation capacity of petroleum by bacterial strains was performed by measuring the optical density, colony forming unit counts (CFU/ml) and concentration of total petroleum hydrocarbons (TPH). Degradation of Isomerate by isolates was characterized by GC/FID. In this study, we report bacterial isolates which are able to degrade efficiently a wide spectrum of hydrocarbons found in refined petroleum.

2. EXPERIMENTAL METHOD

2.1. Soil samples

Hydrocarbon contaminated soil samples were collected from the Arzew refinery in northern Algeria (Sonatrach, Algeria Petroleum Corporation). The refinery receives crude oil from the production site of Hassi Messaoud (located at 900 km in the south of Algiers). The refinery represents one of the largest oil industrial zones of Africa [10]. The samples were taken (in October 2014) using a clean spatula at a depth of 20 cm. The soil is removed in sterile glass vials and was stored in the refrigerator at 4°C. Petroleum was filtered with Filter unit 0.22 µm.

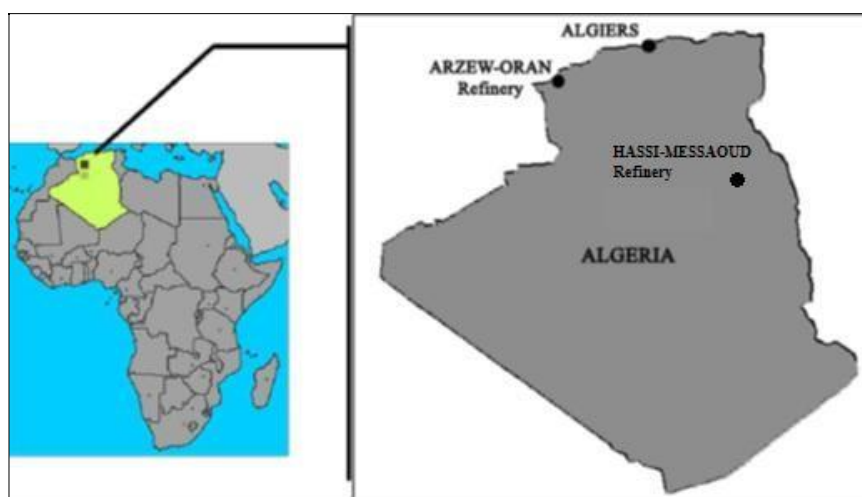


Fig.1. Map of Algeria, showing the localization of the petroleum refinery of ARZEW where the hydrocarbon contaminated soil samples was obtained [10].

2.2. Enrichment and Isolation of aerobic hydrocarbons degrading bacteria

Hydrocarbons-degrading bacteria were isolated on Bushnell-Haas medium (BH) [11], which contained per liter: 1.0g of KH_2PO_4 , 1.0g of K_2HPO_4 , 1.0g of NH_4NO_3 , 0.2g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05g of FeCl_3 and 0.02g of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (pH 7). For enrichment, 10g contaminated soil was added to 100 ml of BH medium containing 2% (v/v) Petroleum [12]. Cultures were incubated in the dark at 30°C and 150 rpm. After one week, 2ml of enriched media was transferred into fresh BH medium and incubated at the same conditions as described above. After three consecutive transfers (interval of 1 week), 100 μl of culture were plated on BH agar, which were covered with 100 μl of Petroleum and incubated at 30°C [13; 14]. Colonies were isolated, purified and stored at 4° C on nutrient agar. For long duration, the isolates are stored in glycerol (30%) at -50° C.

Pure cultures of bacterial isolates were identified on the basis of their colonial morphology, cellular morphology and biochemical characteristics using API20 NE (bio Mérieux, Marcy-l'Etoile, France) according to the taxonomic scheme of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology [15;16].

2.3. Kinetic of Hydrocarbons Degrading Isolates

The ability to degrade petroleum was performed as described by Koolivand et al., (2013) [17] with modifications. Erlenmeyer Flasks of 250ml containing 100 ml of BH Liquid medium with 2ml (2%) of petroleum were prepared. The isolates were incubated overnight in 5ml Nutrient Broth at 30°C. After incubation, the cultures were centrifuged at 6000 rpm for 15min and cells collected. These were washed three times with BH liquid medium and re-suspended in a small volume (5ml) of the same medium [18], until OD600 was equivalent to 0.91[19].

One ml of inoculum (0.91 OD600 equivalent) was transferred into the flasks and Non-inoculated flasks were prepared as controls [20].

The cultures were grown in the dark at 30°C for 12 days with constant shaking (160 rpm) [19]. The growth patterns were measured using the optical density at 600 nm [21] and the total viable counts (CFU/ml) [22] of the isolates at intervals of 2 days.

2.4. Determination of used hydrocarbons degradation by concentration of total petroleum hydrocarbons

The direct measurement of the dissipation of hydrocarbons in the culture medium is a clear means to evaluate the biodegradation of hydrocarbons [2]. Every 4 days, samples were taken from cultures Flasks for residual of TPH values (Total Petroleum Hydrocarbons) [22; 23] the TPH was measured with Oil Content Analyzer (Infrared spectroscopy, HORIBA, OCMA-310) (Method of NF M07-203). The extraction of the hydrocarbons can be done by polychlorotrifluoroethylene (HORIBA S-316 Solvent).

2.5. Isomerase degradation assay by GC/FID

The ability of isolates to degrade Isomerase (Naphta Petroleum, Refinery of Arzew, SONATRACH) in BH at 30°C with agitation at 160 rpm was examined. Erlenmeyer flasks containing 100ml of BH, supplemented with 2% of Isomerase, were inoculated with strains to a final OD600 of 0.91, parallel Erlenmeyer flasks, which were not inoculated with strains, were set up as controls to monitor loss of the hydrocarbons due to volatilization. After 15 days of incubation, inoculated flasks and un-inoculated controls were extracted [24; 25]. The extracts were analyzed by Gas Chromatography (DANI Master GC Fast Gas Chromatograph System, DANI Instruments Sp. A., Milan), with CP-Sil PONA CB Column (50mm, 0.21mm, 0.5µm) and Flame Ionization Detector (FID). All runs were carried out under the following conditions: initial temperature 40°C for 1min; temperature rate 10°C/min and final temperature 150°C for 1min; injector (split/splitless mode) temperature 250°C; FID temperature 300°C. Carrier gas constant flow rate (helium) 40ml/min.

3. RESULTS

3.1. Isolation and identification of isolates

Two strains (P3 and P4) were isolated and characterized to have petroleum degrading capabilities. The isolates were respectively identified as *Pseudomonas* sp. (P3 and P4).

3.2. Determination of hydrocarbons degradation by turbidometry and bacterial counts:

Growth rate of the two isolates in BH broth medium supplemented with 2% petroleum was evident from the significant increase in cell density at 600 nm and alternate colony counting after 12 days of incubation (Fig 2). The increase in optical density indicates the ability of cultures strains to utilize and degrade petroleum as source of energy. More specifically, this was observed between day 4 and 8 after which the growth became limited. The cell-concentration increased from 1.3×10^5 and 1.32×10^5 CFU/ml in BH with Petroleum to 2×10^9 CFU/ml on day 4 and 1.5×10^9 CFU/ml on day 6, for the isolates P3 and P4 respectively (Fig 2).

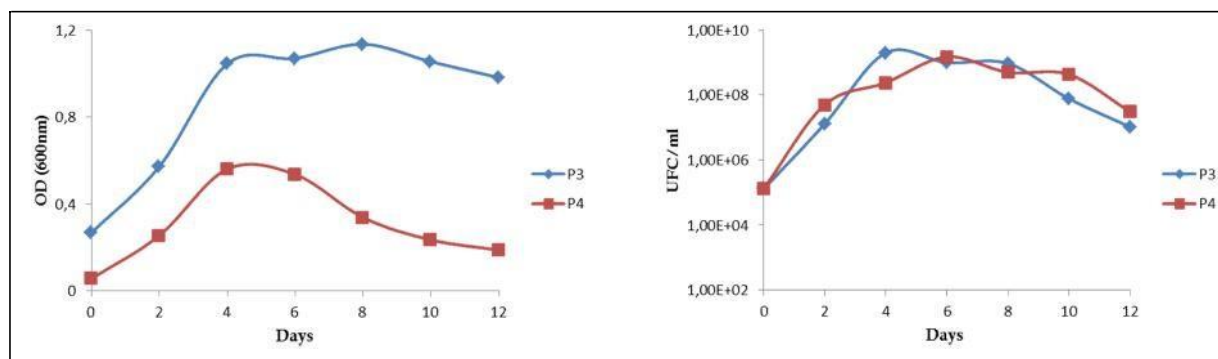


Fig.2. Growth rate of the isolates in BH broth medium supplemented with Petroleum (2%) while 12 days of incubation at 30°C.

3.3. Determination of total petroleum hydrocarbons (TPH)

The growth of bacteria in BH medium supplemented with 2% petroleum increased progressively with decrease in TPH throughout the monitored period (12 days). The total amounts of TPH in the first day of incubation were 260 and 262 mg/L medium with petroleum for strains P3 and P4 respectively. The initial amount of TPH of the control was 282 mg/L (Fig 3). These curves indicate the degradation of petroleum by bacterial isolates

because the amount of TPH decreased after 12 days of incubation to 49mg/L, and 169mg/L in BH with petroleum for P3 and P4, respectively. At the beginning, the degradation rate was high but decreased with time due to the substrate exhaustion resulting from the use of the substrate by the isolates, as already hypothesized by Ichor et al., (2014) [26].

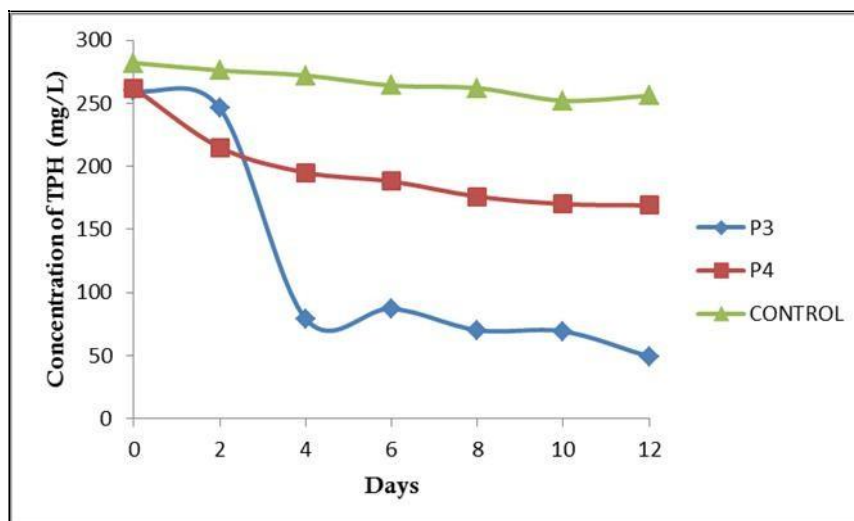


Fig.3. TPH degradation by isolated strains in BH broth medium supplemented with 2% of Petroleum while 12 days of incubation at 30°C.

3.4. Gas chromatographic analysis of Isomerate

GC analysis of Isomerate inoculated with isolate P3 and P4 after 15 days of incubation (Fig 4). The results showed that the level of hydrocarbon has been significantly reduced with the appearance of degradation products (C1, C2, N-C4, N-C5 and 2-2 dimethyl-butane) comparing with the control (Fig 4A). Fig 4B shows the disappearance of cyclopentane, Et-benzene and O-xylene were not visible after treatment with isolate P3. On the other hand, the treatment with isolate P4 (Fig 4C) favored the disappearance of I-C4 and hexane. According to results from GC-FID analysis, the percentage of Isomerate compounds's degraded was determined (Fig 5).

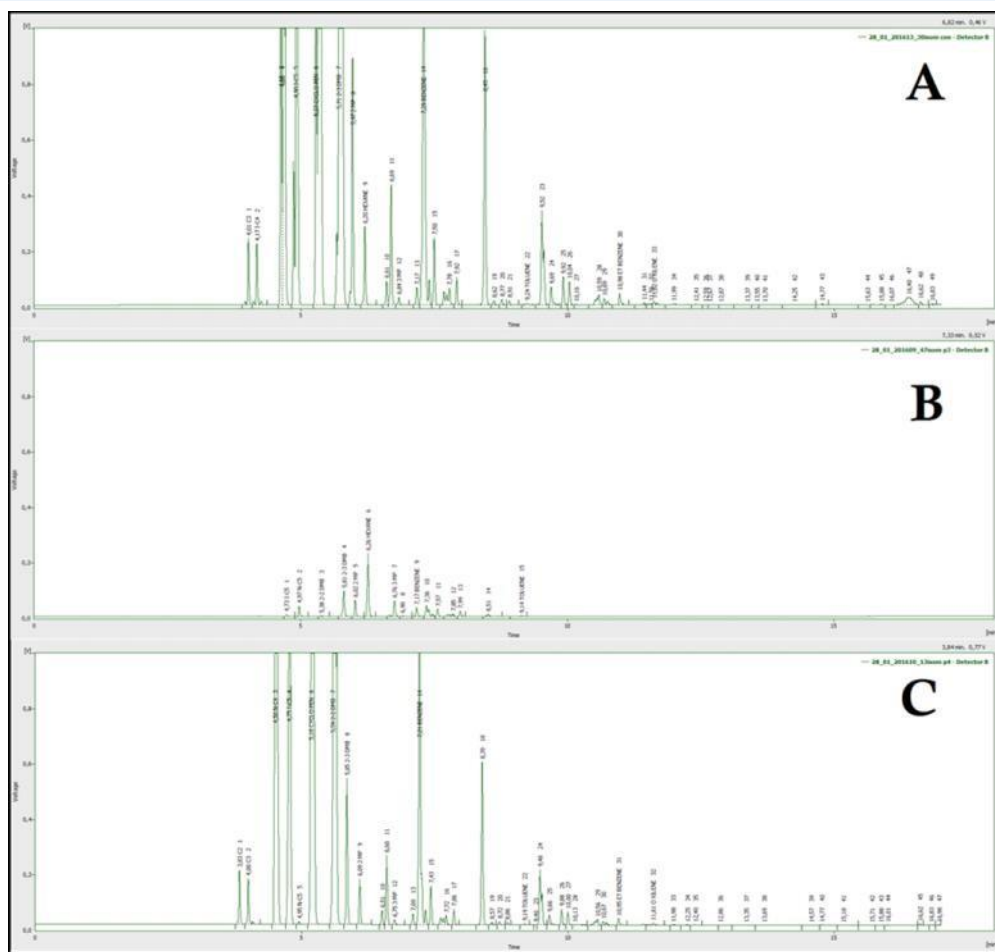


Fig.4. GC-FID analysis of Isomerate obtained without (A) and with treatment with microbial isolates: P3 (B) and P4 (C) for 15 days of incubation

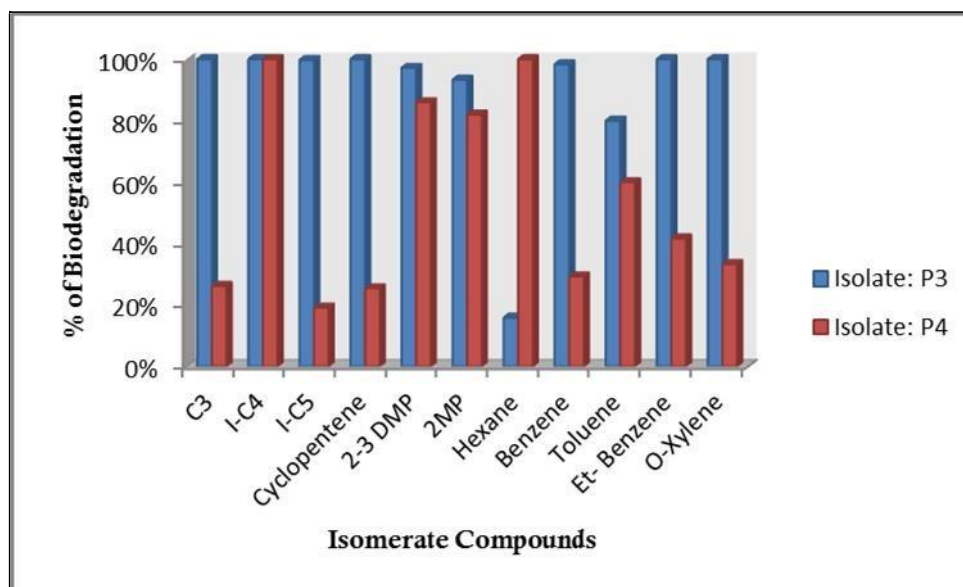


Fig.5. Percentage of Isomerate compounds’s biodegradation by bacterial isolates (P3 and P4) after 15 days of incubation.

4. DISCUSSION

Two bacterial strains used for this study were isolated by application of an enrichment technique from the contaminated soil of the refinery of Arzew, Northern Algeria. In the view of investigating their ability to retain their biodegradation potential of petroleum and Isomerate and employed those in bioremediation strategies of hydrocarbons contaminated sites. After morphological identification and number of biochemical tests, these isolates were included *Pseudomonas* sp. (P3 and P4).

Due to the presence of a complex enzymatic system the genus *Pseudomonas* exhibits a wide variety of metabolic and physiological properties [28]. They are also the most predominant group of microorganisms that degrade xenobiotic compounds [28]. In this study, the degradation of petroleum is observed by the significant increase in the population of isolates P3 and P4 in BH medium supplemented with 2% of petroleum as compared to the initial population. However, the higher growth rate was observed in P3 (2×10^9 UFC/ml with petroleum) compared to P4 (1.5×10^9 UFC/ml with petroleum). These results agree with the observation of John et al., 2011 [29] that *Pseudomonas aeruginosa* exhibited greater ability to degrade hydrocarbons.

Biodegradation results demonstrated rapid utilization of the petroleum substance by the bacterial inoculums (Fig 3). From this result, it was clear that the P3 and P4 were able to degrade petroleum as sole source of carbon and energy since there was also loss in concentrations of total petroleum hydrocarbons (TPH). The best reduction in TPH (petroleum) was observed for isolates P3 as compared to control implying that the volatile components of the petroleum had evaporated. TPH loss was significant with time for isolates P4. Indeed, several *Pseudomonas* strains isolated from contaminated soil have been reported to grow on and/or degrade hydrocarbons or to remediate petroleum contaminated soils [27].

The growth of the isolates in BH supplemented with petroleum increased progressively with decrease in TPH (80.86% for P3 and 33.98% for P4) throughout the 12 days period monitored. Ying et al., (2011) [30] and Jinlan, (2012) [31] reported a correlation between the significant decreases of TPH concentration to an increase in biomass bacterial indicating that the microorganisms were responsible for the degradation which corroborates our results.

In the present study, isolate P3 proved to be better hydrocarbon degraders than isolate P4. P3 caused a complete degradation in fifteen days of incubation of five hydrocarbons were C3, I-C4, Cyclopentene, Et.benzene and O.xylene (Fig 4). Isolate P3 degraded more than 80% of the following hydrocarbons; I-C5, 2-3dimethylbutane, 2methylbutane, benzene and toluene (Fig 5). Benzene can be used as sole carbon and energy source for aerobic growth by many bacteria especially *Pseudomonas* species [32]. Whyte et al., (1997) [24] isolated three hydrocarbon-degrading bacteria from petroleum-contaminated Arctic soils and characterized two of the strains as *Pseudomonas* spp. The results obtained by Sutton et al., (2011) [33] indicate that the capability of *Pseudomonas* spp. to use hydrocarbons as the only sources of energy was explained by the production of lipidic biosurfactant that increase the ability of biodegradation. Isolate P4 has completely degraded I-C4 and hexane and more than 60% of 2-3 dimethylbutane, 2 methylbutane and toluene (Fig 5). Isolate P4 was identified as *Pseudomonas fluorescens*. This is a well-known degrader of benzene and toluene [34; 35]. The relative differences in patterns of biodegradation of these substances can be explained by their molecular weights and chemical characteristics. Low molecular weight compound can be degraded relatively easily, while compounds of higher molecular weight require more time to be mineralized. Molecular structure also affects microbial degradation [36]. Highly branched alkanes and multi-ring cycloalkanes are slower to degrade than their straight-chain analogues [36].

5. CONCLUSION

In conclusion, in this study we have isolated and identified from contaminated soil two bacterial strains identified as *Pseudomonas* sp. with the ability to degrade hydrocarbons. The microbial degradative capabilities of hydrocarbons were monitored by different microbial methods including enumeration of hydrocarbon degraders, determination of total petroleum hydrocarbons (TPH) and gas chromatographic analysis of Isomerate. Petroleum and Isomerate were efficiently degraded by isolates P3 and P4. The results of this study showed that isolates P3 have the highest capability of hydrocarbons degradation compared to isolates P4. These isolates could be useful in hydrocarbon degradation and bioremediation of contaminated soil and have desirable oil bioremediation characteristics.

6. REFERENCES

- [1] Das N. and Chandran P. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International.*, 2011, 2011:13.
- [2] Chioma B.C., Gideon C.O., and Blaise O.C. Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. *3 Biotech .*, 2011, 1: 117–138 .
- [3] Leahy J.G. and Colwell R.R. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiological Reviews.*, 1990, 54(3): 305-315
- [4] Agarry S.E. and Ogunleye O.O. Box-Behnken design application to study enhanced bioremediation of soil artificially contaminated with spent engine oil using biostimulation strategy. *International Journal of Energy and Environmental Engineering.*, 2012, 3(31): 1-14
- [5] Yadav B.K and Hassanizadeh M.S. An Overview of Biodegradation of LNAPLs in Coastal (Semi)-arid Environment. *Water Air Soil Pollut.*, 2011, 220:225–239. DOI 10.1007/s11270-011-0749-1
- [6] Kumar B.L and Gopal Sai D. V. R. Effective role of indigenous microorganisms for sustainable environment. *3 Biotech.*, 2015, 5:867–876. DOI 10.1007/s13205-015-0293-6
- [9] Haritash A.K. and Kaushik C.P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials.*, 2009.169: 1–15
- [7] Aouad L. and Abbouni B. Petroleum-Oil Biodegradation by *Corynebacterium aquaticum* and *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from the Industrial Rejection of the Refinery of ARZEW-Algeria. *World Applied Sciences Journal.*, 2012, 18(8) : 1119-1123.
- [8] Khemili T.S., Kebbouche G.S., Akmoussi T.S., Angar Y. and Gana M.L. Isolation of an extremely halophilic archaeon *Natrialba* sp. C21 able to degrade aromatic compounds and to produce stable biosurfactant at high salinity. *Extremophiles.*, 2015. 19: 1109–1120 .
- [9] Guermouche M.A., Bensalah F. and Gray N.. Application of molecular methods as a biomarker in bioremediation studies, *International Journal of Biotechnology Applications.* , 2013,5(1): 147-154.
- [10] Guermouche M., Bensalah A., Gury F.J. and Duran R. Isolation and characterization of different bacterial strains for bioremediation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Sci Pollut Res.*, 2015, 22:15332–15346. DOI 10.1007/s11356-015-4343-8

-
- [11] Atlas R. M. Handbook of Media for Environmental Microbiology (2 Ed.). Boca Raton: Taylor & Francis Group., 2005, pp 664.
- [12] Deziel E., Paquette G., Villemur R., Lepine F. and Bisailon J. Biosurfactant Production by a Soil *Pseudomonas* Strain Growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Applied and Environmental microbiology., 1996, 62(6): 1908.
- [13] Daane L.L., Harjono I., Zylstra G.J., and Häggblom M.M. Isolation and Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria Associated with the Rhizosphere of Salt Marsh Plants, Applied and Environmental Microbiology., 2001. 67(6): 2683–2691.
- [14] Singh C. and Lin J. Isolation and characterization of diesel oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. African Journal of Biotechnology., 2008.7(12): 1927-1932.
- [15] Brenner D.J., Krieg N.R. and Staley J.T. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2 ed., Vol. II). Springer Dordrecht Heidelberg London New York., 2009 , pp 1106.
- [16] De Vos.P, George M.G., Dorothy J., Noel R.K., Wolfgang L., Fred A.R., Karl-Heinz S. and William B.W. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2 ed., Vol. III). Springer Dordrecht Heidelberg London New York., 2009. pp1422.
- [17] Koolivand A., Kazem N., Ramin N., Simin N., Ahmad J.J., Massoud Y., and Kamyar Y. Degradation of petroleum hydrocarbons from bottom sludge of crude oil storage tanks using in-vessel composting followed by oxidation with hydrogen peroxide and Fenton. J Mater Cycles Waste Manag., 2013, 15: 321–327.
- [18] Coral G. and Karagöz S. Isolation and characterization of phenanthrene-degrading bacteria from a petroleum refinery soil. Annals of Microbiology., 2005, 55(4): 255-259.
- [19] Mueller J.G., Peter J.C., Beat O.B., and Hap Pritchard P. Isolation and Characterization of a Fluoranthene-Utilizing Strain of *Pseudomonas paucimobilis*. Applied and Environmental Microbiology., 1990, 56(4): 1079-1086.
- [20] Boonchan S., Margaret L., Britz, and Grant A.S. Degradation and Mineralization of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Defined Fungal-Bacterial Cocultures. Applied and Environmental Microbiology., 2000, 66 (3): 1007–1019.
- [21] Heitkamp M.A., W. Franklin, and C.E. Cerniglia. Microbial Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Isolation and Characterization of a Pyrene-Degrading Bacterium,

Applied and Environmental Microbiology., 1988,54 (10): 2549-2555.

[22] Balba M.T., Al-Awadhi N., and Al-Daher R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. Journal of Methods Microbiological., 1998, 32: 155–164.

[23] Viñas M., Sabaté J., Espuny M.J. and Solanas A.M. Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation during Bioremediation of Heavily Creosote-Contaminated Soil, Applied and Environmental Microbiology., 2005, 71 (11):7008–7018.

[24] Whyte L.G., Bourbonnière L., and Charles W. Greer. Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by Psychrotrophic *Pseudomonas* Strains Possessing Both Alkane (alk) and Naphthalene (nah) Catabolic Pathways, Applied and Environmental Microbiology., 1997. 63 (9): 3719–3723.

[25] Obire O. and Nwaubeta O. Biodegradation of Refined Petroleum Hydrocarbons in Soil. J. Appl. Sci. Environ. Mgt. , 2001, 5 (1): 43-46.

[26] Ichor T., Okerentugba P.O, and Okpokwasili G.C. Biodegradation of Total Petroleum Hydrocarbon by Aerobic Heterotrophic Bacteria Isolated from Crude Oil Contaminated Brackish Waters of Bodo Creek, J Bioremed Biodeg., 2014, 5 (5): 1-6.

[27] Das Kishore and Mukherjee Ashis K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India, Bioresource Technology., 2007, 98: 1339–1345.

[28] Pacwa-Płociniczak Magdalena, Grażyna Anna Płaza, Anna Poliwoda and Zofia Piotrowska-Seget. Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil. Environ Sci Pollut Res., 2014, 21:9385–9395. DOI 10.1007/s11356-014-2872-1

[29] John R.C., Itah A.Y., Essien J.P. and Ikpe D.I. Fate of Nitrogen-Fixing Bacteria in Crude Oil Contaminated Wetland Ultisol, Bull Environ Contam Toxicol. , 2011, 87: 343–353.

[30] Ying Xu, Gao Dongmei, Liu Judong, and Wang Zhenyu. Plant-microbe Interactions to Improve Crude Oil Degradation. Energy Procedia., 2011, 5: 844–848.

[31] Jinlan Xu. 2012. Bioremediation of Crude Oil Contaminated Soil by Petroleum-Degrading Active Bacteria, Introduction to Enhanced Oil Recovery (EOR)

Processes and Bioremediation of Oil-Contaminated Sites, Dr.Laura Romero-Zerón (Ed.) InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/introduction-to-enhanced-oil-recovery-eor-processes-and-bioremediation-of-oil-contaminated-sites/bioremediation-of-oil-contaminated-soil-by-highly-petroleum-degrading-bacteria>

[32] Weelink Sander A. B., Miriam H. A. Van Eekert and Alfons J. M. Stams. 2010. Degradation of BTEX by anaerobic bacteria: physiology and application. Rev Environ Sci Biotechnol. 9: 359–385.

[33] Sutton Nora B., Tim J. Grotenhuis C., Alette A. Langenhoff M. and Huub H. Rijnaarts M.. Efforts to improve coupled in situ chemical oxidation with bioremediation: a review of optimization strategies, J Soils Sediments ., 2011, 11: 129–140

[34] Greene E.A., Kay J.G., Jaber K., Stehmeier L.G. and Voordouw G. Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons. Appl Environ Microbiol., 2000, 66:5282–5289

[35] Aburto Arturo and Peimbert Mariana. Degradation of a benzene–toluene mixture by hydrocarbon-adapted bacterial communities. Ann Microbiol., 2011, 61:553–562. DOI 10.1007/s13213-010-0173-6

[36] Swigert P. James , Carol Lee , Diana C.L. Wong and Paula Podhasky. Aquatic hazard and biodegradability of light and middle atmospheric distillate petroleum streams. Chemosphere., 2014, 108: 1–9

How to cite this article:

Benchouk A and Chibani A. Petroleum-hydrocarbons biodegradation by *pseudomonas* strains isolated from hydrocarbon-contaminated soil. J. Fundam. Appl. Sci., 2017, 9(2), 713-726.