

République Algérienne Démocratique et Populaire

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



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

BAROUDI Noureddine

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN

Spécialité : Production et Transformation Laitière

THÈME

**Isolement et identification de
microorganismes issus d'une matrice
polluée**

Soutenue publiquement le mardi 03/07/2018

DEVANT LE JURY

Président	Mr. NEMMICHE	Professeur	U. Mostaganem
Encadreur	Mme. BEKENNICHE	MAA	U. Mostaganem
Examineurs	M. HENNIA	Docteur	U. Mostaganem

REMERCEMENT :

Je remercie Dieu qui m'a donné la force et la volonté pour réaliser ce travail.

Je tiens à remercier mon encadreur : Dr mde .bekkaniche.

Je tiens à remercier vivement tous mes professeurs, le Directeur de mon établissement ; qui ont contribué à la réalisation de ce modeste projet, qui m'ont aidé tout au long de mon parcours.

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont conseillé et relu lors ma famille, mes amis, camarade de promotion.

DEDICACES :

On dédie ce modeste travail a :

tous les musulmans du monde .

A nos familles surtout nos très chers parents qui ont toujours étaient là pour nous, et qui nous 'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute notre reconnaissance et tout notre amour Nos collègues de la promotion et tous les étudiants de promotion .

Tous nous amis et a Tous ceux qui ont connus, aimés appréciés, encouragés de prée ou loin pendant tous notre cursus.

Résumé

la pollution des sols par les hydrocarbures a une impact sur la diversité écologique de différents être vivant (humain, micro organismes, plantes ...etc.)

ce phénomène est nécessite de L'intervention des différents facteurs biotiques et abiotiques, Parmi ces facteurs la biodégradation par les microorganismes.

Ce travail s'est basé sur l'élaboration d'une collection des souches isolées à partir des différents sites pollués par les hydrocarbures pétroliers et rejets industriels, et l'implication de ces souches dans la biodégradation des hydrocarbures (pétrole brut).

La méthode utilisée pour sélectionner les bactéries à potentiel de biodégradation est une méthode microbiologique rapide et simple: "oil spreading method".

Mots clés : Biodégradation, pétrole brut, bactéries.

Abstract

soil pollution by hydrocarbons has an impact on the ecological diversity of different living beings (human, microorganisms, plants ... etc.).

this phenomenon is necessitated by the intervention of biotic and abiotic factors, among these factors biodegradation by microorganisms.

This work was based on the development of a collection of strains isolated from different sites polluted by petroleum hydrocarbons and industrial discharges, and the involvement of these strains in the biodegradation of hydrocarbons (crude oil).

The method used to select bacteria with biodegradation potential is a quick and simple microbiological method: "oil spreading method".

Key words : Biodégradation, crude oil , bactéries

المخلص:

تلوث التربة بالهيدروكربونات له تأثير على التنوع البيئي للكائنات الحية المختلفة (الإنسان ، الكائنات الدقيقة ، النباتات ... الخ)

هذه الظاهرة يستلزمها تدخل مختلف العوامل الحيوية واللاحيوية ، من بين هذه العوامل التحلل البيولوجي بواسطة الكائنات الحية الدقيقة.

اعتمد هذا العمل على تطوير مجموعة من السلالات المعزولة من مواقع مختلفة ملوثة بالهيدروكربونات البترولية والتصريفات الصناعية ، وإشراك هذه السلالات في التحلل البيولوجي للهيدروكربونات (النفط الخام).

الطريقة المستخدمة لتحديد البكتيريا مع إمكانات التحلل البيولوجي هي طريقة ميكروبيولوجية سريعة وبسيطة: "طريقة نشر الزيت".

الكلمات المفتاحية: التحلل الحيوي، النفط الخام، الجراثيم

LISTE ABRIVIATION

AFNOR : association françaises de normalisation

BN : bouillon nutritive

C : colonie

DA : dégradation aérobie

DAA: dégradation anaérobie

DO : densité optique

E : échantillon

HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques

HCP :hydrocarbures pétrolières

GN :gélose nutritive

MSM : milieu minérale

PH : potentiel d'hydrogène

UFC : unités formants colonies

Liste du tableau

Numéro de tableau	Titre	Page
01	Exemples des microorganismes dégradants Les hydrocarbures (Tarayre. 2012).	19
02	Caractéristiques physico-chimique des échantillons de sol	27
03	nombre des germes des échantillons prélevés	28
04	Résultat d'étude macroscopique des isolats	29,30
05	Résultats de l'étude microscopique des isolats	33,34,35
06	résultats du test biochimiques des isolats	37,38
07	résultats de la DO des isolats en présence du pétrole pendant 15 jours d'incubation	42,43

Liste de figure

Figure 1 : Les étapes de la formation du pétrole à partir de la matière organique	7
Figure 2 : Structure chimique des hydrocarburespétroliers (Colombano <i>et al.</i> , 2008).....	8
Figure 3 :Representationschématique du devenird'une pollution pétrolière à la surface du sol (Morgan et Watkinson, 1989).....	12
Figure 04 : Principe de la degradationaerobe (Moletta, 2002).....	16
Figure 05: Principe de la digestion anaerobe (Moletta, 2002).....	17
Figure 6: site d'échantillonnaged'Arzew (Google, 2018).....	20
Figure 7: Schema de l'isolement et de dénombrement des bactéries.....	22
Figure 8 : flore total de l'échantillon 1 et 2.....	28
Figure 9 : aspect macroscopique des isolats.....	30,31,32
Figure 10 : aspect microscopique des isolats.....	33,34,35
Figure 11 : : résultat d'Ensemencement des colonies sur gélose au cétrimide.....	36
Figure 12 : représentation des résultats positif de catalase.....	37
Figure 13 :ensemencement des colonies dans (MSM) solidecontinent de pétrole.....	39
Figure 14 : dégradation du pétrole par notre isolats.....	40,41
Figure 15 : Schéma récapitulatif du protocole de la méthode de spray.....	42
Figure 16 : cinétique de croissance des isolats dans MSM liquide additionné de pétrole	43

SOMMAIRE

Résumé.....	I
Liste d'abréviations.....	II
Liste des tableaux.....	III
Liste des figures.....	IV
Introduction.....	V

Partie 01 : synthèse bibliographique

Chapitre 01 : Généralités

I.1. Définition	6
I-2- Définition du pétrole brut « Crude oil ».....	6
I.3. Nature et origine.....	6
I.4. Composition et caractéristiques.....	7
I.4.1. Les hydrocarbures aliphatiques.....	7
I.4.2. Les hydrocarbures cycliques.....	8
I.5. Les hydrocarbures en Algérie.....	8
I.5.1. Historique.....	8
I.5.2. Problématique liée aux hydrocarbures pétroliers en Algérie.....	9
I.6. Mobilité des hydrocarbures dans l'environnement.....	10
I.6.1. Evaporation.....	11
I.6.2. Solubilisation.....	11
I.6.3. Emulsifiassions.....	11
I.6.4. Sédimentation.....	12
I.6.5. Photo-oxydation.....	12
I.7. Pollution du sol par les hydrocarbures.....	13
I.7.1. Origines de pollution.....	13
I.7.2. Types de polluants.....	13
I.7.3. Biodétection de la pollution du sol par les hydrocarbures.....	13
I.7.4. Procédés de biodétection de la pollution.....	14

Chapitre 02 : biodegradation

II .1. Définition.....	15
II.2. Types de biodégradation	15
II.2.1. Biodégradation aérobie	15
II.2.2. Biodégradation anaérobie.....	17
II.3. La biodégradation des hydrocarbures par les micro-organismes.....	18

Partie 02 : Etude Expérimentale

Chapitre 01 : Matérielle et Méthode

I. Objectif	20
II. Milieux de culture.....	20
III. Matériel biologique	20
III. Méthode	21
❖ Echantillonnage	21
III.1. Isolement des microorganismes.....	21
III.2. Enrichissement.....	21
➤ Dilution décimale.....	21
III.3. Isolement des bactéries sur milieu solide.....	21
III.4. Dénombrement des bactéries.....	21
III.5. Observation macroscopique.....	23
III.6. Observation microscopique.....	23
III.6.1. Coloration de Gram.....	23
III.6.2. Coloration de spores.....	24
III.7. Purification des isolats.....	24
III.8. Conservation des isolats.....	24
III.9. Identification des microorganismes.....	25
III.9.1. Recherche de la catalase.....	25
IV. Sélection des bactéries par utilisation de milieux de culture spécifiques.....	25
IV.1. isolement de bactéries qui dégradent le pétrole	25
IV.2. Détection de l'activité de biodégradation des bactéries	26

Chapitre 02 : Résultat et Discussion

1- Caractérisations des échantillons prélevé	27
1-1- analyse physicochimique du sol.....	27
1-2- analyse microbiologiques du sol	28
1-2-1- Dénombrement de la microflore totale.....	28
1.2.2. L'étude morphologique	29
❖ Aspect macroscopique	29
1.2.3. Isolement et purification des bactéries	30
❖ Aspect microscopique	33
-Interprétation du résultat microscopique	35
❖ A-coloration de Gram	35
❖ B- mobilité	36
1.2.4. Isolement des bactéries sur le Gélose au cétrimide	36
1.3. Analyse biochimique des isolats.....	36
1.3.1. Recherche de catalase	37
-Interprétation du test biochimique.....	38
➤ test catalase.....	38
1-4-Dégradation de pétrole par microorganismes.....	38
1-4-1-Dégradation de pétrole sur (MSM) solide	38
1-4-2-Dégradation de pétrole sur (MSM) liquide	42
-Interprétation des résultats de Dégradation de pétrole par microorganismes.....	43
1- sur (MSM) solide.....	43
2- sur (MSM) liquide.....	43

Introduction

le phénomène de pollution a une importance de plus en plus grande sur les plans environnemental, sanitaire et économique cette phénomène est ciblé le sol puisqu'il est le support de l'activité industrielle , il renferme de l'eau, des nutriments minéraux, de l'oxygène et possède une grande surface spécifique qui permet un contact et des échanges importants entre les polluants et les organismes dégradeurs c'est aussi un réservoir d'organismes et notamment de microorganismes, qui participent activement à la dégradation des matières et contaminants organiques. . Cette pollution peut avoir un impact soit direct ou indirect, sur la santé humaine et l'équilibre des écosystèmes aussi bien marins que continentaux. la qualité des sols peut également en être altérée (**mbonigaba et al ,.2009**). donc il est nécessaire de mettre en place des moyen afin de lutter contre cette pollution pendant l'activité industrielle, mais aussi de réhabiliter le sol lorsque l'activité cesse

Par ailleurs le problème majeur rencontré dans le sol pollué par les produit pétroliers est leur décontamination pouvant nécessiter soient l'intervention de procédés physicochimiques ou biologiques

le rejet des hydrocarbures d'origine pétrolière dans l'environnement constitue l'un des phénomènes de pollution les plus préoccupants. il entraine la prolifération des microorganismes aptes à dégrader les hydrocarbures, de plus la communauté microbienne du sol semble présenter de fortes capacités de résistance et/ou d'adaptation : elle supporte souvent l'arrivée de polluants toxiques (**amellel et al., 2001**). en dépit des utilisations multiples des procédés physicochimiques dans la restauration des sols pollués par les produits pétroliers, la bioremédiation reste la solution la plus efficace, la plus demandée car la mieux maîtrisée et la moins coûteuse (**vogel, 2001**). il s'agit là d'une technique douce dont le principe repose sur la minéralisation complète des produits pétroliers qui ne génèrent aucun sous produit toxique ; contrairement aux procédés physicochimiques qui consistent souvent en un transfert de la pollution d'un milieu à un autre ou encore à son confinement (**vandercasteel, 2005**).

la réalisation de cette étude est pour étude la capacité de dégradation des hydrocarbures par des microorganismes isolés d'un sol contaminé d'une raffinerie de pétrole et et déterminer la caractérisation et isolement des souches bactériennes hydrocarbonoclastes, présente dans notre échantillons qui se trouve autour des bacs de stockage au niveau de la raffinerie d'arzew et des station d'essence a sidi lakhdar

Partie 01 :

Synthèse bibliographique

Chapaitre 01 :

Etude bibliographique

I- Généralités

I.1. Définition

Les hydrocarbures sont des composés organiques uniquement constitués d'atome de carbone et d'hydrogène (**Frnennec et al., 1988**). Ils possèdent une formule brute de type $C_n H_m$, où n et m sont 2 entiers naturels. Ils peuvent être classés en fonction de la forme de leur structure (linéaires, cycliques) et de leur degré de saturation (**Tarayre, 2012**).

I-2- Définition du pétrole brut « Crude oil »

Le mot « Pétrole est issu des deux mots latins « Petra » et « oléum » qui signifie « huile de pierre » ; dès l'antiquité il pouvait être utilisé comme revêtement étanche, médicament miracle ou arme de guerre. Le pétrole est une roche liquide carbonée, ou huile minérale, est un mélange liquide complexe d'hydrocarbures, c'est-à-dire de combinaisons chimiques de carbone (C) et d'hydrogène (H). Il est généralement extrait du sous sol «bassins sédimentaires » où il occupe les vides de roches poreuses appelés « roches réservoirs». Il contient de faibles quantités de soufre, ainsi que des traces d'azote, d'oxygène et de métaux. Le pétrole est aussi souvent appelé « or noir » en référence à sa couleur noire et à son prix élevé (Nilles, 2008).

I.3 Nature et origine

Les hydrocarbures sont considérés comme étant des polluants à la fois organiques et chimiques (**koller, 2004**) provenant des activités des secteurs énergétique et industriel. Certains composés, les HAP, se forment naturellement par les incendies de forêt (**Barriuso et al., 1996**).

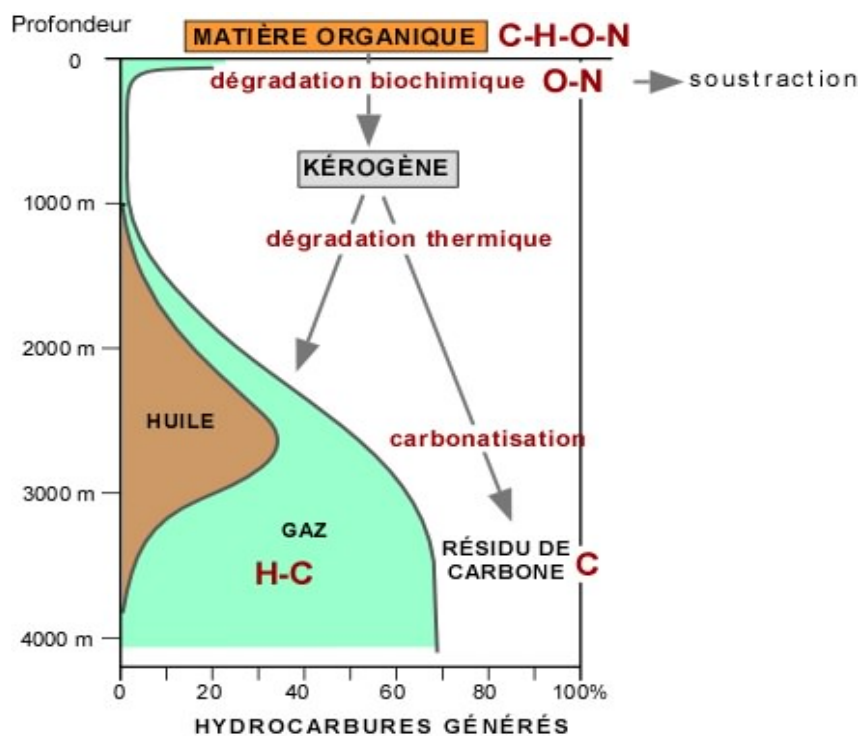


Figure 1 : Les étapes de la formation du pétrole à partir de la matière organique

I.4. Composition et caractéristiques

Malgré le fait que les principaux composants présents dans les hydrocarbures soient le carbone et l'hydrogène, une proportion significative d'autres atomes peut être présente. Celle-ci inclut l'oxygène, le soufre et l'azote (**Morgan et Watkinson, 1994**) et des métaux tels que le calcium et le magnésium (**Chitour, 1983**). Les hydrocarbures peuvent être classés en groupes de structures différentes.

I.4.1. Les hydrocarbures aliphatiques

Ce sont des hydrocarbures à chaînes droites saturés ou insaturés. Les hydrocarbures aliphatiques saturés sont des alcanes de formule générale $C_n H_{2n+2}$, ce sont les plus représentés dans le pétrole et vont du méthane aux chaînes contenant 40 atomes de carbone et plus (**Cerniglia, 1992**).

Les insaturés comportent les alcènes de formule générale $C_n H_{2n}$. Ces molécules contiennent une double liaison et les alcynes qui ont pour formule $C_n H_{2n-2}$ et contenant

une triple liaison dans leur molécule. Ils sont rares dans les pétroles bruts, plus communs dans les produits de raffinage (Cerniglia, 1992).

I.4.2. Les hydrocarbures cycliques

Ils peuvent être saturés : appelés cyclanes qui sont des cycles saturés isomères des alcanes, ou insaturés appelés cyclènes s'ils possèdent une double liaison dans leurs cycles et cyclines s'ils ont une triple liaison. Ils sont dits hétérocycliques si le cycle de leur molécule contient des atomes autres que le carbone tels que le soufre, l'azote et l'oxygène. Les hydrocarbures aromatiques sont des composés contenant au moins un noyau benzénique dans leurs molécules. C'est un cycle insaturé à six atomes de carbone. Ils constituent une proportion très importante du pétrole et s'étalent du benzène aux HAP. Ce sont des composés hydrophobes, persistants dans les écosystèmes à cause de leur faible solubilité dans l'eau (Cerniglia, 1992), certains, tels que l'anthracène, sont quasiment insolubles (solubilité de 0.7 mg/l) (Smith, 1994).

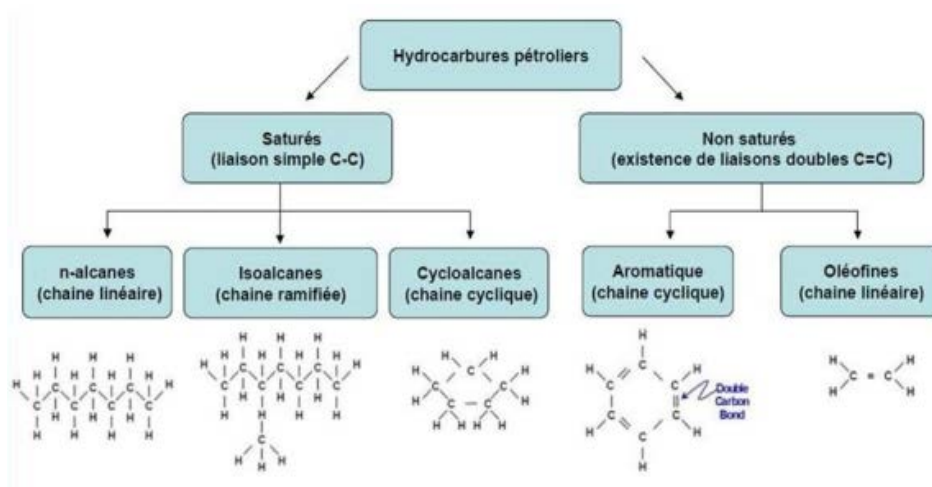


Figure 2 : Structure chimique des hydrocarbures pétroliers (Colombano *et al.*, 2008).

I.5. Les hydrocarbures en Algérie

I.5.1. Historique

Les hydrocarbures Algériens ont été nationalisés juste après l'indépendance (24 février 1971), ils occupent une place importante par rapport l'économie nationale. L'Algérie dispose de potentialités importantes en pétrole et gaz naturel lesquels ne sont pas exploités sous forme

de matières premières mais transformés en partie sur place, selon une stratégie et une planification rigoureuses. Le transport, la transformation et la commercialisation des hydrocarbures ont été confiés à la société nationale SONATRACH dont les principaux sièges se trouvent à: Hassi Messaoud, Alger, Arzew et Skikda. Arzew, wilaya d'Oran représente un pôle important de transformation et transport des hydrocarbures. Elle renferme un grand complexe d'industrie pétrochimique en Afrique. Néanmoins, le développement d'une telle industrie s'est fait au détriment de l'environnement de cette belle ville qu'on voit se dégrader d'année en année.

I.5.2. Problématique liée aux hydrocarbures pétroliers en Algérie

Le littoral de l'Ouest d'Algérie recèle un potentiel biologique important, une flore et une faune riches et variés, des sites naturels exceptionnels, un tel littoral devrait faire l'objet d'un soin minutieux. Les hydrocarbures représentent la plus importante source de pollution. Cette pollution résulte de plusieurs activités liées surtout à l'extraction du pétrole, à son transport et en aval à l'utilisation des produits finis dans les raffineries. En effet, de nombreuses études ont permis d'observer l'apparition de problèmes de santé lors de la baignade ou de pratique de sports aquatiques en eau contaminées. Les plus fréquents sont des troubles digestifs et des infections cutanées. Cette pollution a retenue l'attention de l'opinion mondiale et a suscité de nombreuses conventions nationales et internationales. En mai 1974, l'Algérie porta ratification de la convention de Bruxelles, puis, elle adopta le décret n°94-279 du 17 septembre 1994, portant organisation de lutte contre les pollutions marines et institutions de plans d'urgence. Enfin, le 05 février 2002 la loi algérienne n°02-02 relative à la protection et à la valorisation du littoral est promulguée. Théoriquement la législation protège la baie algérienne, cependant la réalité est toute autre. Les textes de la loi restent inappliqués, puisque sur le terrain rien n'est respecté. Les rejets des déchets riches en hydrocarbures émanant des zones industrielles se déversent directement dans la grande bleue et sans parler de ceux émanant des bateaux poubelles et les navires de ballastage qui traversent quotidiennement la côte, comme ce fut le cas en 1989 par le pétrolier 'Maas Luis' et en 2003 par le navire italien 'Valbruna' (**Saker, 2007**). En attendant l'application de ces textes et la concrétisation de ces projets, seule l'état de la faune et la flore pourra témoigner de la triste vérité. En effet, la pollution par les hydrocarbures en Algérie a fait l'objet de plusieurs études, parmi lesquelles on cite les travaux de (**Talbi et Ghouas en 2005**) qui touchent aux

techniques physico-chimiques de traitement des effluents de la raffinerie d'Arzew- Oran, ils montrent la composition des produits pétroliers tels que Naphta léger et le Naphta lourd, le kérosène et gasoil. Le gasoil est le produit le plus chargé en alcane (62.36%), ces composés varient entre (C1 à C30), et en aromatique (17.36%) et il regroupe le benzène et des hydrocarbures aromatiques non identifiés. Yassa (2005) cible la pollution atmosphérique, ces travaux traitent la composition en particules organiques de la torche (combustion du pétrole brut) émis par la raffinerie à Hassi-Messaoud et la comparer avec la pollution présente en ville. La composition en particules chimiques atmosphériques en n-alcane est de 33% pour (C16 et C34) tel Octadecane (0.012 ppm), et de 47% pour les n-alcane acides (A10 à A30) tel acide palmitique (0.061 ppm). En HAPs 20% tels Phénanthrène (0.011 ppm) et pyrène (0.003 ppm). Ladj (2010) étudie la composition organique du sable du Sahara pollué par les hydrocarbures des différentes régions d'Algérie, Hassi-Messaoud, Hassi-Bahbah, Laghouat, Touggourt et Ghardaia, la plus grande pollution est détectée en n-alcane à HassiBahbah avec 66% entre (C16 à C35), le % de chaque n-alcane est défini dans le sable pollué et pour chaque ville. En HAPs la ville la plus polluée est Laghouat avec 21.8% entre les aromatiques légers tels phénanthrènes, anthracène et les aromatiques lourds tels pyrènes et benzo[a]pyrène, le % de chaque composé aromatique est défini dans le sable pollué et pour chaque ville. Boutenfouchet en (2005) a permis d'établir une cartographie de la pollution et à évaluer la pollution industrielle par les hydrocarbures totaux au niveau de la plateforme industrielle de Skikda. Cependant, il serait intéressant de connaître l'identité de ces hydrocarbures directement dans l'effluent industriel et même dans le pétrole brut avant et après le traitement en raffinerie, qui est un élément important pour définir le degré du danger qu'ils constituent.

I.6. Mobilité des hydrocarbures dans l'environnement

Une fois déplacé, transformé ou éliminé dans l'environnement, l'hydrocarbure est soumis à différents processus qui vont entraîner des modifications de son aspect général et de ses caractéristiques physico-chimiques. Ces processus sont soumis au contrôle de facteurs physiques, chimiques et biologiques. On citera les facteurs environnementaux qui sont (R.EI, 2004).

I.6.1. Evaporation

Qui, selon le type de pétrole, peut affecter la quasi totalité ou une partie insignifiante du pétrole déversé. Les fractions de faible poids moléculaires, les plus volatiles des hydrocarbures déversés se perdent dans l'atmosphère à un taux qui est déterminé par le type d'hydrocarbure, la vitesse du vent et la température ambiante. La plupart des pétroles bruts déversés perdent jusqu'à 40% de leur volume dans les première 48 heures alors que les fuels moins ils lourds, qui contiennent peu de composés volatils, s'évaporent très peu, même après plusieurs jours (R.E1, 2004).

I.6.2. Solubilisation

Bien que les hydrocarbures soient des composés insolubles dans l'eau, certains d'entre eux peuvent partiellement se dissoudre (hydrocarbures aromatiques et hydrocarbures à faible nombre de carbone) (**BERTRAND et MILLE, 1989**). Un hydrocarbure est d'autant plus soluble que sa masse moléculaire est faible et que sa polarité est élevée (**SOLTANI, 2004**). Il est important de noter que ces hydrocarbures solubles sont parmi les plus dangereux pour l'environnement, ils sont difficiles à éliminer et sont adsorbés par la faune et la flore (**SOLTANI, 2004**).

I.6.3. Emulsifiassions

C'est le mélange de deux fractions non miscibles : l'eau et le pétrole. Deux types d'émulsions peuvent se former : Les émulsions directes « huile dans l'eau »: si la surface de l'eau est turbulente ; les hydrocarbures peuvent se fragmenter en gouttelettes qui ensuite restent en suspension dans l'eau. Ces émulsions facilitent l'élimination des hydrocarbures (R.E1, 2004). Et l'eau dans huile appelée « mousse chocolat » Ce type d'émulsion ; que l'on qualifie également d'émulation inverse ; peut se produire en l'espace de quelques heures ; et contient jusqu'à 90% d'eau .Le résultat est une augmentation de la densité et de la viscosité, aussi que des volumes à traiter ou à enlever (R.E1, 2004). Les émulsions eau dans huile sont constituées par des hydrocarbures de haut poids moléculaires (**SOLTANI, 2004**).

I.6.4. Sédimentation

Elle résulte de l'augmentation de la densité du pétrole par rapport à celle de l'eau de mer. Divers processus interviennent dans l'accroissement de cette densité, à savoir l'évaporation, la dissolution des composés légers, l'oxydation des paraffines, la formation d'agrégats et l'adsorption du pétrole dispersé sur les particules en suspension. Les hydrocarbures aromatiques et aliphatiques à haut poids moléculaires, sont plus facilement adsorbés par les matières organiques particulaires et colloïdales et donc incorporés plus rapidement dans les sédiments (**Bertrand et Mille, 1989**).

I.6.5. Photo-oxydation

Photo-oxydation est observée au niveau de la surface de l'eau ou l'air (oxygène) et la lumière (radiation solaires) sont présents pour la transformation des hydrocarbures. Etant donné la réduction rapide de la diffusion de la lumière dans les couches épaisses d'hydrocarbures ; la photo-oxydation affecte essentiellement les couches minces ou la surfaces des couches épaisses d'hydrocarbures (**BERTRAND et MILLE, 1989**). La photo-oxydation touche plus particulièrement les composés aromatiques qui sont plus photo-sensibles que les composés aliphatiques elle transforme les hydrocarbures en leurs homologues oxygénés généralement beaucoup plus solubles que les hydrocarbures de départ, mais parfois beaucoup plus toxiques (**BERTRAND et MILLE, 1989**).

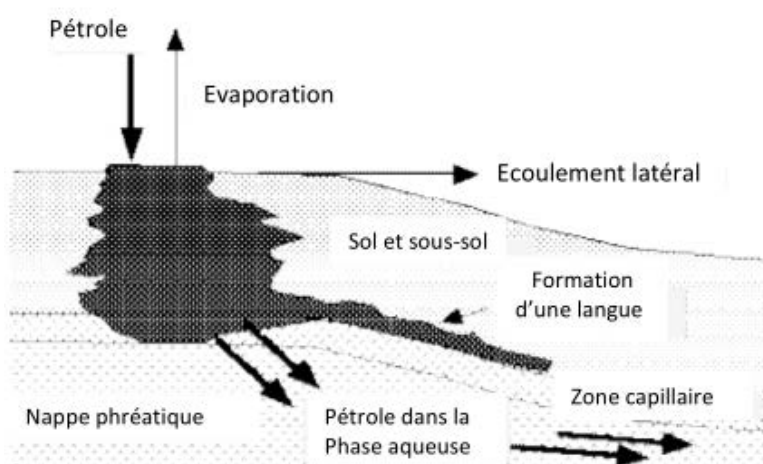


Figure 3 : Représentation schématique du devenir d'une pollution pétrolière à la surface du sol (Morgan et Watkinson, 1989).

I.7. Pollution du sol par les hydrocarbures

L'exploitation des hydrocarbures nécessite et engendre des opérations et activités importantes qui perturbent notre environnement provoquant des effets néfastes pour la santé humaine. (ARBAOUI et AFFANE, 2005). Les hydrocarbures consistent les éléments essentiels des pétroles; leurs molécules ne contiennent que du carbone et de l'hydrogène, elles se divisent en plusieurs familles chimiques selon leur structure (WAUQUIER, 1994). Toutes ces structures sont basées sur le carbone (WAUQUIER, 1994). Les enchaînements moléculaires carbonés-carbone peuvent être : soit réunis par une simple liaison -C-C- (suffixe ANE) soit par liaisons multiples : Doubles C=C (suffixe ENE) ou triples C≡C (suffixe YNE) (WAUQUIER, 1994).

I.7.1. Origines de pollution

A. Pollutions accidentelles : ou une grande quantité de polluant est déversée en fonction du temps (déversement ou dépôt ponctuel de polluants).

B. Pollutions chroniques : dont les effets cumulés peuvent être plus importants que ceux d'une pollution accidentelle (JEANNOT et LEMIERE, 2001).

I.7.2. Types de polluants

Les groupes de composés pétroliers polluants pour lesquelles la bio-dépollution est possible sont : A. Les hydrocarbures pétroliers (gasoils, fuel, kérosène, huiles minérales).

B. Les déchets d'exploitation du pétrole (boues et résidus d'huiles goudrons) (BLIEFERT et PERRAUD, 2004).

I.7.3. Biodétection de la pollution du sol par les hydrocarbures

Une méthode plus pratique pour épurer les environnements contaminés par des produits dangereux est la biorémediation ou la dépollution biologique (DAVID, 2005).

Il s'avère que le traitement des terres polluées se fait majoritairement à l'aide de techniques biologiques qui s'appliquent préférentiellement hors site, dans des installations spécialisées recevant des terres de plusieurs origines. Suivent les techniques de biodépollution

des sols in situ puis la biodégradation des polluants des terres mises en andain sur le site. Ces techniques se basent sur le fait que les micro-organismes qui se développent dans un sol pollué y trouvent des conditions favorables et se nourrissent notamment du polluant présent qui est alors dégradé. En modulant des paramètres comme l'oxygène, l'humidité, la température et les éléments nutritifs, la croissance des micro-organismes dépollueurs peut être optimisée. (DAVID .C ,2005). L'ensemble des procédés d'élimination de polluants, organiques ou minéraux, présents dans les milieux naturels par l'action de microorganismes (DAVID ,2005).

I.7.4. Procédés de biodétection de la pollution

- ✓ Biodégradation: Décomposition d'un substrat organique, par action de microorganismes vivants.
- ✓ Bioréduction: Réduction des composés oxydés (nitrates, oxydes métalliques) par voie biologique.
- ✓ Biolixiviation: Extraction des métaux contenus dans une boue, un sol, un sédiment ou un minerai par solubilisation provoquée par des microorganismes.
- ✓ Biofixation/Biosorption:"Fixation" de polluants, la plupart du temps, métalliques, présents dans un effluent liquide sur des microorganismes.

Chapitre 02 :

Biodégradation

II.1. Définition

La biodégradation est l'ensemble des mécanismes de transformation d'un contaminant (un composé organique métabolisable) en différents sous-produits plus simple par l'action des microorganismes. Ce phénomène peut s'effectuer à n'importe quel milieu (sol, eau) ainsi que dans différentes phases du polluant (liquide, solide, gazeuse) (**Lecomte, 1995**).

Cette phénomène (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**).

II.2. Types de biodégradation

II.2.1. Biodégradation aérobie

Selon **ZHENPENG et al.,(2002)**La biodégradation aérobie d'une substance organique

est le degré de modification physique et chimique que subit cette matière organique par les microorganismes en présence d'oxygène. Celle-ci peut être affectée par la modification de l'un des facteurs suivants :

- Vitesse de dégradation des composés organiques.
- Quantité de l'oxygène consommée.

- Produits résultant de la dégradation.
- Activité microbienne.

. Chez les micro-organismes aérobies, la respiration fournit l'énergie nécessaire à la vie par des réactions biochimiques comme suivant :

l'ammoniaque est transformé en nitrites ($2\text{NH}_4^+ + 3\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{NO}_2^- + 4\text{H}_3\text{O}^+$) puis les nitrites sont transformés en nitrates ($2\text{NO}_2^- + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{NO}_3^-$).

La première étape dans la dégradation aérobie de ces composés est l'introduction dans le substrat d'un atome d'oxygène dérivé de l'oxygène moléculaire. Cette étape critique est effectuée par les oxygénases (Olivier et al., 2005).

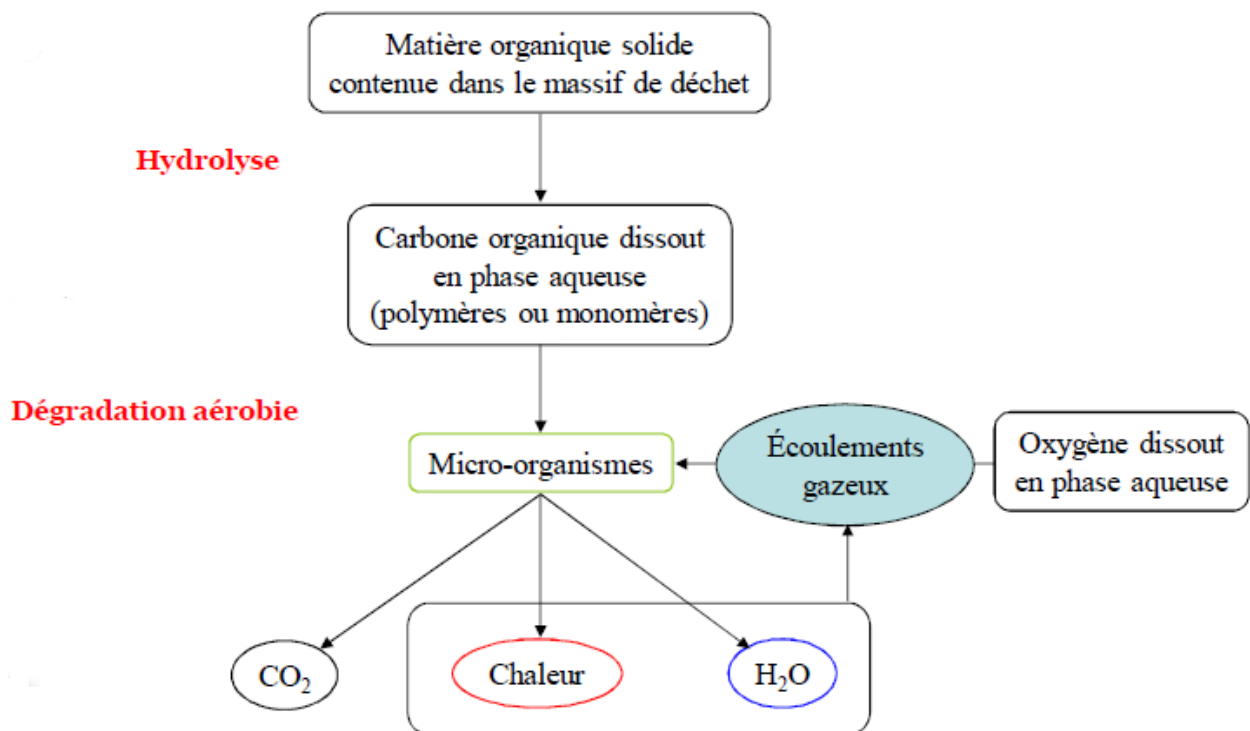


Figure 04 : Principe de la dégradation aérobie(Moletta, 2002)

II.2.2 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 aérobie est bien connue depuis plus d'un siècle.

- La biodégradation anaérobie d'une substance organique est le degré de modification physique et chimique que subit cette matière organique par les microorganismes en conditions d'anaérobie (Bouderhem. 2011). Par Exemple : transformation des nitrates en azote gazeux ($4 \text{ NO}_3^- + 4 \text{ H}_3\text{O}^+ \rightarrow 2 \text{ N}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O} + 5 \text{ O}_2$).

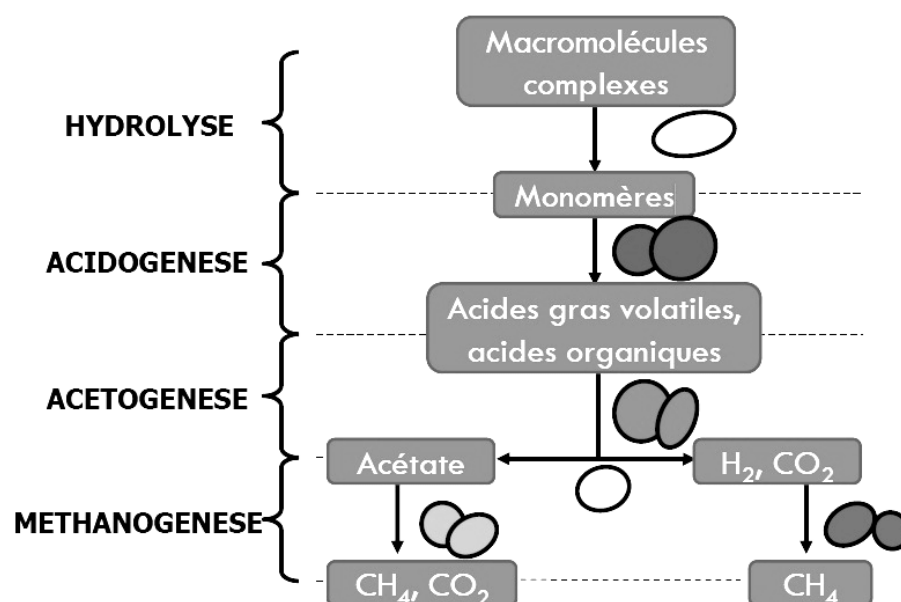


Figure 05: Principe de la digestion anaérobie (Moletta, 2002)

II.3. La biodégradation des hydrocarbures par les micro-organismes

Les composants du pétrole brut constituent une grande source d'énergie qui permet d'alimenter non seulement les moteurs à combustion interne, mais aussi les microorganismes. Ces derniers ont développé des mécanismes d'utilisation de ces hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie.

La capacité des micro-organismes de se développer sur les hydrocarbures ne se limite pas uniquement sur les bactéries, certains sites contaminés contiennent également de nombreux champignons et levure capables de les dégrader (**VANDECASTEELE, 2005**).

Les bactéries peuvent décomposer le pétrole en dioxyde de carbone et en eau. Cependant, aucun micro-organisme ne peut à lui Seul dissoudre tous les composants du pétrole brut ou des carburants raffinés qui sont déversés dans l'environnement. Les dizaines de milliers de composés différents qui forment le pétrole ne sont biodégradables que par une communauté de micro-organismes agissant de concert. Certaines bactéries peuvent dégrader plusieurs hydrocarbures ou toute une classe d'hydrocarbures. L'action combinée de la communauté bactérienne peut arriver à dégrader presque tous les composants .De nombreux genres bactériens ont été recensés et décrits comme aptes à dégrader des hydrocarbures, quelques exemples sont cités dans le tableau (1).

Tableau 01 :exemples des microorganismes dégradants les hydrocarbures (Tarayre. 2012).

Bactéries		Champignons
Gram -	Gram + ou gram variable	
<i>Pseudomonas</i> <i>Xanthomonas</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Agrobacterium</i>	<i>Micrococcus</i> <i>Arthrobacter</i> <i>Rhodococcus</i>	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Acremonium</i> <i>Trichoderma</i> <i>Fusarium</i>

Parmi les microorganismes aptes à se développer sur les hydrocarbures, les bactéries restent qualitativement et quantitativement prépondérantes pour métaboliser ces substrats (**BERTRAND et MILLE, 1989**).

Partie 02 :

Etude expérimentale

Matérielles
et
Méthodes

I. Objectif

Notre travail a pour objectif d'essayer de réhabiliter un sol agricole contaminé par les hydrocarbures pétroliers en utilisant des souches bactériennes.

Ce chapitre a pour but de décrire les différents protocoles et méthodes mis en œuvre au cours de ce travail. Certains protocoles sont détaillés en annexe.

II. Milieux de culture

Gélose nutritive : GN (la composition voir annexe) : un milieu d'isolement et de purification

Gélose au cétrimide (la composition voir annexe) : un milieu sélectif, qui permet l'isolement des *Pseudomonas* et notamment de *P.aeruginosa*. Ce milieu, proche du milieu King A, favorise aussi la production de pigments par *P.aeruginosa*.

BN (la composition voir annexe) : un milieu destiné à obtenir une croissance rapide du micro-organisme étudié.

MSM (la composition voir annexe) : un milieu composé de sels minéraux

III. Matériel biologique :

Pour la réalisation de nos expériences, nous avons utilisé des échantillons de sols contaminés par les hydrocarbures prélevés au niveau la raffinerie d'Arzew (Sonatrach, compagnie Algérienne de pétrole) NAFTEC/RA1Z. Un autre échantillon est prélevé d'un sol n'ayant pas subi de rejets pétroliers, il s'agira d'un contrôle négatif. Afin de déterminer la répartition des bactéries telluriques en fonction du degré de pollution du sol par les hydrocarbures.

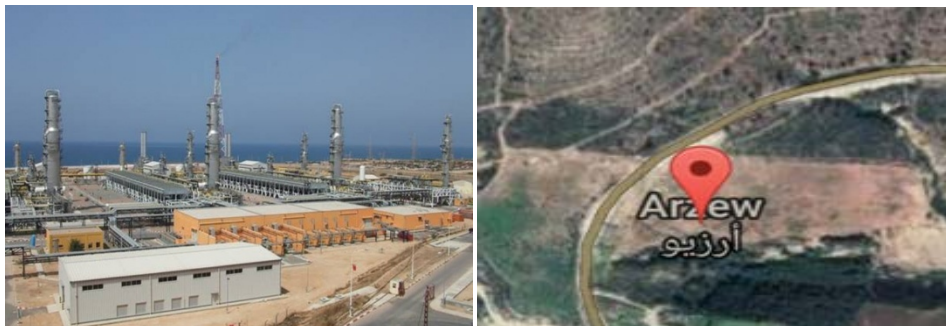


Figure 6: site d'échantillonnage d'Arzew (Google, 2018)

III. Méthode

❖ Echantillonnage

L'échantillonnage est effectué au centre de chaque site. Les prélèvements ont été réalisés à l'aide d'une spatule stérile à une profondeur de 20 cm. Pour chaque échantillon, 1Kg de sol prélevé est mis dans des flacons en verre stériles. Les échantillons de sols obtenus sont ensuite tamisés à 5 mm puis à 2 mm pour éliminer les éléments grossiers et les débris organiques. Les échantillons de sols sont conservés au frais (4°C).

III.1. Isolement des microorganismes

Pour la dilution des échantillons, nous avons besoin d'eau physiologique stérile, tubes stériles, une micropipette, un vortex et une balance.

Pour l'ensemencement et la purification, nous utilisons des boîtes de Pétri contenant de la Gélose nutritive ordinaire (GN) et de gélose au cétrimide.

III.2. Enrichissement

➤ Dilution décimale

Afin de dénombrer la microflore bactérienne existant dans l'échantillon, la solution mère du sol est préparée (10gr de sol dans 90mL de bouillon nutritif) suivie d'une série de dilutions décimales allant de 10^{-1} (solution mère) à 10^{-6} en conditions d'asepsie.

III.3. Isolement des bactéries sur milieu solide

On prélève 0,1 ml de chaque dilution préparée qu'on ensemence par étalement sur les boîtes de Pétri contenant de la GN et de cétrimide à l'aide d'un râtelier. L'incubation des boîtes se fait à 30°C pendant 24h.

III.4. Dénombrement des bactéries

Le dénombrement après culture concerne, évidemment les cellules viables de l'échantillon. Autrement dit, les cellules capables de croître. Il est basé sur l'aptitude de chaque bactérie, fixée par la solidification du milieu gélosé, à former une colonie visible à l'œil nu (Austin, 1988).

Après 24h d'incubation à 30°C, les colonies développées sont dénombrées à l'aide d'un compteur de colonies en UFC (Unité Formant Colonie).

Le nombre de germes par gramme de sol est déterminé en calculant la moyenne Arithmétique des résultats obtenus et en tenant compte des facteurs de dilution, selon la formule(Marchal et Bourdon ,1982):

$$N = n / d \cdot v$$

Où :

N : nombre des microorganismes en UFC/ ml.

n: nombre des colonies dénombrées.

v: Volume prélevé (0.1ml).

d: Dilution).

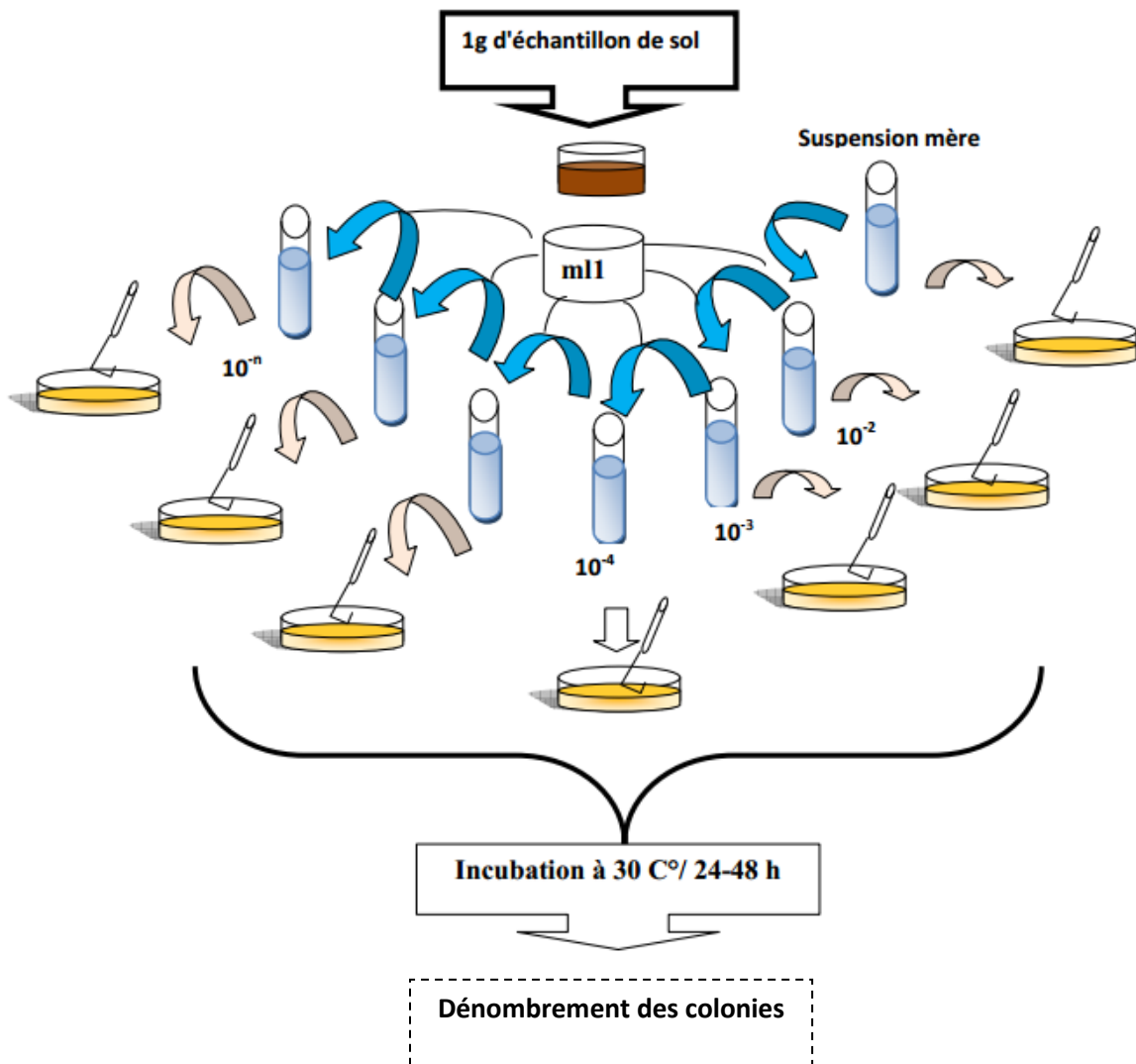


Figure 7: Schéma de l'isolement et de dénombrement des bactéries

III.5. Observation macroscopique

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

D'après **JOFFIN et LEYRAL (2006)**, les éléments d'identifications macroscopiques sont:

- La forme des colonies : rondes, irrégulières,...etc.
- La taille des colonies par la mesure du diamètre: punctiformes ou non punctiformes.
- La chromogénèse: couleur de la colonie.
- L'élévation: convexe, concave, plate.
- L'opacité: opaque, translucide ou transparente.
- La surface: lisse, rugueuse, sèche, dentelée,...etc.

III.6. Observation microscopique

III.6.1. Coloration de Gram

C'est une double coloration qui nous permet de connaître la forme, l'arrangement, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées. Cette coloration est réalisée systématiquement sur les différentes colonies purifiées pour préciser le caractère Gram+ ou Gram- Avec cette coloration double, les bactéries Gram positive apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries Gram négatives sont colorées en rose ou en rouge (**DELARRAS, 2008**).

La technique est comme suit :

- A partir des boîtes de pétri faire un frottis.
- Déposer une goutte d'eau physiologique sur la lame.
- Frotter la pointe dans la goutte d'eau physiologique. Laisser sécher à l'air.
- Passer 3 fois la lame dans la petite flamme du bec Bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur.
- Déposer quelques gouttes de solution de violet de gentiane (cristal violet) sur le frottis fixé.
- Laisser agir 1 minute. Jeter l'excès de colorant dans un bécher.
- Rincer très brièvement
- Déposer quelques gouttes de lugol sur le frottis.
- Laisser agir 1 minute. Jeter la solution de Lugol dans un bécher et rincer brièvement à l'H₂O.
- Déposer quelques gouttes d'alcool sur le frottis et laisser agir 30 secondes.
- Rincer à l'H₂O.

- Déposer la solution de fishine pendant 1 minute.
- Rincer à l'H₂O.
- Laisser sécher à l'air.
- Observer au microscope (grossissement 400x ou, avec une goutte d'huile à immersion, au grossissement 1000x).

III.6.2. Coloration de spores

La coloration au bleu de méthylène permet l'observation de la morphologie cellulaire et la présence ou l'absence de spore (DELARRAS, 2008).

La technique est comme suivante :

- Réaliser un frottis fixé sur la lame.
- Recouvrir la lame de vert de malachite.
- Chauffer jusqu'à émission de vapeurs sans faire bouillir le colorant ni laisser sécher la préparation. Le chauffage doit durer 10 min.
- Laisser refroidir et laver à l'eau.
- Recouvrir la lame de fishine durant 1min.
- Laver et sécher
- Observation à l'objectif 100 à immersion.

III.7. Purification des isolats

Après 24 h d'incubation, nous passons à l'étape de purification des cultures. Celle-ci nous permet d'obtenir des cultures pures à partir des différentes colonies isolées.

La sélection des colonies est basée sur l'aspect macroscopique des colonies à savoir la couleur, la forme, le diamètre, l'opacité. Un échantillon de chaque type de colonie est prélevé et ensuite purifié par repiquages successifs et alternés en milieu liquide, puis en milieu solide jusqu'à l'obtention au sein d'une boîte de Pétri de colonies identiques par l'aspect et la couleur. (Delarras, 2007).

III.8. Conservation des isolats

A partir d'une boîte de pétri contenant des colonies bien purifiées :

- prélever une colonie bien isolée.
- ensemencer dans un milieu BN, incubé à 30 °C /24 avec agitation.

- centrifuger a 6000 rpm pendant 10 min dans des tubes Eppendorf (1ml de la suspension bactérienne)
- éliminer le surnageant et garder le culot.
- ajouter 0.8ml BN stérile et 0.2 solution glycérol stérile a l'Eppendorf qui contient le culot.
- vortexer et conserver a -20 °C (congélation).

III.9. Identification des microorganismes

Elle comporte une série de tests permettant de mettre en évidence le typerespiratoire des souches, leur métabolisme énergétique, la production d'indole et celle du sulfure d'hydrogène (H₂S), la réduction des nitrates ainsi que leur capacité àhémolyser le sang. Des activités enzymatiques telles que l'oxydase, la catalase, la β- galactosidase, la tryptophane désaminase et les enzymes de transformation des acidesaminés (ADH et LDC) ont été également recherchées. Les souches ont été testées aussipour l'utilisation des citrates, du glucose, du lactose et de l'esculine.

III.9.1. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) Avec dégagement d'oxygène.

Sur une lame et à l'aide d'une pipette Pasteur, on dépose une colonie bactérienne à laquelle On ajoute de l'eau oxygénée (à 10 volumes = 3%).

La présence d'une catalase est révélée immédiatement par des bulles de gaz qui Correspondent à l'oxygène dégagé (**Marchal et Bourdon, 1982**)

IV. Sélection des bactéries par utilisation de milieux de culture spécifiques

IV.1. isolement de bactéries qui dégradent le pétrole :

- Ensemencer les souches dans un milieu minéral qui contient MSM.
- Lancer une culture des souches isolées dans du bouillon nutritif et incubé pendant 24heures.
- Centrifuger la culture à 3000t/min pendant 10 minutes, récupérer le culot et effectuer un lavage avec msm liquide 5 fois.
- Laver l'agar puis préparer MSM solide, le couler dans des boites préalablement numérotées et les laisser solidifier.

-Après solidification de la gélose (verser une grande couche de la gélose), étaler 100 ul de pétrole filtré sur la surface des boites puis laisser sécher devant le bec benzène 3heures de temps.

- A partir des différents culots, prendre avec une anse stérile une goutte et déposer sous forme de spots le concentré de culture dans les carreaux appropriés a chaque souche.

-Laisser sécher devant le bec benzène puis incuber a l'abri de la lumière à 30°C pendant 7 à 15jours et la lecture doit se faire quotidiennement

Remarque : l'incubation de certaines souches peut durer jusqu'à 21jours.

-Faire la lecture des boites tous les jours pour voir s'il y apparition de zones claire.

(HohzohKiyohara, 1982) (Jyothi K, K SurendraBabu 2012)

IV.2.Détection de l'activité de biodégradation des bactéries

Une série de culture MSM liquide avec pétrole ajouté comme une source de carbone a été effectuée seulement pour les souches qui ont donné un résultat positif (zone claire) avec la méthode de spray.

Les souches sont (C1,C2,C3,C4,C5,C6,C7,C8,C9,C10,C12,C13,C15)

La croissance bactérienne a été suivie par mesure de la DO par spectrométrie à une longueur d'onde de 595nm de 0heure jusqu'à 15 jours et a des intervalles réguliers de 2 jours (avec MSM comme Blanc).

Résultat
et
Discussion

1- Caractérisations des échantillons prélevé

1-1- analyse physicochimique du sol

L'observation de couleur et la texture d'échantillon de prélèvement de sol montre que il ya une différence entre les deux échantillons, rapportés dans le tableau 2.

Tableau 02: Caractéristiques physico-chimique des échantillons de sol.

échantillon	couleur	Texture	Ph
E1	noir	Agrégats	6,98
E2	Marron	Sableux	6,74

Le premier échantillon prélevé à une distance de 1 m du bac est de couleur noire et d'une texture agrégée, tandis que le deuxième, prélevé à 10 m de la station d'essence est de couleur marron et de texture sableuse.

Les deux échantillons contiennent des concentrations différentes de pétrole, plus nous nous approchons du bac, plus la concentration du pétrole est importante (la saturation du sol par les hydrocarbures augmente)

Les valeurs de pH des deux échantillons qu'on a mesuré au niveau du laboratoire montrent que les 2 échantillons ont des valeurs proches de la neutralité.

Ce pH proche de la neutralité, favorise la croissance des bactéries et par conséquent assure un déroulement efficace de la biodégradation des hydrocarbures (**Leahy et Colwell, 1990**).

Le pH apparaît ainsi comme un paramètre qui influence de manière majeure la structure et la diversité des communautés bactériennes dans les sols, et impose directement une contrainte physiologique sur les bactéries du sol. (**Nicolas T., 2013**).

L'activité biologique d'un sol varie avec le pH, la diversité, l'abondance et l'activité de la microflore (bactéries) sont en effet influencées par le pH. Chaque espèce possède une

plage optimale de pH, par exemple, Un pH de 7 est optimal pour l'activité des bactéries responsables des transformations de la matière organique, et par conséquent il assure un bon déroulement de la biodégradation des hydrocarbures.

1-2- analyse microbiologiques du sol

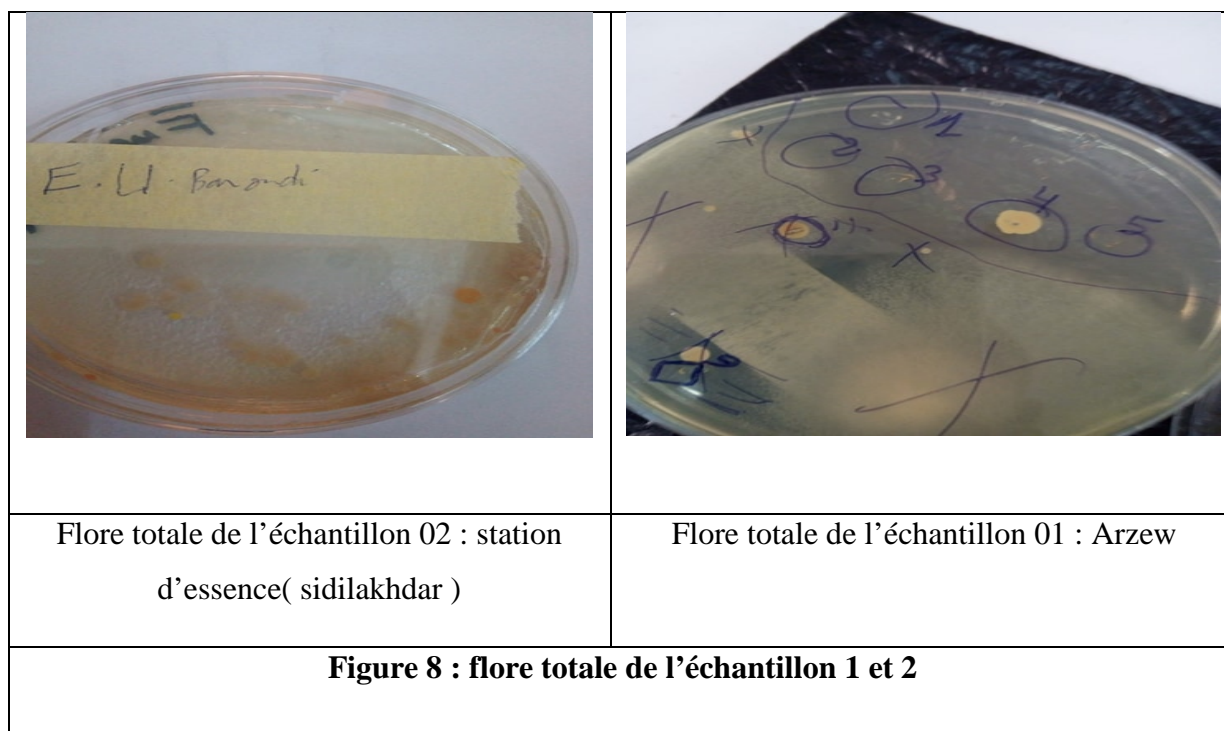
1-2-1- Dénombrement de la microflore totale

Le dénombrement de la microflore totale dans notre échantillon de sol pollué par les hydrocarbures a été faite sur le milieu gélose nutritive (GN), On peut déterminer le nombre de germes dans notre échantillon Selon la règle de **MARCHAL et BOURDON (1982)**,

-Après l'analyse des 2 échantillons prélevés à partir de la raffinerie d'Arzew on a obtenue des résultats mentionné dans le tableau 03.

Tableau 03: nombre des germes des échantillons prélevés

Dilution 10^{-5}	Nombre de colonie	N : nombre des microorganismes en UFC/ml.
E1	8	8.10^4 UFC/ml
E2	7	7.10^4 UFC/ml



Selon les résultats obtenus dans notre expérience on peut conclure que la charge microbienne est importante et la flore est riche.

1.2.2. L'étude morphologique :

❖ Aspect macroscopique :

L'observation macroscopique des colonies a permis d'étudier l'aspect macroscopique des colonies, les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 04.

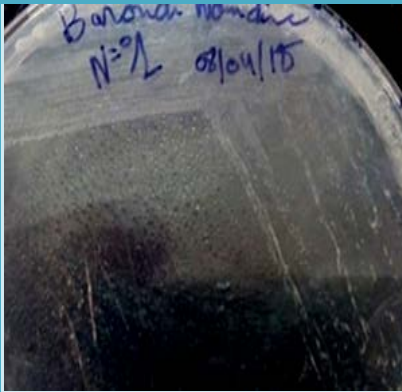

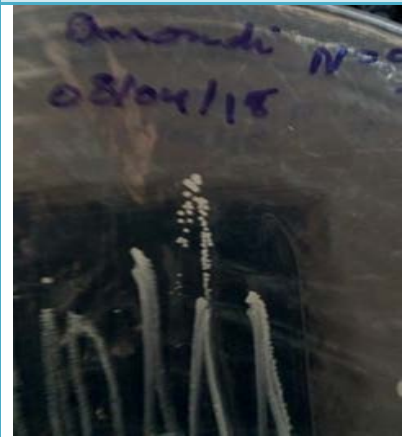

Tableau 04 : Résultat d'étude macroscopique des isolats



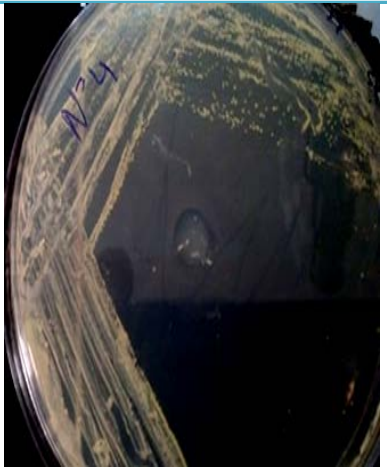



Colonie	Couleur	Forme	Taille	aspect	Opacité
1	Blanc	Circulaire	Très Petit	Plate	-
2	Blanc	Circulaire	Petit	Plate	-
3	Blanc jaunâtre	Circulaire	Grand	Convexe	-
4	Jaune	Irreglé	Petit	Plate	-
5	Jaune clair	Irreglé	Petit	Plate	-
6	Jaune	Circulaire	Petit	Plate	-
7	Jaune foncé	Circulaire	Petit	Plate	-
8	Transparent	Irreglé	Très petit	Plate	+
9	Blanc	Circulaire	Moyen	Bombé	-
10	Blanc	Irreglé	Grand	Convexe	-
11	Blanc	Circulaire	Petit	Plate	-
12	Blanc jaunâtre	Circulaire	Grand	Bombé	-
13	Blanc	Irreglé	Très petit	Plate	-
14	Blanc	Irreglé	Grand	Plate	-
15	Blanc	Irreglé	Petit	convexe	-

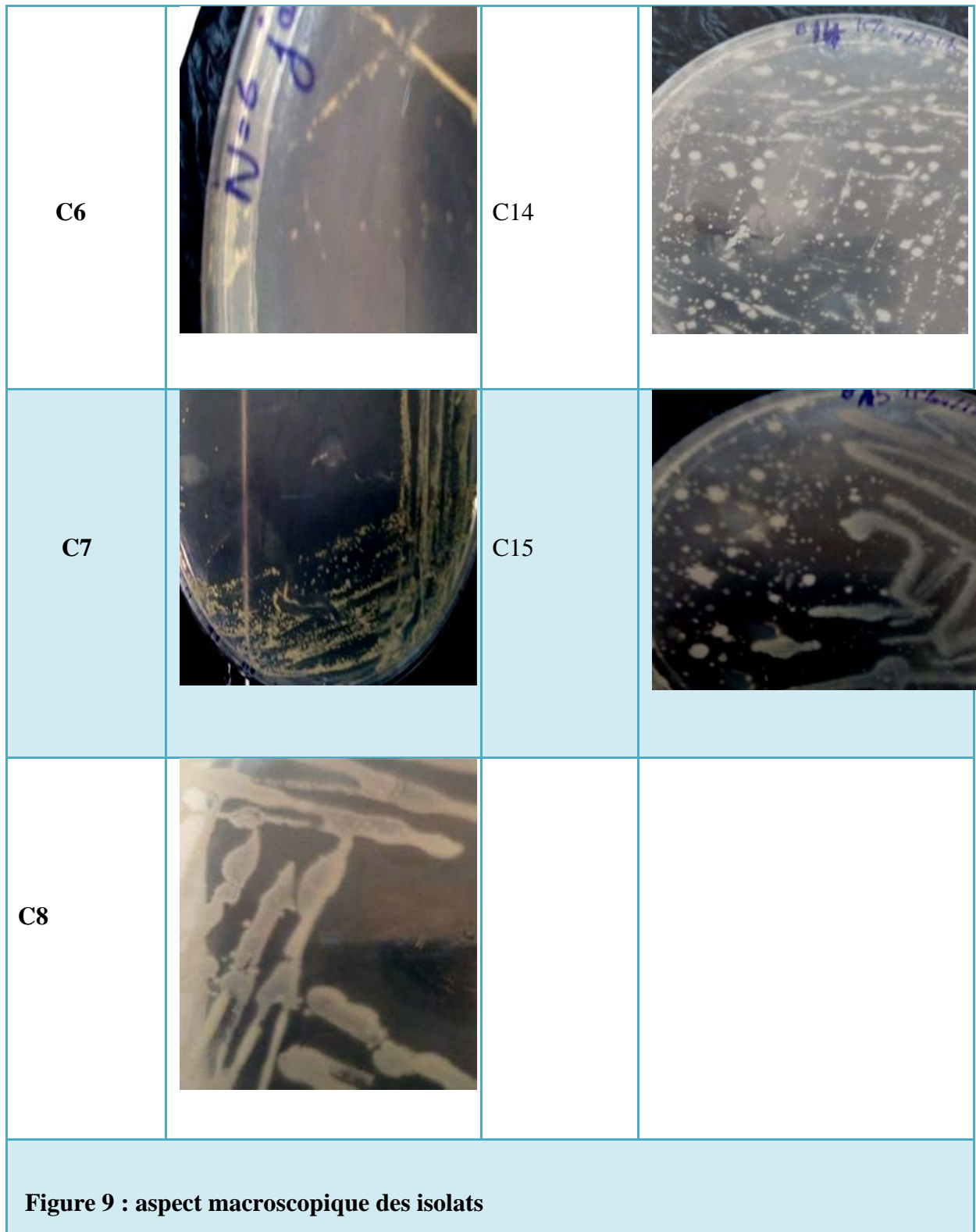
L'observation macroscopique montre des colonies bien séparées avec des caractères spécifiques qui différencient les souches.

1.2.3. Isolement et purification des bactéries :

Les figures en dessous illustrent les différents aspects macroscopiques et quelques aspects microscopiques.

Echantillon 1	Aspect macroscopique	Echantillon 2	Aspect macroscopique
C1		C9	
C2		C10	

<p>C3</p>		<p>C11</p>	
<p>C4</p>		<p>C12</p>	
<p>C5</p>		<p>C13</p>	

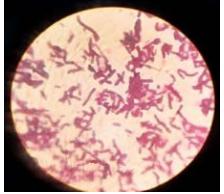
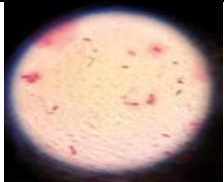

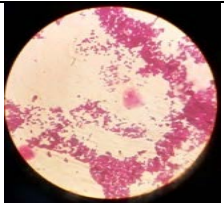


Selon les résultats de qui on à obtenue dans L'étude morphologique des isolats on peut distinguer que notre colonies ont des déférents formes,couleur, tailles, et d'élévation, ont motionnées dans le tableau 04.

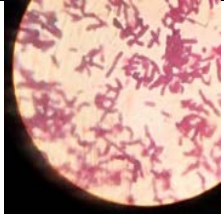
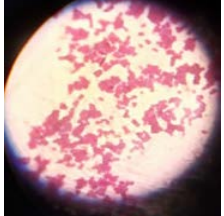
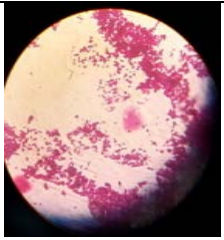
❖ **Aspect microscopique :**

L'observation microscopique a été réalisée suivant à 2 étapes sont la coloration de gram et mobilités des colonies bactériennes (Tableau 05).


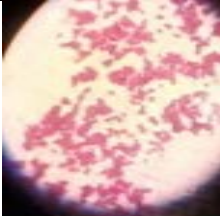
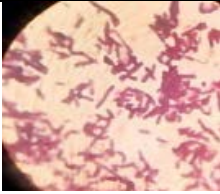
Tableau 05 : Résultats de l'étude microscopique des isolats

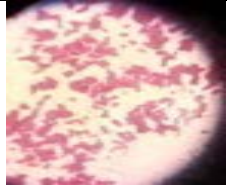
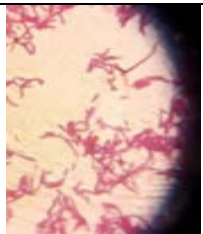
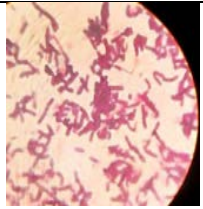
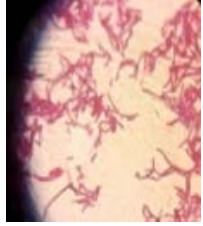
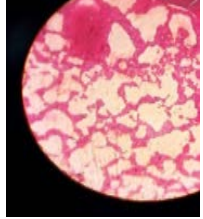
colonie	Gram (+/)	Aspect microscopique	Mobilité (+ / -)	Observation microscopique
Echantillon 1 :station d'épuration(Arzew)				
C1	-	Bacille	+	
C2	-	Coque	-	
C3	-	Bacille	-	
C4	-	Coque	+	

Résultats et discussion

C5	-	Bacille long	-	
C6	-	Coque	+	
C7	-	Coque	-	

Echantillon 2 : Station d'essence (SidilAkhdar)

C8	-	Bacille	-	
C9	-	Bacille	+	
C10	-	Bacille	-	

C11	-	Bacille	+	
C12	-	Bacille	-	
C13	-	Coque	+	
C14	-	Bacille	+	
C15	-	Bacille	-	
<p>Figure 10 : aspect microscopique des isolats</p>				

-Interprétation du résultat microscopique

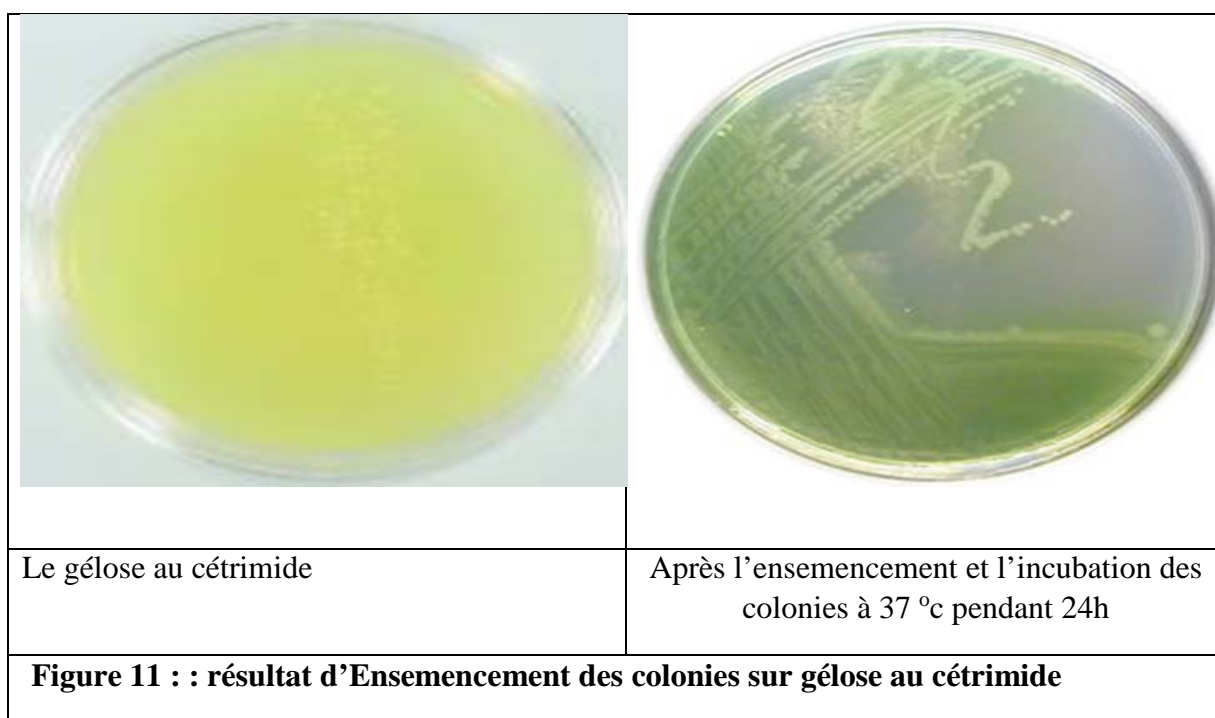
➤ **A-coloration de Gram :**

D'après les résultats qui ont été obtenus par nos observations microscopiques (tableau 05), il ressort que les bactéries isolées à partir de notre échantillon sont présentes sous 2 différentes formes : bacille, coque avec une paroi de type négative.

➤ **B- mobilité :**

Selon les résultats qui ont été obtenus dans le test de mobilité on a détecté des résultats positifs chez les colonies (C1,C4,C6,C9,C11,C13,C14).

1.2.4. Isolement des bactéries sur le Gélose au cétrimide :



-Discussion :

Après 24h d'incubation à 37 °c on a détecté un changement de la couleur du milieu de culture de vert clair vers le vert foncé ce qui indique qu'il y a une croissance de notre isolat sur le gélose au cétrimide.

1.3 analyse biochimique des isolats :

Cette étude est basée essentiellement sur la détermination de certains caractères biochimiques des isolats.

1.3.1.recherche de catalase :

La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée en eau et oxygène, La présence d'une catalase est révélée immédiatement par des bulles de gaz qui correspondent à l'oxygène dégagé (MARCHAL et BOURDON, 1982).



Figure 12 : représentation des résultats positifs du test de catalase

Les résultats d'analyse biochimique de nos échantillons ont permis d'obtenir des caractères biochimiques regroupés dans le tableau 06.

tableaux 6 : résultats du test biochimique des isolats

Echantillon 1	Catalase	Echantillon 2	Catalase
Colonies		colonies	
1	-	9	+
2	+	10	-
3	+	11	-
4	+	12	+
5	-	13	-

6	+	14	-
7	+	15	-
8	-		

❖ **Interprétation du test biochimique :**

➤ **test catalase**

La présence des bulles de gaz pendant le contact direct de L'eau oxygéné (H₂O₂) avec la colonie bactérienne qui correspondent à l'oxygène dégagé (**MARCHAL et BOURDON, 1982**). Indicateur de dégradation de H₂O₂ en oxygène et hydrogène (catalase +)

selon les résultats qui on à obtenue dans notre expérience on à détecté une catalase (+) chez les colonies (C2,C3,C4,C6,C7,C9,C12,).

1-4-Dégradation de pétrole par microorganismes

1-4-1-Dégradation de pétrole sur (MSM) solide

Après une incubation de 5 jours à l'obscurité, les colonies qui montrent une dégradation sont entourées de zones claires sur la surface opaque de la gélose. Cette technique s'appelle: (OIL SPREADING THECHNIQUE) (**HohzohKiyohara et al., 1982**).

Après l'incubation des boites, la lecture se fait quotidiennement pour voire s'il y a eu apparition de zones clair.

La biodégradation des hydrocarbures se manifeste par l'apparition de zones claires sur le milieu de culture. Cette méthode s'avère, simple et pratique pour l'isolement des bactéries qui ont le potentiel de dégrader les hydrocarbures.

Ces bactéries isolées sont capables de digérer le pétrole et cette méthode peut être applicable pour la détection des souches qui dégradent d'autres hydrocarbures non volatiles.

Cette méthode peut être utilisée aussi pour l'étude de la dégradation du

naphtalène, phénanthrène, et l'antracène en plus de la détection des bactéries mutantes, auxotrophes d'après (HohzohKiyohara et al.,1982).

Les résultats d'ensemencement des colonies bactériennes sur le MSM solide sont représentés dans la figure 13.

les résultats du dégradation du pétrole dans ce milieu sont représentés dans la figure 14



Figure 13 : ensemencement des colonies dans (MSM) solide contenant du pétrole

Après l'incubation des coloniesensemencées sur le milieu MSM solide additionné par le pétrole à 37⁰c pendant 21 jours on a détecté du résultatde la dégradation de pétrole par notre isolat.

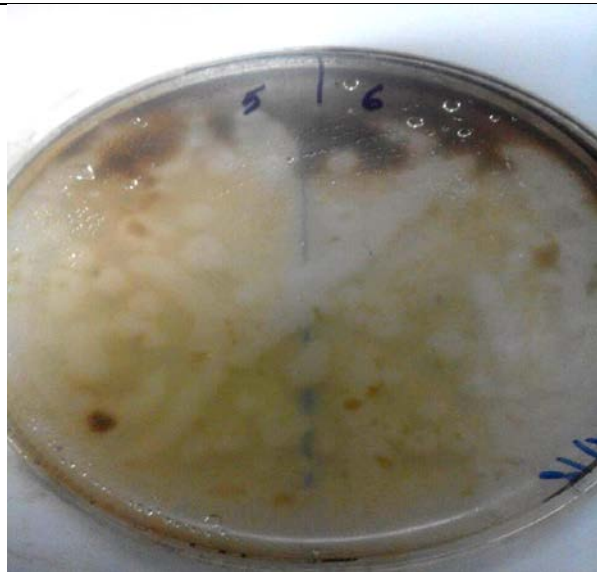
Les résultatsdu dégradation de pétrole par notre bactéries sont présentent dans la figure 14.



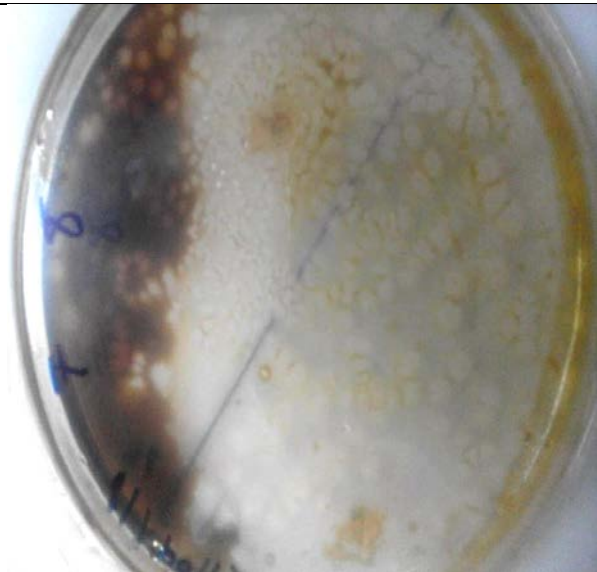
Colonies 1 et 2



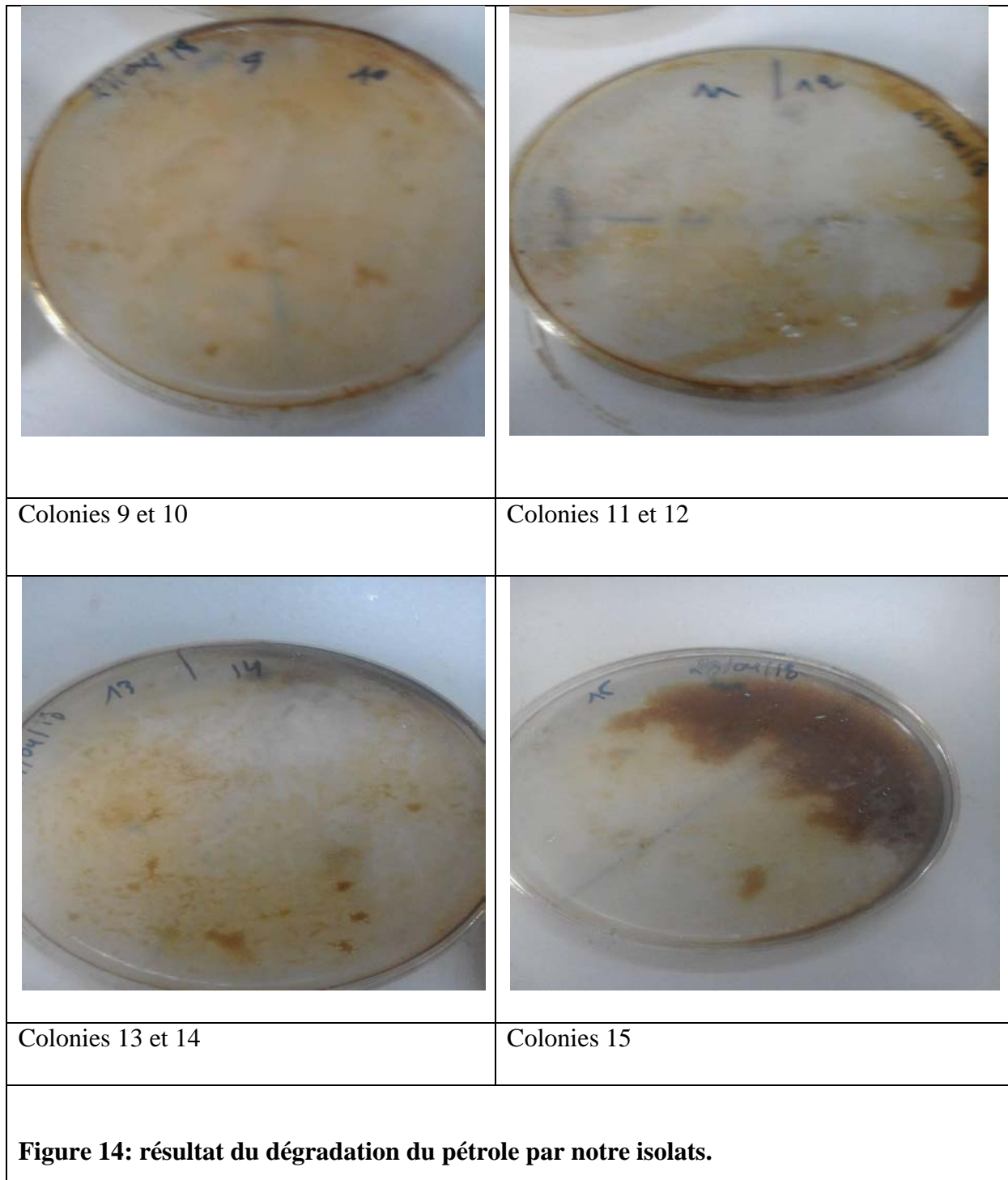
Colonies 3 et 4



Colonies 5 et 6



Colonies 7 et 8



Après une incubation de 5 jours à l'obscurité, les colonies qui montrent une dégradation sont entourées des zones claires sur la surface opaque de la gélose. Cette technique s'appelle : « OIL SPREADING THECHNIQUE » (*HohzohKiyohara et al., 1982*)

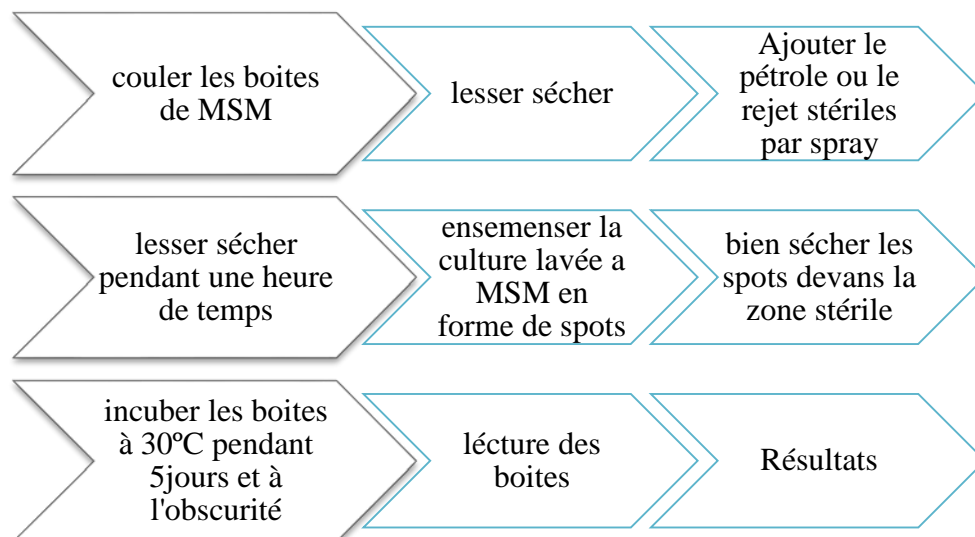


Figure15 : Schéma récapitulatif du protocole de la méthode de spray

1-4-2-Dégradation de pétrole sur (MSM) liquide

La croissance bactérienne a été suivie par mesure de la DO par spectrométrie à une longueur d'onde de 595nm de 0heure jusqu'à 15 jours et à des intervalles régulières de 2jours (Avec MSM comme Blanc ;les résultats sont regroupé dans le tableau 07

tableaux 7 : résultats de la DO des isolats en présence du pétrole pendant 15 jours d'incubation :

Do	Jour 1	Jour 3	Jour 5	Jour 7	Jour 9	Jour 11	Jour 13	Jour15
Col 1	0.19	0.22	0.26	0.39	0.48	0.53	0.56	0.49
Col 2	0.17	0.34	0.42	0.53	0.55	0.52	0.46	0.42
Col 3	0.36	0.53	0.72	0.89	0.76	0.72	0.64	0.56
Col 4	0.27	0.29	0.32	0.33	0.30	0.26	0.17	0.15
Col 5	0.33	0.48	0.49	0.52	0.53	0.45	0.41	0.36
Col 6	0.37	0.79	0.98	1.12	1.26	1.16	0.98	0.91
Col 7	0.30	0.42	0.59	0.78	0.77	0.79	0.81	0.83
Col 8	0.22	0.38	0.42	0.49	0.32	0.26	0.21	0.19
Col 9	0.39	0.48	0.65	0.76	0.89	0.92	0.89	0.82

Col 10	0.37	0.39	0.41	0.42	0.37	0.32	0.29	0.22
Col 12	0.34	0.42	0.49	0.42	0.45	0.43	0.38	0.34
Col 13	0.34	0.39	0.49	0.76	0.92	1.24	1.18	1.12
Col 15	0.39	0.53	0.56	0.59	0.62	0.53	0.51	0.47

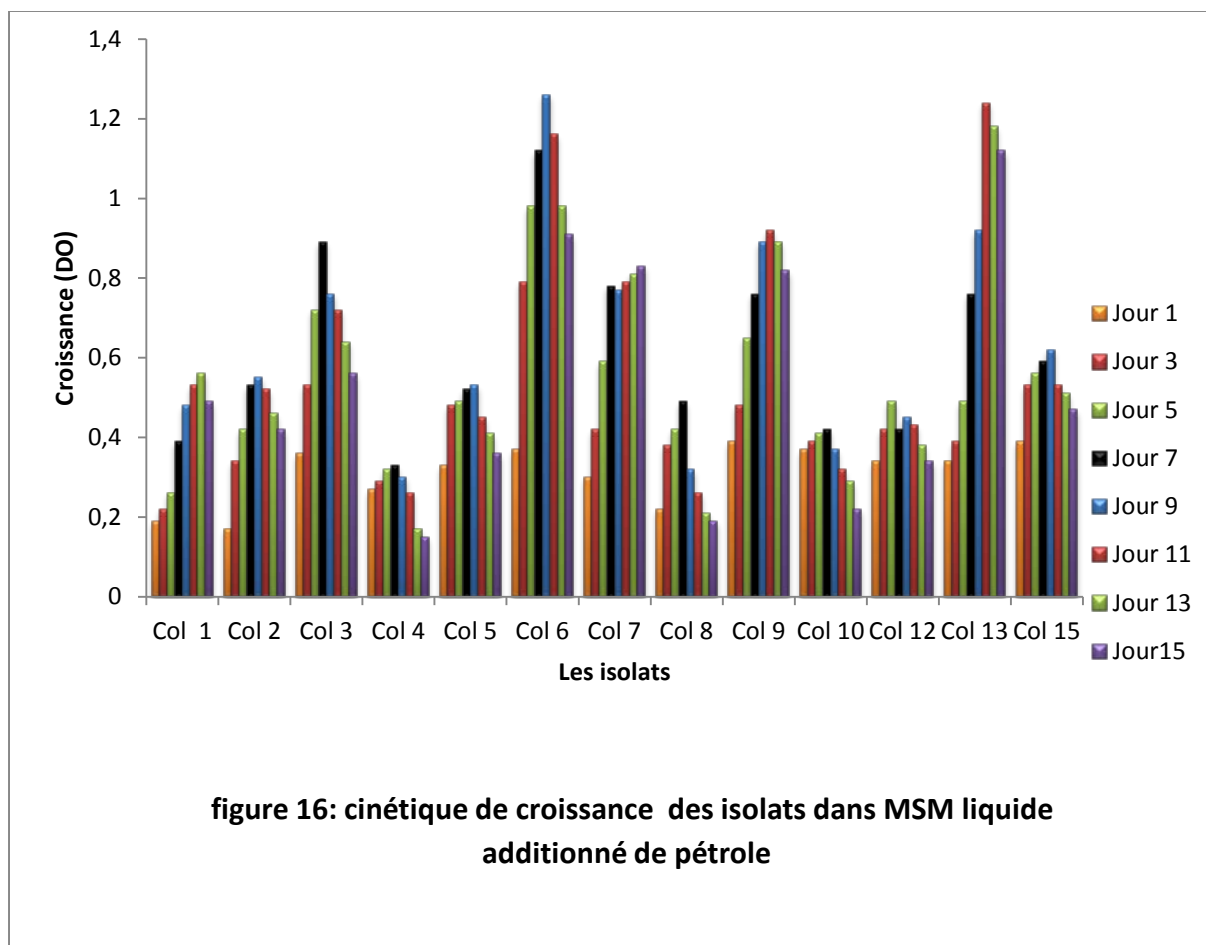
-Interprétation des résultats de Dégradation de pétrole par microorganismes:

1-sur (MSM) solide

Les concentrations des hydrocarbures au premier jour d'incubation sont très élevées dans le milieu (MSM)solide additionné par 2 % de pétrole pour tous les isolats

la carence des différentes concentrations du pétrole sur les boîtes de MSM solide indiquent l'utilisation et la dégradation du pétrole par les isolats pendant la période d'incubation.

2- sur (MSM) liquide



Selon les résultats obtenus dans notre expérience on a détecté que les valeurs du DO de notre isolat sont développées sur le milieu (MSM) liquide additionné par le pétrole pendant les 15 jours d'incubation, ce qui indique que nos isolats sont capables de croître dans le milieu minéral (MSM) liquide additionné par le pétrole par leur dégradation pendant les jours d'incubation.

Les valeurs DO de nos isolats sont augmentées pendant les 10 premiers jours d'incubation et après ces 10 jours ces valeurs commencent à diminuer dans les jours restants, ce qui indique qu'il y a une carence de la source de nutriment (pétrole) à cause de l'utilisation et de la dégradation de pétrole par notre isolat pendant les jours d'incubation.

Les variations des densités optiques (DO) constatées dans les milieux de culture des différentes souches bactériennes étudiées peuvent être dues à la distribution différente de ces bactéries entre les deux phases de notre culture, ou par leur vitesse d'adaptation au substrat utilisé (AKMOUCI, 2009).

L'absence de phase latence démontre une adaptation plus rapide des souches étudiées à la source de carbone utilisée (hydrocarbure pétrole), ils dégradent les fractions solubles de hydrocarbure pétrole.

Par ailleurs, l'augmentation de la biomasse microbienne correspondrait à la phase exponentielle, phase durant laquelle la dissolution du substrat «hydrocarbure pétrole» suffit aux besoins métaboliques des souches. Ainsi, la stabilisation de la concentration microbienne au-delà d'une heure montre que le niveau des exigences nutritionnelles dépasse la vitesse de dissolution du substrat, la biodisponibilité deviendra alors limitante (ROCHA *et al.* 2007), la diminution expliquée peut être par la migration de la cellule vers le nutriment par augmentation de l'hydrophobicité pour faciliter l'accès au hydrocarbure. Puis on observe encore une 2^{ème} phase exponentielle s'expliquant par la richesse du milieu par des composés qui facilitent la dégradation se exprimant par un indicateur biologique de croissance élevé. On observe le même comportement avec différents microorganismes.

Conclusion

Conclusion :

La pollution du sol par les hydrocarbures est impact écologique elle des conséquences négative sur le système écologique et la biodiversité des être vivant .

-Les hydrocarbures pétroliers se présentent comme un mélange complexe d'hydrocarbures, est constitué de nombreuses et différentes molécules composées essentiellement d'atomes de carbone et d'hydrogène.

La solution la plus efficace pour prévention a cette phénomène est la dégradation des hydrocarbures par des micro-organismes.

De nombreux micro-organismes sont capables d'utiliser les composés des hydrocarbures comme une source de nutriment et d'énergie, Ils sont caractérisés par l'hydrophobicité de ses molécules très peu solubles dans l'eau, ce qui réduit leur biodisponibilité.

L' objectif principal de cette étude était d'isoler et de caractériser des bactérie usée dans le sol pollué par les hydrocarbures pétrolière (hydrocarbonoclastes) de la raffinerie de Arzew qui ont capables de dégrader le pétrole brut dans un sol subissant une pollution très ancienne et continuelle par déversement de ce dernier autour des bacs de stockage dans la raffinerie de Arzew .

Dans un premier partie de ce travaille nous avons réalisé une étude préliminaire concernant d'une part, la caractérisation physico-chimique et microbiologique du sol pollué par les hydrocarbures et d'autre part la sélection d'isolats dégradant le pétrole.

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus se résume ainsi :

Cette étude a permis d'isoler 15 souches bactériennes. Certaines entres elles sont capables de dégrader le pétrole brut. Une assimilation qui demande un certain temps d'adaptation et préparation d'équipement enzymatique pour pouvoir accéder à cette source de carbone huileuse.

On peut donc conclure que les différents constituants de pétrole sont intrinsèquement biodégradables, mais à des degrés variables et appropriés aux différentes espèces des bactéries hydrocarbonoclastes utilisées .

Références

- AFNOR.(1993).**Qualité des sols, méthodes chimiques, détermination du carbone organique.
- Amell et al.,(2001).**The author submitted the communication on behalf of her husband, Algeria.
- Arbaoui,etAffane.,(2005).**Les hydrocarbures consistent les elements essentiels des pétroles; leurs molécules ne contiennent que du carbone et de Cerniglia Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Authors; Authors and affiliations.
- Arbaoui et Affane., (2005).**Traitement des rejets pétroliers en Algérie. .
- Austin.,(1988).** Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium.International Biodeterioration& Biodegradation. 54:61-67.
- Banque de données (Data Bank) de HMD, Sonatrach.**
- Barruso et al.,(1996).**Risks assessment of water pollution by pesticides at local scale .
- Barrisoet al.,(1998).** Microbial ecology: fundamentals and applications. 4th edn. Addison Wesley Longman, New York, pp 556–588.
- Bertrand and Mille.,J.C. Bertrand.,G.,Mille.(1989).**Devenir de la matière organique exogène. Unmodele: les hydrocarbures.
- Bertrand et Mille.,(1989).** Microbial degradation of petroleum hydrocarbons an environmental perspective.
- Bertrand and Mille.,(1989).**Utilisation des souches bactériennes autochtones dans la Biodegradation et la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures. Magister.Université KasdiMerbah, Ouargla.
- Bertrand et Mille.,(1989).** Bioremediation of spent oil contaminated soils using poultry litter. Research Journal in Engineering and Applied Sciences. 3(2): 124-130.
- Blifert et Perraud.,(2004).**Chimie de l'environnement air, eau, sols, déchet. De Boeck université. P (369 ,372-375)Department of basic Medical Science, Malaysia,vol.15,N°3,p.99-105.
- Blifert et Perraud.,(2004).** Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Edition Doin, Paris.
- Cerniglia.,(1993).**Article in Biodegradation 4(3):331-338 · June 1992 with 167 Reads compound either by ortho or meta cleavage.
- Cerniglia.,(1993).**Heitkamp Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment ... Environ ToxicolChem, 11 (1992), pp.
- 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.

Cerniglia and Sutherland 2001; Hammel et al. 1991; 1992). chrysochlorium also cometabolizes single-ring aromatic compounds.

Chitour.,(1983). Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. Adv Appl Microbiol. 30:31–71.

Chouas.,(2005). Isolation and characterization of phenanthrene-degrading bacteria from a petroleum refinery soil, Annals of Microbiology. 55(4): 255-259.

Chouas.,(2005). Anaerobic degradation of mono aromatic hydrocarbons. Appl Microbial Biotechnol. 2005. 63: 437-446.

Colomboet et al.,(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 .

Colombetet al.,(2008). Compost bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil inoculated with organic manure. African Journal of Biotechnology. 7(10): 1516-1525.

DAVID,C.berliner (january1,2005).thein vtable corruption of indication and educators Through High-Stakes Test.

David,c.,(2005). Drosophila Ric-8 regulates Gai cortical localization to promote Gai-dependent planar orientation of the mitotic spindle during asymmetric cell division. Nat. Cell Biol. 7(11): 1083--1090.

Delerass, C.,(2008).Pratique en microbiologie de laboratoire : recherché de bactéries et de levures-moisissuures. Edition la voisier, Paris, p 146-147.

.Delerass et al.,(2008).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'universite de Limoges. Pages : 177.

Delirass et al.,(2008). Le raffinage de pétrole : exploitation des gisements de la raffinerie. Tome 5.technip.

Dossier spécialAlgérie. (2002). (2ème partie), Pétroleet techniques, No.440.

FRNENNEC et al.,(1988).biodiversité est inversement proportionnelle à l'augmentation de la teneur en hydrocarbures de carbonés (C) et d'hydrogène.

Gopal,. MarcoFornari, Stefano Curtarolo, Luis A. Agapito, Laalitha S. I. Liyanage, and Marco BuongiornoNardelli Phys. Rev. B 91, 245202 – Published 4 June 2015.

Hohzohkiyohara et al.,(1982). Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In: Gibson, T.D. (Ed.), Microbial degradation of organic compounds, pp. 181-252. Marcel Dekker, New York, Basel.

Hohzohhiyohara et al.,(1982).Méthode de dénombrement des microorganismes en milieu liquide.Consulté le 6 novembre 2014 de (www.technobio.fr).

Hohzohhiyohara et Bourdon,.(1982).Anaerobic degradation of mono aromatic hydrocarbons. Application Microbiol Biotechnology.vol.64, p. 437–446.

Jinnot et Lemiere,.(2001). Distribution and location of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and PAH-degrading bacteria within polluted soil aggregates.

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

Jyothik,ksurendaBadu,.(2012).Anaerobic biodegradation of long-chain n-alkanes under sulfate-reducing conditions. Environmental Science & Technology. 32(14): 2191-2195.

Koler,.(2004). Distribution and location of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and PAH-degrading bacteria within polluted soil aggregates. Biodegradation.

Kumar et Gopal,.(2015).Les méthodes de traitement des sols pollués par les hydrocarbures. Mémoire de licence en Microbiologie appliquée. Université kasdi merbah-ouargla.

Leahy et Cowell,.(1990). Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. Process Biochem. 35:889–896.

Leahy, J.- G., Colwell, R.- R. (1990). Microbial Degradation of hydrocarbons in the Environment Microbiol, vol, 54,p. 305-315.

Lecomte,P.(1995). Les sites pollués, traitement des sols et des eaux souterraines(2° Éd.) Édition Lavoisier, TEC & DOC, p. 198.

.Lemière et al.,(2001).Guide méthodologique pour l'analyse des sols pollués. Rap. BRGM R 50128, 110 p., 44 fig, 3 ann. O BRGM.

Marchel et Bourdon,.(1982). Application of molecular methods as a biomarker in bioremediation studies, International Journal of Biotechnology Applications. 5(1): 147-154.

Mbomiiglaret . (2009).Réhabilitation de sols pollués par des HAP grâce aux bactéries associées à la rhizosphère de Miscanthus x giganteus. Université Paul Verlaine de Metz.307p.

Mohamed Soltani. Thèse de doctorat en Chimie analytique. Sous la direction de Claude Largeau. Soutenu en 2004. à Paris 6 . Description en français.

Molta,.(2002).Anaerobic degradation of 2-methylnaphthalene by a sulfate-reducing enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (12):5329–5333.

Molta,.(2002)Environmental Microbiology, 2nd Edition.

Morgan and Watkinson (1989),reviewed numerous biodegradation ... 1994). The toxic and inhibitory effects of nitrogen fertilizers.

Morgan P. etWaykinson R.J. (1989). Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 8:305- 333.

Nicolas,t.(2003).Traitement des pollutions industrielles : Eau, Air, Déchets, Sols, Boues.

NICOLAS,T.(2003). Impact environnemental des corps gras et de leurs dérivés formulés. non: biodégradabilité et écotoxicité, Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Vol.10.

Nilles,A.-B.(2008).Effets de pollutions par hydrocarbures sur les capacités de défense d'organismes marins. Thèse de doctorat. Université de la Rochelle.

Olivier,B et al (2005). Petroleum Microbiology, Edition illustrée, Edition ASM Press.

SOLTANI,.(2004).la classification des hydrocarbures pétroliers.

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.

Saker,.(2007). devenir des polluants organiques dans les sols lors de la biodegradation naturelle et après biotraitement : Identification des composés métabolites et des cinétique. Edition Record. P : 32-61.

Smith,.(1994). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International.* 2011:1-13. doi:10.4061/2011/941810.

VOGEL,.(2001).Anaerobic degradation of pristane in nitrate-reducing microcosms and enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(5): 2077–2081.

tabli,.(2009).Caractérisation des bactéries isolées de sol contaminées par les hydrocarbures (zone de Skikda) Thèse de magistère de l'Université Mentouri Constantine. Spécialité :Microbiologie.

Talbi et al,2009 , Ghouas et al. 2010, Haddou et al. 2011, Ghouas et al,.(2012). The effects of temperature and surfactant concentrations.

Tarayre,C,.(2012).Bioremédiation de sols pollués aux hydrocarbures Editions Universitaires Européennes. 116p.

Vanderstell,.(2005).Petroleum-oil biodegradation by *Coryne bacterium aquaticum* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from the industrial rejection of the refinery of ARZEW-Algeria. *World Applied Sciences Journal*. 18(8) : 1119-1123.

Vanderstell,.(2005). Anaerobic degradation of mono aromatic hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol*. 64(4): 437–446. DOI: 10.1007/s00253-003-1526-x..

vogel,.(2001).Bacterial diversity in a tropical crude oil-polluted soil undergoing bioremediation. *Afr J Biotech*. 8:2535–2540.

Wauquire,.(1994). Effects of temperature warming during a bioremediation study of natural and nutrient-amended hydrocarbon-contaminated sub-antarctic soils. *Cold RegSci Technol*. 40:61–70. doi:10.1016/j.coldregions.2004.05.005.

Wauquire,.(1994).suggests a paucity of research on the impact of the national context on individual volunteering, while Hodgkinson contends that "future research.

WAUQUIER,.(1994).Procédés de séparation. Raffinage du pétrole (Le). Tome 2. Procédés de séparation. Auteurs : Jean-Pierre.

WAUQUIRE,.(1994). Microbial communities in different soils types do not converge after diesel contamination. *J. Appl. Microbiol*. 92 (2): 276-288.

zhenpeng et al,.(2002). Microbiologie technique, Tome1 :Dictionnaire des techniques, 4ème édition. Edition CRDP d'aquaire.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : composition des milieux de cultures

➤ Milieu de dénombrement et de conservation :

1/ **Gélose nutritive**

-Extrait de viande	1g
-Extrait de levure	3g
-Peptone	5g
-NaCl	5g
-Glucose	10g
- Agar	15g
-Eau distillée	1000ml

pH=7.4

2/ **Mineral salt medium : MSM** pH=6.5

-NH ₄ CL	4g
-K ₂ HPO ₄	1,8g
- MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g
-NaCl	0.1g
-Na ₂ SO ₄ .7H ₂ O	0.01 g
- Agar	20 g
- eau distillée	1000ml

3/ L'eau physiologique : NaCl

-Chlorure de sodium	9g
-Eau distillée	1000ml

4/Gelose au cetrimide :

-Peptone	2g
-Sulfate de potassium	10g
-Chlorure de magnesium	3g
-Hydrogénophosphate de potassium	0.3g
-Cetrimide	0.2g
-Acide nalidixique	0.015g
-Agar	13g
-L'eau distillée	1000 ml

Annexe2 : Les techniques utilisées

1/ Coloration de Gram

Les différentes étapes de cette coloration :

- ✓ préparer et fixer un frottis bactérien à la chaleur du bec bunsen.
- ✓ coloration par le violet de gentiane. Laisser agir 1 minute. Rincer à l'eau déminéralisée
- ✓ Ajouter du lugol (solution d'iode iodo-iodurée) : étaler le lugol et laisser agir 20secondes. Rincer à l'eau déminéralisée. On peut réaliser une deuxième fois l'opération identiquement pour plus de sécurité.

- ✓ Décoloration de l'alcool : verser goutte à goutte l'alcool sur la lame, et surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous filet d'eau déminéralisée.
- ✓ Recoloration à la fuchsine. Laisse agir de 30 secondes à 1 minute. Rinçage à l'eau puis séchage.
- ✓ Observer avec une goutte d'huile à immersion, objectif 100 (grossissement x100). Les bactéries à Gram positif se colorent en violet alors que les bactéries à Gram négatif se colorent en rose.

➤ **Etat frais**

Déposer une goutte d'une culture en milieu liquide sur une lame de verre.

Recouvrir la goutte d'une lamelle couvre objet (la culture ne doit pas déborder les contours de la lamelle).

Luter la lame avec de la paraffine fondue.

Observer immédiatement au microscope (objectif x40, condenseur non relevé au maximum, diaphragme non complètement ouvert).

2/ Ph-métrie : pH du sol (iso 10390-AFNOR, 1994)

But : mesure de pH du sol.

Principe :

Le pH est mesuré dans une suspension de sol dans l'eau (pH eau) et dans laquelle on mesure le pH, c'est-à-dire la concentration en ions H^+ à l'état dissocié dans le liquide surnageant.

Mode opératoire :

-Etalonnage du pH-mètre (suivre les indications propre à chaque appareil).

En principe :

-Sortir les solutions tampon du réfrigérateur suffisamment à l'avance afin qu'elles prennent la température ambiante.

-Mettre en circuit le pH-mètre au moins une demi-heure avant l'emploi.

-Régler le bouton << To >> par rapport à la température ambiante.

-Placer le bouton sur <<pH>> -Pour les mesures de pH de solution à pH=7.

-Rincer l'électrode à l'eau déminéralisée et essuyer avec du papier absorbant, la plonger dans la solution dans la solution étalon à pH=7. Laisser la lecture se stabiliser et ajouter à l'aide du bouton <<pH>>

-Respecter ces opérations jusqu'à ce que les lectures pH=7 et pH=4 soient stables. Pour les mesures de pH de solution à pH=7.

-opérer de la même façon avec des solutions étalon à pH=7 et 10

3/ La catalase :

1- Technique

-Sur une lame propre et sèche déposer une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes,

-A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, ajouter l'inoculum bactérien

-Observer immédiatement.

-Au contact d'une colonie isolée ou sur la pente d'une culture en gélose, déposer une goutte d'eau

oxygénée

-Observer immédiatement.