

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

Boukhatem Karima

Djerourou Dehiba

Pour l'obtention du diplôme de :

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: Microbiologie appliquée

THÈME

Isolement des bactéries telluriques à potentiel de la
biodégradation des hydrocarbures

Soutenue publiquement le 03 /07/2019

Devant le Jury

Nebbach S

Président

Université de Mostaganem

Sidhom W

Examineur

Université de Mostaganem

Bekenniche N

Encadreur

Université de Mostaganem

Thème réalisé au Laboratoire de Microbiologie à Université de Mostaganem

Année universitaire : 2018/2019

Remerciements

Merci au bon dieu le tout puissant de nous avoir aidés à réaliser ce modeste travail.

*Nous tenons à exprimer notre reconnaissance à notre directrice de mémoire, **Madame Bekenniche N**, qui nous avoir encadrées, orienté, aidé et conseillé.*

*Tous nos remerciements à notre chef de parcours **Mr Djibaoui Rachid** et notre gratitude aux membres du jury « **Mr Nebbach.S** et **Madame Sidhom.W** » pour avoir accepté d'examiner ce travail pour la discussion apportée sur ce projet.*

*Nous remercîments sont aussi adressés à l'ensemble des enseignants de notre cursus universitaire, particulièrement à **Mr Djilali** responsable de « laboratoire de Microbiologie 03 » de l'université de Mostaganem l'établissement l'ITA, pour sa gentillesse, son aide scientifiques, et sa disponibilité.*

*Par ailleurs, nous adressons nos sincères salutations à **Mr Tarkhi Tadj eldine** travailler chez raffinerie d'Arzew-Oran de nous avoir aidé dans notre travaille.*

Enfin, nous tenons à remercier le groupe de plateforme SONATRACH, de nous avoir ouvert les portes pour entamer ce travail avec les échantillons de sol contaminé, sans qui ce mémoire aurait été encore plus difficile.



Dédicace

Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour :

À mes chères parent, ma mère "khiera" et mon père "Mohamed" qui ont toujours cru en moi et qui était présente quand j'en avais besoin, ses encouragements, sa patience, son attention et ses sacrifices juste pour que je consacre tout mon temps rien que pour mes études, que Dieu les protèges.

À la mémoire de ma chère grand-mère .que dieu le tout puissant, bénisse son âme.

*À mon fiancé "Feth Allah",
De me soutien et de m'aider dans les moments difficiles.*

À mes chères sœurs "Amina, Fatma, Hourria, Rachida et Yasmin" que j'aime plus que les mielleuses sœurs du monde

*À mes chers frères "Mohamed, Mokhtar et lakhder",
que le dieu les gardent.*

À mes proche amies: "Hafida, Rahila, Fatiha, Amel" et amie d'enfance "Khiera" qui partagent ma petite vie de tout les jours et qui m'ont soutenue moralement pendant toute cette période de préparation.

Et surtout ma chère amie et binôme "Djerourou Dehiba " qui m'accompagné lors de ce recherche.

Bokhatem Karima

Dédicace

Je dédie ce projet aux être les plus chères à mon cœur :

La meilleur de toutes les mères Djerourou Karima,

*qui ma soutenu durant toute ma vie, qui m'a aidé durant mes années d'études,
qui m'a appris à aimer le travail et le bon comportement, pour son amour infini
et sa bienveillance jour et nuit .*

Je souhaite prouver mon grand remerciement qui ne sera jamais suffisant à elle

Que j'espère la rendre fière par ce travail

Mon très cher père Mohamed

*Pour être le bon exemple de père par son soutien ses encouragements et aides
des mes premiers d'études jusqu'à ce jour*

Mes chères sœurs (wassila, Fatima, Amel et Malouka) je t'aime beaucoup

Mes chers frères Abed Elnour et Abed Elsalam

*Je consacre un grand amour à ma grand-mère et mon grand-père décédés et je
leurs dédie ce travaille je le dédie aussi pour tous ma familles Djerourou et
mes chers amis qui me connaissent*

*De spéciales dédicaces pour ma belle binôme Boukhatem Karima et je la
remercie d'avoir participé à ce travail.*

Djerourou Hiba

Liste des tableaux.

- Tableau n°1** Composition élémentaire des hydrocarbures pétroliers.
- Tableau n°2** Exemples de durée de demi- vie des HAPs dans le sol.
- Tableau n°3** Les facteurs affectant la biodégradation des hydrocarbures pétroliers.
- Tableau n°4** Les Principales souches bactériennes isolées et les produits de dégradation des HAPs.
- Tableau n°5** Nombre de germe des échantillons prélevé.
- Tableau n°6** Caractéristiques macroscopiques des isolats purifiés de l'échantillon A.
- Tableau n°7** Caractéristiques macroscopiques des isolats purifiés de l'échantillon B.
- Tableau n° 8** les différents caractères macroscopiques et microscopiques des colonies isolées de l'échantillon A
- Tableau n°9** les différents caractères des souches bactériennes pour l'échantillon « B »
- Tableau n°10** nombre de germe des échantillons prélevé.
- Tableau n° 11** Les résultats des testes de **VP** et **RM**.
- Tableau n° 12** Résultats du teste dégradation d'amidon des souches étudiée avant et après l'ajout de lugol.
- Tableau n° 13** Résultats du testes biodégradation de pétrole brut des souches d'échantillon « A ».
- Tableau n°14** Résultats du teste de dégradation de pétrole brut des souches d'échantillon « B ».

Liste des figures

- Figure n°01:** Structure moléculaire de base des principaux hydrocarbures pétroliers.
- Figure n°02** Représentation schématique du devenir d'une pollution pétrolière à la surface du sol.
- Figure n°03** Triangle de la biodégradation.
- Figure n° 04** La voie métabolique de dégradation du Naphtalène par *Pseudomonas sp* et A Biodégradation du pétrole brut.
- Figure n°05** Site d'échantillonnage d'Arzew .
- Figure n°06** Schéma de l'isolement et de dénombrement des bactéries.
- Figure n°07** Les photos d'échantillon étudiée A C'est sol pollué et échantillon B Boue réactivée.
- Figure n°08** Dénombrement de l'échantillon A et B su milieu GN
- Figure n° 09** Décombrement sur milieu King A et milieu King B
- Figure n °10** Résultats du test catalase
- Figure n°11** Test de VF : les types respiratoire
- Figure n°12** Le test RM ,la couleur rouge indique la fermentation acide mixte.
- Figure n°13** Test VP pour les différents isolats, la couleur rose indique la fermentation de l'acide bulendoïque.
- Figure n°14** Résultats de citrate de Simon virage de couleur du vert au bleu
- Figure n°15** Mise en évidence de la réduction de nitrate au stade nitrite par nitrate réductase.
- Figure n°16** Résultats des 03 souches après ajouter du zinc
- Figure n°17** Test de biodégradation du pétrole sur milieu MSM liquide.
- Figure n°18** Résultats de la mesure de la densité optique au spectrophotomètre UV des souches isolées de l'échantillon A.
- Figure n°19** Résultats de la mesure de la densité optique au spectrophotomètre UV des souches isolées de l'échantillon B.

Liste des abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique.
BN	Bouillon nutritif
C°	Degré Celsius
Cm, mm	Centimètre, millimètre
C	carbone.
D	Diamètre
DO	Densité optique.
g	Gramme
GN	Gélose nutritive
h, min, s	Heur, minute, seconde
H	hydrogène
HAPs	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.
HCP	Hydrocarbure pétrolier.
MO	Microorganismes.
MSM	Minéral Salt Medium
O₂	Oxygène
P	Pétrole
sp	Du latin species pluralis, espèce non précise
U	Unité
UFC	Unité formant colonie
UV	Ultra-violet
PH	PH
T	Température

Table des matières

Remerciements

Dédicace

Résumé

Abstract

Liste des tableaux

Listes des figures

Liste des abréviations

Introduction

Partie I : Partie bibliographique

I- Les hydrocarbures dans l'environnement.....	01
I-1- Définition.....	01
I-2- Nature et origine.....	01
I-3- Composition et caractéristiques.....	02
I-3-1- Les hydrocarbures aliphatiques.....	02
I-3-2- Les hydrocarbures cycliques.....	02
I-4- Les type de pétroles.....	04
I-5- Les hydrocarbures en Algérie.....	04
I-5-1- Historique.....	04
I-5-2- Problématique liée aux hydrocarbures pétroliers en Algérie.....	04
I-6- Mobilité des hydrocarbures dans l'environnement.....	06
I-6-1 Evaporation.....	06
I-6-2- Solubilisation.....	07
I-6-3- Emulsification.....	07
I-6-4- Sédimentation.....	07
I-6-5- Photo-oxydation.....	08
I-6-6- Biodégradation.....	08
I-6-7- Pénétration dans la chaîne alimentaire.....	09
I-7- Conséquences de la pollution de l'environnement par les HAPs...	09
I-7-1- Pollution du sol par les HAPs.....	10
I-7-2- Origines de pollution.....	10
I-7-3- Types de polluants.....	10
I-7-4- Bio-détection de la pollution du sol par les hydrocarbures...	11
I-7-4-1- Quatre types de procédés.....	11
I-7-5- Biorémediation.....	11
I-7-5-1- Organismes effectuant la bioremédiation.....	12
I-7-5-2- Organismes utilisées.....	12
I-7-5-2-A-Bactéries	12
I-7-5-2-B- Champignons.....	13

I-7-5-2-C- Plantes.....	13
I-7-6- Traitement des sols pollués par les HAPs.....	14
II- Biodégradation des HAPs.....	15
II-1- Types de biodégradation.....	16
II-1-1- Biodégradation aérobie.....	16
II-1-2- Biodégradation anaérobie.....	16
II-2- Facteur affectant la biodégradation des HAPs dans l'environnement.....	17
II-3- Biodégradation du pétrole brut.....	19
II-4- Biodégradation par type d'hydrocarbure.....	19
II-4-1- Biodégradation des hydrocarbures saturés.....	21
II-4-1-1- Voies de dégradation des alcanes linéaires.....	22
II-5- Biodégradation oxydative des HAPs par les bactéries.....	23
II-6-Microbiologie classique.....	23

Partie II : Matériels et méthodes

I- Objectif.....	26
II- Milieux de culture.....	26
III- Matériel biologique.....	26
III- Méthode.....	27
III-1- Echantillonnage.....	27
III-2- Isolement des microorganismes.....	27
III-2-1- Enrichissement.....	28
III-2-1-1- Dilution décimale.....	28
III-2-1-2- Isolement des bactéries sur milieu solide.....	28
III-2-2- Dénombrement des bactéries.....	28
III-3-Purification des isolats.....	30
III-4- Observation macroscopique.....	30
III-5- Observation microscopique.....	30
III-6- Conservation des isolats.....	31
III-7- Identification des microorganismes.....	32
III-7-1- Recherche des enzymes respiratoires.....	32
III-7-1-1- Recherche de la catalase.....	32
III-7-1-2-Recherche de Citrate de Simmons.....	32
III-7-1-3-Clark et lubs.....	33
III-7-1-4- Hydrolyse amidon.....	33
III-7-1-5- Viande-foie.....	33
III-7-1-6- Sélection des bactéries par utilisation de milieux de culture spécifique.....	34
III-7-1-6- A-Croissance sur milieu King (King A et King B).....	34

III-7-1-7- Bouillon nitraté.....	34
III-8- Isolement des bactéries qui dégradent le pétrole.....	35
III-8- Etude de la biodégradation sur milieu solide (MSM solide).....	35
III-8-2-Etude de biodégradation des bactéries sur un milieu liquide (MSM liquide).....	36

Partie III : Résultats et Interprétation

I- Analyses physico-chimiques.....	38
I-1- Caractéristique du sol étudié.....	38
II- Dénombrement de la microflore totale.....	38
III- Etude des caractères morphologiques.....	40
III-1- Aspect macroscopique.....	40
III.1.1. Caractéristiques des isolats purifiés	41
III-2- Aspect microscopique.....	42
III- Recherche des enzymes respiratoires.....	46
III-1 Test de catalase	46
III-2- Teste viande foie.....	47
IV- Tests biochimiques.....	48
IV-1- Teste de VP et RM.....	48
IV -2-Teste de citrate de simoun.....	49
IV - 3-Teste nitrate réductase.....	50
IV -4-Teste de dégradation d'amidon	51
VI- Résultats du test de biodégradation.....	53
VI-1-Résultat du teste de biodégradation sur milieu MSM solide.....	53
VI-2-Résultat du teste de biodégradation sur milieu MSM liquide.....	57

Conclusion

Référence bibliographie

Annexe

Résumé

Les hydrocarbures pétroliers sont des polluants organiques très nocifs et aussi bien pour l'homme que pour l'environnement. Évidemment, certains d'entre eux peuvent présenter une grande toxicité du fait de leurs pouvoirs mutagènes et/ou cancérogènes

La dépollution biologique de ces produits nécessite des microorganismes capables de les dégrader ces polluants. L'apport de biosurfactants permet de libérer les fractions adsorbées sur les particules du sol les rendant solubles et disponibles pour les microorganismes et améliorant ainsi le l'efficacité de la biodégradation.

A ce titre, l'objectif de notre travail c'est d'évaluer les capacités de biodégradation du pétrole brut au moyen de l'inoculation par les souches microbiennes isolées par la technique d'enrichissement à partir des sols contaminés provenant de la raffinerie d'Arzew (Algérie).

La mise en culture sur gélose nutritive a permis d'isoler 20 bactéries, dont diffèrent par leurs caractères macroscopiques et microscopiques et les résultats des quelque tests biochimies.

La capacité des souches isolées à dégrader le pétrole brut a été réalisée dans un milieu MSM liquide, en mesurant la densité optique, la concentration microbienne (UFC/ml) et aussi sur le milieu MSM solide pour observer les zones de la dégradation.

Les résultats du test de biodégradation permettent d'obtenues 17souche qui ont fait la croissance en présence du pétrole brut, 14 isolats qui ont fait juste des zone de biodégradation et 13 souches faire la croissance et les zones de dégradation au même temps.

Mots clés : bio-dépollution, hydrocarbures, sol, pétrole brut.

الملخص

الهيدروكربونات البترولية هي ملوثات عضوية ضارة للغاية لكل من البشر والبيئة بالطبع ، قد يكون بعضها يتطلب التحلل البيولوجي لهذه شديد السمية بسبب خصائصه المسببة للطفرات و / أو المسببة للسرطان. المنتجات كائنات دقيقة قادرة على تحطيم هذه الملوثات. تؤدي اضافة العوامل الحيوية الى تحرير الكسور الممتصة على جزيئات التربة مما يجعلها قابلة للذوبان وال متاح لالكائنات الحية الدقيقة، وبالتالي تحسين كفاءة التحلل البيولوجي على هذا النحو، فإن الهدف من عملنا هو لتقييم قدرة تحلل من النفط الخام عن طريق التلقيح مع السلالات الميكروبية المعزولة بواسطة تقنية التخصيب من التربة الملوثة من مصفاة أرزيو (الجزائر)

تم استخدام زراعة على الآجار المغذي لعزل البكتيريا 20، والتي تختلف في شخصياتهم العيانية والمجهريّة ونتائج بعض الاختبارات الكيميائية الحيوية. تم إجراء قدرة سلالات المعزولة على تفكيك البترول، من خلال قياس الكثافة الضوئية و التركيز الميكروبي في النفط الخام.

نتائج اختبار التحلل البيولوجي التي تم الحصول عليها حيث نمت 17 عزلة في وجود البترول. و 14 عزلة فقط منطقة التحلل البيولوجي في الوسط الصلب و 13 سلالات للنمو ومجالات تدهور في نفس الوقت

.الكلمات المفتاحية: المعالجة الحيوية ، الهيدروكربونات ، التربة ، النفط الخام

Abstarct:

Petroleum hydrocarbons are very harmful organic pollutants for both humans and the environment. of course, some of them may be highly toxic because of their mutagenic and / or carcinogenic properties.

The biological depollution of these products requires micro organisms capable of degrading these pollutants. The addition of bio- surfactants makes it possible to release the adsorbed fractions on the particles of the soil making them soluble and available for the micro-organisms and thus improving the efficiency of the biodegradation. As such, the goal of our work is to evaluate the biodegradation capability of crude oil through inoculation with microbial strains isolated by the enrichment technique from contaminated soil from the refinery Arziw (Algeria)

The ability of isolated strains to degrade crude oil was performed in a liquid MSM medium, by measuring optical density, microbial concentration (UFC /ml) and also on solid MSM medium to observe areas of degradation.

The results of the biodegradation test make it possible to obtain 17 strains that have grown in the presence of crude oil, 14 isolates that have just made biodegradation zones and 13 strains to grow and zones of degradation at the same time.

Key Words: bio-remediation, hydrocarbons, soil, crude oil.



Introduction

Introduction

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. (Yadav et Hassanizadeh, 2011, Lipińska *et al*, 2014).

La civilisation et l'activité de l'homme sont indéniablement les causes principales de la contamination ou la pollution de l'environnement

La pollution des sols est le résultat des activités minières et d'industries lourdes, Les causes majeures de cette pollution sont les activités industrielles comme l'industrie pétrolière ou l'industrie chimique. Les polluants sont majoritairement des composés organiques (hydrocarbures, composés phénolés et chlorés,...) et des métaux lourds. (Yadav et Hassanizadeh, 2011, Lipińska *et al*, 2014) .Qui génèrent une multitude de composés qui peuvent être toxiques pour les organismes vivants telles que l'extraction, la transformation et l'utilisation des produits pétroliers qui par leurs rejets industriels peuvent contaminer notre environnement : le sol, l'eau, l'air.

La pollution par les hydrocarbures constitue une menace très sérieuse pour l'environnement en Algérie. Les pertes et les fuites ainsi que les déversements accidentels font craindre une situation écologique irréversible. (Ali Ahmed.S. 2011).

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

La dépollution des sites contaminés est une préoccupation majeure, en raison d'une part, de l'impact de cette pollution sur l'environnement et la santé, liée notamment à la propagation des molécules dangereuses dans le milieu et leur transfert dans les nappes phréatiques et dans la chaîne alimentaire, et d'autre part des coûts exorbitants engendrés par les projets de réhabilitation qui exigent souvent l'excavation des sols et le transport onéreux des terres vers les installations de dépollution (GABET,2004).

Les traitements physico-chimiques proposés sur site ou après excavation des sols, sont coûteuses et non respectueuses des écosystèmes. Il est donc primordial de mettre en œuvre des moyens de dépollution des sites contaminés par des microorganismes (Bactéries, Levures et des Champignons) sont capable d'utilisés les hydrocarbures. C'est une technique connue sous le nom de bioremédiation. La biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes appelés « hydrocarbonoclastes » a été mise en évidence dès 1946 par ZoBell.

Plusieurs espèces microbiennes sont recensées et qualifiées aptes à dégrader des hydrocarbures telles que *Pseudomonas sp*, *Mycobacterium spp*, *Rhodococcus spp* ..., ces espèces bactériennes sont connues pour la dégradation des hydrocarbures pétroliers. (**Haritash et Kaushik, 2009**). La plupart d'entre elles sont isolées à partir des sols contaminés.

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.

Le présent travail est un support bibliographique se subdivise en deux chapitre. Le premier exposé les données relatives aux hydrocarbures dans l'environnement (sources, nature, Organismes utilisées,...), à leur devenir dans, les sols (biodégradation des hydrocarbures...) suivi par une deuxième partie présentent d'isolements et purifications des isolats microbiens, le nombre des colonies (UFC/ml). En outre, testé la biodégradation du pétrole brut par des souches microbiennes est observée des zones claire sur les boite pétri qui contient MSM solide avec le pétrole comme seul source de carbone. Après avoir vérifié l'aptitude des souches isolées à utiliser les hydrocarbures pétroliers dans le milieu MSM liquide mesurée par la densité optique.

Partie I : Partie bibliographique

I-Hydrocarbures dans l'environnement.**I-1- Définition.**

Le mot pétrole veut dire huile et du latin « pétroléum » ; c'est le nom donné dans le langage courant à des composés chimiques comportant essentiellement des atomes de carbone(C) et d'hydrogène(H) que les chimistes appellent les hydrocarbures (**R.E .1, 2004**)

Les hydrocarbures constituent la fraction la plus importante d'un brut pétrolier, ils représentent entre 65 et 95 % de la plupart des pétroles bruts. (**Morgan et Watkinson, 1994**).

Les hydrocarbures constituent une classe ubiquiste de composés naturels. On les rencontre non seulement dans les sites contaminés par le pétrole mais aussi dans la plupart des sols et sédiments en petite quantité (**Rosenberg et a, 1992**). Ils font partie des produits chimiques les plus importants pour l'humanité et sont notamment utilisés comme source d'énergie primaire.

Malgré la diversité des hydrocarbures et par conséquent de leur biodégradabilité, cette dernière est soumise à quelques règles ; plus la chaîne d'un hydrocarbure sera longue, plus sa biodégradabilité sera difficile et plus l'hydrocarbure comportera de cycles, plus sa biodégradabilité sera importante (**Tarayre 2012**).

I-2- Nature et origine.

Le pétrole est une roche liquide carbonée, ou huile minérale. Suite à la sédimentation de matière 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. (**Benchouk, A 2017**).

Dans l'environnement peuvent avoir plusieurs origines des hydrocarbures:

- **Les hydrocarbures fossiles**, qui proviennent de la décomposition d'une grande quantité de matière organique coincée entre deux couches

sédimentaires. Cela demande des caractéristiques géologiques passées spécifiques ce qui explique la faible quantité de ressources disponibles.

- **Les hydrocarbures actuels**, qui est produits par des bactéries décomposant la matière organique.

Cette production a lieu essentiellement dans les zones humides (tourbières, marais) et en quantité limitée. Le changement climatique pourrait accroître cette production dans les zones actuellement gelée et relâcher de grandes quantités de méthane dans l'atmosphère terrestre ce qui accentuerait d'autant plus l'effet de serre.

- **Les rejets industriels et urbains**, qui est les sources d'hydrocarbure pétrolier Pyrolytique. (Djarbaoui, 2011).

I-3- Composition et caractéristiques.

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).

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 inclue l'oxygène, le soufre et l'azote (Morgan et Watkinson, 1994). Les hydrocarbures peuvent être classés en groupes de structures différentes.

I-3-1- Les hydrocarbures aliphatiques :

Ce sont des hydrocarbures à chaînes droites ; saturés ou insaturés. Les hydrocarbures aliphatiques saturés sont des alcanes de formule générale C_nH_{2n+2} , ce sont les plus représentés dans le pétrole et vont du méthane aux chaînes contenant 40 atomes de carbone et plus.

Les insaturés comportent les alcènes de formule générale C_nH_{2n} . Ces molécules contiennent une double liaison et les alcynes qui ont pour formule C_nH_{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.3.2. 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).

Tableau n° 1. Composition élémentaire des hydrocarbures pétroliers (Speight, 2014)

Eléments	Pourcentage
Carbone	83 à 87 %
Hydrogène	10 à 14 %
Azote	0,1 à 2 %
Oxygène	0,05 à 6,0 %
Soufre	0,05 à 6,0 %
Métaux	< 0,1 %

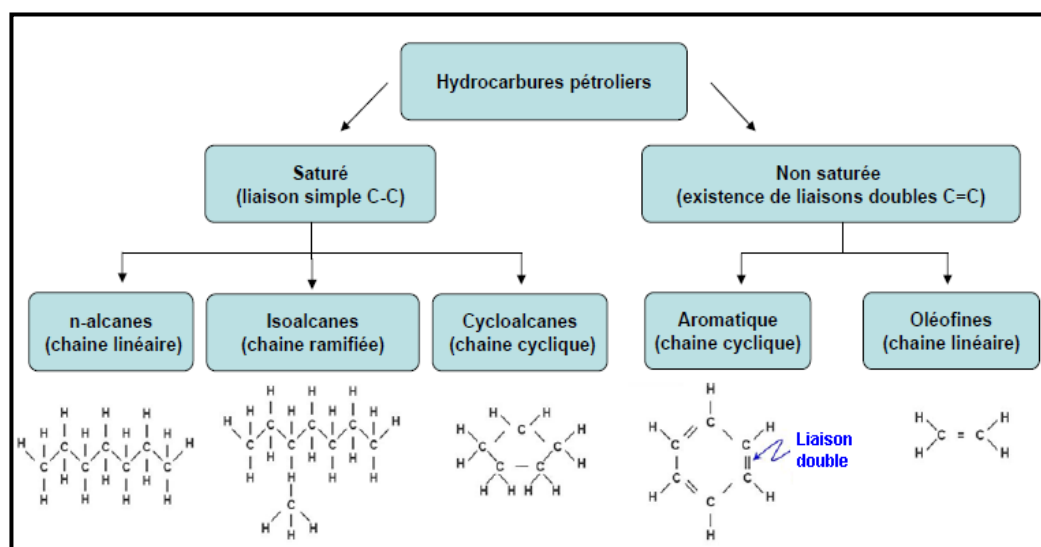


Figure n°01: Structure moléculaire de base des principaux hydrocarbures pétroliers (Colombano *et al*, 2008).

I-4- Les type de pétroles.

Le terme de pétrole recouvre un ensemble de produits dont les compositions peuvent être très différentes. La diversité de composition des bruts repose principalement sur leur provenance. En effet, les conditions de formation d'un brut vont influencer l'importance relative de chacune des familles de constituants citées précédemment. Cependant, des bruts issus d'une région donnée peuvent présenter des différences importantes liées aux conditions de formation et d'évolution différentes. Les bruts lourds contiennent des proportions importantes de résines et d'asphaltènes par rapport aux hydrocarbures saturés. Au contraire les bruts légers sont très riches en hydrocarbures saturés et très pauvres en asphaltènes. Cette diversité dans la composition des bruts est un aspect très important dans l'industrie du raffinage (Syakti, 2004).

I-5- Les hydrocarbures en Algérie.**I-5-1- Historique.**

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. [\(<http://www.energy.gov.dz/francais/index.php>\)](http://www.energy.gov.dz/francais/index.php).

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 2009**) 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-alcanes est de 33% pour (C16 et C34) tel Octadecane (0.012 ppm), et de 47% pour les n-alcanoïque acides (A10 à A30) tel acide palmitique (0.061 ppm). En HAPs 20% tels Phénanthrène (0.011 ppm) et pyrène (0.003 ppm). (Ladji, 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 Ghardaïa, la plus grande pollution est détectée en n-alcanes à Hassi-Bahbah avec 66% entre (C16 à C35), le % de chaque n-alcanes 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. Boutenfnouchet 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.

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 2) :

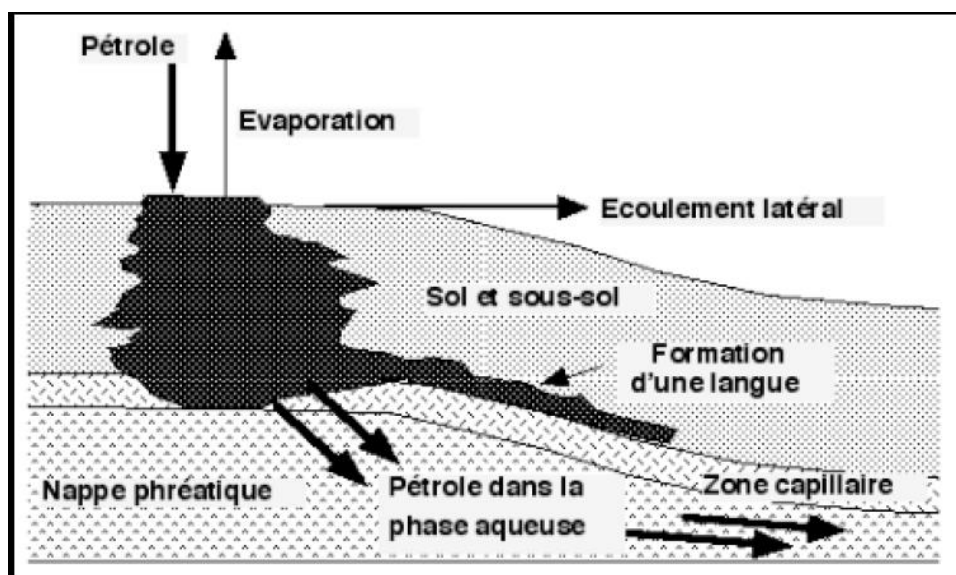


Figure n° 02 : Représentation schématique du devenir d'une pollution pétrolière à la surface du sol. (Morgan et Watkinson, 1989).

I-6-1 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).

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-6-2- 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 (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-6-3- Emulsifiassions.

L'émulsifiassions 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. Cette émulsion stable eau-pétrole est nommée « mousse au chocolat ». (Fingas, 2013). Ces émulsions difficilement dégradables sont les précurseurs des résidus goudronneux retrouvés sur les plages, alors que les émulsions huile dans- eau facilitent l'élimination des hydrocarbures. (Soltani, 2004).

I-6-4- Sédimentation.

La sédimentation est le passage du pétrole de la surface vers le fond. Ce phénomène concerne les résidus goudronneux constitués de la fraction pétrolière la

plus lourde et dont la densité est supérieure à celle de l'eau de mer. (Soltani, 2004). 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). 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. (Soltani, 2004).

I-6-5- Photo-oxydation.

La photo-oxydation est observée au niveau de la surface de l'eau où l'air (oxygène) et la lumière (radiations solaires) sont présents pour la transformation des hydrocarbures

. L'efficacité de ce phénomène dépend de la nature des hydrocarbures et de la présence de composés non hydrocarbonés. Ainsi, la photo-oxydation touche plus particulièrement les composés aromatiques qui sont plus photosensibles que les composés aliphatiques. Parmi ces derniers, les composés ramifiés sont plus facilement photo-oxydés que les *n*-alcanes (Wilcke *et al*, 2000). 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, peroxydes 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). Alors que Rontani *et al*, (1987, 1992) ont montré l'existence d'interactions entre la photo-oxydation et la biodégradation pour l'élimination des alkyl benzènes et de l'anthracène. L'action simultanée de ces deux phénomènes permet une élimination plus rapide de ces deux familles de composés.

I-6-6- Biodégradation.

La biodégradation est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement. (Vogel *et al*. 2001). La biodégradation correspond à la

décomposition de polluants organiques par des micro-organismes (bactéries, champignons ou algues). Les polluants sont convertis en dioxyde de carbone (lorsque la biodégradation est totale), en eau et en énergie pour construire de la biomasse. Les hydrocarbures pétroliers sont des polluants organiques qui sont soumis à la biodégradation dès que les micro-organismes capables de les utiliser se sont développés. (Cécile Noel, 2014)

L'importance de la biodégradation dans l'élimination du pétrole, les voies métaboliques d'oxydation des hydrocarbures par les bactéries et les paramètres qui peuvent influencer la biodégradation. (Soltani, 2004).

I-6-7- Pénétration dans 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. (Soltani, 2004). 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. (BENCHOUK Amina, 2017)

Tableau n°2 : Exemples de durée de demi-vie des HAPs dans le sol (LCPE, 1994)

HAPs	Demi-vie
Fluorène	32 à 60 jours
Phénanthrène	2.5 à 210 jours
Anthracène	170 jours à 8 ans
Fluoranthène	268 jours à 377 jours
Pyrène	2010 jours à 5.5 ans
Benzo (a) pyrène	0.3 à 58 ans

I-7- Conséquences de la pollution de l'environnement par les HAPs.

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques, souvent abrégés en HAP, des constituants naturels du charbon et du pétrole. Ils peuvent aussi être issus de combustion incomplète de matières organiques diverses telles que les carburants, le bois, le tabac...dans l'environnement l'air, eau, aliments..., on les trouve généralement liés aux particules issues de la combustion ou de l'usure des matériaux qui les contiennent, ou sous forme gazeuse dans l'air pour les plus légers d'entre eux. (<https://www.cancer-environnement.fr/235-hydrocarbures-aromatiques-polycycliques-HAP.ce.aspx>)

I-7-1- Pollution du sol par les HAPs.

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**).

I-7-2- Origines de pollution.

Les HAP sont émis dans l'environnement par trois processus : la diagenèse, la combustion et la pyrolyse de matières carbonées ou par biogenèse. Ces processus sont généralement regroupés en deux sources principales : les sources naturelles et les sources anthropiques. Les sources naturelles se répartissent entre les combustions (essentiellement les feux de forêts sources de pyrène et de Fluoranthène, et les éruptions volcaniques) et la formation géologique des combustibles fossiles tels que le pétrole et le charbon (processus de diagenèse) (Blumer, 1976 ; Burgess *et al.*, 2003 ; Wilcke, 2007). Dans la plupart des cas, la fraction des HAP à 3 cycles constitue au moins 90% des hydrocarbures aromatiques formés (Blumer, 1976 ; Wilcke, 2007). Plusieurs travaux ont aussi mis en évidence l'origine biogène de certains HAP tels que le naphthalène (Chen *et al.*, 1998 ; Daisy *et al.* ..., 2002 ; Wolfgang, 2000). Il s'agit dans tous les cas de sources de contamination mineures et diffuses (**Wilcke *et al.* ..., 2007**).

I-7-3- Types de polluants.

Les classifications des types des pollutions selon le milieu considéré : le sol, l'eau de lacs, les rivières et les mers (l'hydrosphère).

- **Pollutions de l'hydrosphère :** les effluents d'une usine, les égouts d'une ville ou pétrolier accident).
- **Pollution de l'atmosphère :** c'est un ensemble encore plus vaste).
- **Pollution de sol :** les sources responsables de ces pollutions résultent : d'épandage d'engrais ou de pesticides, décharge publique et les déchets industrielles) (HAMELIN et al, 2000).
- **I.7.4. Bio détection de la pollution du sol par les hydrocarbures.**

Une méthode plus pratique pour épurer les environnements contaminés par des produits dangereux est la bioremédiation 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 bio dépollution 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. L'ensemble des procédés d'élimination de polluants, organiques ou minéraux, présents dans les milieux naturels par l'action de microorganismes (DAVID ,2005).

I.7.4.1. Quatre types de procédés.

A. Biodégradation: Décomposition d'un substrat organique, par action de microorganismes vivants.

B. Bioréduction: Réduction des composés oxydés (nitrates, oxydes métalliques) par voie biologique.

C. Biolixiviation: Extraction des métaux contenus dans une boue, un sol, un sédiment ou un minerai par solubilisation provoquée par des microorganismes.

D. Biofixation/Biosorption: "Fixation" de polluants, la plupart du temps, métalliques, présents dans un effluent liquide sur des microorganismes.

I.7.5. Biorémediation.

La bioremédiation est définie par l'utilisation d'organismes vivants pour détruire les polluants environnementaux. Elle a été appliquée au traitement de contaminations inhabituelles (**PERR ,2001**) par l'activité des bactéries l'action de leur condition de prolifération (**KOLLER, 2004**).

I.7.5.1. Organismes effectuant la bioremédiation.

L'évolution a permis l'émergence d'une grande variété de micro-organismes présentant des capacités de biodégradation larges et flexibles. Ils peuvent survivre et détruire ou détoxifier des composés chimiques dans une grande variété de niche environnementales (chaleur, froid, PH bas, avec ou sans oxygène, etc.). Les organismes les mieux adaptés pour la bioremédiation sont souvent les espèces indigènes d'un habitat pollué particulier. Les microorganismes indigènes par définition survivre et se multiplie en présence de substances toxiques (**PERRY, 2001**).

I.7.5.2. Organismes utilisés.

La dépollution de sols contaminés par hydrocarbures en utilisant les microorganismes appelés hydrocarbonoclastes a été mise en évidence des 1946 par ZoBell (**SOLTANI, 2004**).

Les microorganismes impliqués dans cette biodégradation peuvent être : des bactéries, des archées, des algues ou encore des champignons. On dénombre après un siècle d'études 200 genres de ces microorganismes, représentant plus de 500 espèces et souches décrites (**TERRAT ,2001**)

Depuis cette date le nombre d'espèces bactériennes identifiées possédant cette propriété n'a cessé d'augmenter. En se basant sur la fréquence d'isolement, les genres bactériens prédominants sont Pseudomonas, Acinetobacter, Alcaligènes, Vibrio, Flavobacterium, Achromobacter, Micrococcus, Corynebacteria, et Nocardia, Ces organismes dégradant les hydrocarbures sont ubiquistes (**SOLTANI ,2004**).

A. Bactéries

Dans le sol, les bactéries sont les micro-organismes les plus abondants et les plus actifs. En fonction des propriétés physico-chimique du sol ; tous les types physiologiques bactériens sont représentés dans la microflore tellurique : Autotrophes et hétérotrophes, thermophiles et psychrophiles, aérobies, anaérobies facultatifs et anaérobies très répandus, les actinomycètes jouent un rôle important dans la décomposition de la matière organique. **(BOUSSEBOUA, 2005)**. 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*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Collimonas*, *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Flavobacterium*, *Gordonia*, *Nocardia*, *No cardioïdes*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas* et d'autres clones bactériens **(Obayori et Salam, 2010)**.

B. Champignons

Les champignons semblent plus résistants que les bactéries dans les conditions de très faible humidité et sont relativement plus abondants **(SASSON, 1967)**. De nombreuses études en sols ont démontré l'utilité et l'efficacité des champignons pour la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures **(Bogan et al, 1999)**. Les principaux responsables de la dégradation des résidus organique du sol. **(SASSON, 1967)**.

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)**.

C. Plantes

De nombreuses plantes sont capables de fixer dans leurs cellules les métaux lourds, radionucléides, composés organiques polluants et autres produits indésirables; certaines plantes produisent des enzymes qui dégradent ces polluants en des produits moins toxiques ou non-toxiques. Elles peuvent également être accompagnées d'une mycorrhizosphère se chargeant du travail de fixation et / ou de transformation, dont l'étude visant aux applications à l'échelle industrielle est en plein essor. Ces propriétés en ont fait des candidates d'avenir à la dépollution des sols. Les plantes sont aussi sélectionnées selon leur taille et aptitude à faire plonger leurs racines profondément dans le sol, de manière à atteindre les couches polluées profondes (quelques mètres), et selon le type de polluant qu'elles sont capables d'emprisonner ainsi.

En pratique on peut aussi excaver la terre et l'épandre sur une membrane imperméable sous serre, de manière à isoler la matière polluante et contrôler précisément les paramètres influant sur la croissance des plantes sélectionnées. Cela retire toutefois un des bénéfices majeurs de la phytoremédiation, à savoir son coût d'opération peu élevé (COLOMBANO et al ,2010).

L'un des avantages de la phytoremédiation est la possible revalorisation des polluants recyclables, aussi appelé phytominage. Ainsi, les plantes dites hyperaccumulatrices, qui stockent le polluant dans leurs tiges et leurs feuilles peuvent être récoltées puis incinérées en vue de récupérer les métaux parmi les cendres et les réutiliser en métallurgie (COLOMBANO et al ,2010).

I.7.6. Traitement des sols pollués par les hydrocarbures

Les hydrocarbures en forte concentration dans l'environnement ainsi que leur transfert ont un effet néfaste vis-à-vis la santé de l'homme et les écosystèmes. Le choix d'une méthode de dépollution doit être préalablement étudié à fin d'éviter la diffusion du polluant des sites contaminés. Les différents paramètres étudiés généralement sont :

- ✓ Type de polluant Nature du sol et son accessibilité ainsi que sa localisation
- ✓ Date de la pollution (récente ou ancienne)

- ✓ L'étendu de la surface contaminée
- ✓ les exigences économiques et administratives

Les opérations de traitements des sols pollués peuvent se faire de plusieurs manières (physico-chimique et biologique). Les procédés physico-chimiques englobent des traitements physiques comme les lavages et l'extraction des polluants, des traitements thermiques par incinération des produits organiques polluants réduits en CO₂ et H₂O et des traitements chimiques qui ont pour but de détruire les polluants ou les rendre moins toxiques. Les procédés biologiques qui sont plus écologiques sont aussi employés, comme la phytoremédiation qui par certaines plantes permet de transformer les polluants dans les sols par association (racines-microflore). Le « Landfarming » qui repose sur le déversement de terres contaminées sur des surfaces plus ou moins préparées {l'avance. L'ajustement du pH et l'additionnement de l'azote sont réalisés afin de stimuler s'emploie hors site ou sur le site. Une autre technique biologique par aération du sol ou bioventing, repose sur l'injection d'air dans le sol pour fournir aux microorganismes l'oxygène nécessaire (la biodégradation) (**Bouderhem, 2011**).

II- Biodégradation des HAPs.

Biodegradation est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement (**SOLTANI, 2004**).

La biodégradation, aussi appelée dégradation biologique, est la décomposition d'un produit organique complexe en molécules plus simples par l'action de microorganismes. D'un point de vue chimique, la biodégradation se traduit par un processus de simplification progressive de la structure d'un composé organique par l'action d'enzymes. Cette dégradation enzymatique permet la minéralisation du carbone organique par les microorganismes et la production de métabolites de plus faibles poids moléculaires. (<https://mern.gouv.qc.ca/energie/filiere-hydrocarbures/etudes/GENV32.pdf>). Biodégradabilité est l'aptitude d'une matière organique à subir la biodégradation, c'est un dire la dégradation moléculaire en milieu généralement aqueux résultant des actions complexes des microorganismes. Sous l'activité enzymatique des ces microorganismes, une substance pourra subir la biodégradation en transformant en métabolites et finalement, en dioxyde de carbone et en eau (**SCOW, 2003**). Les processus de biodégradations sont :

- Biodégradation primaire : qui est l'évaluation de disparition de substance dans des conditions définies par mesure de la quantité résiduelle ou la perte de propriétés (SCOW, 2003)
- **Biodégradation ultime** ; qui exprime le stade du quel la ou les molécules sont totalement transférées en CO₂ (condition aérobie) ou en CH₄ (condition anaérobie), soit en constituant de la biomasse, soit en élément minéraux (ex ; minéralisation de l'azote organique en nitrate, ammonium...) (BOUILLON, 2003)
- **Biodégradation acceptable** ; qui est la dégradation biologique d'une composé organique au point d'atténuer sa toxicité (SCOW ,2003)

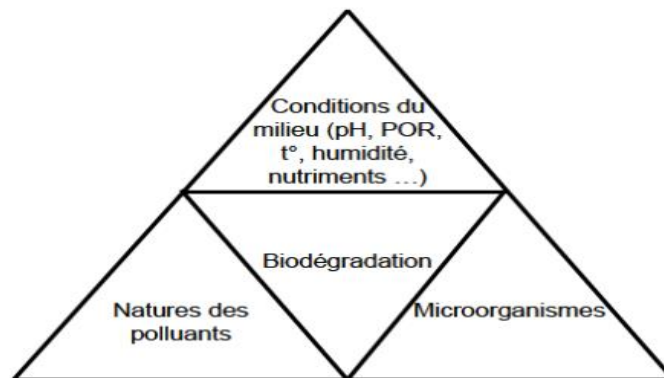


Figure n° 03 : Triangle de la biodégradation (SUTHERSAN ,1997)

II-1-Type de biodégradations.

Il existe deux types de la biodégradation : biodégradation Aérobie et Anaérobie.

II-1-1Biodégradation 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 micro-organismes.la figure 1 illustre les processus de biodégradation d'une substance organique en condition aérobie. Celle-ci pour être effectuée par la modification de l'un des facteurs suivants :

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

II-1-2 Biodégradation anaérobie

La biodégradation anaérobie d'une substance organique le degré de modification physique et chimique que subit cette matière organique par les micro-organismes en condition d'anaérobiose. (**Bouderhem ,2011**).

II-2- Facteur affectant la biodégradation des HAPs dans l'environnement

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

II-2-1. Structure et nature du sol.

Les bioprocédés s'appliquent a une grande variété de sol. Pour cela, il est important connaitre la structure et la nature de sol (**LECOMTE, 1995**).

(**NAM et al, 2003**) ont observé que les agrégats de sols réduisaient la biodégradation.

II-2-2. Composition chimique des hydrocarbures.

Les hydrocarbures pétroliers différents par leur susceptibilité aux attaques microbiennes. Ainsi, la vitesse de biodégradations est plus élevée pour les hydrocarbures saturés, viennent ensuite les aromatiques légères, les aromatiques a haute poids moléculaires et les composés polaires ayant la vitesse de dégradation la plus faibles (**SOLTANI, 2004**).

II-2- 3-L'interaction des HAPs avec la matrice solide (notion de biodisponibilité)

D'une manière générale, les HAPs de faibles pois moléculaires sont plus facilement dégradé que ceux de hauts poids moléculaires sont plus facilement dégradé que ceux de hauts poids moléculaires (**Goodin et Webber, 1995. mueller et al ; 1997 ; Potter et al .. ; 1999**).

La biodégradabilité des HAPs est liée aux caractéristiques et aux capacités métaboliques des écosystèmes, mais aussi dépend de leur biodisponibilité vis-à-vis des microorganismes susceptibles de dégradé, les plus petits HAPs étant les plus solubles, ils sont plus accessibles aux microorganismes et donc plus dégradables (**Straube et al. .1999 ; Wild et Jones, 1993**).la biodisponibilité des HAPs (quelque mg. Kg⁻¹ MS⁻¹ ou quelque dizaines de µg .l⁻¹), les cinétiques de biodégradation sont le

plus souvent limitées par les facteurs physicochimiques liés aux performances intrinsèques de biodégradation de l'écosystème. (Alain GRASMICK ,2005).

Tableau n°3: Ce tableau représente les différents facteurs qui affectent la biodégradation des hydrocarbures pétroliers (Oliveira et al, 2015)

Facteur	Rôle dans la décomposition des hydrocarbures pétroliers
Biodisponibilité	La composition et la concentration en hydrocarbures affectent le taux et l'efficacité de la biodégradation microbienne.
Température	Affecte le comportement physicochimique des hydrocarbures (la viscosité, la diffusion, la solubilité). Affecte la physiologie et la diversité des microorganismes indigènes.
PH	Inhibe l'activité microbienne en régulant le métabolisme microbien.
Nutriments	Affecte la croissance microbienne et par conséquent les taux de biodégradation.
Oxygène	Bien que la biodégradation des hydrocarbures puisse s'effectuer en condition anaérobie et aérobie, la biodégradation aérobie présente un rendement beaucoup plus élevé. Une réduction de la concentration en oxygène entraîne donc une réduction de l'efficacité de la biodégradation.
Salinité	Les variations de salinité modifient la structure et la diversité des communautés microbiennes indigènes en sélectionnant pour des espèces halophiles ou halotolérantes. Ceci peut avoir un effet indirect sur la biodégradation des hydrocarbures dans les milieux de transition comme les milieux estuariens en ajoutant un facteur de sélection supplémentaire sur les communautés indigènes
Matière Organique	La présence de matière organique entraîne une séquestration des hydrocarbures, diminuant ainsi leur disponibilité pour la biodégradation microbienne.
Diversité de la	La présence de bactéries hydrocarbonoclastes au sein de la communauté bactérienne indigène favorisera une réponse rapide et

communauté microbienne indigène	efficace lors de l'introduction d'hydrocarbures pétroliers dans le milieu. Une communauté "adaptée" présentera donc une efficacité de dégradation des hydrocarbures supérieure à celle d'une communauté "non-adaptée"
--	--

II-3- Biodégradation du pétrole brut.

Le pétrole brut est un mélange complexe de différents composés et variable selon le type de gisement et se caractérise par des compositions en hydrocarbures différentes selon les gisements (AAM 2011). Parmi les différents constituants chimiques rentrant dans la composition du pétrole brut, on retrouve des éléments comme le soufre, l'azote et l'oxygène, ainsi que certains métaux, dont le nickel, le vanadium, le cuivre, l'aluminium et le chrome. La concentration totale en métaux est généralement plus élevée dans les produits pétroliers lourds que dans les distillats et pétroles bruts légers (Meyer et al. 2007). Cette composition chimique globale du pétrole brut, comme celle des produits pétroliers raffinés dérivés, varie également en fonction des méthodes de distillation, de craquage et de mélange employées pour leur exploitation ou leur production.

II-4- Biodégradation par type d'hydrocarbure.

Biodégradation aérobie des HAPs : La plupart des expériences ont été réalisées avec des cultures pures issues d'enrichissement à partir de sol, de sédiments ou d'eau naturelles. Les principales souches bactériennes isolées et les produits de dégradation des HAPs sur tableau suivant :

Tableau n°4 : Ce tableau concerne les souches bactériennes et les différents produits de la dégradation des HAPs.

COMPOSE	MICROORGANISMES	PRODUITS	REFERENCE
Naphthalène	<i>Pseudomonas sp</i>	Acide salicylique, catéchol, acide gentisique	Davies and Evans, 1964; Utkin <i>et al.</i> , 1990; Eaton and Chapman, 1992.
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Acide salicylique	Ryu <i>et al.</i> , 1989.
	<i>Mycobacterium sp</i>	Acide salicylique, catéchol,	Heitkamp <i>et al.</i> , 1988a; Kelley <i>et al.</i> , 1990.
	<i>Rhodococcus sp</i>	Acide salicylique, acide gentisique	Walter <i>et al.</i> , 1991; Grund <i>et al.</i> , 1992.
Fluorène	<i>Pseudomonas sp</i>	1,1a-dihydroxy-1-9 hydrofluorénone	Selifonov <i>et al.</i> , 1993
	<i>Rhodococcus sp</i> et <i>Mycobacterium sp</i>	9-fluorenol, 9-fluorénone, 1-indanone	Walter <i>et al.</i> , 1991; Boldrin <i>et al.</i> , 1993.
	<i>Staphylococcus auriculans</i>	4- et 1-hydroxy-9-fluorénone.	Monna <i>et al.</i> , 1993.
Anthracène	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Acide salicylique et catéchol	Evans <i>et al.</i> , 1965; Dagley and Gibson, 1965; Yamamoto <i>et al.</i> , 1965.
	<i>Rhodococcus sp</i>	-	Walter <i>et al.</i> , 1991.
Phénanthrène	<i>Pseudomonas sp</i>	1,2-dihydroxynaphthalène	Evans <i>et al.</i> , 1964; Jerina <i>et al.</i> , 1976.
	<i>Pseudomonas paucimobilis</i> et <i>P. fluorescens</i>	CO ₂	Weissenfels <i>et al.</i> , 1990; Menn <i>et al.</i> , 1993.
Fluoranthène	<i>Pseudomonas paucimobilis</i> et <i>Alcaligenes denitrificans</i>	3-hydroxymethyl-4,5-benzocoumarique	Mueller <i>et al.</i> , 1990; Weissenfels <i>et al.</i> , 1990, 1991.
Pyrène	<i>Mycobacterium spp.</i>	CO ₂	Heitkamp <i>et al.</i> , 1988 a,b; Boldrin <i>et al.</i> , 1993).
Benzo[a]anthracène	<i>Beijerinckia sp</i>	Cis-10,11-dihydrodiol	Gibson <i>et al.</i> 1975, Jerina <i>et al.</i> 1984.
Chrysène	<i>Rhodococcus sp</i>		Walter <i>et al.</i> 1991
Benzo[a]pyrène	<i>Beijerinckia sp</i>	Cis-7,8-et cis 9,10-dihydrodiols	Gibson <i>et al.</i> 1975
	<i>Pseudomonas spp</i>		Barnsley, 1975.

Le naphthalène est l'un des HAPs les plus simple et les plus facilement biodégradables. Ainsi, les voies métaboliques de dégradation par des souches de *Pseudomonas sp.* ont été les premières voies étudiées et sont très connues (Sutherland et al., 1995).

La figure 04 montre la voie métabolique de dégradation du Naphthalène par *Pseudomonas SP* et *Acinebacter Calcoaceticus*. C'est la première étape de la biodégradation aérobie fait intervenir une di oxygénase qui oxyde l'un des cycles benzéniques pour former un Cis- dihydrodiol

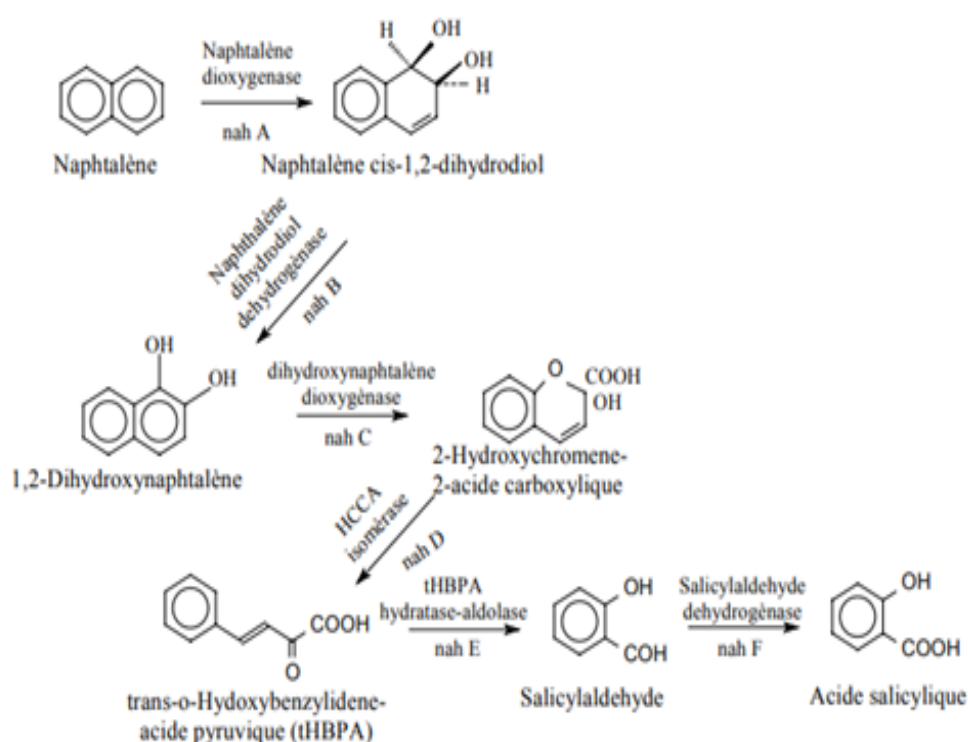


Figure n° 04 : Représente la voie métabolique de dégradation du Naphthalène par *Pseudomonas sp* et *Acinetobacter calcoaceticus* (Sutherland et al. 1995).

II-4-1- Biodégradation des hydrocarbures saturés.

Selon Parales et al.(2000), la biodégradation des hydrocarbures saturés est essentiellement un processus aérobie réalisé par des bactéries. Les alcanes à chaîne moyenne (C5-C10) sont utilisés notamment par des espèces de bactéries du genre *Pseudomonas* comme *P. aerogénosa*, *P. putida* et *P. oleovorans* qui ont été particulièrement étudiées (Kaistner et al.,1994 ; Vandescastele ,2005). Les

alcanes à chaînes longues (C10-C20) sont très bien utilisés par les microorganismes, plus rapidement que les alcanes moyens (**Britton, 1984**), ils contribuent à la formation de films d'hydrocarbures). (**Leahy et Colwell, 1999**) Les bactéries remplissant ce rôle appartiennent en particulier aux groupes des *Corynebacterium*, *Mycrobactérium* et *Nocardia* (CMN) ; notamment au genre *Rhodococcus*, c'est le cas de la souche *Rhodococcus* Q15 capable d'utiliser une large gamme des alcanes (C10 à C 21) et à des températures allant de 0°C à 30°C, (**Whyte et al ..,1998**). De plus, les alcanes à très longues chaînes (<C20) sont également dégradés par les microorganismes, mais l'utilisation de ces substrats solides à température ambiante a été moins étudiée (**Ballerini et Vandecasteele, 1999**). En revanche, les alcanes de plus courte chaîne sont toxiques et plus difficilement biodégradables, ils agissent comme des solvants vis-à-vis des membranes (**Watkinson et Morgan, 1990**).

II.4.1.1. Voies de dégradation des alcanes linéaires

La biodégradation des hydrocarbures saturés est essentiellement un processus aérobie réalisé par des bactéries. La dégradation des n-alcanes a été étudiée en détail. Une spécialisation nette des microorganismes selon les longueurs de chaîne des alcanes est une première caractéristique importante. En effet, les bactéries méthylophiles strictes sont seules capables (hormis quelques levures) de dégrader le méthane. Elles sont très répandues dans la nature, ce qui reflète la large distribution du méthane dans l'environnement. Ces bactéries appartiennent à cinq genres de bactéries Gram –négatives (*Methylobacter*, *methylococcus*, *Methylomonas*, *Methylocystis*, *Methylosinus*) (**PARALES et al.,2000**).

Les alcanes à chaîne longue (C10-C20) sont très bien utilisés par les microorganismes, plus rapidement que les alcanes moyens. Les bactéries remplissant ce rôle appartiennent en particulier aux groupes des *Corynebacterium*, *Mycrobactérium* et *Nocardia* (CMN) ; notamment au genre *Rhodococcus*, c'est le cas de la souche *Rhodococcus* Q15 capable d'utiliser une large gamme des alcanes (C10 à C21) et à des températures allant de 0°C à 30°C (**WHYTE et al .. ,1998**)

De plus, les alcanes à très longue chaîne (<C20) sont également dégradés par les microorganismes, mais l'utilisation de ces substrats solides à température ambiante a été moins étudiée (**BALLERINI et VANDECASTEELE ,1999**).

II-5- Biodégradation oxydative des HAPs par les bactéries.

Une grande variété de bactéries à Gram-positif et Gram-négatif ont été isolées et caractérisées pour leur capacité à métaboliser les HAPs. Si la dégradation bactérienne des HAPs à faible poids moléculaire tels que le naphthalène, le phénanthrène, ou encore l'anthracène est clairement mise en évidence et présente des similarités importantes (**Cerniglia, 1992**), les mécanismes intervenants dans celle des HAPs à cinq cycles aromatiques ou plus tels que le Benzo Pyrène restent encore à explorer. Les HAPs peuvent être dégradés et minéralisés par un seul organisme ou par cométabolisme. Les bactéries oxydent initialement les HAPs par l'incorporation de deux atomes d'oxygène via l'action d'une dioxygénase entraînant ainsi l'oxydation d'un cycle aromatique. L'étape initiale d'attaque des HAPs peut être réalisée via une mono-oxygénase, une dioxygénase, ou par oxydation du groupement substitué par l'action de mono oxygénase (**Gibson et Parales, 2000 ; Khan et al., 2001 ; Williams et Sayers, 1994**). A l'issue de plusieurs réactions biochimiques, l'attaque par une dioxygénase conduit à un cis-dihydrodiol caractéristique de la dégradation bactérienne. Les produits sont par la suite minéralisés ou incorporés en biomasse cellulaire (dépendant du nombre de cycles et de substitutions). La dégradation du naphthalène par clivage intra diol est la mieux connue et constitue la référence pour la dégradation des HAPs (Figure 15). L'étape initiale de la dégradation du naphthalène, catalysée par la naphthalène dioxygénase (NahAc) implique l'incorporation de deux atomes d'oxygène pour former le cis-1,2-naphthalène dihydrodiol. Les étapes enzymatiques suivantes aboutissent à la formation de salicylate et sont spécifiques des composés poly -aromatiques (**Eaton, 1994**).

II.6. Microbiologie classique

La microbiologie, selon la technique utilisée, permet de définir les traits morphologiques, physiologiques et/ou métaboliques des microorganismes d'un écosystème donné (**Heitkamp et al., 1988**). La majeure partie des connaissances concernant la biodégradation des hydrocarbures dans l'environnement a été acquise à partir d'études basées sur l'isolement de microorganismes hydrocarbonoclastes (**Watanabe et Hamamura, 2003**).

L'isolement présente comme avantage essentiel de pouvoir travailler sur des souches pures et ainsi d'étudier précisément un microorganisme et certaines de ses fonctions. Il est par exemple possible de caractériser *in vitro* les mécanismes biochimiques et moléculaires impliqués dans la dégradation d'un hydrocarbure. Cependant, les souches hydrocarbonoclastes isolées ne sont pas forcément représentatives des capacités métaboliques de la communauté naturellement présente (**Thompson et al., 2005**).

En effet, seul 1% des bactéries d'une communauté serait cultivable en condition de laboratoire (**Amann et al, 1995**), le principal biais de ces techniques étant une sous-estimation importante de la diversité soit une sous-estimation des capacités métaboliques de la communauté étudiée. Aussi, les cinétiques de biodégradation d'un polluant *in vitro* sont très différentes de celles observées dans l'environnement (**Watanabe et Baker, 2000**).

Toutes ces méthodes, à l'exception des comptages directs, sont dépendantes de la culture des microorganismes. Afin de s'affranchir de tels biais, des approches biochimiques et moléculaires ont été développées au cours de ces vingt dernières années. La simple utilisation de techniques de microbiologie classique ne permet pas la caractérisation de communautés complexes. Elles sont aujourd'hui généralement utilisées en complément d'approches moléculaires afin d'apporter des informations complémentaires sur la communauté bactérienne étudiée. Au début du XX^{ème} siècle, la classification des microorganismes reposait sur des critères morphologiques observés par microscopie ou cultures pures sur boîtes de Pétri. A cette époque, les microbiologistes étaient conscients que ces méthodes étaient restrictives et insuffisantes pour distinguer les espèces les unes des autres (**Janssen, 2006**).

Partie II : Matériels et méthodes

I. Objectif

Cette étude a été réalisée au laboratoire pédagogique de Microbiologie N=°03 de l'université Abdel Alhamid Ibn Badis- Mostaganem.

Notre travail a pour objectif d'isoler et de caractériser des micro-organismes impliqués dans la biodégradation des hydrocarbures pétroliers à partir d'un sol pollué ou contaminé par ces hydrocarbures

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

- BN (la composition voir annexe) : un milieu destiné à obtenir une croissance rapide des micro-organismes étudié (utilisé pour l'enrichissement).

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

- Milieu King A et B: (les compositions voir annexe) des milieux sélectif, qui permettent l'isolement des *Pseudomonas* et notamment de *P.aeruginosa*. Ces milieux, proche du favorise aussi la production de pigments par *P.aeruginosa*.

- Milieu MSM (la composition voir annexe) : un milieu des sels minéraux

III- Matériel biologique.

Pour la réalisation de nos expériences, nous avons prélevés deux échantillons de sols contaminés par les hydrocarbures (sol sec et beau). Depuis la raffinerie d'Arzew (Sonatrach, Compagnie Algérienne de Pétrole). Ont été utilisés le pétrole brut comme seule source de carbone en milieu minéral pour la croissance microbienne.

Afin de déterminer la répartition des bactéries telluriques en fonction du degré de pollution du sol par les hydrocarbures pétrolier.



Figure n°05: Site d'échantillonnage d'Arzew (Google, 2018).

III- Méthode.

III-1- Echantillonnage et préparation du sol :

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.

Méthode d'échantillonnage

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 (environ 4°C).

III-2- Isolement des microorganismes.

Pour la dilution des échantillons, nous avons besoin de :

- eau physiologique stérile.
- tubes à essaie Stériles.
- une micropipette.

- un vortex et une balance.
- pipettes Pasteur normal et d'autre se forme de râdeaux.

Pour l'ensemencement et la purification, nous utilisons l'anse de platine, des boites de Pétri contenant de la Gélose nutritive ordinaire (GN) et de milieu sélectif King A et King B.

III-2-1- Enrichissement

Pour préparation les solutions mère. Nous allons fait l'enrichissement :

La solution mère du Sol est préparée de 05 g de sol dans 45 ml de bouillon nutritif et incube dans l'étuve à 37c° pendant 24 à 72 h.

III-2-1-1- Dilution décimale

Nous avons fait une série de dilutions Décimales allant de 10^{-1} (solution mère) jusqu'au 10^{-5} en conditions d'asepsie.

III-2-1-2- Isolement des bactéries sur milieu solide.

On prélève 0,1 ml (une ou deux goutte) de chaque dilution préparée qu'on ensemence par étalement sur les boites de Pétri contenant de la GN à l'aide d'un râteau. L'incubation des boites se fait à 37°C pendant 24h à 48h.

III-2-2- Dénombrement des bactéries.

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

Après 24h d'incubation à 37°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 :

1. **N** : nombre des microorganismes en UFC/ ml.
2. **n**: nombre des colonies dénombrées.
3. **v**: Volume prélevé (0.1ml).
4. **d**: Dilution.

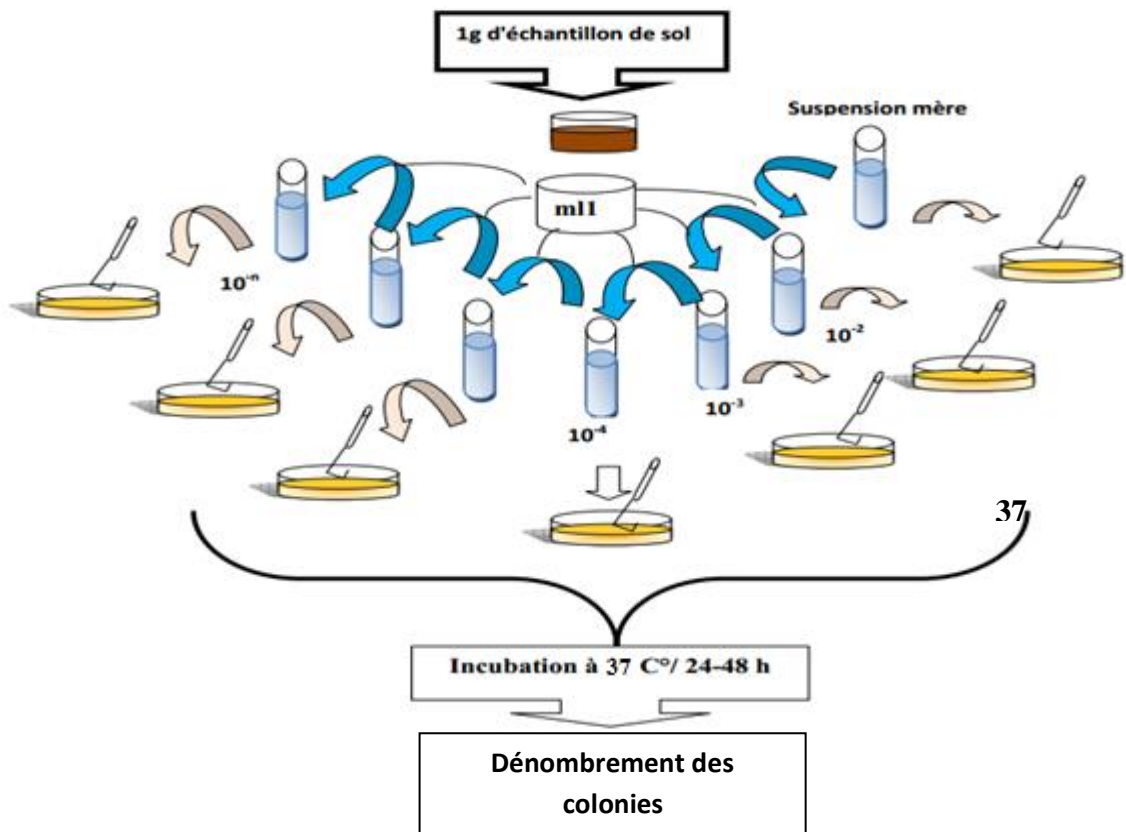


Figure n°06: Schéma de l'isolement et de dénombrement des bactéries.

III-3-Purification des isolats.

Après 24h à 72h d'incubation. Nous passons à étape de la purification des souches.

Les colonies différent morphologiquement (couleur, la forme, le diamètre, l'opacité) ont été isolés et purifier par la méthode de repiquage successifs et alternés en milieu solide (GN) jusqu'à l'obtention au sein d'une boîte de Pétri de colonies identiques par l'aspect et la couleur. (Delarras, 2008).

III-4- 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: ponctiformes ou non ponctiformes.
- La chromogènes: couleur de la colonie.
- L'élévation: convexe, concave, plate.
- L'opacité: opaque, translucide ou transparente.
- La surface: lisse, rugueuse, sèche, dentelée,...etc.

III-5- Observation microscopique.**Coloration de Gram.**

La technique est comme suit :

- préparation de frottis :

On dépose une goutte d'eau physiologique sur la lame, à partir de la boîte de pétri contient la souche purifiée on lève une crème bactérienne à l'aide d'une anse de platine et la après on frotte la pointe dans la goutte d'eau physiologique, laisser sécher à l'air. Ensuite, on a passée quelque fois la lame dans la petite flamme du bec Bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur.

- **La coloration :**

1- On dépose 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 et rincer très brièvement à l'eau.

2- On déposer quelques gouttes de lugol sur le frottis. Laisser agir 1 minute. Jeter la solution de Lugol dans un bécher.

3- On déposer quelques gouttes d'alcool sur le frottis et laisser agir 30 secondes et rincer à l'eau.

4- On déposer la solution de fushine (safranine) pendant 1 minute et aussi rincer à l'H₂O.

5- Laisser sécher à l'air.

6- Enfin, on observe au microscope (grossissement 100x avec une goutte d'huile à immersion).

III-6- Conservation des isolats.

- A partir d'une boîte de pétri contient des colonies bien purifiée on:
- Prélève une colonie bien isolé et ensemence dans un milieu BN, incubé à 37 °C pendant 24h.
- Centrifuger à 4000 rpm pendant 15 min dans des tubes Eppendorf (1ml de la suspension bactérienne).
- Après la centrifugeuse, on élimine le surnageant et garder le culot.
- Ajoute 01 ml de milieu de conservation (0.8ml BN stérile et 0.2 solution glycérol stérile) dans l'Eppendorf qui contient le culot.

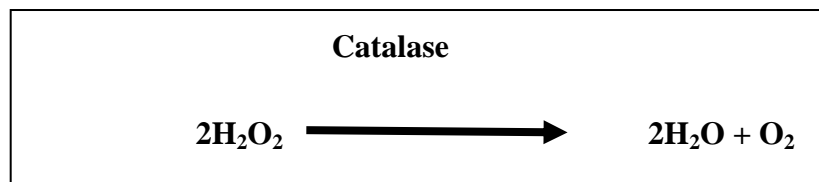
- Vortexés et conserver a -20 °C (congélation).

III-7- Identification des microorganismes. L'étape de purification a permet de sélectionner 20 isolats, l'identification est réalisée en se basant sur les études morphologique, physiologique, biochimique et moléculaire. Dans cette étape nous permet de comporte d'une série de tests permettant de mettre en évidence la réduction des nitrates, le type respiratoire des souches, la catalase ainsi que faire le test de Clark et Lubs. Ont été testées aussi pour l'utilisation des citrates et l'amidon.

III-7-1- Recherche des enzymes respiratoires.

III-7-1-1- Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) Avec dégagement des bulles de gaz d'oxygène.



La technique est comme suit :

- 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**)

III-7-1-2- Recherche de Citrate de Simmons

Le milieu utilisé ne contient que le citrate comme seule source de carbone. Seules les bactéries possédant un citrate perméase seront donc capables de se développer sur ce milieu en provoquant la libération des OH qui alcalinisent le milieu, donc il y aura virage au bleu (**SINGLETON, 1999**).

Pour réaliser ce test, on ensemence la pente selon une strie longitudinale avec une pipette chargée de suspension (préparée à partir d'une culture sur milieu gélosé, en prenant soin de ne pas racler le milieu pour ne pas apporter d'éléments nutritifs susceptibles de fausser les résultats).

- incuber à 37°C/24, sans trop visser le bouchon.

III-7-1-3- Clark et Lubs (tests RM et VP).

Pour faire se test il faut ensemencer dans un milieu Clark et Lubs une culture bactérienne bien purifiée et incuber à 37°C pendant 24 h

Après vérification de la culture (trouble du milieu) :

- **Test RM (rouge de méthyle)**

- Ajouter 10 goutte de rouge de méthyle et attendre quelque minutes.

- **Test VP (Voges-Proskauer)**

- Ajouter 10goutte de réactif VP1 et VP2 sélectivement.

- Attendre 10 min avant de conclure à un résultat négatif.

III-7-1-4- Hydrolyse amidon.

À l'aide de l'anse de platine chargée de culture (plusieurs souches possibles sur la même boîte). On ensemence sur la gélose d'amidon par une strie ou un spot de 3 à 5 mm de diamètre, Incube à 37°C pendant **1 à 2 jours**, en position retournée. Après incubation, on ajoute la diode pour lire les résultats (observer des zones de lise ou un halo).

III-7-1-5-Viande-foie.

La détermination du type respiratoire s'effectue sur la gélose viande foie. 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 ensemencement se fait à la pipette Pasteur scellée (ou boutonnée) et chargée. On introduit la pipette Pasteur au fond du tube et on remonte en spirale. Ne pas visser le bouchon à fond.

Enfin, on place les tubes les tubes dans l'incubateur à 37 °C et lire les résultats après 24 heures.

III-7-1-6- Sélection des bactéries par utilisation de milieux de culture spécifique

III-7-1-6-A- Croissance sur milieu King (King A et King B)

Les milieux King A et King B (Annexe 01) permettent sélectionner les différentes espèces de *Pseudomonas* par la mise en évidence de leurs pigments spécifiques. La production de pigments est favorisée par la composition du milieu (MARCHAL et BOURDON, 1982).

Le milieu King A favorise la production de pyocyanine, pigment permettant l'identification de *Pseudomonas aerogénosa*. Les cultures typiques sont colorées en bleu-vert.

Le milieu King B favorise la synthèse de la pyoverdine, pigment vert fluorescent produit par *Pseudomonas aeruginosa* et d'autres *Pseudomonas* (*P. fluoresces*, *P. putida*). La Pyoverdine se manifeste par une coloration vert fluorescent du milieu de culture.

III-7-1-7- Bouillon nitraté.

L'étude de la réduction des nitrates se fait par la mise en évidence des nitrites formés. Ces derniers en milieu acétique ou sulfurique, donnent une coloration rose. L'enzyme nitrate réductase B catalyse la réduction des nitrates en nitrites (réduction assimilatrice). Les nitrates peuvent aller également jusqu'au stade azote (N₂).

A une culture de 24 à 48h d'incubation à 30°C en bouillon nitraté, cinq gouttes de réactif de Grierson ajoutés. Après agitation, la lecture est immédiate. Plusieurs cas de figures peuvent se présenter :

- Lorsque la coloration est rose ou rouge ; les nitrates sont réduits en nitrites, on parle de nitrate réductase positive (NR+).
- Lorsque le milieu reste incolore ; de la poudre de zinc est ajouté (réducteurs des nitrates) ; après cinq minutes les tubes sont de nouveau observés :

- ✓ si le milieu devient rose ou rouge, il reste des nitrates, donc ces derniers n'ont pas été réduits par la bactérie: nitrate réductase négative NR- .
- ✓ si le milieu reste incolore, il ne reste plus de nitrates, les bactéries les ont réduits au-delà du stade nitrites: nitrate réductase positive NR+ (TORTORA et *al*, 2003).

La méthode comme la suite :

-Onensemencer un milieu nitraté avec quelques gouttes de suspension bactérienne.

Après incubation 37 C° pendant 24h, ajouter:

- réactif Nitrites 1 (acide sulfanilique),
- réactif Nitrites 2 (α -naphtylamine).

III-8- Isolement des bactéries qui dégradent le pétrole.

Pour faire isolement des souches qui ont la capacité de dégrader le pétrole, nous passons par plusieurs étapes.

Préparation des cultures pour le test de dégradation :

- Lancer une culture des souches qui sont bien purifiées etensemencées sur un milieu BN, incubé à 37 °C pendant 24 à 48 h.

-Après un jour d'incubation, centrifuger la culture à 3000t/min pendant 10 minutes, récupérer le culot

- Laver le culot avec MSM liquide 5 fois. (Hohzoh Kiyohara, 1982)

III-8-1 : Etude de la biodégradation sur milieu solide (MSM solide) :

Protocole :

- 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 µl de pétrole filtré sur la surface des boîtes 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 les boîtes de pétri intactes pour les renverser.

-Laisser sécher devant le bec benzène puis incuber a l'abri de la lumière à 37°C pendant 7 à 15jours.

- La lecture doit se faire quotidiennement pour voir s'il y apparition de zones claires ou de croissance bactérienne. **(Jyothi K, K Surendra Babu 2012).**

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

III-8-2 : Etude de biodégradation des bactéries sur un milieu liquide (MSM liquide) :

Protocole :

- A l'aide d'une micropipette, ajouter 40 µl de pétrole brut comme seule source de carbone (C), dans des tubes contenant 9ml milieu MSM liquide.

- Ensemencer les culots préalablement lavés dans les tubes à 37°C pendant 7 à 15 jours sous agitation continue.

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

Partie III : Résultats et Interprétation

I - Analyses physico-chimiques.**I-1- Caractéristique du sol étudié.**

La structure de nos échantillons étudiés diffère, pour le premier échantillon (A) on observe une distribution hétérogène des particules de différentes tailles, la grande à un diamètre de 3 à 5 cm et la petite à un diamètre 2 à 3 mm, une couleur noir des granules, jaune et marron avec une forte odeur des hydrocarbures et une visqueux-té importante.

L'échantillon (B) est une boue réactivée de forme liquide, la granulite du sol est nulle, c'est une solution bien homogène à une couleur marron, visqueux, forte odeur.

**Figure n°7 :** Échantillons A : sol pollué

Échantillon B : Boue réactivée.

II- Dénombrement de la microflore totale

Le dénombrement de la microflore totale dans notre échantillon de sol pollué par les hydrocarbures a été fait 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 obtenu des résultats mentionnés dans le tableau n°5.

Tableau n°5: Nombre de germe des échantillons prélevé.

Echantillon A	8.10^4 UFC/ml
Echantillon B	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.

Ceci a été observé lors de la recherche de la microflore totales chez les deux échantillons su milieu de culture GN ou on a observé plusieurs formes (plates, bombés, petites, grandes, irrégulières...) et couleurs de colonies (beige, blanc, orange, vert, ...) (figure 8 et 9)

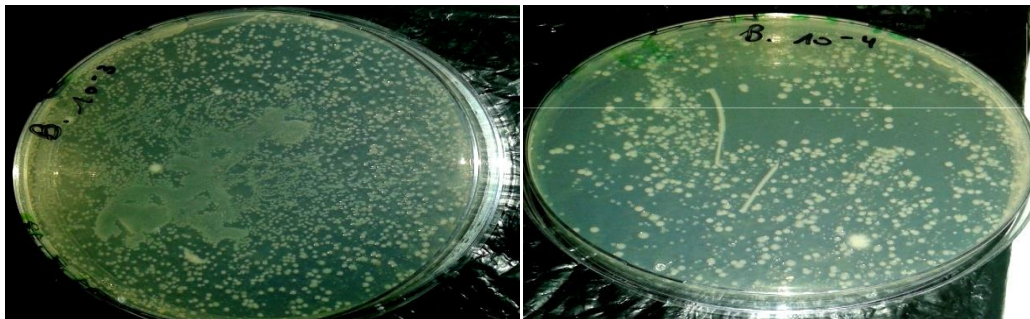


Figure n°8 : Dénombrement des bactéries des échantillons A et B sur milieu GN

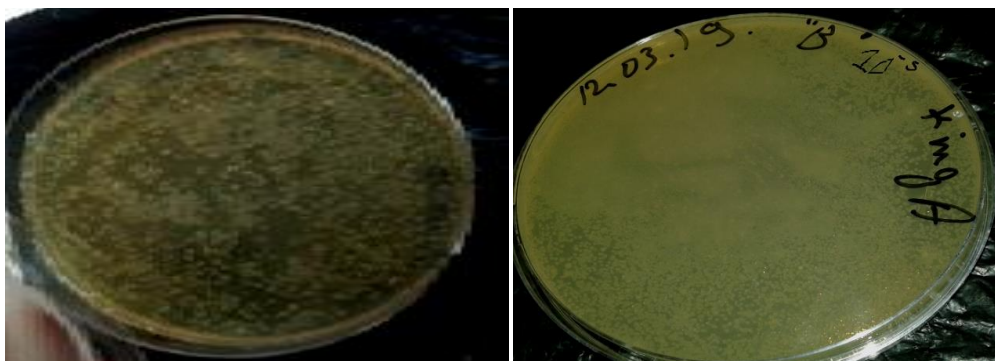


Figure n°9 : Décombrement des bactéries sur milieu King A et milieu King B

En tenant compte uniquement des bactéries cultivables, la variété des aspects, par contre n'est pas très élevée, cela nous a permis de sélectionner à partir de 17 isolats

de l'échantillon A, 8 seulement qui sont vraiment différentes sur le plan macroscopique et 9 seulement de l'échantillon B.

III- Etude des caractères morphologiques.

III-1- Aspect macroscopique.

L'observation macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation. Le repiquage des 20 isolats sur la GN, nous a permis d'étudier aspect des colonies, les résultats obtenus sont regroupés dans les tableaux n°6 et n°7 d'échantillon A et B respectivement.

Tableau n°6: Caractéristiques macroscopiques des isolats purifiés de l'échantillon A.

colonies	Diamètre	couleur	Formes	Élévation	Contour	Opacité	aspect
A1	1mm	Blanc châtre	Ronde	Convexe	Régulier	Opaque	Lisse visqueuse
A2	1mm	Beige	Ronde	Convexe	Régulier	Opaque	Lisse Visqueuse
A3	1mm	Blanche	Ronde	Convexe	Régulier	Opaque	Lisse visqueuse
A4	2mm	Blanc châtre	Ronde	Convexe	Régulier	Opaque	Lisse visqueuse
A5	2mm	Blanc châtre	Ronde	bombé	Régulier	Opaque	Rugueuse
A6	1mm	Brillante	Ronde	Convexe	Régulier	Translucide	Lisse visqueuse
A7	1mm	Brillante	Ronde	Convexe	Régulier	Translucide	Lisse Visqueuse
A8	2mm	Jaune clair	Irrégulier	Convexe	Régulier	Opaque	Lisse
Akin g A	2mm	Jaune	Ronde	Convexe	Régulier	Opaque	Lisse Visqueuse
Akin g B	2mm	Jaune	Ronde	Convexe	Régulier	Opaque	Lisse

Tableau n°7 : Caractéristiques macroscopiques des isolats purifiés de l'échantillon B.

coloni e	Diamètr e mm	Chrom ogènes	Forme	Elévatio n	Contou r	Opacit é	aspect
B0	1mm	Beige	Ronde	Convexe	Régulie r	Opaque	Lisse
B1	2mm	Transpa rent	Ronde	Plat	Régulie r	Opaque	Rugueus e
B2	<1mm	Blanc	Ronde	Plat centre convexe	Régulie r	Opaque	Rugueus e
B3	1mm	Brillant e	Ronde	Bombé	Régulie r	Opaque	Lisse visqueus e
B4	1mm	Beige	Ronde	Bombé	Régulie r	Opaque	Rugueus e
B5	1mm	Beige	Ronde	Plat	Régulie r	Opaque	Lisse visqueus e
B6	1mm	Marron clair	Ronde	Bombé	Régulie r	Opaque	Lisse visqueus e
B7	1mm	Orange clair	Ronde	Bombé	Régulie r	Opaque	Lisse visqueus e
B8	1mm	Orange clair	Ronde	Bombé	Régulie r	Opaque	Lisse visqueus e
B king A	1mm	Jaune	Ronde	Bombé	Régulie r	Opaque	Lisse visqueus e

III.1.1. Caractéristiques des isolats purifiés

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

Un sol qui contient des hydrocarbures va modifier l'activité des microorganismes. Ceux-ci doivent donc adapter leur activité enzymatique afin de pouvoir s'y attaquer. Les bactéries vont ensuite subir une période de forte croissance au cours de laquelle ils seront capables d'assimiler les produits de la dégradation des hydrocarbures. Cette

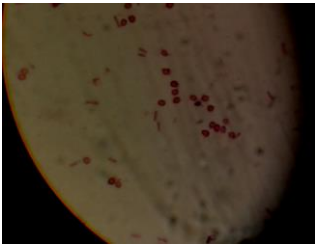

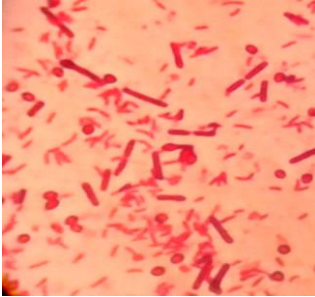

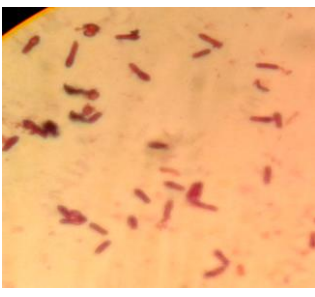

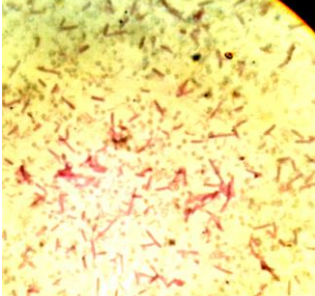

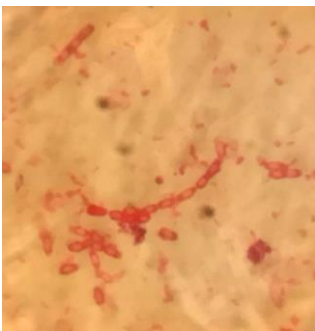

biodégradation peut prendre plusieurs mois. Une fois qu'ils ont consommé les composés les plus facilement dégradables, leur nombre diminue jusqu'à atteindre de nouveau la taille d'une population normale. (Ce qui explique l'écart au niveau de nombre des souches isolées entre les deux échantillons). Parfois, seule une partie des polluants est dégradés car les hydrocarbures se lient partiellement à la matière organique du sol et deviennent alors moins accessibles aux microorganismes. Le niveau de dégradation des pétroles (mélange de composés facilement dégradables et de composés récalcitrants) est donc totalement dépendant de la diversité métabolique des bactéries hydrocarbonoclastes présentes dans l'environnement pollué. La diversité des espèces bactériennes est un facteur décisif dans la réponse des communautés bactériennes à ce type de variation environnementale. (*Sauret C.2011*).

Les colonies sont généralement lisses et ont un diamètre de plus de 1mm, de tous les microorganismes du sol, les bactéries sont les plus nombreuses et les plus petites : la taille de leurs colonies ne dépasse pas en général, 0.5 à 2 mm de diamètre. (*Roget et al.2001*) cité dans (*Djaoud. 2013*).

III-2- Aspect microscopiques :

L'observation microscopique a été réalisée par la coloration de Gram. Le tableau suivant représente les différents caractères des souches bactériennes pour l'échantillon « A ». La source de ces souches des échantillons « A » et « B » c'est les sols pollués par les hydrocarbures pétroliers.

Tableau n° 8: les différents caractères macroscopiques et microscopiques des colonies isolées de l'échantillon A

Code des isolats	Gram	Aspect microscopique	Observation microscopique	Observation macroscopique
A1	-	Coque grand et isolé		
A2	-	Coque moyen isolé et en chainettes		
A3	-	Coque moyen en diplocoques et tétrades		
A4	+	Coque isolé et en chainettes		
A5	-	Coccobacilles isolés et en chainettes		

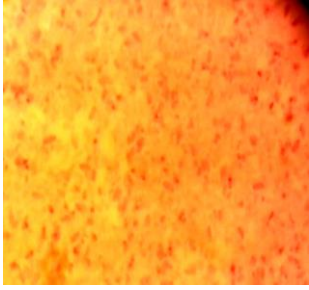


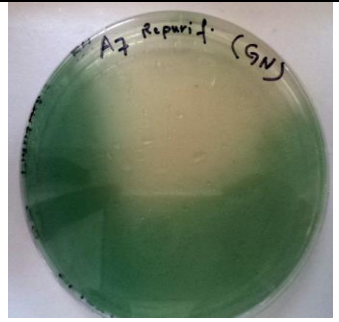
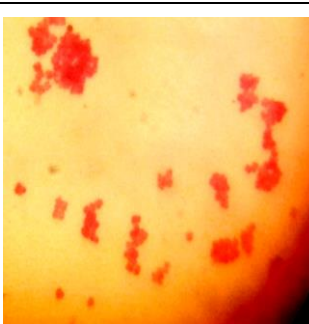

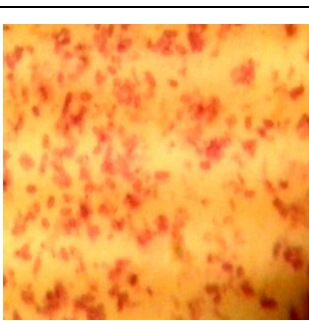

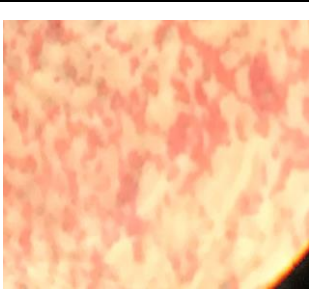
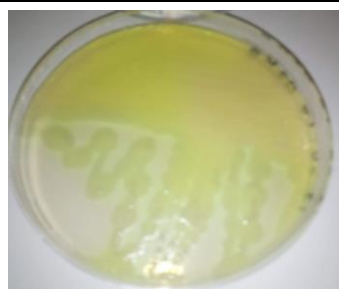
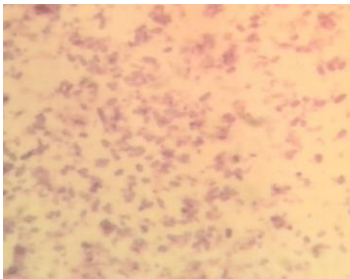
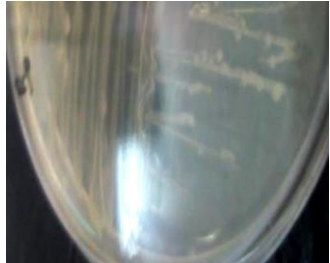
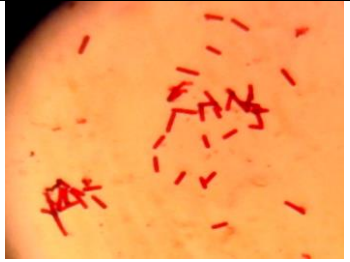

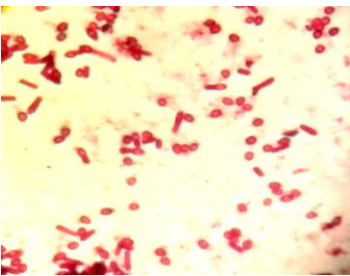

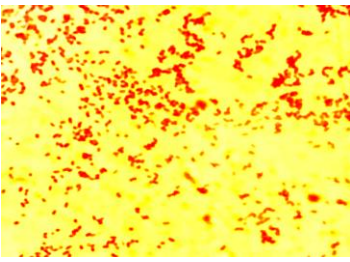

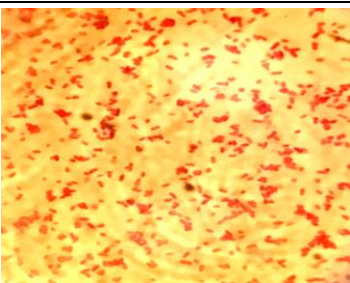

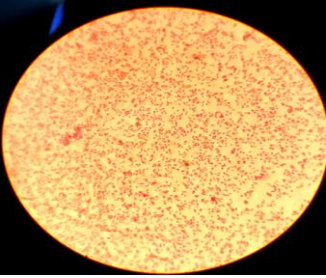
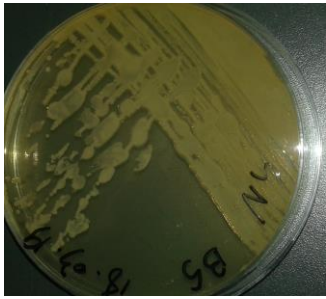
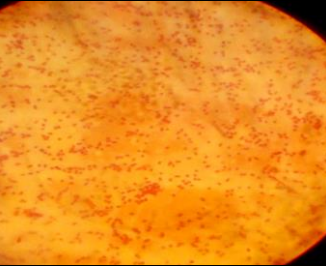

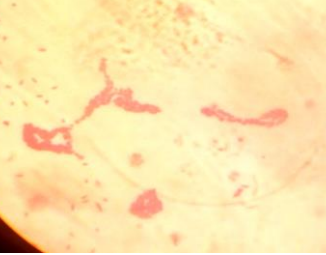

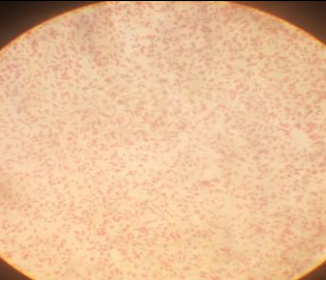

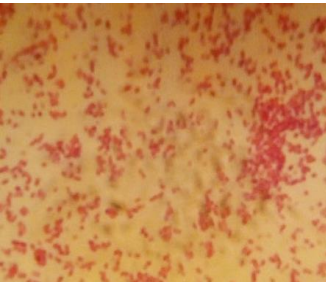

A6	-	Petit coque isolé		
A7	-	Coccobacille isolé		
A8	-	Coque en amas		
A king A	-	Coccobacille isolé et en amas		
Aking B	-	Coccobacille isolé		

Tableau n°9 : les différents caractères des souches bactériennes pour l'échantillon « B »

Code des isolats	Gram	Aspect microscopique	Observation microscopique	Observation macroscopique
B0	+	Coque isolé en amas		
B1	-	Bacille longue		
B2	+	Coque moyen isolé et diplocoque		
B3	-	Petits Coque isolé		
B4	+	Coque isolé en amas		

B5	-	Coque très petit isolé		
B6	-	Coque moyen isolé		
B7	-	Coccobacilles		
B8	-	Petit coque isolé		
BKing A	-	Coccobacille		

D'après les observations, il ressort que les souches isolées sont de forme et de Gram différents.

Selon PELMONT, (1995), Les caractéristiques des bactéries aptes à biodégrader les hydrocarbures sont les suivantes :

- La majorité des souches bâtonnées Gram négatives

- 32% des bactéries motiles ou mobiles
- 20% des bactéries à Gram positives, filamenteux.

III- Recherche des enzymes respiratoires.

III-1 Test 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).

Les résultats du test de catalase sont positives pour les 20 isolats obtenus, ces bactéries peuvent produire la catalase et ont la faculté de dégrader le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . (Figure 10)



Figure n° 10: Résultats du test catalase.

La présence des bulles de gaz pendant le contact direct de l'eau oxygénée (H_2O_2) avec la colonie bactérienne qui correspondent à l'oxygène dégagé (MARCHAL et BOURDON, 1982). Indicateur de dégradation de H_2O_2 en oxygène et hydrogène (catalase +)

Selon les résultats qui ont été obtenus dans notre expérience on a détecté une catalase (+) chez toutes les colonies

III-2- Teste viande foie :

Les résultats obtenus sur le milieu VF montrent que tous les isolats (se développent uniquement dans la partie supérieure du milieu dans les tubes ce sont des bactéries aérobies strictes sauf la souche A8 peuvent croître toute au long du milieu, les s'agit donc des bactéries aéro-anaérobie facultatives (tableau 10 et figure 11).

Tableau n°10 : Lestypes respiratoires des différentes souches isolées.

Echantillon A	Type respiratoire	Echantillon B	Type respiratoire
A1	Aérobie strict	B0	Aérobie strict
A2	Aérobie strict	B1	Aérobie strict
A3	Aérobie strict	B2	Aérobie strict
A4	Aérobie strict	B3	Aérobie strict
A5	Aérobie strict	B4	Aérobie strict
A6	Aérobie strict	B5	Aérobie strict
A7	Aérobie strict	B6	Aérobie strict
A8	Aéro-anaérobie facultatif	B7	Aérobie strict
A king A	Aérobie strict	B8	Aérobie strict
A king B	Aérobie strict	B King A	Aérobie strict

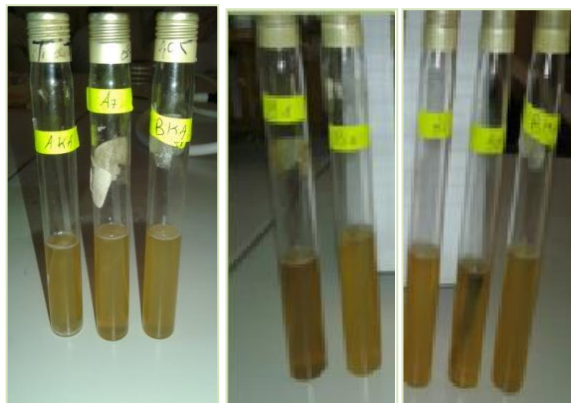


Figure n °11:Test de VF : les types respiratoire.

IV- Tests biochimiques.

IV-1- Teste de VP et RM.

Ces tests ont permis de mettre en évidence la fermentation butylène glycolique et la fermentation de l'acide mixte. Tous nos isolats sont positive pour teste VP sauf les souches « B1 et B3 » qui ne sont pas capable de dégrader l'acide pyruvique par apport les autres isolats positive provoquent forte acidification de milieu, pour teste RM en observe déférent résultats positive (B0, B4, B5, B king A, A1, A3, A7, A8, A

king A, A king B) et autres sont négatives et ne sont pas capables de produire les acides mixte dans le milieu (tableau 11 et figure 12 et 13).

Tableau n°11 : Les résultats des tests de VP et RM.

Souches	VP	RM	Souches	VP	RM
A1	+	+	B0	+	+
A2	+	-	B1	-	-
A3	+	+	B2	+	-
A4	+	-	B3	-	-
A5	+	-	B4	+	+
A6	+	-	B5	+	+
A7	+	+	B6	+	-
A8	+	+	B7	+	-
A King A	+	+	B8	+	-
A King B	+	+	B King A	+	+



Figure n°12 : Le test RM, la couleur rouge indique la fermentation acide mixte.

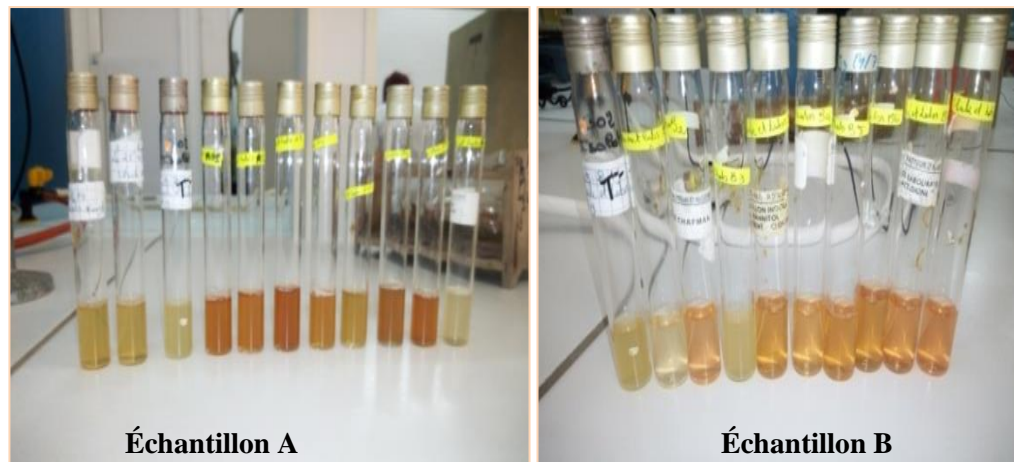


Figure n°13 : Test VP pour les différents isolats, la couleur rose indique la fermentation de l'acide bulendoïque.

IV -2-Teste de citrate de simoun.

A partir des 20 souches, seulement 6 sont capables d'utiliser le citrate comme une seule source de carbone et provoquer un virage de couleur du vert au bleu à partir d'une alcalinisation de milieu (A1, A4, B2, B5, B7, B8). (figure 14).



Figure n°14: Résultats de citrate de Simon virage de couleur du vert au bleu

IV - 3-Teste nitrate réductase.

On a 17 souches qui peuvent produire l'enzyme de nitrate réductase et font la réduction de nitrate en nitrite, sauf les bactéries (A1, A2 et A3) qui ne changent pas de couleurs après ajout du zinc. Tandis que les résultats positive parce que la nitrate réductase est positive jusqu'au le stade azote.

Les résultats obtenus dans les figures suivantes :

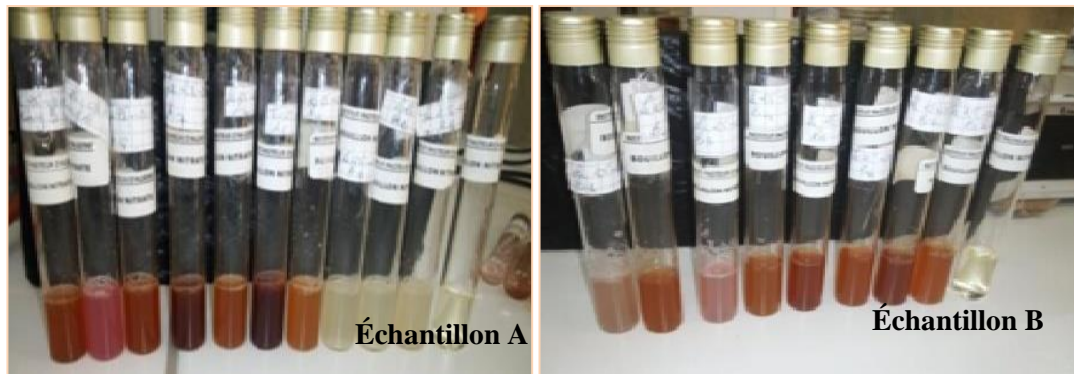


Figure n°15 : Mise en évidence de la réduction de nitrate au stade nitrite par nitrate réductase.




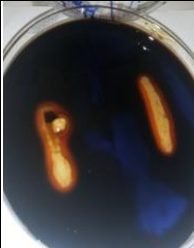














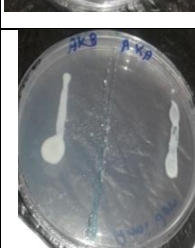

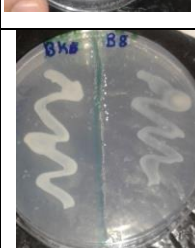

Figure n°16 : résultats des 03 souches après ajouter du zinc

IV -4-Teste de dégradation d'amidon :

L'amidon est un glucide complexe dont la dégradation nécessite une amylase présente chez les isolats qui sont présentés dans le tableau suivant cependant les autres isolats incapables d'utiliser ce polymère.

On observe des zones de dégradation qui montrent des résultats positifs dans la plus part des souches sauf les souches suivantes : **B0 ; B2 ; B7 ; B King ; A A4 ; A5 ; A6 ; A7, A King A ; A King B** qui sont des résultats négative

Tableau n°12 : Résultats du teste dégradation d'amidon pour 20souches étudiée, c'est comparaison avant et après ajout de lugol.

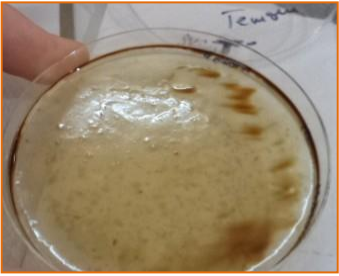
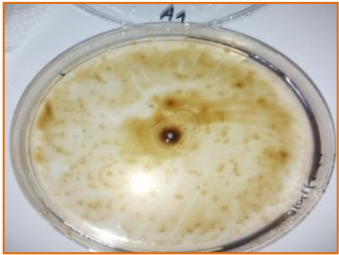


Souches échantillon A	Photos avant ajout de lugol	Photos après ajout de lugol	Souches échantillon B	Photos avant ajout de lugol	Photos après ajout de lugol
			B0/B1		
A3/A4			B2/B3		
A5/A6			B4/B5		
A7/A8			B6/B7		
A King A/A king B			B8/B King A		

V- Résultats du test de biodégradation

V-1-Résultat du teste de biodégradation sur milieu MSM solide.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau n°7 et n°8. Il représente les résultats d'échantillon A et B respectivement, on a 20 souches ensemencer sur milieu MSM solide additionnée de pétrole brut comme seul source de carbone

Tableau n°13 : Résultats du testes biodégradation de pétrole brut des souches d'échantillon « A ».

Souches	Photos	Zone de dégradation	Diamètre	Croissance bactérienne
Témoin		Négative	0mm	Négative
A1		Positive Zone ou halo clair	3mm	Croissance Positive
A2		Positive Trouve zone clair comme halo	6 mm	Croissance positive sur toute la boîte pétrie
A3		Positive Trouve une zone ondulée entoure de souche	2 mm	Croissance positive juste entoure la zone






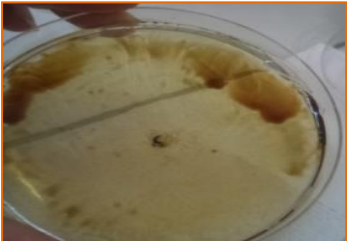










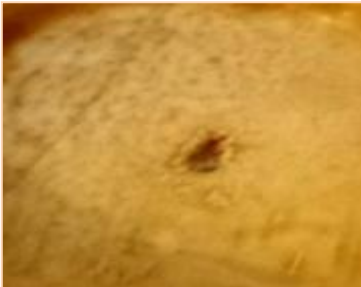
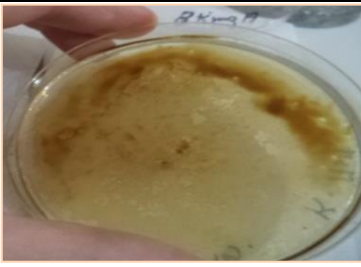
A4		Positive Trouve une zone halo entoure de la souche	2mm	Croissance positive sur toute la boîte pétrie
A5		Positive zone ondulée au centre de boîte	2 mm	Croissance positive sur toute la boîte
A6		Positive	3mm	Croissance positive sur toute boîte pétrie
A7		Positive	2mm	Croissance positive entoure de souche bactérienne
A8		Négative	0mm	Croissance positive sur tous la boîte
AKing A		Positive	4mm	Croissance nulle
A king B		Positive	5mm	Croissance positive au tour de la zone.

Tableau n°14 : Résultats du teste de dégradation de pétrole brut des souches d'échantillon « B ».

Souches	Photos	Teste dégradation	Diamètres	Croissance
Témoin		Négative	0mm	Croissance négative
B0		Positive	3mm	Croissance sur toute la boîte pétrie.
B1		Négative.	0mm.	Croissance des bactéries sur toute la boîte pétrie.
B2		Négative	0mm	Croissance favorite sur toute la boîte, des colonies brillantes et colorée.
B3		Négative	0mm	Croissance favorite sur toute la boîte pétrie, des colonies brillantes.

B4		Positive	7 mm.	Croissance des bactéries entoure de la zone claire et loin du centre.
B5		Négative	0mm	Croissance nulle.
B6		Positive	3mm.	Croissance sur toute la boite pétrie.
B7		Positive	3mm	Croissance favorite sur toute la boite pétrie.
B8		Positive Une zone claire autour des dépôts	4mm	Croissance des bactéries sur toute la boite pétrie
B King A		Négative.	0mm.	Croissance des bactéries sur toute la surface

La biodégradation des hydrocarbures se manifeste par l'apparition de zones claires ou un halo 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 de souches qui dégradent d'autres hydrocarbures non volatiles. Elle a été appelée : technique de spray : « oil spreading technic ».

Cette méthode peut être utilisée aussi pour l'étude de la dégradation du naphthalène, phénanthrène, et l'anthracène en plus de la détection des bactéries mutantes, auxotrophes. D'après *Hohzoh Kiyohara* les zones claires au tour du dépôt en plus de la croissance bactérienne témoignent de la présence d'une activité de dégradation des souches isolées du sol pour le pétrole comme seule et unique source de carbone.

Les zones varient de 2mm comme le cas de A5 jusqu'à 7mm qui est le cas de la souche B4 et ceci dépasse largement certaines littératures.

D'autres souches ont représenté et une zone claire autour du dépôt et une croissance bactérienne comme B0, B4, B7, et B8.

V-2-Résultat du teste de biodégradation sur milieu 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 10 jours et à des intervalles régulières de 2jours (MSM comme Blanc) les résultats sont présent dans la figure n°17.



Figure n°17 : Test de biodégradation du pétrole sur milieu MSM liquide.

Détection de l'activité de biodégradation des bactéries

Nous pouvons observer un film à la surface dans la majorité de l'inoculum, ceci se traduit par une croissance bactérienne dans le milieu de culture additionné de source de carbone (pétrole).

La variation de biomasse au cour du temps (jour) des quatre souches testées au cour de croissance dans le milieu de sels minéraux (MSM) additionné de 1% de pétrole brute comme seul source de carbone et de phénol a été suivi en mesurant la concentration microbienne en fonction du temps ce qui nous a permis de tracer les courbes représentées par les figures (19 et 20.). Les valeurs de Log UFC/ml en fonction du temps sont données dans les tableaux (voir annexe).

Figure n°18: Résultats de la mesure de la densité optique au spectrophotomètre UV des souches isolées de l'échantillon A

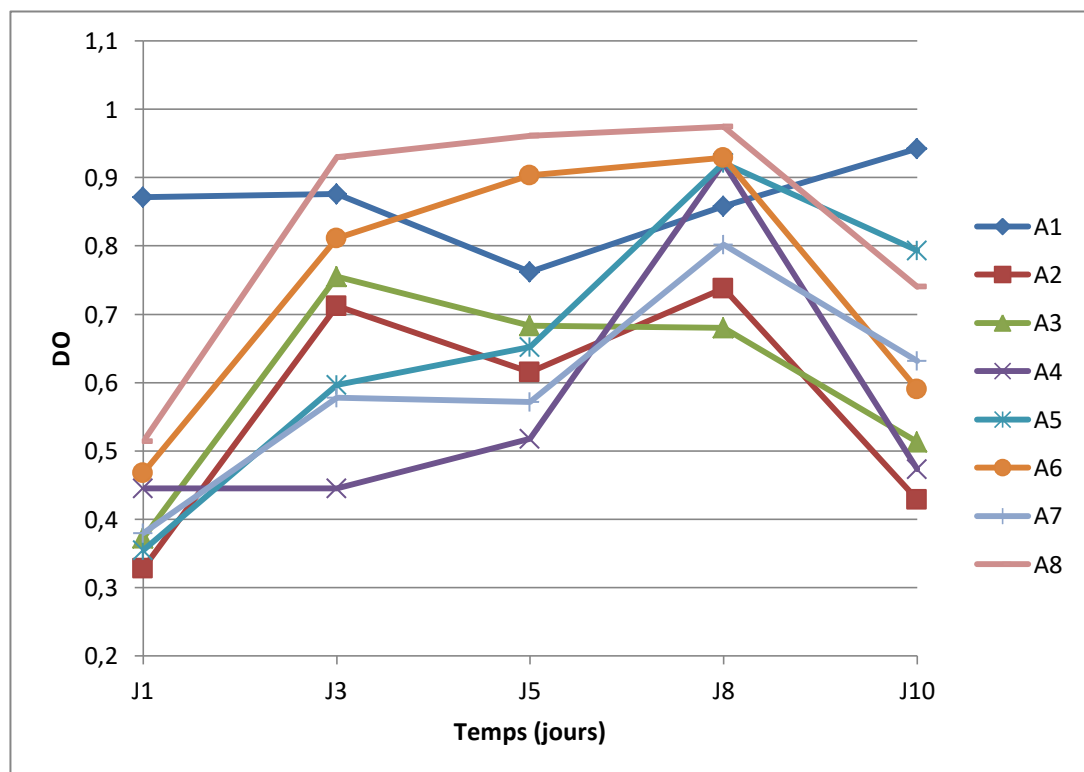
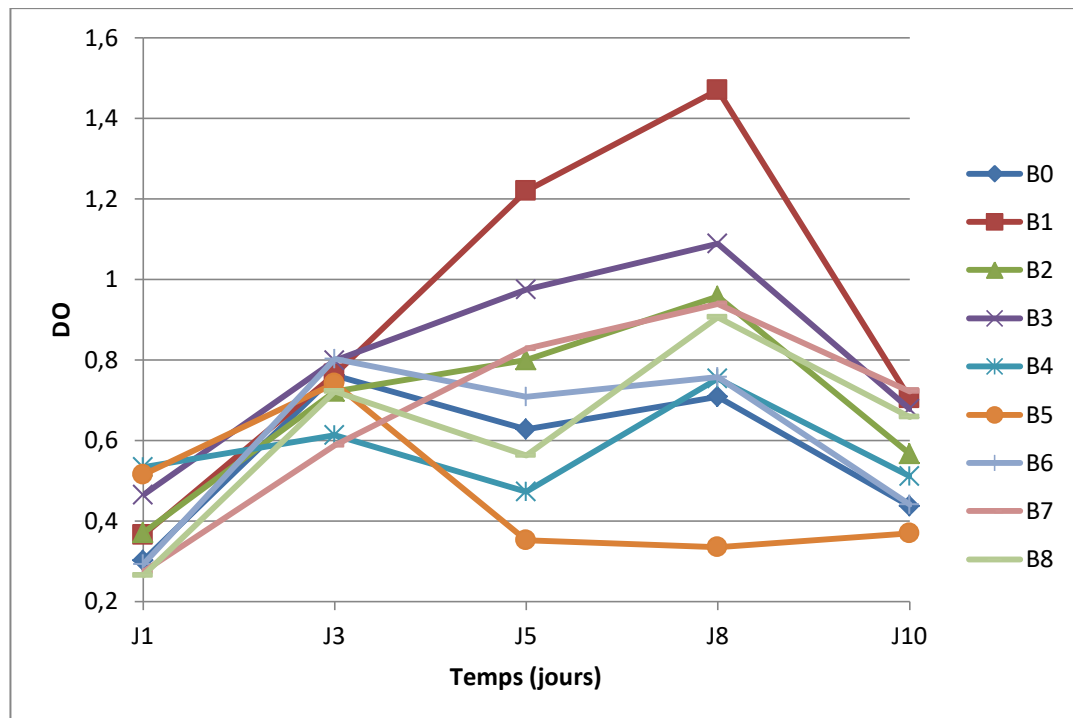


Figure n°19: Résultats de la mesure de la densité optique au spectrophotomètre UV des souches isolées de l'échantillon B



Selon les résultats obtenus dans notre expérience on a détecté que les valeurs de la DO de nos isolats 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 minérale (MSM) liquide additionné par le pétrole.

Les valeurs de la DO de nos isolats augmentent pendant les 10 premiers jours d'incubation et après ces 10 jours ces valeurs commencent à diminuer.

Ce qui indique qu'il y a une carence de nutriment, à cause d'utilisation et de 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).



Conclusion

Conclusion

La contamination des sols et eaux souterraines par des déversements d'hydrocarbures pétrolier est fréquente elle entraîne des risques pour l'environnement et la santé humaines. La biodégradation c'est une méthode de dépollution in situ qui peut être envisagé pour dégrader un panache de contamination organique.

L'objectif de ce travail a été la découverte d'une flore bactérienne pouvant dégrader le pétrole brut. Nous avons pu isoler 20 souches à partir du sol contaminé obtenu de la raffinerie d'Arzew, Oran.

Les espèces isolées ont été testées dans un milieu minéral gélosé additionnée de pétrole brut comme seule et unique source de carbone et d'énergie. La dégradation du pétrole brut a été suivie chaque jour par la recherche de : soit la croissance sur la surface du pétrole vaporisé soit par l'apparition de zones claires au tour des dépôts (hallo claire). Ces bactéries isolées sont capables de digérer le pétrole et cette méthode peut être applicable pour la détection de souches qui dégradent d'autres hydrocarbures non volatiles de manière microbiologique. Elle a été appelée : technique de spray : « Oil spreading technic ». Cette méthode peut être utilisée aussi pour l'étude de la dégradation du naphthalène, phénanthrène, et l'anthracène en plus de la détection des bactéries mutantes, auxotrophes.

D'après *Hohzoh Kiyohara* les zones claires au tour du dépôt en plus de la croissance bactérienne témoignent de la présence d'une activité de dégradation des souches isolées du sol pour le pétrole comme seule et unique source de carbone. L'étude du potentiel de biodégradation des souches bactérien isolée comme B0, B4, B7 et B8.

Ces souches ont été suivies sur milieu MSM liquide additionné de pétrole brut comme une seule source de carbone et d'énergie pendant 15 jours d'incubation sous agitation pour voir la croissance bactérienne. Les résultats de spectrophotométrie UV indique les valeurs de la DO de nos isolats augmentant pendant les 10 premiers jours d'incubation et après ces 10 jours ces valeurs commencent à diminuer. Ce qui

Conclusion

indique qu'il y a une carence de nutriment, à cause d'utilisation et dégradation de pétrole par notre isolat pendant les jours d'incubation.

Les courbes de croissance obtenues ont montrées que les bactéries sont dégradées en différentes périodes après ajout de nutriment ((pétrole brut)) chaque 2 jours indique 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.

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 Bibliographiques.

Références Bibliographiques.

Références Bibliographiques

-**Alain GRASMICK, 2005.** Elimination des hydrocarbures aromatiques polycycliques présent dans le boue d'épuration par couplage ozonation –digestion anaérobie. Univ Arodi BERNAL-MARTINEZ.(page 57).

-**Amann R, Ludwig W.(2000).** Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology .FEMS Microbial .27:63-68.

_ **Austin,.(1988).** Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium.International Biodeterioration& Biodegradation. 54:61-67.

_ **Auzaias Dominique et Labourdette Jean-Paul. (2010).** Algérie. Petit Futé., pages: 410.

- **AAM (2011) FAQ: Microbes & oil spills. ASM FAQs**

- **ALI AHMED Samira (2010,2011).** Essai de Réhabilitation d'un Sol Contamine par les Hydrocarbures a l'aide de Tensioactifs Obtenus par Voie Biologique. Thèse de Magistère en Sciences Agronomiques de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique

_ **BENCHOUK Amina (2017)** .Bioremédiation des sols pollués de pétrole par les micro-organismes indigènes et amélioration génétique de leur pouvoir. Université d'IBN BADIS MOSTAGANEM, Faculté des Sciences de la Nature. et de la Vie: 04-30

-**BOUDERHEM Amel,(2014).** Les méthode de traitement des sol pollué par des hydrocarbures pétrolières. Université B.U.K.O Ourgla. P 13-14

_ **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.

-Ballerini D,et Vandecasteele J.P.1999.La restauration par voie microbiologique des sols contaminés par les polluants organiques .In :Biotechnologie, coordinateur R .Scriban,5ème édition, Edition

_ **Bocard Christian. (2006).** Marées noires et sols pollués par des hydrocarbures: enjeux

*environnementaux et traitement des pollutions. Editions Technip -Paris. Pages : 150.

Références Bibliographiques

- **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.
- _ **Blumer .M.(1976).**Polycyclic Aromatic compounds in nature. *Scientific American*, 234(3), 35-45.
- _ **Burgess, R, M., Ahrens, m, J. & Hickey, C,W.(2003).** Geochemistry of PAHs in Aquatic Environments: Source, Persistence and Distribution. John Wiley & Son, Ltd.
- BOUSSABOUA H.,(2005)-** Elément de microbiologie
Ed .MASSON 2^{ème} édition, Paris. La restauration par voie microbiologique des sols contaminés par les polluants organiques. In :Biotechnologie, coordinateur R .Scriban,
-Ballerini D .et Vandecasteele J.P.1999.
- Britton, L.N.1984.**Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons, In *Microbial Degradation.Of Organic Compounds*,D,T,Gibson, Ed,pp.89-129,Marcel Deker , New York,NY,USA.
- _ **Chitour C., 1983 :** Le raffinage du pétrole. T1 Edt OPU. 93p.
- _ **COLOMBANO, S.A.SAADA , V.GUERIN ,P ,(2010) :**Rapport Final de Quelles techniques pour quels traitements _ Analyse coûts –bénéfices, BRGM 58609-FR.
- _ **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 .
- _ **Cécil Noel.** suivi de la biodégradation des hydrocarbures par couplage des mesures géophysiques électriques du sol (polarisation provoquée) et des analyses des gaz (concentration du CO₂ et isotopie du carbone). université d'Orléans, 2014. Français.
- _ **Cerniglia C.E. (1992).** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* .3:351–368

Références Bibliographiques

_ **Chen ,J. ?Henderson,Grimm,C,C.,Lloyd,S.W.&Laine? R. A(1998)** Termites fumigate their nests with naphthalene. *Nature*.392(6676),558-559

-**DAVID, C,(2005).HST**, Risque biologique et biodepollution des sol.

_ **DJERBAOUI Amina Nesrine. (2011)**.utilisation de souche bactériennes autochtones dans la production de biosurfactant et la bioremediation des HESSI MESAOUUD contaminés par les hydrocarbures. mémoire magister .université KASDI MERBAH OUARGLA

_ **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.

_ **Daisy, B.H.,Strobel, G, A., Castillo,U.,Ezra,D., Sears,J ., Weaver,D,K,& Runyom,J,B.(2002)**.Naphthalene. an insect repellent, is produced by *Muscodora vitigenus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*,148(11),3737-3741.

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

-**EMILIA KOLLER,(2004)**. Traitement des pollutions industrielles : Eau, Air, Déchets, Sols, Boues.

-**Eaton R.W., (1994)**.Organization and evolution of naphthalene catabolic pathways: Sequence of the DNA encoding 2-hydratase-aldolase from the NAH7 plasmid. *Journal of Bacteriology*.176:7757-7762.

_ **Fingas M. (2013)**. The Basics of oil spill cleanup. CRC Press, États-Unis.

_ **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.

Références Bibliographiques

- **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.
 - _ **Ghouas,(2005).** Anaerobic degradation of mono aromatic hydrocarbons. *Appl Microbial Biotechnol.* 2005. 63: 437-446.
 - Gibson D.T., Parales R.T. (2000).**Aromatic hydrocarbon dioxygénase in environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology.*11 :236-243
 - _ **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.
 - HAMLIN R , LAPRTE J, et PTC A(2000)**-Environnement et nuisances Edition Clartés, P 157.
 - **Haritash A.K. et Kaushik C.P. (2009).** Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials.* 169: 1–15.
 - _ **Hassanshahian M. et Cappello S. (2013).** Crude oil biodegradation in the marine Environments.*Biodegradation - Engineering and Technology*
 - Heitkamp M.A., Freeman J.P., Miller D.W., Cerniglia C.E.(1988b).**Pyrene degradation by a Mycobacterium sp:identification of ring oxidation and ring fission products. *Appl, Environ .Microbiol.*54:2556-2565.
 - _ **Hohzoh kiyohara et all,(1982).** Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In: Gibson, T.D. (Ed.), *Microbial degradation of organic compounds*, pp. 181-252. Marcel Dekker, New York, Basel.
 - Johnson ,M ;D Keinath T. M.and WeberW .J.(2001).**A distributed reactivity model for sorption by soils and sediments. Characterization and modeling of phenantherne desorption rates.*Environ. Sci.Technol.* 35(8):1688-1695
 - _ **Joffin J. N. et Leyral G., (2006).** Microbiologie technique, Tome1 : Dictionnaire des techniques, 4ème édition. Edition CRDP d'aquitaire, p. 368.

Références Bibliographiques

- _ **Jyothik, ksurendaBadu,.(2012)**.Anaerobic biodegradation of long-chain n-alkanes under sulfate-reducing conditions. *Environmental Science & Technology*. 32(14): 2191-2195.
- Khan A.A., Wang RF.,Cao W,W., Doerge D.R., Wennerstrom D.,Cerniglia C.E.(2001)**.Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenes from Mycobacterium sp.strain PYR-1.Appl.Environ.
- _ **LCPE : Loi canadienne sur la protection de l'Environnement, liste des substances d'intérêt prioritaire-Rapport d'évaluation- Hydrocarbures Aromatique Polycyclique, (1994) ,69 p.**
- _ **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.
- _ **Marchel et Bourdon,. (1982)**. Application of molecular methods as a biomarker in bioremediation studies, *International Journal of Biotechnology Applications*. 5(1): 147-154.
- _ **Marchel et Bourdon,. (1982)**. Application of molecular methods as a biomarker in bioremediation studies, *International Journal of Biotechnology Applications*. 5(1): 147-154.
- _ **MARCHAL N. et BOURDON J. L., (1982)**. Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. *Ed. Doin, Paris*.
- 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.
- **Meyer RF, Attanasi ED, Freeman PA (2007)**. Heavy oil and natural bitumen resources in geological basins of the world: U.S. Geological Survey Open-File Report 2007-1084.
- Muller, J.G;Deveux,R;Santavy,D;Lantz,S.E ;Willis ,S.G.and Pritchard.P.H(1997)**. Phylogenetic and physiological comparisons of PAH-

Références Bibliographiques

degrading Bacteria from geographically diverse soils. *Anton .Leeuw. Int. J.*71/329-343

-**Monteil (L)** , L'évolution de répression ,pénale de la pollution maritime par l'hydrocarbures Mémoire Master 2 de droit maritime et des transport ,sous la direction de Monsieur SCAPEL.

_**Morgan P. ; Watkinson R.J., 1994** : Biodegradation of components of petroleum. *Biochemistry of Microbial Degradation*. Vol.2. N°1. pp: 1-31

-**Muller, J.G;Deveux,R;Santavy,D;Lantz,S.E ;Willis ,S.G.and Pritchard.P.H(1997)**. Phylogenetic and physiological comparisons of PAH-degrading Bacteria from geographically diverse soils. *Anton .Leeuw. Int. J.*71/329-343

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

_**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.

- **Obayori S.O. et Salam L.B. (2010)**. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: role of plasmids. *Sci Res Ess.* 5(25):4093–4106

-**Oliveira ,V. ,Gomes, N,C Almelda, A, Silva,A. M, Silva, H .E. Cunha, A.(2015)**.**Microbe-assisted phytoremédiation of hydrocarbons In estuarine environments, Microb.Ecol** 69/1-12

_**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.

- **PERRY ,G ,(2001)**, Microbiologie cours et questions de révision, **PCEM ,PCEP** , Cycle /Licence ,2ème Cycle /Master, pp (849-853).

Prescott Harley. (2002). Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth Edition. The McGraw–Hill Companies,pages: 466

Références Bibliographiques

-**Potter, C.L ;Glaser, J. A; Chang L. W. Meler, J. R; Dosani, M.A. and Herrmann R.F.(1999).**Degradation of polycyclic hydrocarbons in aqueous solutions by ultrasonic irradiation. *J.Hazard.Mat.* B108/-95-102.

_ **Rniglia C.E. (1992).** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* .3:351–368

_ **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.

-**Rosenberg E. ; Legmann R. ; Kushmaro A. ; Taube R. ; Ron E.Z., 1992 :** Petroleum bioremediation- A multiphase problem. *Biodegradation*. Vol.3. pp : 337-350.

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

-**SASSON A, (1967)-**Recherche ecophysiologique sur la flore bactérienne du sol des régions arides du Maroc, **RABAT ,1967,p277.**

_ **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

-**SCOW K. M ,(2003).Rate of biodegradation, in :** W,J ,Lyman,W,f.Rosenblatt,(Eds.)*Handbook of Chemical Property Estimation Methods*, McGraw-Hill, New York.

_ **Smith M.R., 1994:** The physiology of aromatic hydrocarbon degrading bacteria. In : *Biochemistry of microbial degradation* (Ratledge C). Edt Kluwer Academic publishers. Netherlands. 356p.

-**SOLTANI M, (2004).** Distribution lipidique et voies métabolique chez quatre bactéries Gram négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone Thèse de doctorat de l'université Paris 6, spécialité chimie analytique.284.

Références Bibliographiques

_ **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.

_ **SPEIGHT J. G. (2014).** The Chemistry and Technology of Petroleum – Fifth Edition. CRC Press, États-Unis, 984 p.

-**Straube, W. L. Jones -Meehan, J; Pritchard, P .H. and Jones WR.(1999).**Bench-scale optimization of bioaugmentation strategies for treatment of soils contamination with high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons .*Resou. Conserv .Recy.*27:27-37

-**Sutherland, J ,B ; Raff, F. khan , A. A. and Cerniglia, C,E (1995).**Mechanisms of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation. In *Microbial Transformation and degradation of toxic organic chemicals.* Edited by Young, L, L and C.E Cerniglia. Wiley-Liss .New York.

SINGLETON P., (1999), Bactériologie, *Edition Duodot 4ème édition Paris.* P.415.

_ **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.

-**TERRAT,S,(2001),**Nouveaux design de sondes pour biopuces AND fonctionnelles et caractérisation des capacité de biodégradation des communautés bactériennes de sol pollués par des hydrocarbures , Thèse de doctorat ,université Blaise Pascal, Ecole doctorale des sciène de vie et de la sante, p41.

-**Thompson I.P. ,Van Der Gast C.,J.,Ciric L.,Singer A.C.(2005).** Bioaugmentation for bioremediation: The challenge of strain selection.*Environmental Microbiology.*7:909-915

TORTORA G .J., FUNKE B.R. et CASE C. L., (2003).Introduction à la microbiologie. *Ed. de Renouveau pédagogique Inc.* pp : 157- 355.

_ **Vogel T, Ballerini D. 2001.** Biorestauration des sols et des aquifères contaminés par des hydrocarbures et des composés halogénés. *Bull. Soc. Fr. Microbio. ,* 16(3) :204-209

Références Bibliographiques

- **Watnabe K et Hammune, (2003).**Molecular and physiological approaches to understanding the ecology of pollutant degradation *Current Opinion in Biotechnology*.14:289-295.
- **Watnabe K,, Baker P.W.(2000).** Envirommentally relvant microorganisms.*Journal of Bioscience and Bioengiineering* 89:1-11
- Watkinson R.J.Morgan P.(1990).**Physiology of aliphatique Central Sud. Cahier O.R.S.T.O.M Série Océanogradation.1:79-92
- _ **Wilcke,W.(2007).**Global patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil.*Geodema*,141(3-4),157-166.
- _ **Wolfgang, W.(2000).**SYNOPSIS Polycyclic Aromatic Hydrocarbons(HAPs) in soil – a Review .*Journal of Plant Nutrition and soil Science*, 163(3), 229-248.
- _ **Wilcke W., Krouss,M., Lilienfein,J,& Amelung,W.(2004).** Polyciclic Aromatic Hydrocarbons storage in a typical Cerrado of the Brazilian savanna. *Journal of Environmental Quality*,33(3), 946-55.
- _ **Wilcke W., Krouss,M.,& Amelung,W.(2002).** Carbon isotope signature of Polyciclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): evidence for different sources in tropical and temperate environments? *Enviromental Science & Technology*,36(16), 3530-5.
- _ **Young L.Y. et Cerniglia C.E. (1995).** Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. Wiley, New York, pp: 77–125
- **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

Site électronique:

- _ [https://www.cancer-environnement.fr/235-hydrocarbures-aromatiques polycycliques-HAP.ce.aspx](https://www.cancer-environnement.fr/235-hydrocarbures-aromatiques-polycycliques-HAP.ce.aspx)
- _ http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/etude_de_cas_TAUW .

Références Bibliographiques

<https://mern.gouv.qc.ca/energie/filiere-hydrocarbures/etudes/GENV32.pdf>.

_ [R.E.1.www.fr.encarta.msn.com/encyclopédie](http://www.fr.encarta.msn.com/encyclopédie) ,2004 .



Annexes

Annexes

Annexe 01: Composition des milieux de culture utilisés.

Milieu bouillon nutritif : Milieu d'enrichissement.

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

Milieu GN (gélose nutritive) : Milieu de dénombrement et de conservation.

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

Milieu King A : Milieu sélectionner le genre de *Pseudomonas* .

Proteose peptone.....	20g/l
Glycerol.....	10g/l
Sulfate de potassium (K ₂ SO ₄).....	10g/l
Chlorure de magnésium (MgCl ₂ ·6H ₂ O)..	3.5g/l
Agar.....	15g/l
pH.....	7.2± 0.2

Annexes

Milieu King B Milieu sélectionner le genre de *Pseudomonas* .

Proteose peptoneNo. 3.....	20g/l
Glycerol.....	15ml
Hydrogenophosphate de potassium (K ₂ HPO ₄).....	1.5g/l
Sulfate de magnésium héptahydraté (MgSO ₄ ·7H ₂ O)...	1.5g/l
Agar.....	20g/l
pH.....	7.2± 0.2

Milieu Mineral salt medium: MSM solide : pour la biodégradation

-Na ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g/l
-NaCl	0.1g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g/l
-K ₂ HPO ₄	1,8g/l
-NH ₄ CL.....	4g/l
- Agar	20 g/l
pH.....	6.5/l

Milieu Mineral salt medium: MSM liquide

-Na ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g/l
-NaCl	0.1g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g/l
-K ₂ HPO ₄	1,8g/l
-NH ₄ CL.....	4g/l
-pH.....	6.5/l