

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 والحياة



DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par :

BOUDIDA Abdelali - BOUKHARI Menad

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : Microbiologie Appliquée

THÈME

**Essai de biodégradation de pétrole par
quelques micro-organismes**

Soutenu le : 30/06/2025

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

Présidente	Belarbi Amaria	MCA	U. Mostaganem
Examinatrice	Belabed souria	MCB	U. Mostaganem
Encadrante	Hammadi Kheira	Pr	U. Mostaganem

Année universitaire 2024/2025

Remerciement

*Tout d'abord nous tenons à remercier **ALLAH** le tout puissant de nous avoir fourni la patience au moment de besoin, de la force au moment de la faiblesse et de la volonté contre le désespoir, et de nous avoir permis d'en arriver là.*

*Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à notre encadreur Mme **Hammadi Kheira** dont les conseils précieux et les directives avisées nous ont permis de mener à bon port ce travail de recherche.*

Merci également aux membres du jury

***Dr Belarbi . A** Président et **Dr Belabed . S** Examinatrice*

D'avoire accepter d'examiner ce travail, d'assister à la soutenance et d'enrichir ce dernier via leurs commentaires.

*Nous ne pourrons pas mettre fin à ces remerciements sans associer **nos familles** et **nos amis** pour leurs encouragements.*

*Nous vous disons **tout** merci*

Liste d'abréviation

DBO₅ : Demande Biochimique en Oxygène à 5 jours

DCO : Demande Chimique en Oxygène

DCPIP : Dichlorophénolindophénol (indicateur redox)

EPA : Eau Peptonée Alcaline

EPA : eau peptonée Alcaline

GNAB : Gélose Nutritive Alcaline Bilée

GNAB : Gélose Nutritive Alcalin Bilée

HAPs : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

MES : Matières en Suspension

MES : Matières en Suspension

NPP : Nombre le Plus Probable

OD : Oxygène Dissous

OD : Oxygène Dissous

RM : Rouge de Méthyle

TDS : Total Dissolved Solids

UFC : Unité Formant Colonie

VP : Voges-Proskauer

Liste des tableaux

Tableau 1 : valeurs limites des paramètres de rejet d'usine des eaux usée à sablottes Mostaganem...	43
Tableau 2 : résultats des souches microbiennes qui se trouve dans l'eau de mer	45
Tableau 3 : test de confirmation biochimiques sur les souches bactériennes.....	58

Listes des figures

Figure 1: composition chimiques des hydrocarbures	17
Figure 2 : Le devenir des hydrocarbures pétroliers dans le milieu marin.....	23
Figure 3 : station de prélèvement du port de mostaganem.....	29
Figure 4 : la formule chimique de DCPIP (Dichloro-2,6-phénolindophénol, sel de soduim hydraté, 5g).....	40
Figure 5 : résultat de de teste de présomption des coliformes totaux sur le milieu BCPL....	47
Figure 6 : Résultats des streptocoques fécaux sur le milieu Roth.....	48
Figure 7 : résultats des souche des staphylocoques dans le milieu Giolitti-Cantoni	49
Figure 8 : résultats du test confirmatif de staphylocoques sur milieu chapman.....	49
Figure 9 : résultats des souches vibrions cholérique dans l'eau péptoné de	50
Figure 10 : Résultats de confirmation pour la recherche des Vibrion cholériques.....	50
Figure 11 : Résultats des souches de pseudomonas dans le milieu KING A	51
Figure 12 : Résultat des souche fongiques dans le milieu sabouraud.....	52
Figure 13 : souche purifiée de pseudomonas.....	53
Figure 14 : souche purifiée de vibrions cholériques	53
Figure 15 : souche purifiée de staphylocoque.....	53
Figure 16: souche purifiée de coliforme totaux.....	54
Figure 17 : aspect des pseudomonas a grossissement x1000.....	55
Figure 18 : aspect des coliformes totaux a grossissementdes x1000.....	55
Figure 19 : aspect des vibrions cholériques a grossissement x1000.....	56
Figure 20: aspect des staphylocoques a grossissement x1000.....	56
Figure 21 : 20 Ml de la solution du colorant rédox DCPIP.....	57
Figure 22 : résultats du test de biodégradation de DCPIP.....	58

Résumé

Etant un lieu convoité de par les activités anthropiques et nuisibles qui y règnent, la mer fait l'objet d'un dépotoir pour les hydrocarbures qui y sont constamment déversés et qui sont à l'origine d'une altération écologique non-négligeable. Notre étude met en lumière l'importance de développer les processus de biodégradation permettant d'éliminer progressivement cet agent pollueur. Il s'agira de certains microorganismes actifs dans cette bioremédiation *Pseudomonas*, *Coliformes Totaux*, *Staphycoque*, *les Vibrions colériques* détectées dans l'eau de mer polluée puisé dans la station portuaire de la salamandre à Mostaganem. A l'issu de notre recherche nous avons démontré que ces bactéries peuvent dégrader le DCPIP (Rédox) et par conséquent, réduire la quantité du pétrole contenu dans l'eau.

Mots clés : biodégradation , hydrocarbures, microorganismes, *Pseudomonas sp* *Coliformes sp*, *Staphycoques sp* et *les Vibrions SP* , *DCPIP*.

Abstract

Being a coveted environment subjected to various anthropogenic and harmful activities, the sea has unfortunately become a dumping ground for hydrocarbons, which are continuously discharged and cause significant ecological damage.

Our study highlights the importance of developing biodegradation processes to progressively eliminate these pollutants. Certain active microorganisms involved in this bioremediation process : *Pseudomonas*, total coliforms, *Staphylococcus*, and *Vibrio cholera* were detected in polluted seawater samples collected from the Salamander port station in Mostaganem.

At the conclusion of our research, we demonstrated that these bacteria are capable of degrading DCPIP (a redox indicator), thereby reducing the amount of oil present in the water.

Keywords : biodégradation , hydrocarbures, microorganismes, *Pseudomonas sp* *Coliformes sp*, *Staphycoques sp* et les *Vibrions SP* , *DCPIP*.

ملخص:

نظرًا لكونه مكانًا تتمركز فيه الأنشطة البشرية الضارة ، يُعد البحر مكنًا للهيدروكربونات التي تُلقى فيه باستمرار ، والتي تُسبب خللاً بيئيًا كبيرًا. تُبرز دراستنا أهمية تطوير عمليات التحلل البيولوجي للتخلص تدريجيًا من هذا العامل الملوث. سيتم الكشف عن بعض الكائنات الحية الدقيقة النشطة في عملية المعالجة البيولوجية هذه، وهي *Pseudomonas, Coliform* ، *Totaux, Staphycoque, les Vibrions sp* ، في مياه البحر الملوثة المأخوذة من محطة ميناء صلامندر في مستغانم. في نهاية بحثنا، أثبتنا أن هذه البكتيريا قادرة على تحلل DCPIP (الأكسدة والاختزال)، وبالتالي تقليل كمية البترول الموجودة في الماء.

الكلمات المفتاحية: التحلل البيولوجي؛ الهيدروكربونات؛ الكائنات الحية الدقيقة ؛ *Pseudomonas sp, Coliform sp*

Totaux, Staphycoque sp, Vibrions sp, DCPIP

Table des Matières

Résumé	i
Abstract	ii
ملخص.....	iii
Introduction	1
Première Partie : Partie Bibliographique	4
Chapitre 1 : Biosystème marin	5
• I. Définition de l'écosystème marin	6
• I.1. Caractéristiques physico-chimiques des eaux marines	7
○ I.1.1 Température	7
○ I.1.2 Potentiel hydrogène (pH) et dioxyde de carbone (CO ₂)	8
○ I.1.3 Salinité et conductivité	8
○ I.1.4 Gaz dissous	9
○ I.1.5 Matières en suspension (MES)	9
○ I.1.6 Demande Biochimique en Oxygène (DBO ₅)	9
○ I.1.7 Demande Chimique en Oxygène (DCO)	10
○ I.1.8 Métaux lourds	10
○ Les micro-organismes hydrocarbonoclastes.....	11
▪ La flore microbienne des environnements marins.....	12
▪ I.2.1.1 les bactéries marines.....	12
▪ I.2.1.1.1 Coliformes totaux.....	12
▪ I.2.1.1.2 Coliformes fécaux.....	12
▪ I.2.1.1.3 Streptocoques fécaux (Enterococcus spp.).....	12
▪ I.2.1.1.4 Salmonelle spp.....	13
▪ I.2.1.1.5 Staphylococcus spp.....	13
▪ I.2.1.1.6 Clostridium perfringens.....	13
▪ I.2.1.1.7 Pseudomonas aeruginosa.....	13
▪ I.2.1.1.8 Vibrio cholerae.....	13
▪ I.2.1.2 Les champignons marins.....	13
I.2.1.2.1 Aspergillus terreus.....	15
I.2.1.2.2 Candida albicans.....	15
Chapitre 2 : Les hydrocarbures	16
• I. Composition du pétrole	17
○ I.1. Origine des hydrocarbures dans l'eau de mer	17
○ I.2. Composition chimique des hydrocarbures	17

- I.2.1. Hydrocarbures aliphatiques 19
 - Hydrocarbures aliphatiques acycliques saturés.....19
 - II.2.1.2 Hydrocarbures aliphatiques acycliques insaturés.....20
 - II.2.1.3 Hydrocarbures aliphatiques cycliques (ou acycliques).....20
 - II.2.1.4 Hydrocarbures alicycliques saturés (cycloalcanes)....20
 - II.2.1.5 Hydrocarbures alicycliques insaturés.....20
- I.2.2. Hydrocarbures aromatiques 21
- I.2.3. Le devenir des hydrocarbures pétroliers dans le milieu marin....22
 - 3.1. Dégradation abiotique 23
 - I.3.2. Dégradation biologique 24
 - Le processus de biodégradation aérobie des hydrocarbures pétroliers au niveau métabolique.....24

Deuxième Partie : Partie expérimentale 27

Chapitre 1 : Matériels et Méthodes 29

- I. Matériel et produits utilisés pour l’analyse microbiologique 30
- II. Méthodologie d’analyse 30
 - II.1. Prélèvement des échantillons 30
 - II.2. Analyse microbiologique 31
 - II.2.1. Comptage sur milieux solides et liquides 32
 - II.2.2. Nombre le plus probable (NPP) 33
 - II.2.3. Recherche et dénombrement des bactéries indicatrices 34
 - II.2.3.1. Coliformes totaux 35
 - II.2.3.2. Vibrions cholériques 35
 - II.2.3.3. Pseudomonas aeruginosa 36
 - II.2.3.4. Staphylococcus 37
 - II.2.3.5. Clostridium perfringens 38
 - II.2.3.6. Streptocoques fécaux 39
 - II.2.3.7. Isolement des souches fongiques 40
 - II.3. Purification et identification des souches 41
 - II.4. Test de biodégradabilité (DCPIP) 43
 - II.5. Études physiologiques des souches bactériennes 43

Troisième Partie : Résultats et Discussion	44
1 Résultats des analyses microbiologiques.....	45
II.1.1 Résultat Coliforme totaux.....	46
II.1.2 Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux.....	47
II.1.3 Résultats de la recherche des staphylocoques.....	48
II.1.4 Résultats de la recherche des Vibrions cholériques.....	49
II.1.5 Résultats de la recherche et du dénombrement des pseudomonas.....	50
II.1.6 Résultats de la recherche et du dénombrement des souches fongiques.....	51
II.2 Résultats de purification.....	52
II.2.1 Résultats sur les souches de références purifiées.....	52
II.3 Résultats microscopiques.....	54
II.4 Identification biochimique.....	56
II.5 Résultats du test de la biodégradabilité.....	57
Conclusion Générale	62
Références Bibliographiques	65

Introduction

Occupant près de 71% de la terre (CNES), l'eau est omniprésente d'où le surnom de « la planète bleue ». Elle circule, de fond en comble, dans toutes les sphères biologiques et physico-chimiques et ce, en quantités considérables (**ARNOULD et HOTYAT, 2003**). Toutefois, l'omniprésence des réseaux hydrographiques les rend plus enclins aux différentes dégradations.

Allant des répercussions de la modernisation (urbanisation, industrialisation, agriculture technicisée, tourisme de masse, croissance démographique, etc) aux activités humaines dévastatrices (pratiques anthropiques, extraction du sable, gaspillage, exploitation abusive des ressources, industrie du tourisme balnéaire, etc), les écosystèmes marins deviennent l'exutoire de la planète notamment dans la zone méditerranéenne où les ultimes sources de subsistances sont acquises par voie marine grâce au trafic maritime intense qui, à son tour, fragilise et altère les littoraux. (**KRAKIMEL, 2003**).

Cette mer tant riche et appréciée pour ses écosystèmes marins et côtiers est affectée par toute sorte de pollution qui en modifie l'écosystème, en altère la stabilité du milieu (**D'ADAMO et al, 2008**) et provoque l'extinction de plusieurs espèces de la faune et la flore marine qu'elle abrite (**GOLD, 2002**)

Les sources de pollution se multiplient constamment avec l'accroissement de ces activités. Entre déchets urbains, eaux usées et domestiques, engrais et pesticides, produits chimiques et substances radioactifs, le risque de la contamination de l'eau devient incontournable. Cependant, les hydrocarbures déversés par les sources pétrolières restent les polluants les plus dangereux et les plus fréquents tant dans la mer Méditerranée que dans la Mer internationale. En effet, environ 1,9 milliard de tonnes de pétrole sont transportés par voie maritime chaque année.

Chaque année plus de 200 000 navires se croisent dans la mer Méditerranée pour différentes l'exploitation offshore. Les activités commerciales y varient entre exploitation des ressources énergétiques, extraction de ressources marines, aquaculture et dégazage qui engendrent des marées noires sur la surface de l'eau, non loin de la côte (**BERATTO et CHARBONNIER, 2018**). Ces déversements pétroliers sont à l'origine d'un énorme déséquilibre écologique et menace intensivement la sécurité et la santé de l'homme.

Selon **Pulgarin (2012)**, les déversements pétroliers constituent un problème environnemental fréquent à l'échelle mondiale, avec plus de 10 000 galons de pétrole signalés dans les bases de données internationales.

L'impact de ces déversements est significatif, et bien que les techniques physiques et chimiques permettent de traiter rapidement une grande partie du pétrole échoué, une fraction importante reste présente sur le site contaminé (**Roling et al., 2002**). Les méthodes classiques d'élimination du pétrole dans les écosystèmes aquatiques incluent le nettoyage mécanique, le nettoyage chimique et la biodégradation microbienne. Cette dernière constitue le principal mécanisme d'élimination des hydrocarbures et des dispersants dans les milieux aquatiques (**Ventikos et al., 2004**). D'après **Alexander (1994)**, **Bertin et al. (2007)** et **Massalha et al. (2007)**, la bioremédiation apparaît comme une alternative écologique prometteuse, car elle est simple à mettre en œuvre, efficace et peu coûteuse par rapport aux techniques conventionnelles. La biodégradation permet ainsi de transformer ces substances toxiques en composés moins dangereux (**Soltani, 2004**).

Ce procédé repose sur l'utilisation de microorganismes capables de dégrader divers polluants, notamment les hydrocarbures et les métaux lourds (**Alisi et al., 2009 ; Plociniczak et al., 2013**). Ces microorganismes ont montré une capacité d'adaptation remarquable aux milieux pollués, que ce soit dans les stations d'épuration ou dans les environnements naturels contaminés (**Molina et al., 2009**). Les hydrocarbures pétroliers peuvent être dégradés par une grande variété de microorganismes qui les utilisent comme source de carbone et d'énergie (**Das et al., 2011**). Ces bactéries sont largement réparties dans la nature, parmi lesquelles on retrouve notamment *Rhodococcus* (**Van Hamme et al., 2001**), *Alcanivorax* (**Liu et al., 2010**), *Pseudomonas* (**Zhang et al., 2011**), *Dietzia* (**Xing-Biao et al., 2011**) ou encore *Acinetobacter lwoffii* (**Marchal et al., 2003**).

Concernant les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), plusieurs études ont démontré la capacité de certaines bactéries marines comme *Vibrio sp.* et *Halomonas sp.* à dégrader efficacement ces composés (**Dastgheib et al., 2012**), grâce à leur polyvalence métabolique (**Arahal et al., 2006 ; Simon et al., 2008**).

Cette aptitude des microorganismes à utiliser des composés organiques de synthèse est à la base du procédé de bioremédiation (**Perry et al., 2004**). Ces bactéries dégradatrices se trouvent aussi bien dans les sols que dans les environnements marins (**Pelmont, 2005**). La biodégradation naturelle réalisée par ces communautés microbiennes représente le mécanisme

le plus fiable pour éliminer les hydrocarbures et autres polluants organiques (**Cappello et al., 2007**).

Cependant, l'efficacité de cette dégradation est influencée par plusieurs facteurs comme la composition du pétrole, les conditions climatiques et les paramètres physico- chimiques du milieu (**McGenity et al., 2012 ; Sauret, 2011**). L'ensemble de ces processus abiotiques (dispersion, évaporation, dissolution, etc.) et biotiques (biodégradation) concourent à transformer progressivement ces hydrocarbures en dioxyde de carbone (CO₂).

Les activités humaines, à travers la mondialisation et les différentes sources de pollution, favorisent également l'apparition de nouvelles souches capables de dégrader les hydrocarbures (**Van der Meer et al., 1992**). Cependant, les communautés microbiennes indigènes déjà présentes dans les milieux marins restent généralement plus adaptées et plus efficaces (**Yakimov et al., 2005 ; Head et al., 2006**). De plus, l'introduction de souches génétiquement modifiées est strictement encadrée, voire interdite, en raison des risques potentiels sur l'équilibre écologique (**Perry et al., 2004**).

Il est donc crucial d'identifier et de caractériser ces communautés microbiennes locales, afin d'optimiser les processus de bioremédiation in situ (**Sivaraman, 2011**).

- Dans présent travail consiste à isoler et identifier des bactéries existantes dans le port de la salamandre (Mostaganem), plus précisément dans des zones marines exposées à une pollution par les hydrocarbures.
- Notre travail contient trois chapitres :
- Le premier chapitre sur biosystème marins
- Deuxième chapitre sur les hydrocarbures
- Troisième chapitre de la partie expérimentale consiste a isoler des souches résistantes aux hydrocarbures particulièrement au pétrole partir de l'eau de mer des zones étudiées et tester la biodégradation du pétrole et pétrole par les microorganismes identifiés.

Partie bibliographique

Chapitre 1

Biosystème marins

L'écosystème marin

L'écosystème marin est spécifiquement sensible aux différentes perturbations externes dues à des facteurs d'origine variée (activités anthropiques, fonte des glaces et changement climatiques, etc). Or, le déversement (accidentel ou prémédité) du pétrole et la propagation des marées noires sur la surface des eaux marines modifient incontestablement les caractéristiques physico-chimiques de cette eau entraînant, par conséquent, des processus de restauration écologique.

I- Définition de l'écosystème marin

Dans sa définition la plus simple, l'écosystème marin désigne un milieu d'eau salée incluant les océans, les rivages, les zones côtières et littorales abritant des collectivités pélagiques (vivant sur la colonne ou près de la surface de l'eau) et des collectivités benthiques (vivant au fond de la mer). **(Dictionnaire de l'environnement)**

De façon plus large, l'écosystème marin renvoie à l'ensemble des organismes vivants (biotope), leur environnement physique (biotope) ainsi qu'à l'ensemble de leurs interactions entre eux et avec ce même environnement (Mélanie PEREZ, 2025, UNIVERSALIS JUNIOR). Ces milieux côtiers sont considérés comme de hauts lieux de biodiversité rendant de nombreux services énormes à l'humanité. **(Office français de la biodiversité)**

I.1 Caractéristiques physico-chimiques des eaux marines

L'évaluation de la qualité des eaux marines repose sur plusieurs paramètres physico-chimiques. Parmi ceux-ci figurent des facteurs physiques comme la température et le pH, influencés par la présence de particules minérales en suspension, ainsi que des paramètres chimiques tels que les concentrations en métaux lourds, souvent liées à des rejets d'hydrocarbures. Ces éléments permettent d'apprécier l'état écologique global de l'eau.

I.1.1 Température

La température constitue un paramètre clé influençant les processus physico-chimiques et biologiques des écosystèmes aquatiques. Les hydrocarbures, pouvant apparaître à des températures inférieures à 50°C, sont fréquemment associés aux zones exposées aux risques de pollution par marées noires. En général, la température n'entrave pas directement la dégradation des hydrocarbures, sauf lorsqu'elle interagit avec d'autres

facteurs tels que la nature physique des hydrocarbures ou la disponibilité de l'eau nécessaire au développement microbien.

Par ailleurs, la température conditionne la dissolution des sels et des gaz présents dans l'eau. Elle influence également la vitesse des réactions chimiques et biochimiques, qui double ou triple à chaque élévation de 10°C. Cette augmentation stimule également le métabolisme des organismes aquatiques (**Institut bruxellois de gestion de l'environnement, 2005**).

De manière générale, la température affecte fortement la dégradation des hydrocarbures. **ZoBell (1969)** a démontré que cette dégradation était beaucoup plus rapide à 25°C qu'à 5°C. Cependant, l'effet thermique dépend également de la nature des hydrocarbures présents et de la composition des populations microbiennes impliquées.

I.1.2 Potentiel hydrogène (PH) et dioxyde de carbone (CO₂)

En l'absence d'activité biologique, un déversement d'hydrocarbures dans l'eau de mer induit une baisse sensible du pH, même pour des concentrations proches de 2 mg/L. Cette acidification est généralement observée au cours des premiers jours suivant la dispersion des hydrocarbures, avec une stabilisation progressive autour du neuvième jour (**Suzanne Roy et al., 1993**).

Dans les milieux ouverts, l'équilibre du carbone dissous varie en fonction des apports ou des pertes en CO₂. La photosynthèse réalisée par le phytoplancton, par assimilation du dioxyde de carbone, tend à réduire la concentration des acides faibles, contribuant ainsi à une élévation du pH (**Lindel et al., 1987**). Ces auteurs ont souligné l'importance de surveiller les fluctuations du pH pour évaluer les conséquences environnementales des marées noires. Globalement, une hausse du CO₂ dissous (sous forme d'acide carbonique) conduit à une acidification de l'eau.

I.1.3 Salinité et conductivité

La conductivité électrique élevée des eaux marines s'explique par la forte concentration en sels dissous. Grâce à la relation de proportionnalité entre les ions présents, la mesure de la conductivité permet d'estimer avec précision la salinité, faisant de cet indicateur un critère pertinent pour caractériser la répartition des espèces vivantes. Les valeurs de salinité varient sensiblement selon les bassins marins : entre 38 et 39 pour la

Méditerranée, entre 36 et 47 pour la mer Rouge, inférieure à 15 pour la Baltique, et entre 18 et 22 pour la mer Noire (**Aminot et Kérouel, 2004**).

I.1.4 Gaz dissous

Le taux d'oxygène dissous (OD) constitue l'un des indicateurs fondamentaux de la qualité des eaux (**Davis, 1980 ; Kettab et al., 2005**). La diminution de cet oxygène, notamment dans les couches profondes, est fréquemment associée à des phénomènes de dégradation organique (**Davis, 1980 ; Gafsi et al., 2004b**). Lorsque l'apport d'oxygène par diffusion atmosphérique ou par photosynthèse est insuffisant pour compenser sa consommation par les processus biologiques, une hypoxie peut survenir (**Zic et al., 1992 ; Gafsi et al., 2005**). Afin d'éviter des conséquences néfastes pour la faune aquatique, il est recommandé de maintenir des concentrations minimales comprises entre 2 et 2,5 mg/L, avec une valeur optimale autour de 3 mg/L (**Stefan et al., 2000 ; Gafsi et al., 2005 ; Kettab et al., 2005, 2006**).

I.1.5 Matières en suspension (MES)

Les matières en suspension regroupent l'ensemble des particules organiques et minérales présentes dans l'eau. Leur concentration est influencée par des facteurs tels que la nature géologique des sols traversés, la saison, le régime des précipitations, le débit des cours d'eau, ainsi que les rejets d'origine anthropique (**Rodier, 1984**). Des concentrations élevées en MES sont généralement considérées comme des indicateurs de pollution. Selon **Hébert et Légaré (2000)**, une augmentation importante des MES peut également provoquer un réchauffement de l'eau, ce qui entraîne une dégradation de la qualité des habitats aquatiques, en particulier pour les espèces adaptées aux eaux froides.

I.1.6 Demande Biochimique en Oxygène (DBO₅)

La DBO₅ correspond à la quantité d'oxygène dissous consommée par les micro-organismes présents dans l'eau lorsqu'ils dégradent la matière organique biodégradable. Cette mesure est réalisée à une température constante de 20 °C (pendant 5 jours), dans l'obscurité. Elle constitue un indicateur fiable pour évaluer la charge organique biodégradable dans un milieu aquatique. Les valeurs moyennes de la DBO₅ varient généralement entre 5 mg/L et 19 mg/L durant la période hivernale, et peuvent atteindre 8 mg/L à 37 mg/L pendant la saison sèche (**MAKHOUKH ET AL, 2011**).

L'augmentation des niveaux de DBO durant la saison sèche s'explique par des conditions favorables à l'activité microbienne : le ralentissement du débit d'eau et l'élévation de la température favorisent la dégradation de la matière organique. Cette consommation d'oxygène participe directement au phénomène naturel d'autoépuration des milieux aquatiques **(BRÉMOND ET PERRODON, 1979)**.

I.1.7 Demande Chimique en Oxygène (DCO)

La demande chimique en oxygène (DCO) permet d'estimer la quantité totale de matière organique présente dans l'eau, en se basant sur son oxydation par le bichromate de potassium. Cet indicateur est essentiel pour évaluer la charge polluante globale d'un milieu aquatique. La matière organique dissoute, qu'elle soit directement assimilable par les organismes vivants ou qu'elle nécessite une transformation préalable par les bactéries, constitue un facteur clé de la productivité marine. Cependant, cette relation présente des limites : une fois un certain seuil atteint, une augmentation supplémentaire de la matière organique ne conduit plus nécessairement à une hausse de la productivité **(PIERRE MICHEL, 1972)**.

En parallèle, l'accumulation excessive de matière organique entraîne une consommation accrue d'oxygène dissous, créant ainsi une concurrence directe avec la faune aquatique. Dans les cas extrêmes, cette situation peut conduire à l'eutrophisation, une dégradation sévère et durable du milieu. De plus, la présence de matières organiques est souvent associée aux effluents domestiques ou industriels, ce qui en fait un indicateur pertinent de pollution à prendre en compte lors des analyses physico-chimiques **(PIERRE MICHEL, 1972)**.

I.1.8 Métaux lourds

Les métaux lourds, tels que le plomb, le cadmium et le mercure, sont définis par leur densité élevée, généralement supérieure à 5 g/cm³. Ils se retrouvent couramment dans l'air, le sol et l'eau. Leur présence dans l'environnement est notamment favorisée par la combustion de combustibles fossiles comme le pétrole, le charbon et même le bois, ces activités contribuant à la dispersion de métaux ou de leurs dérivés sous diverses formes.

Certains de ces éléments, bien que nécessaires en faibles quantités pour le développement des êtres vivants (plantes ou animaux), peuvent devenir toxiques lorsque leurs concentrations dépassent les seuils admissibles **(BLIEFERT & PERRAUD, 2001)**. La toxicité et la mobilité des métaux lourds varient en fonction de leurs propriétés chimiques spécifiques **(CHARLATCHKA & CAMBIER, 2000)**. Certains métaux, comme le plomb (Pb), le cadmium (Cd), le cuivre (Cu) ou

le mercure (Hg), sont solubles dans l'eau, ce qui facilite leur dispersion dans les réseaux biologiques et aquatiques.

Les sédiments aquatiques jouent un rôle fondamental dans le piégeage de ces polluants, car leurs particules fines ont une grande capacité d'adsorption (**MONTUELL, 2003**). Ces métaux peuvent ainsi se fixer aux surfaces de minéraux argileux, d'oxydes métalliques ou encore de substances humiques (**BLIEFERT & PERRAUD, 2001**). Toutefois, plusieurs facteurs influencent l'adsorption et la mobilité des métaux dans le sol et les sédiments. Par exemple, des variations de pH peuvent modifier leur solubilité : une diminution du pH de 6,0 à 4,0 entraîne une libération accrue de métaux tels que le Cd, le Zn, le Cu et le Pb (**CHARLATCHKA & CAMBIER, 2000 ; DUCHAUFOR, 2001**).

Ces fluctuations sont souvent liées à la saisonnalité biologique, en particulier pendant la saison sèche, où l'intensification de l'activité microbologique modifie le pH et donc la mobilité des métaux (**BOURG ET AL., 2000**). Par ailleurs, les épisodes d'inondation ou les variations du niveau des nappes phréatiques influencent également ces processus en modifiant les conditions redox du milieu, ce qui affecte directement la mobilité et la minéralisation des métaux (**VAN DEN BERG ET AL, 1998**).

I.2. Les micro-organismes hydrocarbonoclastes

Depuis plusieurs décennies, il est établi que lorsqu'une nappe de pétrole est déversée dans l'eau de mer, elle subit une série de processus physico-chimiques favorisant progressivement sa disparition. Parmi ces mécanismes, on retrouve la dispersion du pétrole, l'évaporation des fractions volatiles, la photo-oxydation des hydrocarbures lourds, l'émulsification des composés hydrophobes, ainsi que leur adsorption et leur agrégation avec la matière organique en suspension. Une partie du pétrole se dissout également sous forme de composés organiques dissous (**Bianchi et al., 1988**). Toutefois, au-delà de ces processus physiques et chimiques, **la biodégradation par les micro-organismes constitue l'un des moyens les plus efficaces d'élimination des polluants pétroliers**(Atlas, 1981).

De nombreux micro-organismes, qu'ils soient procaryotes ou eucaryotes, possèdent cette capacité naturelle à décomposer les hydrocarbures, ce qui leur vaut le nom d'**hydrocarbonoclastes**. On les retrouve largement répartis dans l'environnement marin, que

ce soit dans la colonne d'eau ou dans les sédiments (Bertrand et al., 1989). Prince (2005) a recensé pas moins de **9 genres de cyanobactéries, 103 genres de champignons, 14 genres d'algues** et **79 genres de bactéries** capables d'utiliser les hydrocarbures comme unique source de carbone et d'énergie. Parmi les genres bactériens les plus fréquemment cités figurent *Acinetobacter*, *Alcanivorax*, *Alcaligenes*, *Cycloclasticus*, *Flavobacterium*, *Marinobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, et *Vibrio*, ces bactéries étant reconnues comme les acteurs majeurs de la dégradation pétrolière.

L'existence de bactéries dégradant les hydrocarbures est connue depuis près d'un siècle (Naughton et al., 1999). Ces organismes constituent aujourd'hui le groupe principal des bactéries marines hydrocarbonoclastes (Klein et al., 2008). Leur importance réside non seulement dans leur diversité taxonomique, mais également dans leur grande polyvalence métabolique, leur permettant d'adapter leur métabolisme à divers types d'hydrocarbures (Abalos et al., 2004).

Ces bactéries sont capables d'agir aussi bien en conditions **aérobies** qu'**anaérobies** (Head et al., 2014 ; Prince et al., 2007). Ainsi, la biodégradation aérobie est fréquente dans la colonne d'eau et les sédiments oxygénés, même à des profondeurs marines importantes (Prince et al., 2013). La dégradation anaérobie, quant à elle, se produit surtout dans les sédiments dépourvus d'oxygène. Des études ont montré que ces processus peuvent avoir lieu jusqu'à **2000 à 5000 mètres de profondeur**, y compris dans des environnements extrêmes comme l'Arctique (McFarlin et al., 2014) et l'Antarctique (Delille et al., 1998).

La dégradation des hydrocarbures en conditions aérobie a fait l'objet de nombreuses recherches, et des bactéries marines dégradant le pétrole ont été isolées dans divers écosystèmes marins à travers le monde (Head et al., 2006), soulignant leur **présence cosmopolite**. En temps normal, ces micro-organismes sont présents en faible quantité, mais leur nombre augmente significativement en cas de contamination pétrolière, entraînant des modifications dans la composition des communautés microbiennes locales (Caruso et al., 2004). Par exemple, dans le Golfe Persique et la mer Caspienne, il a été observé que la pollution pétrolière stimule considérablement la prolifération des bactéries dégradant les hydrocarbures (Hassanshahian et al., 2010).

I.2.1 La flore microbienne des environnements marins

I.2.1.1. Les bactéries marines

Les bactéries représentent la composante principale de la communauté microbienne dans les habitats marins. Leurs caractéristiques physiologiques diffèrent largement de celles des bactéries terrestres, du fait de leur adaptation à des conditions particulières telles qu'une forte salinité, une faible concentration en oxygène dissous, une pression hydrostatique élevée, un pH modérément basique et des températures souvent basses. Grâce à ces capacités d'adaptation, elles remplissent des fonctions écologiques essentielles, notamment dans le recyclage des éléments nutritifs et le fonctionnement des chaînes trophiques océaniques (**Morita & Colwell, 1984 ; Bianchi et al., 1989**).

I.2.1.1.1 Coliformes totaux

Les coliformes totaux englobent un groupe de bactéries entériques présentes dans les intestins des mammifères, mais aussi dans des milieux non intestinaux tels que le sol, l'eau ou les végétaux. Leur identification repose souvent sur la détection de l'enzyme β -galactosidase, qui hydrolyse des substrats spécifiques en composés colorés (**CEAEQ, 2015 ; Edberg et al., 2000**). Parmi les genres les plus courants, on trouve *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* et *Serratia*. Bien que généralement inoffensifs, certains membres peuvent révéler une contamination environnementale.

I.2.1.1.2. coliformes fécaux

Les coliformes thermotolérants, ou coliformes fécaux, sont capables de fermenter le lactose à une température de 44,5°C. *Escherichia coli* constitue l'espèce de référence dans ce groupe, avec d'autres espèces comme *Enterobacter* ou *Klebsiella* (**Elmund et al., 1999**). Même si leur présence est souvent associée à une pollution fécale, certains coliformes thermotolérants peuvent aussi provenir d'autres sources organiques.

I.2.1.1.3. Streptocoques fécaux (*Enterococcus* spp.)

Le groupe des streptocoques fécaux, désormais regroupés sous le genre *Enterococcus*, comprend notamment *E. faecalis* et *E. faecium*, fréquemment isolés chez l'homme. Leur capacité à survivre dans des milieux salés, à pH alcalin (jusqu'à 9,6), et leur persistance dans l'eau en font d'excellents marqueurs de contamination fécale (**OMS, 1977**).

I.2.1.1.4. Salmonella spp.

Appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, les *Salmonella* sont des bacilles Gram négatif capables d'utiliser le citrate comme unique source de carbone, de réduire les nitrates en nitrites et de produire du sulfure d'hydrogène. Ce sont des pathogènes majeurs associés à des toxoinfections alimentaires et hydriques (**Korsak et al., 2004**).

I.2.1.1.5 Staphylococcus spp.

Les staphylocoques, en particulier *Staphylococcus aureus*, sont des cocci Gram positif, catalase positive, capables de produire de l'acide lactique par fermentation. Leur présence dans l'eau, bien que souvent naturelle, est surveillée en raison de leur potentiel pathogène (**Leclerc et al., 1995**).

I.2.1.1.6. Clostridium perfringens

Bactérie anaérobie stricte et sporulée, *Clostridium perfringens* est extrêmement résistante dans l'environnement aquatique. Elle est souvent utilisée comme indicateur de contamination ancienne. Sa capacité à réduire les sulfites en H₂S est exploitée dans les techniques de détection (**Le Minor & Véron, 1982**).

I.2.1.1.7 Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa est un bacille Gram négatif strictement aérobie, oxydase positif et non fermentant. Il est opportuniste et prolifère dans des milieux riches en matière organique. C'est un pathogène connu dans divers contextes cliniques et un bon indicateur de pollution organique (**Katy Jeannot, 2019**).

I.2.1.1.8 Vibrio cholerae

Vibrio cholerae est une bactérie halophile typique des milieux marins côtiers et estuariens. Certaines souches produisent la toxine cholérique (sérogroupes O1 et O139), à l'origine du choléra. D'autres espèces du genre *Vibrio*, comme *V. parahaemolyticus* ou *V. vulnificus*, sont également pathogènes pour l'homme (**Michel et al., 2021**).

I.2.1.2. Les champignons marins

Les champignons, classés dans le règne des Fungi, sont des eucaryotes hétérotrophes. Ils peuvent être unicellulaires comme les levures, ou pluricellulaires sous forme de filaments

mycéliens. Leur croissance dans les milieux aquatiques dépend de plusieurs facteurs tels que l'humidité, le pH, la température et la disponibilité en oxygène. Ils participent activement à la dégradation de la matière organique, notamment de composés complexes comme la cellulose ou la lignine (**Pichard et al., 2006**).

I.2.1.2.1. *Aspergillus terreus*

Ce champignon filamenteux, *Aspergillus terreus*, est généralement isolé du sol, des poussières ou du compost. Il se distingue par une morphologie aspergillaire bisériée, avec des conidies sphériques et lisses. Bien qu'il soit surtout saprophyte, il peut aussi être responsable d'infections opportunistes (**Denning, 1998 ; Schmidt & Wolff, 1997**).

I.2.1.2.2. *Candida albicans*

Candida albicans est une levure appartenant au phylum des Ascomycota. Elle fait partie de la flore humaine normale mais peut devenir pathogène dans certaines conditions (humidité élevée, immunosuppression, etc.). Elle forme des colonies blanches et crémeuses et peut passer d'une forme unicellulaire à une forme filamenteuse (**Pfaller et al., 2007 ; Krick et al., 2008**). nhbk

Chapitre 2

Les hydrocarbures

I. Composition du pétrole

I.1 l'origine des hydrocarbures dans l'eau de mer

Les origines, les formes et la vulnérabilité de la pollution dans le bassin méditerranéen. Actuellement, la mer Méditerranée fait face à une augmentation de la pollution, provenant aussi bien de sources naturelles qu'humaines. Les polluants atteignent cet endroit par différents moyens : les rivières qui se déversent dans l'océan, l'air, le drainage des régions côtières, ou encore grâce à des déversements directs effectués en mer, y compris ceux provenant de navires ou d'émissaires industriels.

Il existe de nombreuses sources de pollution, et ses manifestations sont diverses. On trouve dans cet environnement des résidus solides (comme les sacs en plastique ou les conteneurs déversés par les navires), des matières liquides ou dissoutes (telles que les nappes d'hydrocarbures, les nitrates, les métaux lourds), et aussi des micropolluants dérivés de médicaments ou de pesticides.

Cette pollution se déplace à travers un continuum écologique reliant les rivières, les estuaires, les zones côtières et les profondeurs marines. En d'autres termes, ces environnements aquatiques ne sont pas séparés les uns des autres, mais constituent un réseau interconnecté dans lequel les polluants peuvent se déplacer, s'amasser et se métamorphoser.

Selon les informations fournies par le Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE), près de 80 % de la pollution marine a pour origine les activités sur terre. Elle est transportée vers la mer par le biais des rivières, du ruissellement sur les terres et des rejets provenant des régions côtières. Les activités maritimes sont responsables des 20 % restants : déversements accidentels ou réguliers de pétrole ou de substances chimiques, pertes de fret, immergations illégales de déchets, et émissions atmosphériques associées au transport par voie maritime (CGDD-SOeS). Le faible renouvellement des eaux rend la mer Méditerranée un écosystème très vulnérable à l'accumulation de ces polluants. Dans ce travail on s'est intéressé à deux types de polluants différents ; les hydrocarbures (contaminants organiques) et les métaux lourds (polluants inorganiques) qui représentent les contaminants majeurs dans la mer méditerranéenne.

I.2 Composition chimique des hydrocarbures

Les hydrocarbures sont des composés organiques constitués exclusivement d'atomes de carbone et d'hydrogène, généralement représentés par la formule chimique générale (C_xH_y). Sur le plan

chimique, ils sont classés en trois grandes catégories : les hydrocarbures saturés et insaturés non aromatiques, les hydrocarbures aromatiques, et les hydrocarbures lourds.

Ces trois types se retrouvent à la fois dans les hydrocarbures d'origine naturelle (biogène) et dans ceux issus du pétrole, à l'exception des alcènes, qui ne sont pas présents dans les pétroles bruts.

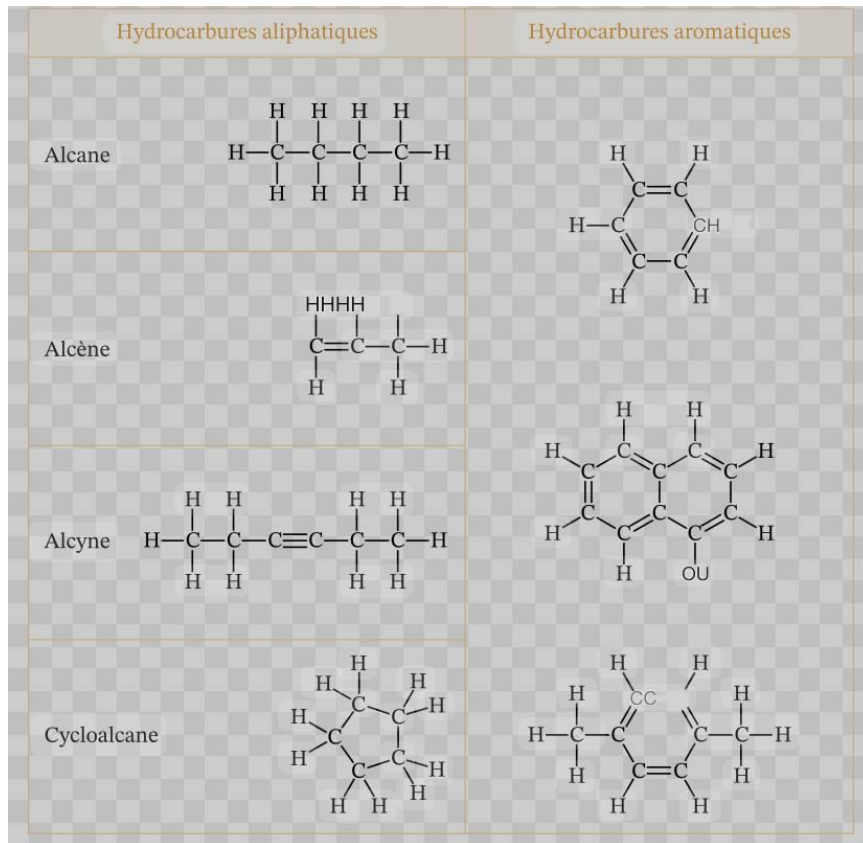


Figure 1: composition chimiques des hydrocarbures(image google)

I.2.1 Hydrocarbures aliphatiques

Les hydrocarbures aliphatiques sont constitués de composés saturés, à chaîne ouverte linéaire ou ramifiée, tels que les n-alcanes (paraffines), les isoalcanes, les cycloalcanes (naphtènes), les terpènes et les stéranes. Selon leur poids moléculaire, les n-alcanes sont divisés en quatre groupes : (a) alcanes gazeux, (b) hydrocarbures aliphatiques de faible masse moléculaire (C8-C16), (c) hydrocarbures aliphatiques de poids moléculaire moyen (C17-C28), et (d) les hydrocarbures aliphatiques à haut poids moléculaire (> C28).

I.2.1.1 Hydrocarbures aliphatiques acycliques saturés

Les hydrocarbures saturés acycliques, connus sous le nom d'**alcanes**, appartiennent à la famille des composés aliphatiques. Ils sont constitués uniquement d'atomes de carbone et d'hydrogène, reliés entre eux par des **liaisons simples**. Leur formule chimique générale est **C_nH_{2n+2}**, où *n* représente le nombre d'atomes de carbone.

On distingue deux types principaux d'alcanes :

- **Les alcanes linéaires** (ou à chaînes droites) : Ils se composent d'une suite continue d'atomes de carbone formant une chaîne droite, chaque carbone étant lié à des atomes d'hydrogène. Ces structures sont relativement simples et chaque molécule est chimiquement stable dans des conditions normales.
- **Les alcanes ramifiés** (ou à chaînes latérales) : Contrairement aux linéaires, ces molécules présentent un ou plusieurs groupements méthyle ou autres radicaux alkyles greffés sur la chaîne principale. Ces ramifications modifient les propriétés physico-chimiques de la molécule, comme le point d'ébullition ou la réactivité. Leur nomenclature est régie par les règles de l'IUPAC, qui tiennent compte de la chaîne principale, des substituants et de leur position.

I.2.1.2 Hydrocarbures aliphatiques acycliques insaturés

Ces composés se distinguent des alcanes par la présence de **liaisons multiples (doubles ou triples)** entre atomes de carbone, ce qui leur confère une plus grande réactivité chimique. Leur formule brute générale est $C_nH_{2(n-i)+2}$, où i représente le nombre d'insaturations.

On les regroupe en deux grandes classes :

- **Les alcènes** : Ils comportent au moins une liaison **double C=C**. Leur nom dérive de celui de l'alcane correspondant, avec le suffixe « **-ène** ». La position des doubles liaisons est précisée par un chiffre. Selon leur nombre de doubles liaisons, on parle de **monoalcènes, diènes** ou **triènes**. Ces composés sont plus réactifs que les alcanes en raison de la présence de la double liaison, ce qui les rend utiles en synthèse organique.
- **Les alcynes** : Ils se caractérisent par une ou plusieurs liaisons **triples C≡C**. Leur nomenclature suit le même principe, en remplaçant le suffixe par « **-yne** ». On distingue ainsi les **monoalcynes, diynes** et **triyne**. Les alcynes sont connus pour leur **réactivité élevée**, leur **odeur piquante** et leur **potentiel toxique** à fortes concentrations, provoquant parfois des effets narcotiques.

I.2.1.3. Hydrocarbures aliphatiques cycliques (ou alicycliques)

Les hydrocarbures alicycliques sont des composés **cycliques** mais **non aromatiques**, c'est-à-dire qu'ils forment des cycles d'atomes de carbone sans délocalisation électronique caractéristique des composés aromatiques.

I.2.1.4 Hydrocarbures alicycliques saturés (cycloalcanes)

Ce groupe regroupe les **hydrocarbures cycliques saturés**, dans lesquels tous les atomes de carbone sont reliés uniquement par des **liaisons simples**. Lorsqu'il ne contient qu'un seul cycle, on parle de **cycloalcane** ; plusieurs cycles donnent lieu à des structures **polycycliques**. Leur formule générale dépend du nombre de cycles et d'atomes, mais ces molécules ont des propriétés similaires aux alcanes linéaires, bien que leur forme fermée influence leur stabilité.

I.2.1.5. Hydrocarbures alicycliques insaturés

- **Cycloalcènes** : Ce sont des hydrocarbures **cycliques insaturés** contenant **au moins une double liaison** dans le cycle. Leur formule générale est $C_nH_{2(n-i)}$. La nomenclature s'effectue en

ajoutant le préfixe « **cyclo-** » au nom de l'alcène de base. La présence d'une double liaison dans un cycle confère à la molécule des propriétés intermédiaires entre les alcènes et les cycloalcanes.

- **Cycloalcynes** : Ils contiennent **une ou plusieurs triples liaisons** au sein du cycle. Leur formule générale est $C_nH_{2(n-i)+2}$. Ces molécules sont plus rares en raison de leur **instabilité chimique**, notamment pour les petits cycles. Le **cyclooctyne (C₈H₁₂)** est le plus petit cycloalcyne stable connu. Comme pour les alcynes linéaires, leur nom dérive de celui de l'alcyne correspondant, précédé de « **cyclo-** ».

I.2.2 Hydrocarbures aromatiques

Un hydrocarbure aromatique est défini comme une molécule contenant de un à sept cycles benzéniques, avec une formule chimique générale de type C_nH_{2n-6} (**Conjan et Renard, 1999**). Ces composés peuvent être mono-aromatiques, di-aromatiques ou polyaromatiques, et comporter éventuellement des chaînes latérales aliphatiques. Certaines recherches suggèrent que des organismes tels que les algues, les plantes ou les bactéries seraient capables de synthétiser ces hydrocarbures, mais d'autres études indiquent que ces composés sont principalement accumulés par les organismes, sans être produits directement par eux (**Borneff et al., 1968 ; Hase et Hite, 1976**). Par conséquent, ils sont majoritairement d'origine anthropique. Parmi l'ensemble des hydrocarbures aromatiques, ce sont les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) qui suscitent le plus d'intérêt scientifique.

I.2.2.1 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) sont des molécules caractérisées par la présence d'au moins deux noyaux aromatiques fusionnés. Ces composés se distinguent par le nombre et l'organisation de leurs cycles. À ce jour, environ 130 HAPs ont été recensés, mais seuls 16 d'entre eux sont régulièrement ciblés lors des études environnementales. Ce sont ces 16 composés qui ont été classés par l'Agence américaine de protection de l'environnement (US-EPA) parmi les polluants prioritaires en raison de leur toxicité élevée (**Keith et al., 1979**). On distingue généralement les HAPs légers (possédant trois cycles aromatiques ou moins) des HAPs lourds (composés de plus de trois cycles).

Ces molécules sont particulièrement stables, faiblement volatiles et très hydrophobes. Leur résistance chimique ainsi que leur hydrophobicité augmentent avec le nombre de cycles aromatiques et la masse

moléculaire (**Kim et al., 2013**). Ces caractéristiques expliquent leur faible biodégradabilité et leur forte persistance dans les écosystèmes, ce qui représente un risque pour la santé. En effet, plusieurs études ont démontré que certains HAPs possèdent des propriétés génotoxiques, mutagènes et cancérigènes (**Randerath et al., 1999**).

La diversité des origines des HAPs dépend en grande partie de leur structure chimique. Lorsque les cycles aromatiques sont substitués par des groupements alkyles, cela révèle généralement une origine biologique, avec un précurseur ayant subi un processus d'aromatisation au cours de la diagenèse. À l'inverse, les HAPs dépourvus de groupements alkyles proviennent principalement de la combustion de matière organique, notamment végétale (**Youngblood et Blumer, 1975**).

Deux grandes origines sont généralement retenues pour les HAPs. La première, dite pyrolytique, est liée à la combustion incomplète de matières organiques (forêts, charbon, pétrole, gaz d'échappement) à haute température, entraînant leur libération dans l'atmosphère. La seconde origine, dite pétrogénique, est associée aux fuites ou déversements de pétrole, qu'ils soient d'origine naturelle ou anthropique. De plus, certains combustibles fossiles tels que le charbon et la houille renferment naturellement des HAPs, ces derniers étant particulièrement résistants à la dégradation.

Il existe également une hypothèse concernant une origine dite « biogénique », selon laquelle certains micro-organismes (champignons, plantes ou bactéries) seraient capables de synthétiser des précurseurs de HAPs (**Young et Cerbiglia, 1995**). Cependant, cette théorie demeure controversée. Dans l'environnement, les HAPs à faible poids moléculaire se retrouvent principalement sous forme gazeuse dans l'atmosphère, tandis que ceux contenant cinq cycles aromatiques ou plus sont majoritairement présents sous forme particulaire.

1.2.3 Le devenir des hydrocarbures pétroliers dans le milieu marin

Lorsqu'une nappe de pétrole est déversée en mer, elle s'étale rapidement à la surface de l'eau et subit ensuite divers processus de transformation qui modifient progressivement sa composition chimique au fil du temps. Ce phénomène, connu sous le nom d'altération ou de vieillissement, résulte principalement de plusieurs mécanismes (**Conrad et al., 2003 ; NRC, 2003**) :

- l'évaporation des fractions légères (à faible poids moléculaire),
- la dissolution des composés hydrosolubles,
- l'émulsification et la dispersion,
- la sédimentation,
- l'oxydation photochimique,
- la biodégradation.

Globalement, ces processus peuvent être regroupés en deux grandes phases selon le moment où leur influence est la plus marquée :

- **Phase précoce du déversement** : elle comprend l'étalement initial de la nappe, l'évaporation des fractions volatiles, la dispersion, l'émulsification et la dissolution des composants solubles.
- **Phase tardive du déversement** : elle est dominée par des processus plus lents tels que l'oxydation, la sédimentation et la biodégradation, qui conditionnent le devenir final du pétrole déversé dans le milieu marin.

1.3.1 Dégradation abiotique

La dégradation abiotique des hydrocarbures pétroliers dans le milieu marin regroupe plusieurs processus physiques et chimiques influençant leur transformation sans intervention biologique.

- **Évaporation** : Ce processus affecte principalement les fractions légères du pétrole, avec une intensité variable selon sa composition. Plus la nappe est étalée, plus l'évaporation est rapide, phénomène amplifié par l'action du vent et de l'agitation des vagues (**Harrison et al., 1975**).
- **Photo-oxydation** : Sous l'effet du rayonnement solaire, les hydrocarbures présents à la surface réagissent avec l'oxygène de l'air, formant des composés polaires plus solubles dans l'eau (**Marchand et Kantin, 1997**). Ce phénomène est accéléré lorsque le pétrole se présente sous forme de films minces (**OMI/PNUE, 2002**).
- **Émulsification** : Résultant du mélange de l'eau et du pétrole, elle donne lieu à deux types d'émulsions : les « huile dans l'eau », facilement dispersées par les courants marins, et les émulsions inverses « eau dans l'huile », qui tendent à former des boulettes goudroneuses échouées sur les plages. Ce processus joue un rôle clé dans la disparition des hydrocarbures à la surface (**Bertrand et Mille, 1989**).

- **Dissolution** : Bien que la solubilité des hydrocarbures dans l'eau reste limitée, elle est plus importante pour les composés aromatiques légers et polaires. La salinité élevée, comme celle observée en Méditerranée, réduit encore davantage cette solubilité (**Marchand et Kantin, 1997**).
- **Sédimentation** : Lorsque la densité du pétrole augmente sous l'effet de plusieurs processus (évaporation, dissolution des légers, oxydation, formation d'agrégats), il finit par se déposer. Les hydrocarbures lourds, notamment aromatiques et aliphatiques, se fixent plus facilement sur les particules en suspension, accélérant leur incorporation dans les sédiments (**Bertrand et Mille, 1989**).

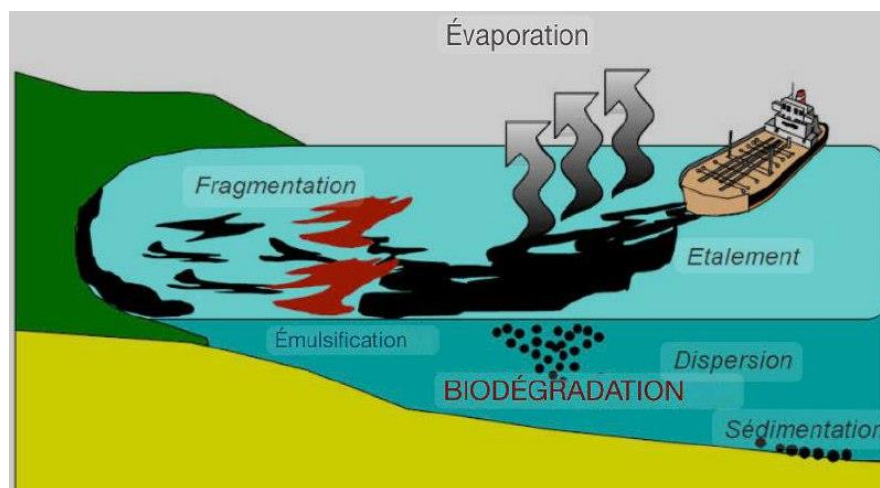


Figure 2 : Le devenir des hydrocarbures pétroliers dans le milieu marin (image google)

I.3.2 Dégradation biologique

La biodégradation est l'un des processus essentiels pour l'élimination naturelle des hydrocarbures en environnement marin. Ce procédé s'appuie principalement sur l'intervention de micro-organismes tels que les bactéries et les champignons marins, qui sont en mesure de convertir ces composés en substances oxydées plus simples. Toutefois, l'efficacité de ce processus de dégradation est tributaire de divers éléments : la température de l'eau, la présence de nutriments indispensables, le taux d'oxygène dissous et la composition chimique des hydrocarbures en question. En règle générale, les hydrocarbures légers sont plus facilement dégradés, alors que les composés de poids moléculaire supérieur résistent davantage à cette décomposition (**Sauer et al., 1993**).

I.3.2.1 Le processus de biodégradation aérobie des hydrocarbures pétroliers au niveau métabolique

La biodégradation est un processus biologique durant lequel divers microorganismes tels que les bactéries, les champignons ou les micro-algues convertissent des composés chimiques en éléments naturels simples, y compris l'eau, le dioxyde de carbone, le méthane et la biomasse cellulaire. Ce processus s'appuie sur une série d'étapes enzymatiques, déclenchées par diverses enzymes spécifiques.

La dégradation des hydrocarbures peut être effectuée soit par une souche microbienne unique, soit par un consortium constitué de plusieurs souches provenant du même genre ou de genres variés. Cependant, il a été prouvé que les communautés complexes de micro-organismes tendent généralement à surpasser les cultures en milieu pur pour la décomposition de différents types d'hydrocarbures.

Au sein des hydrocarbures, les n-alcanes sont généralement plus aisément dégradés que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Plusieurs éléments justifient cette inclination : l'accessibilité des hydrocarbures en tant que source exclusive de carbone et d'énergie, la capacité d'adaptation des microorganismes aux environnements pollués, ainsi que la présence

D'enzymes dédiées à certaines routes métaboliques. La majorité des enzymes qui provoquent cette décomposition sont codées par des plasmides (des éléments génétiques circulaires), bien qu'il existe des exceptions, comme dans le cas de certaines espèces d'*Acinetobacter*, où les gènes de dégradation sont localisés sur le chromosome. On connaît de nombreux plasmides impliqués dans la décomposition des hydrocarbures, à l'instar de Q15, OCT, TOL, NAH7, pND140 et pND160. Ces derniers portent des gènes particuliers tels qu'*alkA*, *alkM*, *alkB*, *theA*, *LadA*, *assA1*, *assA2* et *nahA-M*.

Malgré la capacité de nombreuses bactéries à décomposer les composés simples présents dans le pétrole brut, seules quelques espèces sont en mesure de traiter les molécules plus complexes telles que les HAP, les résines ou les asphaltènes. Le processus de décomposition de ces substances dépend de systèmes enzymatiques spécifiques, et débute généralement par deux phases cruciales

-L'adhésion des cellules microbiennes aux hydrocarbures,

-La fabrication de biosurfactants ou bioémulsifiants qui favorisent l'accès aux substrats.

II.3. La Biodégradation des hydrocarbures en milieux estuarien et marin froids

II.3.1. Biodégradation des hydrocarbures dans les milieux aquatiques

La dégradation des hydrocarbures présents dans l'environnement repose principalement sur l'activité de microorganismes capables d'utiliser ces composés comme source de carbone et d'énergie. Ce processus s'effectue majoritairement par respiration aérobie, impliquant l'oxygène comme accepteur final d'électrons. Toutefois, lorsque l'oxygène devient limité ou absent, des mécanismes de dégradation anaérobie peuvent intervenir, bien qu'ils soient généralement moins performants et plus lents.

L'efficacité de cette décomposition dépend de plusieurs facteurs essentiels. Parmi eux, la complexité moléculaire de l'hydrocarbure joue un rôle clé : plus le composé est complexe, plus il sera difficile à dégrader. De même, les conditions environnementales (température, disponibilité en oxygène, salinité, nutriments) influencent directement la vitesse du processus. Enfin, un facteur déterminant réside dans la présence ou non de populations microbiennes dotées des capacités enzymatiques nécessaires pour mener à bien ces transformations.

Dans les écosystèmes estuariens et marins, notamment en zones froides, la biodégradation des hydrocarbures dépend donc à la fois des caractéristiques physico-chimiques du milieu et de la richesse fonctionnelle des communautés microbiennes locales. (Karine Lemarchand et al., 2017)

II.3.2. Rôle des communautés microbiennes dans la dégradation des hydrocarbures pétroliers

Divers microorganismes présents dans les écosystèmes naturels sont capables de transformer les polluants organiques tels que les hydrocarbures, les solvants, les pesticides ou certaines matières plastiques, en éléments constitutifs nécessaires à leur métabolisme (Margesin & Schinner, 1999 ; Dash et al., 2013). Les principaux acteurs de cette biodégradation sont essentiellement des bactéries et des champignons, jouant un rôle prépondérant dans l'épuration biologique des milieux contaminés (Leahy, 1990).

Il est important de noter qu'aucune espèce microbienne n'est en mesure, à elle seule, de dégrader la totalité des composés présents dans le pétrole brut ou dans les carburants raffinés déversés dans l'environnement. Bien que certaines souches bactériennes soient capables de métaboliser plusieurs types ou classes d'hydrocarbures (AAM, 2011), la grande diversité chimique du pétrole nécessite l'action coordonnée de nombreuses espèces au sein de communautés microbiennes complexes (Head et al., 2006) (voir Figure 3). (Karine Lemarchand et al., 2017)

! [Figure 3] : Communauté microbienne impliquée dans la dégradation des hydrocarbures pétroliers (Head et al., 2006). (Karine Lemarchand et al., 2017)

Il est intéressant de constater que ces communautés bactériennes spécialisées présentent une certaine homogénéité à l'échelle mondiale (Wietz et al., 2010). Cependant, la proportion relative des microorganismes capables d'utiliser les hydrocarbures varie considérablement selon les milieux et les conditions locales : de 6 % à 82 % pour les champignons dans les sols, de 0,13 % à 50 % pour les bactéries du sol, et de 0,003 % à 100 % pour les bactéries marines (Leahy, 1990 ; Dash et al., 2013).

Ces microorganismes sont communément appelés **hydrocarbonoclastes**, c'est-à-dire spécialisés dans l'utilisation des hydrocarbures. En milieu naturel non contaminé, ils représentent généralement moins de 0,1 % de la communauté microbienne totale. Cependant,

en cas de pollution pétrolière, leur abondance peut s'accroître de manière spectaculaire pour atteindre quasiment 100 % dans certaines zones touchées par des déversements, qu'ils soient d'origine naturelle ou anthropique (Atlas, 1981 ; Yakimov et al., 2003 ; Yang et al., 2009).

Ces communautés se composent d'une part de microorganismes strictement dépendants des hydrocarbures pour survivre (hydrocarbonoclastes obligatoires), et d'autre part d'espèces opportunistes capables d'exploiter les hydrocarbures lorsqu'ils sont disponibles, tout en utilisant d'autres sources de carbone en leur absence. R+M=<3 27 octobre

Partie Expérimentale

Le point de prélèvement

Le prélèvement des échantillons de l'eau de mère est –il effectué au niveau de portpèche de salamandre (Mostaganem) . ce dernier est fait pour la pêche et pour le stationnement des bateaux de pêche , La ou il y'a une grande pollution dans la surface d'eau .

Site de prélèvement :



Figure 3 : station de prélèvement du port de mostaganem

Chapitre 1

Matériels et méthodes

Matériels et produits utilisé pour l'analyse microbiologie

Désignation	Quantité
Flacons stériles 250 ml	4 flacons
Boites de pétri stériles	4 sachets
Milieu bcpl + cloche de derham	20 tubes
Milieu schulbert + cloche de derham	20 tubes
Milieu roth	20 tubes
Milieu viande de foie	1 flacon
Milieu eaux peptone	9 tubes
Milieu sabouraud	20 tubes
Indicateur redox	1
Gélose nutritif	3 flacons
Boullion nutritif	1 flacon

Tableau 1 : le matériel et les produits utilisé

I.2 Méthodologie d'analyse

I.2.1 Prélèvement des échantillons

Les prélèvements d'eau ont été réalisés, au niveau du port de Mostaganem, à l'aide de deux flacons en verre d'une contenance de **250 mL** chacun.

Le premier flacon a été transporté, maintenu à une température de 4°C dans une glacière, jusqu'au laboratoire de microbiologie de l'Université de Mostaganem, en vue de la réalisation des analyses bactériologiques. Lors de ces prélèvements, une vigilance particulière a été apportée afin d'éviter toute modification de la qualité de l'eau avant son analyse. L'ensemble des manipulations a été réalisé dans des conditions strictes d'asepsie, afin d'écartier tout risque de contamination externe.

Le protocole suivi pour le prélèvement s'est articulé comme suit :

1. Les flacons destinés aux prélèvements ont été soigneusement nettoyés et rincés à plusieurs reprises pour éliminer tout résidu éventuel de détergent.
2. Au moment de la prise d'échantillon, chaque flacon a été rincé avec l'eau à prélever pour garantir une représentativité optimale de l'échantillon.
3. L'échantillonnage a été effectué manuellement, en immergeant le flacon de la surface vers une profondeur déterminée, au sein d'une zone choisie pour le prélèvement.
4. Une fois remplis, les flacons ont été fermés hermétiquement, puis enveloppés de papier aluminium afin d'assurer une double protection, notamment contre les contaminations lors des analyses microbiologiques.
5. Enfin, les échantillons ont été conservés dans une glacière réfrigérée pour limiter la croissance bactérienne et prévenir les réactions de photo-oxydation susceptibles d'altérer les propriétés organiques de l'eau

I.3. Analyse microbiologique

I.3.1 Comptage des colonies bactériennes suite à la culture

La technique de référence et fréquemment utilisée consiste à compter (numérer) les cellules viables après culture. .

On dépose une quantité déterminée d'une suspension bactérienne parfaitement uniforme et de ses dilutions sur un substrat gélosé (milieu solide), ou on l'intègre dans un milieu gélosé en surfusion (au cœur de la masse). Sous ces circonstances, seules les cellules viables produisent une colonie. Suite à une incubation effectuée dans des conditions appropriées, un dénombrement des colonies bactériennes apparues sur ou au sein du milieu de culture est effectué. L'analyse s'effectue en trois exemplaires et le dénombrement a lieu sur les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies. Toutefois, il n'est pas garanti qu'une colonie découle du développement d'une seule bactérie. Effectivement, les amas ou agglomérats de bactéries fournissent une

Une seule colonie et plusieurs bactéries déposées aléatoirement à proximité les unes des autres peuvent également donner lieu à une unique colonie. Il s'agit donc de plusieurs bactéries qui ne sont pas séparées. Cela entraîne un comptage par défaut, car de nombreuses bactéries ne constituent qu'une seule colonie.

C'est la raison pour laquelle les résultats ne sont pas présentés en termes de nombre de cellules, mais plutôt en Unités Formant une Colonie (**UFC ou CFU pour Colony Forming Unit**).

I.3.2 Comptage sur milieu liquide :

On intègre les microorganismes dans un milieu de culture liquide élaboré pour favoriser leur développement. L'expansion est caractérisée par l'émergence d'un trouble (coupure) du environnement et, éventuellement, une altération perceptible (changement d'un indicateur de pH coloré).

I.3.3 Méthode du nombre le plus probable NPP

Cette méthode est une estimation statistique du nombre de microorganismes supposés distribués dans le milieu de manière parfaitement aléatoire. L'estimation de la densité bactérienne est obtenue par application du principe de vraisemblance, à partir de réponses positives. Ces dernières sont observées pour une ou plusieurs dilutions successives de la suspension bactérienne originelle, dans des milieux de cultures liquides. Il s'agit d'une méthode quantitative et non pas énumérative. L'utilisation de cette méthode avec un tube par dilution entraîne une forte incertitude que des méthodes statistiques tentent de pallier par des essais multiples (2 ou 3 tubes par dilution). Le nombre de bactéries dénombrées est alors exprimé en Nombre le plus Probable (NPP) de bactéries viables, initialement présentes dans l'échantillon inoculé. Ce nombre est déterminé à partir de la considération des trois dernières séries de tubes positifs de la gamme des dilutions retenues, où l'on considère le nombre de tubes positifs par rapport au nombre de tubes inoculés. En se référant à la table de Mac GRADY, qui donne toutes les combinaisons possible et les interprétants en donnant le nombre de bactéries qui devrait statistiquement leur correspondre.

I.3.3.1. Détection et dénombrement des coliformes totaux

La mise en évidence et le comptage des coliformes totaux ont été effectués en utilisant la méthode de colimétrie en milieu liquide, reposant sur deux étapes principales :

Étape de présomption (mise en évidence des coliformes totaux) L'analyse a été réalisée à partir de l'échantillon d'eau de mer, en respectant des conditions d'asepsie strictes. Les volumes suivants ont étéensemencés :

- 5 tubes contenant 10 mL de milieu BCPL D/C (équipés de cloches de Derham) ensemencés chacun avec 10 mL d'eau de mer,

. Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24 heures. Un tube est considéré positif lorsque le milieu vire au jaune, accompagné d'un dégagement gazeux observé dans la cloche. →Étape de confirmation (test de Mac Kenzie) (détection des coliformes fécaux) Les tubes présumés positifs lors de la première étape sont repiqués dans des tubes contenant du milieu de Schubert muni d'une cloche de Derham, puis incubés à 44°C pendant 24 heures. La présence simultanée d'un dégagement gazeux et d'un anneau rouge en surface (après l'ajout de 2 à 3 gouttes de réactif de Kovacs) confirme la production d'indole, caractéristique des coliformes fécaux.

I.3.3.2. Recherche et dénombrement des *Vibrions cholériques*

-**Première étape d'enrichissement** Un volume de 18 mL d'eau de mer est transféré dans un tube contenant 2 mL d'eau peptonée concentrée 10X (EPA). Ce mélange est incubé à 37°C pendant 18 heures. Cette phase constitue le premier enrichissement (EPA1).

- **Deuxième étape d'enrichissement** À partir de cet enrichissement initial (EPA1), un second enrichissement est effectué dans un tube contenant de l'eau peptonée alcaline (EPA2). Simultanément, un ensemencement est réalisé sur une gélose nutritive alcaline bilée (GNAB1). Les deux supports sont incubés à 37°C pendant 6 heures.

-**Troisième étape d'enrichissement** Depuis le deuxième enrichissement (EPA2), un nouvel isolement est pratiqué sur une autre gélose nutritive alcaline bilée (GNAB2), suivie d'une incubation à 37°C pendant 48 heures (Mouffok, 2001).

-**Lecture et identification** :Les *Vibrions cholériques* se reconnaissent par l'apparition de colonies de grande taille, lisses, transparentes et aux contours réguliers.

I.3.3.4. Recherche et dénombrement des *Pseudomonas* :

On commence par ensemencer 0,1 ml d'eau de mer à la surface de la gélose inclinée de KING A par la méthode des quatre quadrants

- Une incubation à 30°C pendant 24h

Les colonies qui présentent une pigmentation bleue sont considérées des *pseudomonas*

- Si la pigmentation est pas franche, elle peut être confirmée par l'ajout de 0,5 ml de chloroforme dans le tube, ainsi que quelques gouttes de HCL, cela cause le changement de couleur de bleu vert le rouge, confirmant la présence de pyocyanine.

I.3.3.5. Recherche et dénombrement des *staphylococcus*

Dans 9 ml de milieu de bouillon Giolitti-Cantoni on introduit 1ml d'eau de mer

-Incubation 37C° pendant 24 h

-Les staphylocoques à Coagulase Positive réduisent les tellurites et produisent des colonies noires.

- Le test confirmatif :

Les colonies sontensemencées dans la gélose mannitol-sel (chapman). ensuite incubées à 37C° pendant 48H

I.3.3.6. Recherche et dénombrement des spores de *clostridium sulfito-reductrice*

Les *Clostridium sulfito-réducteurs* constituent un groupe de bactéries anaérobies capables de former des spores particulièrement résistantes. Ces microorganismes disposent d'un système enzymatique qui leur permet de réduire partiellement ou totalement les sulfites en sulfures.

Le protocole de recherche de ces bactéries commence par l'élimination des formes végétatives, réalisée par un traitement thermique à 80°C pendant 10 minutes, suivi d'un refroidissement rapide à l'aide d'eau du robinet. Par la suite, l'échantillon est incorporé dans un milieu de culture à base de gélose viande-foie (VF) fondue, enrichi en sulfite de sodium et alumine ferrique, afin de mettre en évidence la capacité réductrice de ces bactéries.

Pour garantir les conditions anaérobies nécessaires à leur développement, le milieu est hermétiquement bouché afin d'empêcher toute pénétration d'oxygène.

Les *Clostridium sulfito-réducteurs* se reconnaissent par l'apparition de colonies noires après 24 à 48 heures d'incubation à 37°C. Leur dénombrement est réalisé en comptant ces colonies noires caractéristiques.

I.3.3.7 Recherche et dénombrement de *streptocoque fécaux*

Cette méthode suit les principes de base de l'analyse colimétrique en milieu liquide, avec comme particularité l'ajout d'acide de sodium dans le tube primaire, destiné à inhiber le développement des bactéries Gram négatif.

- Phase présomptive :

L'essai commence par l'ensemencement de 10 mL d'eau dans un flacon contenant 10 mL de milieu Rothe D/C.

L'incubation est réalisée à 37°C pendant 24 à 48 heures.

L'apparition d'une turbidité dans le milieu est considérée comme un résultat présomptif positif.

- Phase confirmative :

Les milieux de Rothe déclarés positifs sont ensuite transférés dans des tubes contenant le milieu de Litsky EVA, suivis d'une incubation à 37°C.

Un résultat est confirmé positif lorsque l'on observe à la fois une turbidité et la formation d'une pastille violacée ou blanchâtre au fond du tube.

Le résultat final est exprimé en nombre de streptocoques fécaux pour 100 mL d'échantillon, à partir des données de la table de Mac-Gray.

I.3.3.8 Isolement des souches fongiques

Procédure d'isolement sur milieu spécifique : gélose de Sabouraud et gélose de PDA

Dépôt de l'échantillon :

-Déposer 0,1 mL de la solution mère en surface des tubes contenant le milieu de culture (gélose de Sabouraud).

-Étaler l'échantillon :

- Étaler uniformément l'échantillon avec un étaloir stérile

-. Incubation :

- Incuber les boîtes à 30°C. Puis Observer les cultures après 48 heures, 4 jours et 7 jours

I.4.Purification des souches

Après incubation sur un milieu sélectif, des colonies présentant les caractéristiques recherchées sont soigneusement choisies sur les boîtes de Pétri. Ces colonies sont ensuite purifiées par ensemencement en stries simples sur un milieu gélosé non sélectif, tel que la gélose nutritive, afin d'isoler des colonies issues d'une seule cellule bactérienne.

Les boîtes ainsi ensemencées sont incubées à la température optimale de croissance des bactéries, généralement fixée à 37°C pour une durée de 18 à 24 heures. Une fois l'incubation terminée, une colonie bien isolée est sélectionnée et transférée sur un nouveau milieu gélosé non sélectif pour assurer l'obtention d'une souche pure. Cette étape de purification peut être répétée plusieurs fois si nécessaire, jusqu'à obtention d'une culture homogène.

Les souches pures ainsi obtenues sont ensuite conservées sur des milieux appropriés, comme des gélose nutritives inclinées ou des billes de verre stériles, et stockées à -80°C ou dans de l'azote liquide pour une conservation à long terme et une utilisation future.

I.5. Identification de souches microbiennes

I.5.1 étude macroscopiques

Cette étude est réalisée par l'observation à l'œil nu la taille ; la forme (ronde ; ovale ; elliptique ; irrégulière) ; l'aspect des colonies (lisse ou visqueuse) ; et la couleurs (jaune ; noir ; blanc ...).

I.5.2 étude microscopiques

I.5.2.1. Bactéries

Cette étude se réalise par le microscope optique pour étudier la forme et la disposition des bactéries, par la coloration de Gram pour rendre les micro-organismes bien visibles, ou les bactéries à Gram négatif apparaissent colorées en rose et les Gram positif en violet (membrane).

Pour réaliser la coloration de Gram :

1. Réaliser un frottis de l'échantillon bactérien sur une lame, le laisser sécher et le fixer à la chaleur.
2. Recouvrir le frottis de cristal violet (colorant primaire) pendant 1 minute.
3. Rincer à l'eau et recouvrir d'une solution d'iode (mordant) pendant 1 minute.

4. Décolorer avec de l'alcool-acétone pendant 30 secondes à 1 minute.
5. Rincer abondamment à l'eau et recouvrir de safranine (colorant de contraste) pendant 1 minute.
6. Rincer à l'eau, laisser sécher et observer au microscope à l'objectif à immersion (x100). Après cette coloration différentielle :

- Les bactéries Gram positives apparaissent en violet foncé car elles retiennent le cristal violet-iodé.
- Les bactéries Gram négatives se colorent en rose car elles perdent le cristal violet lors de la décoloration et fixent le colorant de contraste (safranine). Cette coloration permet donc d'observer la morphologie (forme) et le mode de groupement des bactéries, en plus de leur réaction Gram qui est un critère taxonomique important

I.5.2.2-souches fongique :

Examens microscopiques à l'état frais (pour voir la cellule) . après coloration par bleu de méthylène permet de étudier ces caractères :

Les spores ; les mycéliums

I.6. test de biodégradabilité

Définition :

Le test de biodégradabilité est une méthode expérimentale visant à évaluer l'aptitude des micro-organismes, en particulier les bactéries, à décomposer des composés organiques tels que les hydrocarbures. Ce procédé permet ainsi de mesurer la capacité de ces bactéries à utiliser ces substances comme source de carbone et d'énergie, participant ainsi aux processus naturels de dépollution.

Principe :

Cette technique repose sur l'utilisation d'un indicateur d'oxydo-réduction appelé DCPIP (2,6-dichlorophénol-indophénol). Celui-ci présente une propriété caractéristique : il change de couleur selon son état d'oxydation :

- Bleu lorsqu'il est oxydé,
- Incolore lorsqu'il est réduit.

En présence de bactéries capables de consommer le pétrole comme source de carbone, des réactions d'oxydation biologique ont lieu. Ces réactions libèrent des électrons qui réduisent progressivement le DCPIP, provoquant ainsi un changement de couleur du bleu vers l'incolore. Cette évolution de couleur constitue un indicateur direct de l'activité métabolique des bactéries impliquées dans la biodégradation.

Méthodologie :

Selon Mc Genity et all (2012)

La formule chimiques de DCPIP :

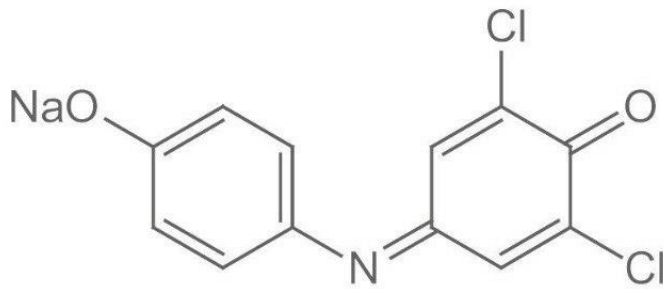


Figure 4 : la formule chimique de DCPIP (Dichloro-2,6-phénolindophénol, sel de sodium hydraté, 5g)

I.7.Etude physiologique

I.7.1Test de RM

Le test du rouge de méthyle est une méthode utilisée pour détecter la voie fermentative des acides mixtes. Pour le réaliser, on inocule un tube de Clark et Lubs, puis on incube pendant 24 heures à 30°C. Après incubation, on ajoute 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle et on observe la couleur. Si la solution vire au rouge, le test est considéré comme positif (RM+), indiquant la présence de la voie fermentative des acides mixtes. Si la couleur reste jaune, le résultat est négatif (RM-).

I.7.2.Le teste de Voges-Proskauer

sert à détecter la présence d'acétoïne par le biais d'une réaction colorimétrique. Pour réaliser ce test, un tube de Clark et Lus rempli de milieu de culture est inoculé, puis il est incubé à 30°C pendant une durée de 24H. Pour la lecture, on introduit par la suite 5 gouttes d'alpha-naphtol (VPI) et une quantité équivalente d'hydroxyde de potassium (VPII) dans le tube, tout en le penchant légèrement pour faciliter l'apport en oxygène. On attend de quelques minutes à une heure. Si la solution prend une couleur rouge, le test est jugé positif (VP+), ce qui signale la présence d'acétoïne.

I.7.3Oxydase

cette méthode facilite la détection de l'enzyme phénylalanine déshydrogénase au sein des bactéries, en se basant sur leur culture sur un milieu gélosé. Cette enzyme peut interagir avec le réactif N, N-diméthyl-p-phénylènediamine. Quand ce réactif est utilisé sur des colonies bactériennes, une absence de couleur signale que la bactérie est considérée comme négatif pour l'oxydase (Oxydase-).

I.7.4Catalase

cette technique permet d'identifier une enzyme respiratoire chez les bactéries exploitant un métabolisme oxydatif direct, contribuant à la régulation du taux de peroxyde d'hydrogène. Une goutte d'eau oxygénée est ajoutée sur une lame propre et sèche, après quoi l'inoculum bactérien est introduit à l'aide d'une pipette Pasteur. L'observation de la réaction se fait sans délai. SI des bulles se forment, signalant la libération d'oxygène, cela indique la présence de catalase (Catalase+).

I.7.5.Etude de type respiratoire

La régénération de la gélose Viande-Foie se réalise par ébullition au bain-marie pendant une demi-heure. Lorsque le milieu atteint une consistance liquide, autour de 45°, il est inoculé à l'aide d'une pipette Pasteur. Celle-ci est introduite au fond du tube, puis utilisée pour ensemercer en effectuant une rotation en spirale. Suite à un refroidissement de l'eau, le tube est disposé dans une étuve à une température de 30° pendant une durée de 24H.

I.7.6.Production des pigments

La composition du milieu influence la production des pigments, c'est pourquoi deux milieux distincts sont employés. On fera appel à King A pour l'étude de la pyocyanine. Le King B offre un environnement favorable à la production de pyoverdines.

La surface des milieux King A et King B est striée à partir d'une culture solide. On incube le King A et le King B pendant une journée à 37 °C. Le milieu King A se distingue par une teinte bleue signalant la présence de pyocyanine, alors que le milieu King B révèle une couleur jaune-verdâtre fluorescente indiquant la présence de pyoverdine.

I.7.7.Hydrolyse de l'amidon

Le milieu d'amidon est préparé en ajoutant 10 g/l au milieu GN. On dispose les échantillons en petites portions, et après une incubation de 48 heures à 30°C, l'ajout de quelques gouttes de lugol sur la surface du milieu permet d'améliorer la clarté de la lecture. Si la teinte se transforme en bleu, cela signifie que la bactérie est amidon (-), tandis que si la couleur bleue est inexistante, elle est identifiée comme amidon (+).

I.4.analyse physico-chimique

I.4.1. Mesure des paramètres physiques (pH / Température) :

L'évaluation du pH et de la température de l'eau de mer a été réalisée à l'aide d'un appareil multiparamètres portable. La procédure est relativement simple et nécessite de suivre quelques étapes essentielles afin d'assurer la fiabilité des résultats.

Avant toute utilisation, il est impératif de procéder à l'étalonnage de l'appareil conformément aux recommandations du fabricant. Pour cette opération, il faut utiliser des solutions tampons adaptées à l'analyse du pH de l'eau de mer. Les électrodes sont plongées dans ces solutions, puis les valeurs affichées sont ajustées en fonction des valeurs de référence des tampons utilisés. Cette opération doit être réalisée au minimum avec deux solutions tampons de pH différentes pour garantir une calibration correcte et précise.

Après l'étalonnage du pH, il est également nécessaire de calibrer la sonde de température, en la comparant à une source de température fiable. Une fois ces deux calibrations effectuées, les capteurs peuvent être immergés dans l'échantillon d'eau de mer. Il est recommandé d'attendre que les valeurs se stabilisent avant d'effectuer les relevés.

Pour améliorer la fiabilité des résultats, plusieurs mesures doivent être réalisées afin d'obtenir une moyenne représentative.

Il convient de noter que ce type d'appareil multi paramètres permet également de mesurer d'autres caractéristiques physico-chimiques, telles que la salinité ou la présence éventuelle de substances chimiques dissoutes.

I.4.2. détermination des paramètres chimiques et biochimiques

I.4.2.1. Détermination de la DCO :

La norme ISO 6060 :1989 est utilisée pour évaluer la demande chimique en oxygène (DCO) des échantillons d'eau, un indicateur essentiel de la pollution organique. Cette méthode mesure la quantité de matière organique susceptible d'être oxydée par un réactif chimique. Elle est applicable aux échantillons dont la DCO se situe entre 30 mg/L et 700 mg/L, avec une meilleure précision entre 300 mg/L et 600 mg/L. Pour garantir l'exactitude des résultats, la concentration en chlorures ne doit pas excéder 1000 mg/L.

I.4.2.2. Détermination de la DBO₅ :

La demande biologique en oxygène sur 5 jours (DBO₅) est déterminée par la méthode OXITOP, une technique respirométrique normalisée. Elle permet d'évaluer la charge organique biodégradable dans l'eau en mesurant la consommation d'oxygène par les micro-organismes, à l'aide de capteurs de pression. Ce procédé fournit une estimation précise de la pollution organique.

I.4.2.3 Détermination des métaux lourds :

L'analyse des métaux lourds (tels que cobalt, nickel, cuivre, zinc, cadmium, plomb, etc.) est effectuée selon la norme ISO 8288 :1986. Cette méthode repose sur la spectrométrie d'absorption atomique avec flamme, reconnue pour sa haute précision et sa sensibilité, permettant l'identification et la quantification de ces éléments dans l'eau.

I.4.2.4. Détermination des hydrocarbures totaux :

La quantification des hydrocarbures totaux dans l'eau suit la méthode standard **ASTM D1664 A**, qui repose sur une extraction à l'aide de **n-hexane**. Les hydrocarbures extraits sont ensuite mesurés par **analyse gravimétrique**, permettant ainsi d'évaluer la concentration totale des hydrocarbures présents dans l'échantillon.

	Unités	Normes
Température	°C	30
DBO₅	Ppm	35
DCO	Ppm	120
pH à 20°C	-	6,5-8,5
Conductivité à 20°C	µS/cm	-
Fer	mg/l	3
T.D.S	mg/l	-
Azote totaux	mg/l	30
MES	mg/l	35
Hydrocarbures totaux (méthanol)	mg/l	10
Huiles et graisses	mg/l	20
Indice de phénols	mg/l	0.3

Tableau 2 : valeurs limites des paramètres de rejet d'usine des eaux usées sablettes Mostaganem

Chapitre 2

Résultats et discussion

II.1 Résultat d'analyses microbiologique

Dans les échantillons du prélèvement dans le site du port de la salamandre et après une analyse microbiologiques des eaux prélevés on a isolés les micro-organismes suivant dans le tableau 2 :

Espèces	Résultats	Observation
<i>Coliformes totaux</i>	+	-Virage de couleur vert le jaune -production du gaz
<i>Streptocoque fecaux</i>	-	-Une faible turbidité dans les tubes
<i>Clostridium SulfitoRéductrices</i>	-	-Pas de colonies noir
<i>Staphylococcus</i>	+	-Milieu troublé
<i>Vibrion cholérique</i>	+	-Une turbidité dans les tube
<i>Pseudomonas</i>	+	-présence des colonies
<i>Souches fongique</i>	-	-Pas de colonies dans le milieu sabouraud

Tableau 3: résultats des souches microbiennes qui se trouve dans l'eau de mer

D'après les résultats obtenus les souches étudiées sont positif sauf les souches fongiques et *clostriduim sultifo-reductase*

II.1.1. Résultat coliforme totaux

Teste présomption



Figure 5 : résultat du teste de présomption des *coliformes totaux* sur le milieu BCPL (S1 et S2)

Discussion

Ces résultats ont rendu possible l'observation d'une transition vers le jaune dans la totalité des tubes. Ce changement de teinte signale une réponse favorable, reflétant l'activité métabolique des micro-organismes présents. Aucun dégagement de gaz n'a été noté pendant l'incubation, ce qui atteste de l'absence de fermentation produisant des gaz. Par conséquent, les résultats observés sont uniquement basés sur le changement de couleur, indiquant l'utilisation du substrat par les bactéries.

II.1.2. recherche et dénombrement des *streptocoques fécaux*

Résultats des souches sur le milieu Roth

Test de présomption

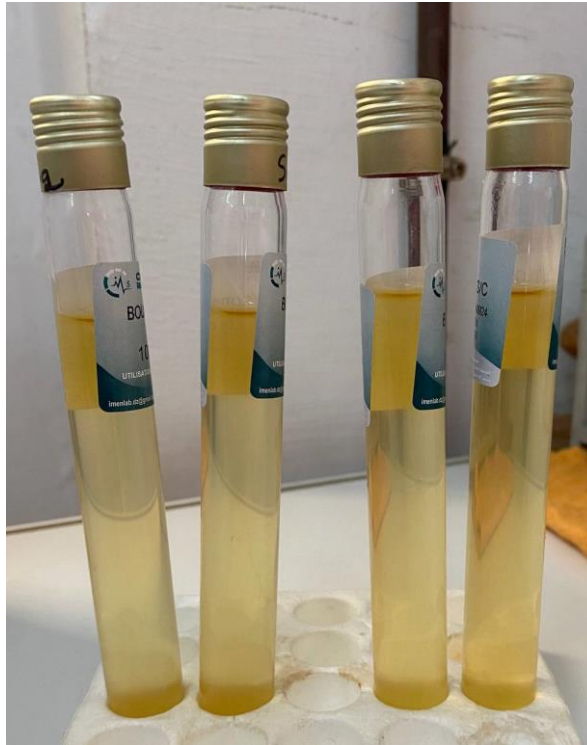


Figure 6: Résultats des *streptocoques fécaux* sur le milieu Roth (S1 et S2)

Discussion

Ces résultats montre une faible turbidité au niveaux des tubes de 11 ml de solution (L'absorption dans la spectrophotométrie est faible) indique qu'il ya quelques bactéries mais dans une faible densité.

II.1.3.Résultats de la Recherche des *staphylocoques*



Figure 7 : résultats des souche des *staphylocoques* dans le milieu Giolitti-Cantoni (S1 et S2)

Discussion

Les résultats d'après l'expérience faite on observe qu'il y'a une turbidité qui montre une présence bactériennes dans le milieu, on plus du test confirmatif dans le milieu CHAPMAN on observe des bactéries qui correspond au *staphylocoques* .

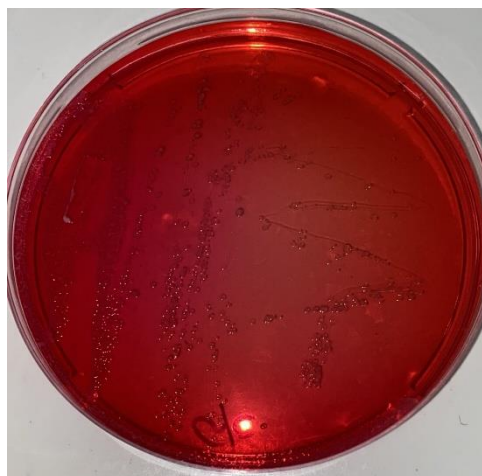


Figure 8 : résultats du test confirmatif de *staphylocoques* sur milieu chapman

II.1.4 Résultat Recherche des *vibrions cholériques*



Figure 9 : résultats des souches *vibrions cholérique* dans l'eau péptoné de (S1 ; S2)

Discussion

Présence de trouble microbien donc on passe au test confirmatif sur gélose TCBS +additif (résultat positif)

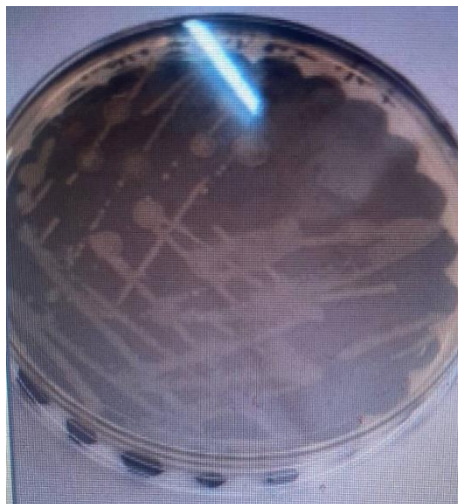
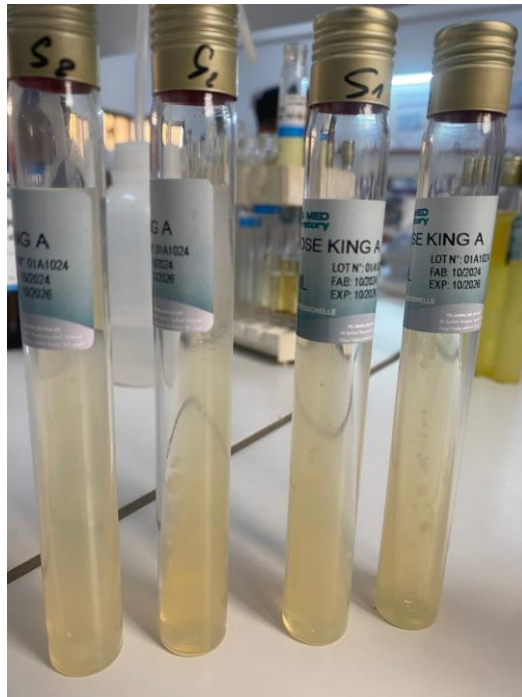


Figure 10 : Résultats de confirmation pour la recherche des *Vibrion cholériques*

II.1.5.Résultats de Recherche et dénombrement des *pseudomonas*



Figures 11 : Résultats des souches de *pseudomonas* dans le milieu KING A (S1 ; S2)

Discussion

Après l'incubation de 24h une croissance obtenue au niveau des tubes (S1 et S2) , les colonies indiquent une présence bactérienne (*pseudomonas* fortement).

II.1.6. Résultats de recherche et dénombrement des souches fongiques :






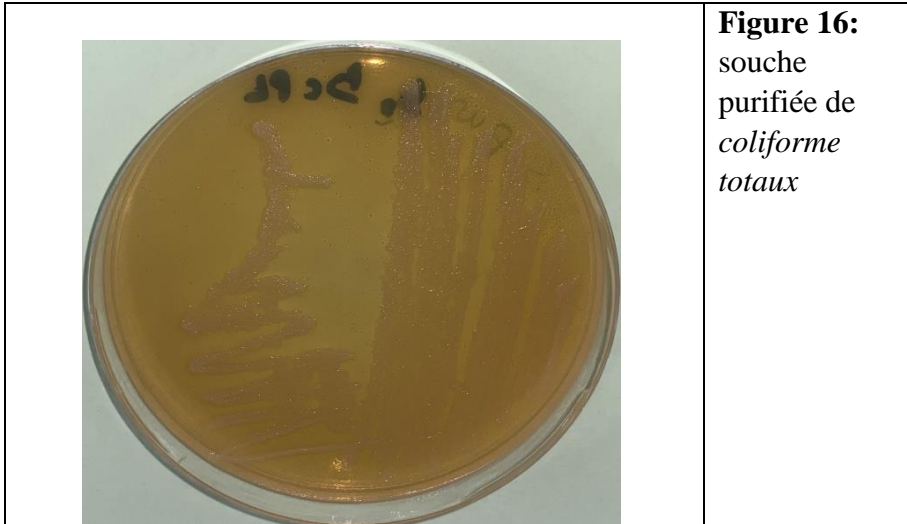
Figure 12 : résultat des souche fongiques dans le milieu sabouraud

discussion

pas de colonies au niveau de gélose indique qu'il y'a pas de mycètes .

II.2.Résultats de purification

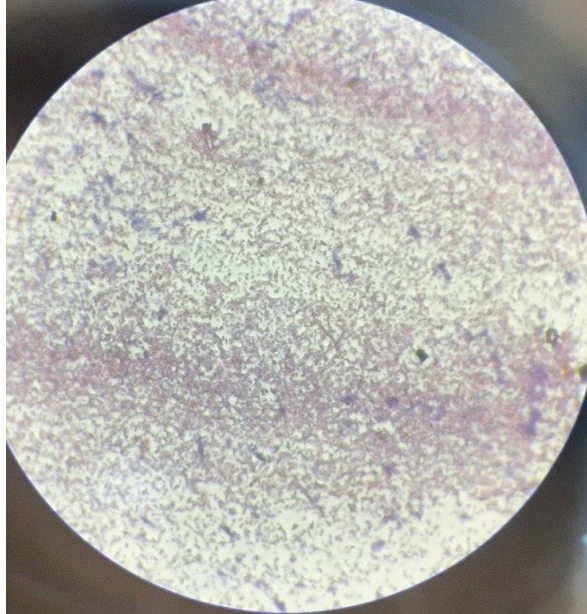
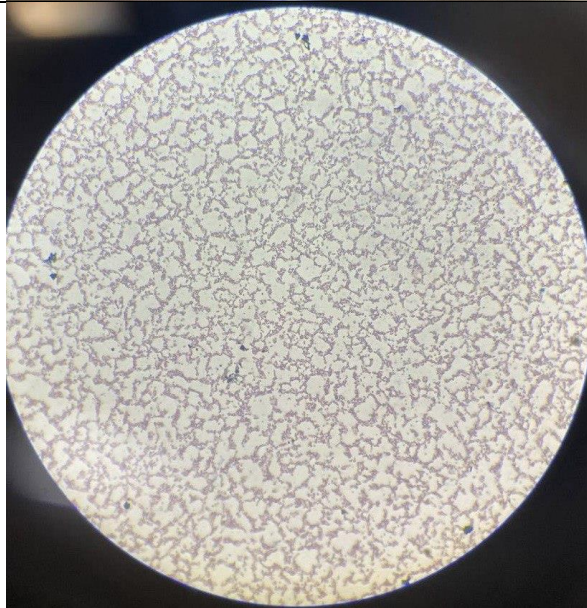
	<p>Figure 13 : souche purifiée de <i>pseudomonas</i></p>
	<p>Figure 14: souche purifiée de <i>vibrions cholériques</i></p>
	<p>Figure 15: souche purifiée de <i>staphylocoque</i></p>

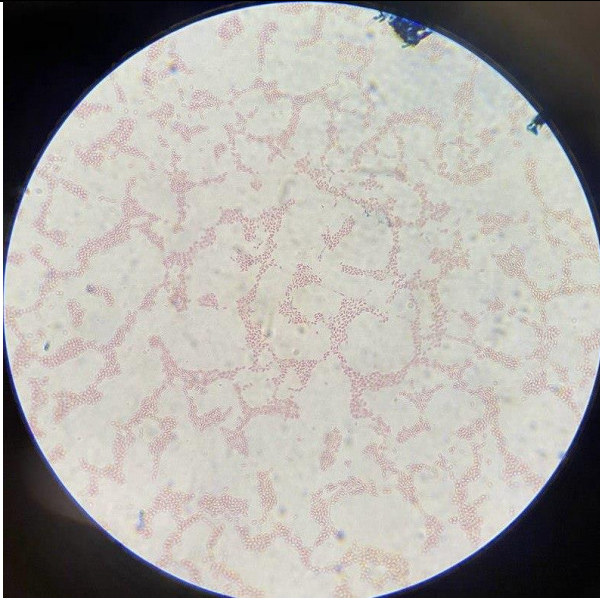
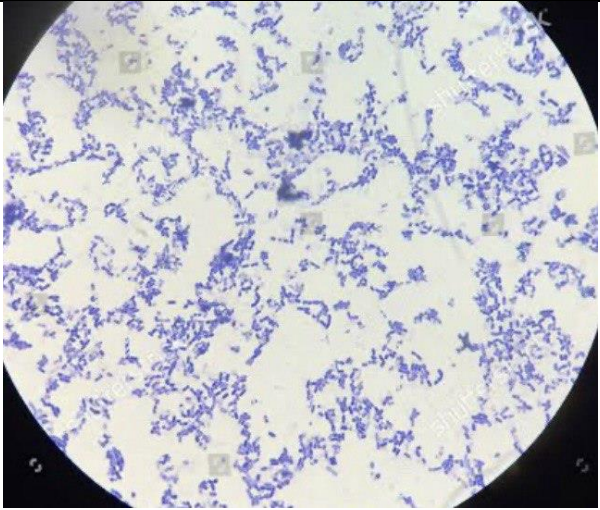


Discussion

Une identification macroscopique a été effectuée pour les souches de *Vibrio cholerae*, qui se distinguent par des colonies lisses, rondes et légèrement convexes, généralement opaques et présentant une couleur jaunâtre ou grise. Par contre, les colonies de *Pseudomonas* se caractérisent par une apparence humide et éclatante, avec des teintes qui oscillent entre le vert et le bleu-vert. Les colonies de *Streptococcus* ont généralement une taille petite à moyenne et peuvent être parfois translucides, alors que celles de *Staphylococcus* sont petites, rondes et convexes, souvent d'une teinte blanche ou crème. Ces traits macroscopiques fournissent des indices précieux pour le repérage et la distinction des diverses souches bactériennes en laboratoire.

II.3.études microscopiques

	<p>Figure 17 : aspect des <i>pseudomonas a</i> grossissement x1000</p>
	<p>Figure 18: aspect des <i>coliformes</i> <i>totaux a</i> grossissement x1000</p>

	<p>Figure 19: aspect des <i>vibrions</i> <i>cholériques</i> a grossissement x1000</p>
	<p>Figure 20: aspect des <i>staphylocoques</i> a grossissement x1000</p>

Discussion

L'analyse microscopique des diverses souches bactériennes après la coloration de Gram a révélé des variations morphologiques et structurales notables. *Vibrio cholerae* se distingue par sa morphologie spécifique de bacilles courbés et fait partie des bactéries Gram négatif, caractérisé par une paroi cellulaire mince entourée d'une membrane externe. En ce qui concerne *Pseudomonas*, il se manifeste sous la forme de bacilles droits, également considérés comme Gram négatif.

Toutefois, les *Streptococcus* se présentent sous forme de chaînes de cocci bien ordonnées et sont teintés de violet, ce qui signale leur classification en Gram positif, dû à une paroi cellulaire dense en

peptidoglycane. De manière similaire, on observe les *Staphylococcus* sous la forme d'amas irréguliers de cocci, également Gram positif

II.4 Résultats Test de biodégradabilité



Figure 21 : 20 ml de la solution du colorant rédox DCPIP

Pour la pération des tubes on a préparé 7 tubes :

- 2 tubes *staphylocoques*
- 1 tube avec une souche de référence *e-coli*
- 1 tube avec une souche de référence *klebsseilla*
- 1 tube *pseudomonas*
- 1 tube *vibrions cholériques*
- 1 tube *coliformes totaux*

Les résultats des biodégradation de DCPIP obtenue les suivants :



Figures 22 : résultats du test de biodégradation de DCPIP

Discussion

Les essais de biodégradabilité réalisés sur le pétrole extrait du littoral de Mostaganem ont mis en évidence des résultats majoritairement favorables. Effectivement, la plupart des souches bactériennes cultivées ont démontré leur aptitude à décomposer les hydrocarbures présents, comme en témoigne le changement progressif de couleur du milieu de culture, qui évolue du bleu vers l'incolore, et est observé sur une période de 72 heures. Cette progression témoigne d'une baisse effective du niveau redox (DCPIP) due à l'action métabolique des bactéries.

Pour être plus précis, des souches comme *Pseudomonas*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus* et *Staphylococcus* ont toutes démontré une activité biodégradative observable dans ce laps de temps.

Ces résultats mettent en évidence la capacité globale des bactéries isolées à Mostaganem à participer au processus de biodégradation des hydrocarbures, bien que cette capacité varie légèrement d'une souche à une autre en fonction de leur métabolisme spécifique.

II.5. Identification biochimiques

	Production de pyoverdine	Type respiratoire	Production de pyocyanine	Test de VP	Test de RM	Utilisation de citrate	Oxydase	Degradation de glucose	Production de H ₂ S	Fermentation de manitol	Mobilité	Croissance à 42°	Nitrate réductase	Amidon
<i>Pseudomonas</i>	+	AS	+	▪	▪	+	▪	▪	▪	▪	+	+	+	+
<i>Staphylocoque</i>		AS		+	▪	▪	▪	+	▪	+	▪	+	+	▪

Tableau 4 : test de confirmations biochimiques sur les souches bactériennes

Discussion

Les résultats trouvés au tableau confirment les caractères assimilables à ceux de ces 2 bactéries (*pseudomonas* et *staphylocoques*).

Conclusion

Le présent travail avait pour objectif d'évaluer l'état de pollution hydrocarburée au niveau du port de Salamandre à Mostaganem, ainsi que de confirmer l'existence du phénomène de biodégradation naturelle des hydrocarbures par certaines souches microbiennes isolées à partir de ce site. Cette étude s'inscrit dans une démarche de compréhension des mécanismes biologiques permettant d'envisager l'utilisation potentielle de ces microorganismes pour lutter efficacement contre la contamination marine par les hydrocarbures.

Le choix du port de Salamandre comme site d'étude n'est pas anodin. Il s'agit d'une zone côtière fortement exposée aux activités portuaires, industrielles et urbaines, ce qui en fait un environnement particulièrement vulnérable aux pollutions chroniques, notamment celles causées par les hydrocarbures. Quant aux hydrocarbures utilisés lors de nos essais en laboratoire, ils proviennent du pétrole brut de Hassi Messaoud, connu pour sa large distribution sur le territoire national, et régulièrement impliqué dans les pollutions constatées sur les côtes algériennes.

Dans la première partie de cette étude, une analyse détaillée des paramètres physico-chimiques et microbiologiques des eaux marines du port a été réalisée. Cette investigation a révélé la présence de différentes espèces microbiennes indicatrices de pollution fécale, telles que les coliformes totaux, coliformes fécaux, streptocoques fécaux, ainsi que des bactéries opportunistes comme *Pseudomonas* sp. Ces résultats témoignent d'une charge microbienne significative reflétant l'impact des rejets anthropiques dans ce milieu marin. Ces résultats confirment les travaux de Djelloul-hammadi.k 2016 et de Boubakeur en 2019.

L'observation d'une augmentation notable de la densité microbienne dans les milieux enrichis avec du pétrole confirme l'existence d'un effet biostimulant des hydrocarbures sur le développement bactérien. Ce phénomène met clairement en évidence le rôle adaptatif et métabolique de ces microorganismes capables d'utiliser les hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie.

L'ensemble de ces transformations subies par les hydrocarbures dans l'environnement est désigné par le terme altération, un processus complexe dans lequel la dégradation microbienne joue un rôle prépondérant. Cette biodégradation repose sur des interactions étroites entre plusieurs facteurs : la composition chimique des hydrocarbures, la diversité des communautés bactériennes locales et les conditions environnementales (température, salinité, teneur en oxygène, etc.). Ainsi, le devenir des hydrocarbures dans les écosystèmes marins dépend à la fois de paramètres abiotiques et biotiques.

L'intérêt scientifique et environnemental de ce travail réside également dans le fait qu'il apporte une contribution supplémentaire aux études menées sur la pollution pétrolière en Algérie. Alors que la majorité des travaux antérieurs s'étaient concentrés sur d'autres zones portuaires comme Arzew ou

Oran, cette recherche met en lumière la situation spécifique du port de Salamandre à Mostaganem, zone stratégique aussi bien sur le plan économique qu'écologique.

De plus, l'histoire environnementale mondiale regorge d'exemples d'accidents pétroliers où l'action des microorganismes a joué un rôle fondamental dans la résorption progressive des hydrocarbures. Néanmoins, bien que le processus naturel de biodégradation soit réel, il demeure lent et tributaire de conditions favorables.

D'où la nécessité d'associer les processus naturels à des interventions humaines réfléchies, encadrées et méthodiques. Il est impératif que ces actions soient réalisées avec prudence afin de ne pas accentuer les déséquilibres écologiques déjà existants. L'expérience a montré que des interventions mal maîtrisées pouvaient causer plus de dégâts que de bénéfices.

Au terme de ce travail, il apparaît clairement que le port de Salamandre présente une pollution hydrocarbonée chronique. Toutefois, les souches bactériennes isolées au cours de cette étude démontrent un potentiel certain pour la biodégradation de ces hydrocarbures. Ce constat ouvre la voie à des perspectives intéressantes pour le développement de programmes de bioremédiation in situ, adaptés aux particularités locales du littoral algérien.

Il serait pertinent, dans la continuité de ce travail, de mener des études complémentaires afin d'identifier précisément les souches les plus performantes, d'optimiser les conditions de leur utilisation et de proposer des protocoles applicables à plus grande échelle dans les programmes de dépollution marine.

Référence bibliographiques

- Arahal, D. R., & Ventosa, A. (2006). The family *Halomonadaceae*. In M. Dworkin, K. H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria* (3rd ed.). Springer-Verlag.
- Akcha, F., Izuel, C., Venier, P., Budzinski, H., Burgeot, T., & Narbonne, J. F. (2000). Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Aquatic Toxicology*, *49*, 269–287. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00082-8](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00082-8)
- Aminot, A., & Kérouel, R. (2004). *Hydrologie des écosystèmes marins : paramètres et analyses*. Éditions Ifremer.
- Atlas, R. M., & Atlas, M. C. (1991). Biodegradation of oil and bioremediation of oil spills. *Current Opinion in Biotechnology*, *2*(3), 440–443. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(91\)90088-G](https://doi.org/10.1016/0958-1669(91)90088-G)
- Baudet, E. (2015). *Micro-capteurs optiques fonctionnant dans l'infrarouge pour la détection de polluants émergents en eaux souterraines et marines* [Thèse de doctorat, Université de Rennes]. HAL.
- Beratto, L., & Charbonnier, C. (2018, juin 21). Méditerranée. *Parcours Méditerranéen*, 15–38.
- Bernard, T. (2024). *Pétrole – Le pétrole brut*. Encyclopædia Universalis.
- Bernard, T., & Wauquier, J.-P. (1994). *Le raffinage du pétrole – Produits pétroliers : Schémas de fabrication*. Éditions Technip.
- Bogan, B. W., Lahner, L. M., Sullivan, W. R., & Paterek, J. R. (2003). Degradation of straight-chain aliphatic and high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a strain of *Mycobacterium austroafricanum*. *Journal of Applied Microbiology*, *94*(2), 230–239. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01828.x>
- Bouchez, M., Blanchet, D., Heasler, F., & Vendecasteel, J.-P. (1996). Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement : propriétés, origines, devenir. *Revue de l'Institut Français du Pétrole*, *51*(3), 407–419.
- Boubakeur, W., Hammadi, K., & Djennad, M. (2019). The investigation of the pollution sea water in Arzew west coast line in Algeria. *Chemistry Research Journal*, *4*(2), 9–15. <http://www.chemrj.org>
- Buckley, M. (n.d.). Caractérisation de la distribution des micro-organismes dans un estuaire par rapport aux concentrations ambiantes d'hydrocarbures. *Étude environnementale non publiée*.
- Chalghmi, H. (2015). *Étude de la pollution marine par les hydrocarbures et caractérisation de leurs effets biochimiques et moléculaires sur la palourde de *Ruditapes* sp.* [Thèse de doctorat, Université de Bordeaux & Université de Monastir].
- Chu, W. S., Magee, B. B., & Magee, P. T. (1993). Construction of an SfiI macro restriction map of the *Candida albicans* genome. *Journal of Bacteriology*, *175*, 6637–6651.
- Djelloul, H. K. (2016). Biodegradation of crude oil of Hassi Messaoud and the Arabian oil by microorganisms isolated from fishing port of Mostaganem, Algeria. *International Journal of Biological Sciences and Applications*, *4*(2).

Élie, F. (2022). *Les hydrocarbures*. ResearchGate. <https://www.researchgate.net>

Figarella, J., Leyral, G., & Terret, M. (2007). *Microbiologie générale et appliquée* (Éd. n° 3328-r2). Paris Cedex 05.

Gräser, Y., Volovsek, M., Arrington, J., Schönian, G., Presber, W., Mitchell, T. G., & Vilgalys, R. (1996). Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), 12473–12477.

Hase, A., & Hite, R. A. (1976). On the origin of polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments: Biosynthesis by anaerobic bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 40(10), 1141–1143.

Haroun, B. (2013). *Évaluation des niveaux de pollution marine par les hydrocarbures et les métaux lourds dans l'eau de mer et du sédiment superficiels marins dans la baie d'Alger* [Mémoire de master, École Nationale Polytechnique].

Le Mercier, M.-L. (1998). *Étude des bactéries d'origine entérique dans les sédiments marins*. IFREMER, Centre de Brest.

McGenity, T. J., Folwell, B. D., McKew, B. A., & Sanni, G. O. (2012). Marine crude-oil biodegradation: A central role for interspecies interactions. *Aquatic Biosystems*, 8(10). <https://doi.org/10.1186/2046-9063-8-10>

Michel, P. (1972). Mesure de la demande chimique en oxygène dans l'eau de mer. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 39(3), 361–365.

Mouffok, F. (2001). Guide technique d'analyses bactériologiques des eaux de la mer. *Océanis*, 11, 399–408.

OMS., 1977. Recommandation pour la surveillance sanitaire des zones côtières à usage récréatif et des zones conchylicoles. Bureau régional de l'OMS pour l'Europe, Copenhague : 168p.

Pelmont, J. (2005). *Biodégradations et métabolismes : Les bactéries pour les technologies de l'environnement*. Collection Grenoble Sciences.

Rkoosh, M. R., Clemons, E. R., Huffman, P. A., Sanborn, H. R., Casillas, E., & Stein, J. E. (1996). Leukoproliferative response of splenic leukocytes from English sole (*Pleuronectes vetulus*) exposed to chemical contaminants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, 1154–1162.

Semal, J., Fraselle, J., Impens, R., Kummert, J., Lepoivre, P., Meulimans, M., ... & Viseur, J. (1993). *Traité de pathologie végétale*. Presses Agronomiques de Gembloux.

Van Hamme, J. D., Singh, A., & Ward, O. P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 503–549.

Villers, J., Squilbin, M., Yourassowsky, C., Dutrieux, S., Onclincx, F., Thirion, A., & Viseur, J. (2005). *Qualité physico-chimique et chimique des eaux de surface*. Institut Bruxellois pour la Gestion de l'Environnement.

Walker, J. D., Seesman, P. A., & Colwell, R. R. (1975). Effect of South Louisiana crude oil and NO-2 fuel oil on growth of heterotrophic microorganisms including proteolytic, lipolytic, chitinolytic and cellulolytic bacteria. *Environmental Pollution*, 9, 13–33.

ZoBell, C. E. (1969). Microbial modification of crude oil in the sea. In *Proceedings of Joint Conference on Prevention and Control of Oil Spills* (pp. 317–326). American Petroleum Institute.

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة عبد الحميد بن باديس - مستغانم -
كلية علوم الطبيعة والحياة

تصريح شرفي خاص بالالتزام بقواعد النزاهة العلمية
لإنجاز البحث

أنا الممضي أدناه،

الطالب(ة): بوسعيدة عبد العالي رقم التسجيل الجامعي: 20237028444

الحامل لبطاقة التعريف الوطنية رقم: 413250429 والصادرة بتاريخ: 10/31/2024

عن بلدية مستغانم . مستغانم

المسجل ب كلية علوم الطبيعة والحياة / قسم بيولوجيا

شعبة علوم بيولوجية / التخصص بيولوجيا التطبيقية

والمكلف بإنجاز مذكرة ماستر بعنوان:

Essai de Biodegradation du Pétrole par quelques micro-organismes
isolés du Port de Mostaganem

أصرح بشرفي أنني ألتزم بمراعاة المعايير العلمية والمنهجية ومعايير الأخلاقيات العلمية والنزاهة الأكاديمية
المطلوبة في إنجاز البحث ، وأتحمل المسؤولية الشخصية عن كل المحتوى المتضمن في البحث المذكور أعلاه .

التاريخ 2025.06.30

إمضاء المعني



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة عبد الحميد بن باديس - مستغانم -
كلية علوم الطبيعة والحياة

تصريح شرفي خاص بالالتزام بقواعد النزاهة العلمية
لإنجاز البحث

أنا الممضي أدناه،

الطالب(ة): بنو حاريب مسنيد رقم التسجيل الجامعي: 202032013575

الحامل لبطاقة التعريف الوطنية رقم: 202027451081 والصادرة بتاريخ: 20240801

عن بلدية قعر الشلالة - تيارت

المسجل ب كلية علوم الطبيعة والحياة / قسم بيولوجيا

شعبة علوم بيولوجية / التخصص بيولوجيا التطبيقية

والمكلف بإنجاز مذكرة ماستر بعنوان:

Etude de la biodegradation du pétrole par quelques Micro-organismes
isolés du port de Mostaganem

أصرح بشرفي أنني ألتزم بمراعاة المعايير العلمية والمنهجية ومعايير الأخلاقيات العلمية والنزاهة الأكاديمية
المطلوبة في إنجاز البحث ، وأتحمل المسؤولية الشخصية عن كل المحتوى المتضمن في البحث المذكور أعلاه .

التاريخ: 20250730

إمضاء المعني

