

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abdelhamid Ibn Badis



Faculté des sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Science Biologique

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Mémoire de fin d'études

Présenté par

BERRAHOUAL Nabila

BELKHAROUBI Bouchra

THEME

**Contribution à la biodégradation, étude des
sols pollués par le pétrole brut et optimisation
des microorganismes biodepollueurs**

Devant le jury composé de :

NEMMICHE Said	Président	Professeur	Université de Mostaganem
SIDHOUM Warda	Examineur	MCB	Université de Mostaganem
BEKENNICHE Nahla	Encadreur	MAA	Université de Mostaganem

Année universitaire : 2019 – 2020

Remerciement

Tout d'abord, nous remercions Dieu « Tout puissant» de nous avoir permis d'accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer notre gratitude aux membres de jury pour avoir accepté d'examiner ce travail. Nous témoignons nos vifs remerciements au Pr NEMMICHE S. qui a bien voulu présider le jury de ce Mémoire de fin d'étude et Mme SIDHOUM W. qui nous a honoré d'accepter de juger ce travail

On ne saura comment remercier notre encadreur BEKENNICHE Nahla qui a accepté de nous diriger. Nous la remercions pour sa confiance, sa pédagogie, sa présence et son enthousiasme. Encore merci.

Dédicace

A

Mes Grand-Parents

A qui je dois tout et qui m'ont donné l'amour, l'aide, le courage et la foi pour accomplir ce travail. Qu'ils trouvent ici toute ma considération.

A

Mes Parents

Pour leur amour, leur soutien moral et matériel tout au long de mon parcours scolaire et universitaire. Merci d'avoir cru en moi Maman et Papa.

Je tenais à dédier ce modeste travail aux membres de ma famille qui ont contribués de loin ou de près à sa réussite

Enfin je tenais à dédier ce travail à ma camarade et amie SADOUKI RADIA qui nous a quitté le 09/08/2019 à l'âge de 20ans, qu'elle repose en paix. Je ne t'oublierai jamais...

Berrahoual Nabila

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A mes très chers parents maman et papa qui sont ma sources de tendresse, de force et de courage. Je vous remercie d'être toujours à mes coté de me soutenir, de m'aimer, de me protéger et pour tous ce que vous avez fait pour moi.

A mes chères sœurs et mes frères.

A Mon Mari Mohamed Hakim pour son aide, son soutien moral et physique

A tous les membres de la famille : BELKHAROUBI Et KARA

Enfin je tenais à dédier ce travail à ma camarade et amie SADOUKI RADIA qui nous a quitté le 09/08/2019 à l'âge de 20ans, qu'elle repose en paix. Tu seras toujours vivante dans mes pensées...

Belkharoubi Bouchra

ملخص :

الهيدروكربونات هي ملوث رئيسي للتربة. ظهر التحلل البيولوجي للمنتجات البترولية من خلال الكائنات الحية الدقيقة في التربة كطريقة ذات أهمية اقتصادية وبيئية. الهدف من دراستنا هو عزل البكتيريا المحلية من المواقع الملوثة بالنفط الخام ودرستها بالطرق البيوكيميائية والميكروبيولوجية من أجل التعرف على مدى ارتباطها واختبارها على أنها عوامل مزيلة للتلوث الحيوي

الكلمات الدالة :

التلوث النفطي ، التحلل الحيوي ، الزيت الخام ، البكتيريا.

Résumé :

Les hydrocarbures constituent un polluant majeur des sols. La biodégradation des produits pétroliers par le biais des microorganismes de sol est apparue comme une méthode d'intérêt de point de vue économique et écologique. Le but de notre étude est d'isoler des bactéries indigènes de sites pollués par le pétrole brut et de les étudier par méthodes biochimiques et microbiologique afin de pouvoir déterminer leur appartenance et de les tester comme agents biodépolluants.

Mots clés :

Pollution pétrolière, biodégradation, pétrole brut, bactérie.

Table Des Matières

Introduction	1
Partie 01 : Etude bibliographique	
Chapitre 01 : Pollution de l'environnement	
I. Généralité	5
Définition	6
Origine et formation du pétrole	
Caractéristique d'un système pétrolier	7
Composition et caractéristique d'un pétrole	7
II. Les hydrocarbures	7
Définition	8
Classification des hydrocarbures	8
Les hydrocarbures aliphatiques	8
Les hydrocarbures aromatiques	9
Les hydrocarbures aromatiques monocycliques	9
Les hydrocarbures aromatiques polycycliques	9
Impact et toxicité des hydrocarbures pour l'environnement	10
Classification des hydrocarbures	11
Evaporation	12
Dissolution	13
Photo-oxydation	13
Emulsification	13
Biodégradation	14
Devenir des hydrocarbures dans le sol	15

Volatilisation	16
Adsorption	16
Chapitre 02 : La biodégradation	
La biodégradation	18
Processus de biodégradation des hydrocarbures	18
La dégradation aérobie	20
La dégradation anaérobie	20
Facteurs influençant la biodégradation des hydrocarbures	21
Partie 02 : Etude d'articles	
Article 01 : Ex-situ biodegradation of petroleum hydrocarbons using <i>Alcanivorax borkumensis</i> enzymes	
Article 02 : Biodegradation and dissolution of polyaromatic hydrocarbons by <i>Stenotrophomonas</i> sp	
Article 03 : The biodegradation of crude oil in the deep ocean	
Article 04 : Décontamination des sols pollués par les hydrocarbures	
Article 05 : 25 years monitoring of PAHs and petroleum hydrocarbons biodegradation in soil	
Article 06 : Morphological, biochemical and molecular identification of petroleum hydrocarbons biodegradation bacteria isolated from oil polluted soil in Dhahran, Saud Arabia	
Article 07 : Insights into the biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soils by bioaugmentation and nutrient stimulation	
Conclusion	
Référence bibliographique	

Liste des figures :

Figure 01 : Structure de quelques hydrocarbures aromatique polycyclique abondants dans l'environnement	10
Figure 02 : Devenir des hydrocarbures pétroliers dans la colonne d'eau et dans les Sédiments	12
Figure 03 : Les émulsions formées par le pétrole dans l'eau de mer	13
Figure 04 : Devenir d'un polluant organique au niveau du sol	16
Figure 05 : Mécanisme général de dégradation aérobie des hydrocarbures par les microorganismes	20

Liste des abréviations :

BTEX : Benzène, Toluène, Ethylène et Xylène

ATP : Adénosine-Triphosphate

UV: Ultra-Violet

sp. : Du latin species pluralis, espèce non précise

GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à spectromètre de masse

UHPLC : Chromatographie en phase liquide à ultra haute performance

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

HPLC : Chromatographie en phase liquide à ultra haute performance

GC-FID : Chromatographie en phase gazeuse couplée au détecteur à ionisation de flamme

PCR :

La pollution est une modification défavorable du milieu naturel qui apparaît en totalité ou en partie. Les polluants environnementaux de tous genres contaminent l'eau, l'air et le sol, mettant en péril la vie humaine et les écosystèmes. De plus, ils sont souvent sources de conflit entre populations et industries. Les polluants sont toujours omniprésents. Ils constituent une classe des produits biologique physique et chimiques, ces derniers restent les plus courants, issus des industries pétrochimiques, pharmaceutiques ou fabrication de polymères, ils sont les plus dangereux. Toutefois, l'industrie pétrochimique reste le secteur qui a le plus enregistré de crises environnementales depuis la découverte du pétrole.

Le développement des activités humaines est devenu aujourd'hui une menace pour l'environnement marin qui subit depuis plusieurs décennies des agressions majeures.

Selon *Le livre bleu des engagements du Grenelle de la Mer 1*, 80% de la pollution proviennent des activités terrestres et 20 % des activités maritimes. Les activités maritimes sont génératrices de divers types de pollutions : Atmosphériques (cheminées des navires), Marines (substances liquides nocives, chute à la mer de la cargaison contenant des substances toxiques ou rejets de déchets domestiques). Toutefois, la plus symbolique, la plus ancienne et la plus médiatisée des pollutions marines restent sans conteste, pour l'opinion publique, la pollution par hydrocarbures.

La catastrophe du Torrey Canyon le 18 mars 1967 au large des côtes britanniques a révélé la carence du régime international dans le secteur de la prévention ou la réparation des dommages dus à la pollution maritime. Pour cette raison, plusieurs conventions internationales ont été adoptées pour la responsabilité et la réparation des dommages dus à la pollution par les hydrocarbures.

Le pétrole aussi connu sous le nom de l'or noir a fait bien parler de lui. Composé majoritairement d'hydrocarbures, il est exploité dans différents domaines et représente la principale source d'énergie et de transport. Néanmoins il est sujet à un commerce très important qui induit à des pollutions accidentelles plus ou moins massives (les marées noires) et des pollutions opérationnelles plus ou moins fréquentes. Ainsi son déversement peut toucher l'eau et la terre, dans cette étude nous nous consacreront à la pollution du sol.

Le sol est l'une des composantes majeures de l'écosystème, sa contamination induit à un déséquilibre de l'écologie terrestre. Plusieurs études se sont penchées sur cette pollution en

raison des risques qu'elle engendre mais aussi du système naturel et biologique de décontamination effectuait par des microorganismes. Cette décontamination naturel et biologique est appelé biodégradation, elle consiste à dégrader le polluant hydrocarboné par divers processus et voies métaboliques faisant appel à des microorganismes.

L'objectif de ce mémoire est d'étudier le potentiel de dégradation des hydrocarbures de bactéries telluriques isolées de différents sols pollués par le pétrole brut.

Suite au confinement imposé : COVID 19, la partie pratique de ce travail a été remplacé par une étude approfondie d'articles sur le même axe.

PARTIE 01 :

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 01

I. Généralité

L'environnement marin et terrestre apparaissent comme deux grands problèmes étroitement liés à l'évolution de l'humanité depuis les temps modernes, en effet il représente la vie, et la survie des organismes vivants plantes, animaux et homme (Abi ayad, 2016). Le développement des activités humaines est devenu aujourd'hui une menace pour l'environnement qui subit depuis plusieurs décennies des agressions majeures. 80% de la pollution proviennent des activités terrestres et 20 % des activités maritimes (Albakjaji, 2010).

La pollution marine s'est accentuée au fil des temps et reste aujourd'hui un défi énorme à long terme, ceci dit, ces dernières années, la dispersion des contaminants métalliques ne cesse d'évoluer. Ce phénomène s'est aggravé par le biais de l'augmentation des polluants d'origine urbains et industriels (Abi ayad, 2016). Avec l'augmentation de la densité du trafic maritime. Les mers et les océans reçoivent aujourd'hui des volumes importants en polluants comme les métaux lourds et les pesticides à partir de multiples sources tels que les rejets industriels et les rejets d'eau usée la concentration des polluants dans les estuaires, les mers et les océans, en particulier celle des produits pétroliers, est à l'origine de nombreuses études dans différentes zones du globe (Abi ayad, 2016). La Méditerranée en a fait l'expérience En effet, par sa position géographique, la Méditerranée accueille les pétroliers en provenance du Golf par le canal de Suez, ceux en provenance de la mer Noire par le Détroit des Dardanelles, le détroit de Gibraltar constitue la porte de sortie de ces bateaux. Mohamed ; l'exemple de l'Erika ; Le naufrage du Prestige survenu le 13 novembre 2002, trois ans seulement après celui de l'Erika, souligne de nouveau la vulnérabilité de l'Europe devant les marées noires puisque, pour la première fois, trois Etats membres sont affectés par la pollution : l'Espagne, le Portugal et la France. Mais surtout, cette catastrophe peut inciter l'opinion publique, de plus en plus sensible aux problèmes écologiques, à mettre en cause la crédibilité des mesures proposées en 2000 par la Commission postérieurement au naufrage de l'Erika (Albakjaji, 2010).

Ainsi que les océans les sols sont aussi touchés par les polluants organiques tels que les hydrocarbures pétroliers (HP), cette pollution entraîne des modifications de la structure physique et/ou de la composition chimique et microbiologique ce qui a un effet négatif sur l'évolution normale de la biomasse. Si le sol contaminé a une concentration supérieure à 1%, la pollution se manifeste par l'inhibition de l'augmentation des plantes. Pour des concentrations

inférieures à 1% Au Québec, de nombreux terrains ou sites contaminés aux produits pétroliers doivent leur origine au lourd passif environnemental dû aux activités industrielles, depuis la révolution industrielle. Cette période est d'ailleurs marquée par la forte médiatisation de l'incidence survenue au site industriel de La Salle Coke qui aurait été à l'origine en 1988 de la publication de la première Politique de réhabilitation des terrains contaminés aujourd'hui devenue la Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés. Cette politique met en avant la protection des sols et de l'eau souterraine par la prévention et la réhabilitation des terrains contaminés, applicable à travers une grille de critères génériques d'usage (Fokou Mbogne, 2017).

De nos jours, l'exploitation du pétrole et les dommages qu'elle engendre ont atteint leur paroxysme (Sauret, 2011). Mais les risques de contamination qu'ils soient accidentels ou chroniques pour l'environnement, peuvent influencer l'équilibre écologique et parfois même, entraîner la destruction d'écosystèmes entiers (Rouidi, 2014).

Définition :

Le pétrole est une roche liquide carbonée, ou huile minérale, constituée d'une multitude de molécules composées majoritairement d'atomes de carbone et d'hydrogène appelés hydrocarbures. Énergie fossile, son exploitation est l'un des piliers de l'économie industrielle contemporaine, car il fournit la quasi totalité des carburants liquides. Le pétrole est aussi souvent appelé « or noir » en référence à sa couleur noire et à son prix élevé (Bado-Nille, 2008)

Origine et formation du pétrole :

Le pétrole brut est un fluide massivement utilisé comme combustible pour la production d'énergie. On le rencontre dans les bassins sédimentaires où il occupe les vides de roches poreuses appelés réservoirs présentant des caractéristiques favorables : la fuite du pétrole vers le haut est rendue impossible par la présence d'une couverture imperméable (argile, sel) et latéralement par une géométrie favorable (Dôme anticlinal, biseau de sables dans les argiles...). Le pétrole a pour origine la substance des êtres, animaux ou végétaux, vivants à la surface du globe et particulièrement en milieu aquatique. La matière organique se dépose au fond des mers et des lacs et est incorporée aux sédiments. À mesure que ceux-ci sont enfouis, les constituants organiques se transforment, principalement sous l'action de la température, en hydrocarbures dont une partie vient progressivement se concentrer dans les pièges des réservoirs poreux. Si l'analyse centésimale des pétroles est relativement fixe, la structure chimique de leurs

constituants varie plus largement ce qui entraîne une grande diversité des propriétés physiques {viscosité, densité} ainsi que des teneurs très variables dans les différentes coupes obtenues par raffinage. Ce processus de formation du pétrole nécessite plusieurs dizaines de millions d'années (Swistek, 1992).

Caractéristiques d'un système pétrolier

Un système pétrolier est défini comme un bassin sédimentaire ou une portion d'un bassin sédimentaire où l'on trouve à la fois les éléments (roche mère, roche réservoir, roche couverture et pièges) et les processus (expulsion et migration secondaire) nécessaire à la génération, la migration, l'accumulation et la préservation du pétrole (Al Saab, 2007).

Pour que le système pétrolier fonctionne, les roches doivent avoir des propriétés physiques particulières:

Pour la roche mère, il faut une roche riche en matière organique (une maturation thermique adéquate);

Pour les roches réservoir et couverture, ce sont les propriétés physiques de la porosité et de la perméabilité qui sont importantes (Dake.LP, 1978).

Compositions et caractéristiques du pétrole :

Il est possible de distinguer les différents types de pétrole selon leur densité, leur fluidité, leur teneur en soufre et autres impuretés (vanadium, mercure, sels...) et leur teneur en différentes classes de molécules chimiques (Bado-Nille, 2008) tel que les hydrocarbures (aromatiques, *n*-alcane, cycloalcane) qui représentent 93 à 99 % (m/m), mais également de composés organiques soufrés (0,01 à 6 % (m/m)), azotés (0,05 à 0,5 % (m/m)), oxygénés (0,1 à 0,5 % (m/m)) (Laxalde, 2012). Il est aussi possible de les classer selon leur provenance, car les pétroles issus de gisements voisins ont souvent des propriétés proches. Cependant chaque poche de pétrole a des caractéristiques particulières dues à l'histoire géologique de sa formation (Bado-Nille, 2008).

II. Les hydrocarbures

II.1. Définition

Les hydrocarbures sont des substances constituées exclusivement de carbone et d'hydrogène. On inclura toutefois dans ce groupe, des substances dérivées dont la structure chimique, la nomenclature et le comportement, peuvent être assimilés à ceux d'un hydrocarbure. La composition de ces produits pétroliers dépendra à la fois, de leur origine et du type de traitement qu'ils auront subi. Les hydrocarbures présentent une grande importance commerciale : nous les utilisons comme carburants, comme combustibles, comme huiles lubrifiantes, et comme produits de base en synthèse pétrochimique (Rouidi, 2014).

Classification des hydrocarbures :

La famille des hydrocarbures comprend un nombre important de composés chimiques. Cela est dû aux propriétés de l'atome de carbone qui possède de nombreuses possibilités de se lier à l'atome d'hydrogène. Il forme des chaînes moléculaires linéaires ou fermées appelées cycliques. De plus, l'atome de carbone peut à la fois être lié à un ou des atomes d'hydrogène mais aussi à un autre atome de carbone donnant alors des composés saturés (qui ne contiennent que des liaisons simples) ou insaturés (qui contiennent au moins une double liaison). Les combinaisons chimiques sont donc nombreuses et, à cela, s'ajoute encore d'autres possibilités issues de la capacité d'autres atomes à se substituer à certains atomes d'hydrogène (chlore, brome, azote, soufre, iode et fluor) (Braud et André, 2017). Les hydrocarbures les plus souvent rencontrés peuvent être regroupés selon les familles suivantes :

- ❖ Les hydrocarbures aliphatiques
- ❖ Les hydrocarbures aromatiques

Les hydrocarbures aliphatiques :

La famille des alcanes (paraffine) correspond à des hydrocarbures dont tous les liens sont saturés en hydrogènes (simples). Au contraire, les familles des alcènes (oléfines) et des alcynes contiennent au moins un lien double ou triple respectivement (insaturés). Les liens doubles et triples de ces composés sont moins forts que les liens simples et bloquent toute rotation possible, ce qui occasionne la stéréoisomérisation. Les alcanes, alcènes et alcynes peuvent être linéaire, ramifiés ou cycliques. Les hydrocarbures ramifiés possèdent des branches qui brisent leur linéarité, tandis que les hydrocarbures cycliques possèdent au moins un anneau formé de trois atomes de carbones ou plus. Parmi les hydrocarbures cycliques, on distingue les alcènes cycliques dits aromatiques, possédant un anneau composé d'au moins six atomes de carbones reliés en alternance par des liens simples et doubles. Cette structure de cycle

aromatique est aussi communément appelé noyau benzénique, et il s'agit d'un système de résonance. La résonance permet la délocalisation des électrons π , et augmente la stabilité du système. Finalement, les hydrocarbures non-aromatiques sont classés aliphatiques (Thanh Khoa Nguyen, 2018).

Les hydrocarbures aromatiques :

Les hydrocarbures aromatiques, ou arènes, sont des composés chimiques de formule générale C_nH_{2n-6} contenant un système cyclique, qui possède une alternance de liaisons simples et doubles, composé d'un noyau benzénique très stable formant un hexagone régulier (Braud et André, 2017).

1. Les hydrocarbures aromatiques monocycliques :

Les hydrocarbures aromatiques, qui possèdent un cycle, sont dénommés mono - cycliques et regroupent ce que l'on appelle les BTEX (Braud et André, 2017). Ce terme BTEX correspond aux quatre composées suivants : Benzène, Toluène, Ethylbenzène et Xylène) (Colombano et *al*, 2014).

2. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques :

Ce sont des molécules principalement formées par la condensation de cycles benzéniques. Cette condensation peut être linéaire (anthracène) ou bien angulaire (phénanthrène) (Figure 01). Certains auteurs ont même subdivisé ce groupe d'HAP en deux catégories en fonction de la disposition relative des cycles condensés. Ils ont ainsi défini les systèmes kataannelés et péri-condensés qui correspondent respectivement aux molécules dont le carbone tertiaire est engagé dans une liaison entre deux cycles (anthracène) et dans une liaison entre trois cycles (pyrène). Cependant, bien que la plupart des molécules soient formées par des réactions de condensation, certains HAP ont leurs cycles liés par les sommets ou même grâce à des chaînes aliphatiques. La majorité des HAP est constituée de 2 à 6 cycles et les poids moléculaires varient approximativement entre 130 et 280 g.mol⁻¹. Les HAP peuvent être subdivisés en 2 sous-groupes : les HAP de faible masse moléculaire et les HAP de masse moléculaire élevée. Il est communément admis que les HAP légers ont un nombre de cycles compris entre 2 et 3, alors que les HAP lourds sont composés de 4 à 6 cycles.

Cependant, certains auteurs n'utilisent pas cette classification par exemple ils les considèrent comme étant 3 classes : les HAP de faible (2 à 3 cycles), moyen (4 cycles) et haut poids moléculaire (5 à 7 cycles) (Gasperi, 2006).

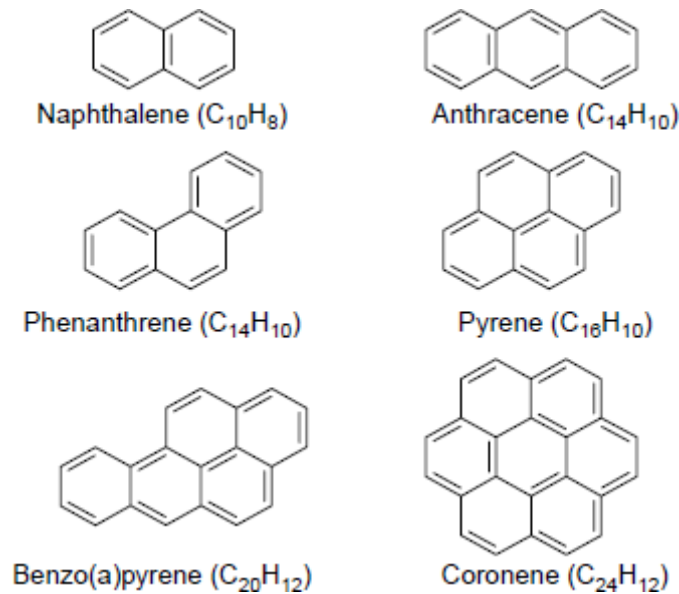


Figure 01 : Structure de quelques hydrocarbures aromatiques polycycliques abondants (HAP) dans l'environnement (Benchouk, 2017)

Impact et toxicité des hydrocarbures pour l'environnement :

La toxicité des hydrocarbures pétroliers est fonction de leur persistance, de leur biodisponibilité et de leur cinétique de pénétration dans l'organisme. Elle dépend aussi des capacités des organismes à les bioaccumuler et à les métaboliser. La toxicité des pétroles et des produits pétroliers varie considérablement selon la présence et les proportions des différents composés. A l'échelle d'un produit, la toxicité est difficile à mesurer, même si celle des différents constituants est connue, en raison du manque d'information sur d'éventuels phénomènes d'antagonisme et de synergie entre substances. En terme de toxicité intrinsèque, il est généralement admis que les composés aromatiques sont les plus toxiques. La toxicité augmentant avec le poids moléculaire, ce sont les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP : composés de haut poids moléculaires) les plus dangereux en raison de leur faible solubilité et de leur capacité à s'accumuler dans les organismes vivants. Les composés monoaromatiques (benzène) et diaromatiques (naphthalène) sont intrinsèquement moins toxiques car de plus faible poids moléculaire. Paradoxalement, la phase de toxicité aiguë qui suit l'introduction d'importants volumes d'hydrocarbures en mer est plutôt associée aux

aromatiques légers (benzène et naphthalène notamment) « car si leur toxicité intrinsèque est inférieure à celle des composés de hauts poids moléculaires, ils sont en général plus abondants dans le pétrole épandu ». Leur dissolution est également plus rapide et, « pour que des concentrations toxiques soient atteintes dans l'eau, ils nécessitent un brassage moindre ». Enfin, si les composés à haut poids moléculaires (HAP notamment) contribuent moins à la phase de toxicité aiguë (car moins solubles, etc.), « ils sont susceptibles à long terme de provoquer des dommages non négligeables s'ils s'accumulent à des doses notables dans les tissus des organismes » (toxicité résiduelle) (Le Gentil, 2009). À titre d'exemple, en 1996, la contamination par les hydrocarbures aux États-Unis se chiffrait déjà entre 10 000 et 15000 nouveaux cas par année. Au Canada, environ 60 % des sites pollués le sont par des produits pétroliers (Mariles Hahni, 2009).

Devenir des hydrocarbures dans l'environnement :

Lorsque des hydrocarbures sont déversés dans l'environnement, différents processus d'altération ont lieu. Ces processus génèrent des changements des propriétés physicochimiques des hydrocarbures qui ont lieu plus ou moins rapidement, mais commencent immédiatement après le déversement dans l'environnement. Ces changements dépendent souvent des conditions environnementales et du type d'hydrocarbures déversés, soit de la composition chimique. Les processus d'altération des hydrocarbures sont l'évaporation, l'émulsification, la dispersion naturelle, la dissolution, la photooxydation, la sédimentation, l'interaction avec des particules fines et la biodégradation. Le devenir des hydrocarbures dans l'environnement à la suite d'un déversement dépend de ces processus (Figure 02) (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2015).

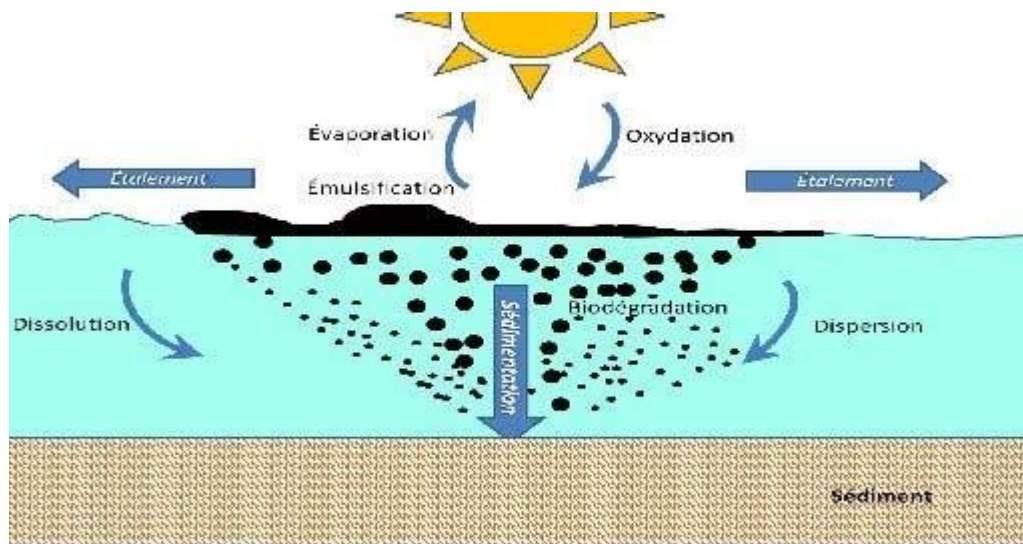


Figure 02 : Devenir des hydrocarbures pétroliers dans la colonne d'eau et dans les sédiments
(Rouidi, 2014)

11.4.1- Evaporation

Ce phénomène est l'élément le plus important de l'altération des hydrocarbures, il concerne les produits volatils à faible poids moléculaire, et contribue à l'élimination des hydrocarbures de la surface du sol ou de l'eau vers l'atmosphère. La vitesse d'évaporation et son importance, dépendent essentiellement de la proportion des fractions à faible point d'ébullition. Elle est immédiate pour les composés légers. Tous les hydrocarbures ayant moins de 15 atomes de carbones et un point d'ébullition inférieur à 250°C se volatilisent dans les 10 jours ; les hydrocarbures qui comptent de 15 à 25 atomes de carbones, avec un point d'ébullition compris entre 250 et 400°C s'évaporent en quantité moindre. Les composés ayant de 4 à 12 atomes de carbone, représentent près de 50 % d'un brut moyen, il peut donc y avoir une pollution atmosphérique notable. L'évaporation dépend aussi des conditions météorologiques, en général plus la vitesse du vent, la vitesse des vagues et la température ambiante sont élevées, plus l'évaporation est rapide. Au-delà de deux semaines les phénomènes d'évaporation cessent. L'atmosphère contient plus de 2800 composés chimiques. Parmi ces composés, les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont considérés comme une des principales familles de polluants atmosphériques, susceptibles d'entraîner des cancers. Dans l'atmosphère, les HAP à 2 ou 3 cycles sont sous forme gazeuse, alors que ceux à 3 et 4 cycles (anthracène, phénanthrène, pyrène, fluoranthène) se retrouvent à la fois dans la phase gazeuse et dans la phase particulaire. Les HAP de 4 à 6 cycles sont sous forme particulaire dont 70 % sont adsorbés sur des particules ultrafines (<0,5 µm) (Rouidi, 2014).

Dissolution

La dissolution se produit rapidement après le déversement et affecte principalement les composés aromatiques polaires et de faible poids moléculaire, c'est-à-dire essentiellement les composés inférieurs à C15.), il a été observé que pour des composés ayant le même nombre de carbones, les composés se dissolvent dans l'ordre suivant : les composés aromatiques, suivis des alcanes non cycliques et, finalement, des cycloalcanes. Généralement, la solubilité des cycloalcanes est supérieure à celle des alcanes non cycliques (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2015)

Photo-oxydation

La photo-oxydation, ou oxydation photochimique, est un processus d'altération des hydrocarbures qui est modulé par différents facteurs, notamment le spectre et l'intensité lumineuse du rayonnement solaire et la composition chimique des hydrocarbures déversés. Dans le cas des sols, ce phénomène n'a lieu que dans les premiers centimètres de la surface. Sous l'action du rayonnement solaire, essentiellement les rayons UV, certains composés peuvent être oxydés. Les composés produits sont alors plus solubles (acides, alcools, cétones, peroxydes et sulfoxydes) que les composés initiaux et peuvent être plus toxiques pour les communautés microbiennes. Les composés saturés ne sont pas affectés, mais la majorité des composés aromatiques qui sont plus photosensibles que les composés aliphatiques sont convertis en résines ou en molécules polaires. Par ailleurs, plus les composés aromatiques sont alkylés, plus ils sont sujets à la photooxydation ont montré l'existence d'interactions entre la photooxydation et la biodégradation pour l'élimination des alkylbenzènes et de l'anthracène. L'action simultanée de ces deux phénomènes permet une élimination plus rapide de ces deux familles de composés (Benchouk, 2017).

I1.4.4.Emulsification

Deux types d'émulsions peuvent se former : eau-dans-huile appelée "mousse au chocolat" et huile-dans-eau (Figure 03). Les émulsions eau-dans-huile sont constituées par des hydrocarbures de haut poids moléculaires. Ces émulsions difficilement dégradables sont les précurseurs des résidus goudronneux retrouvés sur les plages. Leur formation et leur stabilisation dépendent essentiellement de la composition chimique du pétrole et en particulier d'une teneur élevée en composés polaires, en résines et en asphaltènes. Elles sont très stables,

leur dégradation est alors considérablement ralentie et elles sont extrêmement dommageables pour les zones côtières qui sont impactées.

Les émulsions huile dans eau, quant à elles facilitent l'élimination des hydrocarbures, leur formation est favorisée par la présence de substances tensioactives naturelles.

Parallèlement, la biodégradation s'accompagne d'une production de substances émulsifiantes (bio-surfactants) qui vont favoriser la dispersion/dissolution (Rouidi, 2014).

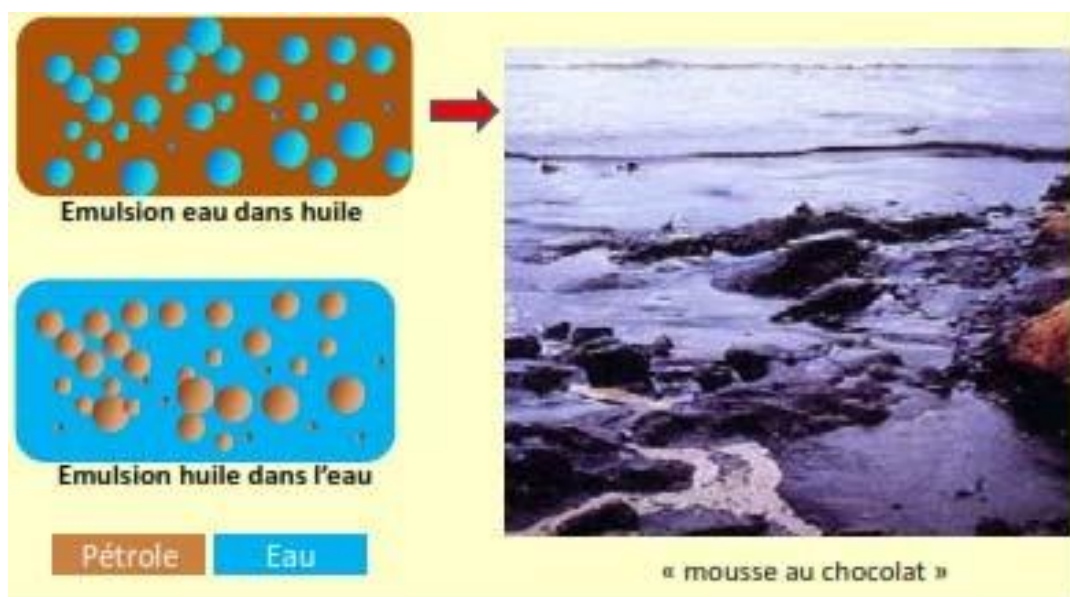


Figure 03: Les émulsions formées par le pétrole dans l'eau de mer (Rouidi, 2014)

II.4.5. Biodégradation :

La biodégradation d'un polluant hydrocarboné dans l'environnement est assurée par les microflore présentes naturellement dans les sols et aquifères selon des processus aérobies ou anaérobies. Les approches théoriques et expérimentales visant à caractériser les processus de biodégradation dans l'environnement sont nombreuses. Elles ont pour objectif de prévoir le devenir environnemental des polluants et définir ainsi des actions efficaces pour restaurer les sites pollués. Ces études de biodégradation des polluants sont néanmoins complexes car elles nécessitent différents niveaux de connaissance. Dans le cas de la mise en œuvre d'un traitement biologique in situ, il est nécessaire de savoir si les conditions propres au site sont compatibles

avec l'activité biologique que l'on souhaite mettre en place Il faut donc connaître la répartition du polluant, sa concentration dans l'environnement, l'historique du site en terme de pollution.

Il est également important de connaître la biodisponibilité du polluant en terme d'accessibilité par les bactéries (solubilité du polluant, adsorption de celui-ci sur la matrice solide). La connaissance de la biodégradabilité du polluant dans les conditions du site ainsi que l'identité et les concentrations des différents accepteurs d'électrons présents sont à prendre en compte dans la mise en œuvre d'un traitement biologique in situ. Il est également intéressant de caractériser les microflore présentes sur le site ainsi que leurs capacités dégradatives vis-à-vis des polluants et en particulier des différentes familles de composés (Gautier, 2007).

Devenir des hydrocarbures dans le sol

Les sols sont, avec les milieux aquatiques et l'atmosphère, une des trois composantes majeures de la biosphère. À ce titre, ils ont joué et jouent en permanence un rôle déterminant dans l'apparition et le maintien de l'activité biologique et de la biodiversité à la surface de la planète. La contamination des sols due aux activités agricole, industrielle et urbaine devient aujourd'hui un problème préoccupant. En effet, cela se traduit par des impacts négatifs sur les activités dépendant directement ou indirectement de la terre, mais aussi sur la santé humaine et les écosystèmes (Verdin *et al*, 2004).

À la suite d'un déversement des hydrocarbures au niveau du sol, ceux-ci sont soumis à différents processus d'altération physique, chimique et biologique qui vont déterminer leur devenir dans le milieu. Ceci étant, il n'est pas toujours évident de prédire avec certitude le comportement d'un polluant au niveau du sol, car celui-ci est un grand système dynamique, complexe, hétérogène et évolutif dans le temps. Ce dynamisme vivant, le plus souvent caractérisé par des phénomènes abiotiques (évaporation, etc.) et biotiques (biodégradation, etc.) dépendent beaucoup des propriétés intrinsèques du sol, des conditions environnementales, de la composition chimique et des propriétés physiques des hydrocarbures. Les phénomènes biotiques sont ceux qui participent majoritairement à la dégradation des hydrocarbures lourds tandis que les phénomènes abiotiques agissent plutôt sur les plus légers. Les différents processus naturels d'altération des hydrocarbures sont la volatilisation, la biodégradation, l'adsorption, etc. (Figure 04) (Fokou Mbogne, 2017).

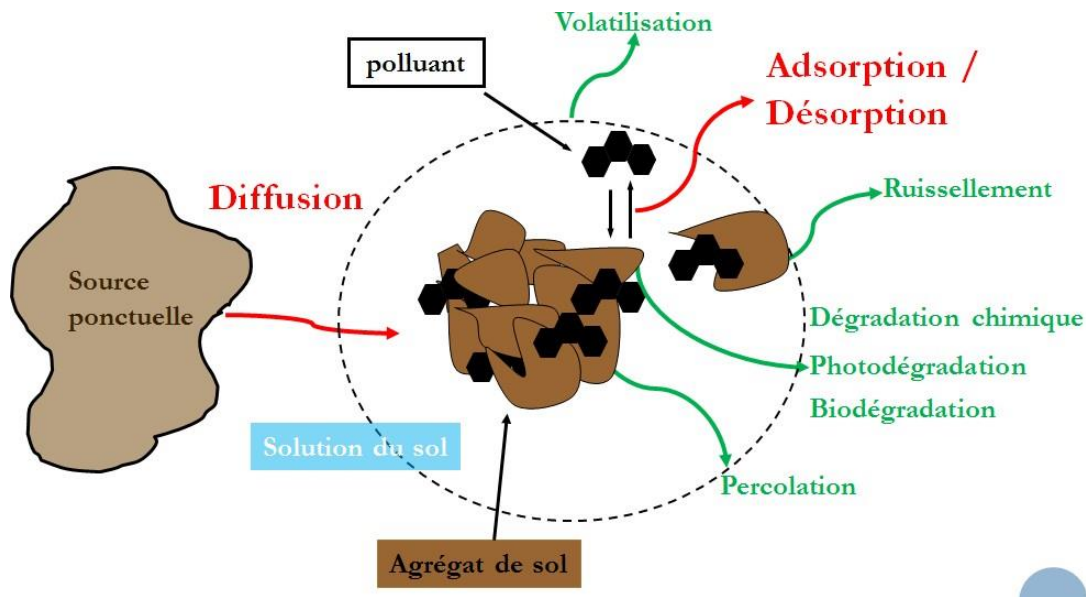


Figure 04 : Devenir d'un polluant organique au niveau du sol (Fokou Mbogne, 2017)

I1.5.1. Volatilisation

C'est un processus qui induit la plus grande perte de masse pour les hydrocarbures légers. La température fait partie de ces facteurs qui influent énormément sur ce processus d'évaporation (Fokou Mbogne, 2017).

I1.5.2. Adsorption

À défaut d'être biodégradés, les hydrocarbures pétroliers sont le plus souvent séquestrés par les molécules du sol ou du compost. Liés au sol, ces contaminants sont plus résistants à l'attaque biologique que les contaminants en solution. L'adsorption est un procédé physico-chimique, naturel et passif d'accumulation des matières organiques, mettant en jeu des forces d'interactions qui retiennent l'adsorbat sur la surface de l'adsorbant. La formation de tels résidus nécessite la présence de groupes réactifs sur le contaminant et sur la matrice organique du sol. Quant aux HAP, il n'existe pas de tels groupes. Dans leur cas, il a été supposé que l'humification, c'est-à-dire la formation de résidus liés à la matière humique, ne peut donc avoir lieu que si des métabolites réactifs dérivés des HAP sont formés. Elle se fait préférentiellement au niveau de la fraction organique du sol ou sinon, au niveau de la fraction minérale. C'est un phénomène qui peut être réversible (si adsorption physique) ou irréversible (si adsorption chimique) et dépend des conditions environnementales (température, pH, taux d'humidité, etc.), des caractéristiques du polluant (solubilité, masse moléculaire, âge du polluant, etc.), de la

nature du sol (granulométrie, minéralogie, taux de matière organique, etc.) mais aussi de la synergie des phénomènes dynamiques du sol, comme vu précédemment (Fokou Mbogne, 2017).

CHAPITRE 02

III. Généralité

Le déversement des hydrocarbures dans le sol représente un risque majeur et bien connu pour les écosystèmes ainsi que pour la santé humaine. De nos jours plusieurs méthodes physico-chimiques ont été conçues pour lutter contre ces contaminants. La lutte biologique reste la plus exploitée et la plus aboutie dans l'élimination de ces polluants en raison de sa solution alternative écologique, de son procédé moins coûteux que les autres procédés et du fait qu'elle soit applicable pour de large espaces (Verdin et *al*, 2004). Ce processus naturel a pour nom la biodégradation. Ce dernier implique des organismes vivants (Bactéries, champignons, plantes et algues) (Sauret, 2011).

La biodégradation

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

Ce phénomène se réalise soit en conditions aérobiques : les composés organiques sont complètement oxydés en composés inorganiques solubles et l'oxygène agit comme un accepteur terminal d'électrons, soit en conditions anaérobiques : les composés organiques sont oxydés de façon incomplète en acides organiques simples, le méthane et l'hydrogène comme sous-produits (conditions dénitrifiantes, sulfato-réductrices ou méthanogènes) par différents groupes de microorganismes. Contrairement au métabolisme aérobie, le nitrate, le sulfate et le bicarbonate jouent le rôle d'accepteurs terminaux (Kumar et Gopal, 2015)

Processus de biodégradation des hydrocarbures

Depuis l'exploitation des réserves pétrolières, le milieu terrestre est devenu un déversoir des hydrocarbures pétroliers. Par infiltration, cette pollution, accidentelle ou consécutive à des mauvaises pratiques environnementales, menace les écosystèmes et la santé des populations (Noel, 2015). La biodégradation est donc venue comme processus naturel et complexe dépendant de la nature et la quantité des hydrocarbures présents (Das et Chandran, 2011) et faisant intervenir pour la dépollution des microorganismes (Bactéries, champignons, algues et plantes). Toutefois il a été établi que les bactéries (79 genres recensés en 2005) étaient qualitativement et quantitativement les plus efficaces dans cette fonction (Sauret, 2011).

Les bactéries sont des microorganismes unicellulaires, ubiquitaires. Elles sont capables de se reproduire de manière autonome par des divisions cellulaires. La taille des bactéries varie de 1 à 10 μm , et leur forme varie en forme ovoïde ou en bâtonnet (Noel, 2015). Ce sont des petits sacs de molécules séparés de l'environnement extérieur. Cet ensemble a la capacité remarquable de se copier à l'identique en puisant énergie et réactifs primaires dans le monde extérieur (Cottinet, 2013). En tant que procaryote, elles ne possèdent pas de noyau ni d'organites mais se composent d'un cytoplasme entouré par une membrane plasmique et une paroi cellulaire, son patrimoine génétique se trouvant dans le volume intérieur forme un chromosome circulaire unique (Noel, 2015). Au-delà de la membrane cytoplasmique, ou plasmique, les bactéries possèdent une paroi constituée de peptidoglycane.

Elle assure la cohésion mécanique de la cellule (Cottinet, 2013). Grâce à la coloration de Gram (1884), les bactéries ont pu être réparties en deux groupes (Noel, 2015) : bactéries possèdent uniquement une paroi épaisse et complexe. Celle-ci reste perméable au colorant de Gram et les bactéries correspondantes sont dites Gram positives. Les autres bactéries possèdent une paroi de peptidoglycanes plus simple et surtout une membrane externe, cette dernière est imperméable au colorant de Gram, les bactéries possédant cette structure sont Gram négatives (Cottinet, 2013).

De leur description générale se sont le groupe de micro-organismes le plus étudié et leur aptitude à dégrader les hydrocarbures a été démontrée depuis plus de 50 ans. Les différents genres bactériens fréquemment décrits pour leur capacité à les dégrader sont : *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Beijerinckia*, *Gordona*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Rhodococcus Brevibacterium*, *Aeromicrobium*, *Dietzia* et *Burkholderia* (Das et Chandran, 2011).

Pendant la biodégradation, les bactéries vont utiliser les polluants hydrocarbonés pour produire de l'énergie (ATP). Les polluants sont catabolisés : il y a une oxydation d'un donneur d'électrons (les hydrocarbures) et une réduction d'un oxydant ou accepteur d'électrons (composés oxydants tels que l'oxygène, les nitrates, les sulfates...) (Noel, 2015).

En général, la quantité d'accepteurs d'électrons est le facteur limitant pour la biodégradation. La disponibilité de l'azote (N) et du phosphore (P) est aussi un facteur limitant de la dégradation des hydrocarbures. Deux sortes de dégradations biologiques se distinguent suivant le type d'accepteur d'électrons : La dégradation aérobie et la dégradation anaérobie (Noel, 2015).

La dégradation aérobie

Cette dégradation nécessite de l'oxygène comme accepteur d'électrons. Par exemple, la ring dioxygénase, la méthyl monoxygénase ou la ring monoxygénase responsables du clivage du toluène chez différentes bactéries. Des conditions aérobies sont donc indispensables à l'oxydation des hydrocarbures dans l'environnement. L'oxydation produit de l'acétyl-CoA. Ce dernier est alors transformé en énergie et en carbone dans le cycle de Krebs (cycle permettant la transformation de l'acétyl-CoA en carbone et ATP) (Figure 05) (Noel, 2015).

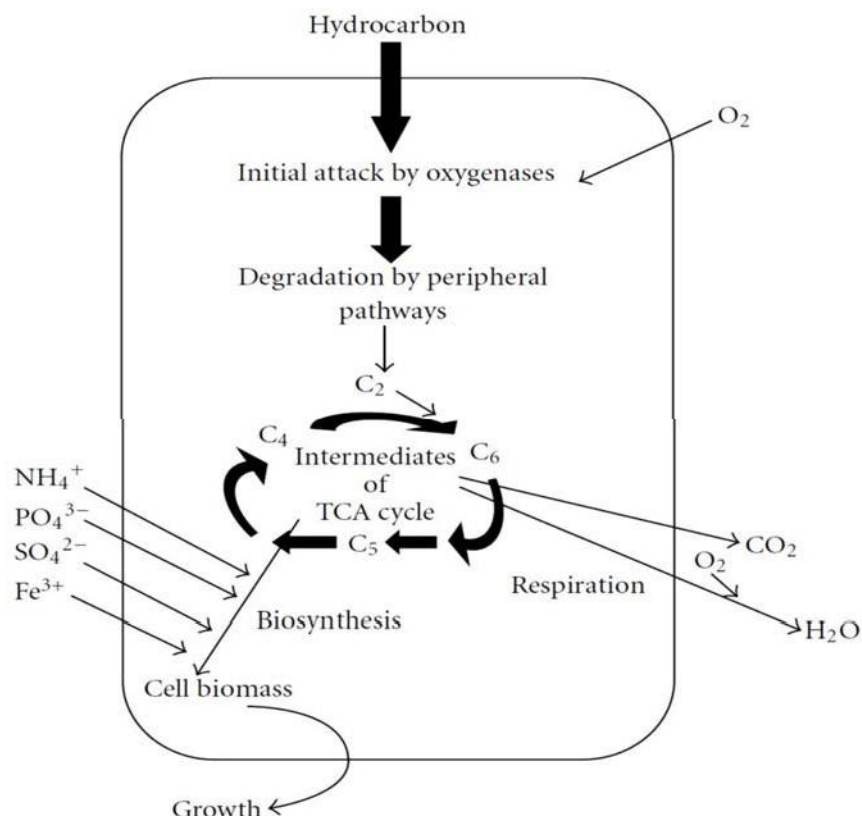


Figure 05 : Mécanisme général de dégradation aérobie des hydrocarbures par les microorganismes (Das et Chandran, 2011)

Biodégradation anaérobie

Les hydrocarbures sont maintenant reconnus comme une source potentielle de carbone et d'énergie permettant le développement de microorganismes en conditions anaérobie. La dégradation des hydrocarbures par les microorganismes dans des conditions aérobies est bien connue depuis plus d'un siècle (Britton, 1984; Gibson et Subramanian, 1984).

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

Dans les hydrocarbures plus les structures moléculaires sont complexes, plus le taux de biodégradation diminue (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2015). Les alcanes sont les hydrocarbures les plus facilement biodégradés par la voie aérobie ce qui correspond à une oxydation du groupe méthyle terminal, conduisant à la formation d'un alcool primaire, d'un aldéhyde puis d'un acide mono-carboxylique faisant intervenir une mono-oxygénase.

Cependant La dégradation des alcanes ramifiés est plus lente et plus difficile comparativement à celle des alcanes linéaires (Sauret, 2011). En ce qui concerne la dégradation des hydrocarbures aromatiques, ils sont susceptibles d'être biodégradés en conditions aérobies. La première étape lors du clivage du noyau est le remplacement de deux atomes d'hydrogène situés sur des carbones adjacents, par deux groupes hydroxyles. Le noyau benzénique est alors coupé entre les deux carbones portant les groupes hydroxyles pour donner un diacide carboxylique (Jouannin, 2004).

De plus, les hydrocarbures aromatiques peuvent subir une dégradation anaérobie. Le noyau benzénique peut être dégradé en présence de nitrate par *Pseudomonas* sp et *Moraxella* sp. Le noyau benzénique est tout d'abord saturé en cyclohexane, puis oxydé en cétone, puis coupé par hydrolyse, pour donner finalement un acide carboxylique. Au cours de ce processus, le nitrate est réduit en azote (Jouannin, 2004).

Facteurs influençant la biodégradation des hydrocarbures

Depuis les premières investigations sur la pollution pétrolière, un grand nombre d'études ont entrepris de comprendre le devenir du pétrole dans l'écosystème et les facteurs environnementaux pouvant affecter à la fois l'élimination des polluants pétroliers et la biodégradation (Sauret, 2011) de ce fait un certain nombre de facteurs limitatifs ont été reconnus pour affecter la biodégradation des hydrocarbures pétroliers, une considération de la composition et biodégradabilité intrinsèque du polluant hydrocarboné reste la plus importante lors d'une approche d'assainissement.

Parmi les facteurs physiques, la température joue un rôle important dans la biodégradation des hydrocarbures en affectant directement la chimie des polluants hydrocarbonés ainsi que la physiologie et la diversité de la flore microbienne. Des recherches ont établi qu'à une basse température la viscosité du polluant augmentait tandis que la volatilité et la toxicité moléculaire devenaient faibles ce qui réduisait le poids moléculaire des hydrocarbures retardant par conséquent le début de la biodégradation. Il a été aussi établi que la température affectait également la solubilité des hydrocarbures. (Das et Chandran, 2011)

La photo-dégradation des hydrocarbures par les UV est un phénomène avéré mais qui a été très peu étudié en effet L'action des UV sur les molécules aromatiques et polaires, en particulier, libère des radicaux libres capables de dégrader ces mêmes molécules. Ainsi les processus photochimiques peuvent rapidement altérer la composition initiale du pétrole (Sauret, 2011).

Les nutriments sont des ingrédients très importants pour réussir la biodégradation des polluants hydrocarbonés, en particulier l'azote, le phosphore et, dans certains cas, le fer. D'autres recherches ont indiqué qu'un approvisionnement avec des quantités élevées en nutriments pouvaient inhiber la biodégradation (Das et Chandran, 2011).

PARTIE 02:

ETUDE D'ARTICLE



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Engineering Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bej

Regular article

Ex-situ biodegradation of petroleum hydrocarbons using *Alcanivorax borkumensis* enzymes



Tayssir Kadri, Sara Magdouli, Tarek Rouissi, Satinder Kaur Brar*

INRS-ETE, Université du Québec, 490, Rue de la Couronne, Québec, G1K 9A9, Canada

ARTICLE INFO

Article history:
Received 7 September 2017
Received in revised form
19 December 2017
Accepted 13 January 2018
Available online 31 January 2018

Keywords:
Biodegradation
Petroleum hydrocarbons
Alcanivorax borkumensis
Enzymes production

ABSTRACT

Bioremediation for degradation of hydrocarbons is a widely used alternative for the recovery of contaminated sites. The current study aimed to use *Alcanivorax borkumensis* crude enzyme preparation as an agent for enhanced microbial hydrocarbons biodegradation in contaminated water and soil. The inoculum and hydrocarbons concentration have a remarkable effect on the biodegradation with the crude enzymes. The high enzymatic production reaching 145.71 U/mg for alkane hydroxylase, 3628.57 U/mg for lipase and 2200 U/mg for esterase led to a significant degradation efficiency of the different concentrations of petroleum hydrocarbon substrates reaching 73.75% for 5000 ppm of hexadecane, 82.80% for 1000 ppm of motor oil, 64.70% for 70 ppm of BTEX and 88.52% for 6000 ppm of contaminated soil. The study suggested that *Alcanivorax borkumensis* is a potential hydrocarbon-degrading bacterium with higher enzymatic capacities for bioremediation of hydrocarbon-polluted environment.

Crown Copyright © 2018 Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Petroleum is the most cost-effective energy source in the current global economy. Its widespread and extensive use has led to serious ecological problems and severe disruption of the ecological balance [1].

The removal of petroleum-hydrocarbons by means of mechanical and physical methods is used as a primary response during oil spill. However, the efficiency of mechanical removal is limited. Bioremediation has been proven to be successful and eco-friendly in the mineralization and removal of petroleum hydrocarbon contaminants in different habitats, such as water and soil [2–4]. Some recently characterized bacterial species are highly specialized for hydrocarbon degradation. These species are called hydrocarbonoclastic bacteria, and they play a key role in the removal of hydrocarbons from polluted environments [5–8]. Importantly, *Alcanivorax borkumensis*, a marine bacterium that can assimilate various hydrocarbons [6,9,10]. *Alcanivorax borkumensis* is present in non-polluted seawater in low numbers; however, their number can increase as a result of an oil spill, and they are believed to play an important role in the natural bioremediation of oil spills worldwide [13–15]. Moreover, *Alcanivorax borkumensis* is able to produce a glucolipid biosurfactant [14,15] which may enhance the bioavail-

ability of hydrocarbons by either increasing apparent hydrocarbon solubility in the aqueous phase or by expanding the contact surface area due to emulsification [16].

A. borkumensis genome has been completely sequenced and hence leading to a better understanding of the cellular biology of hydrocarbons metabolism [17]. Many genes encoding for enzymes initiating the degradation of these hydrocarbons have been detected [10–12]. However, very few biochemical studies have been carried out on the enzymatic effectiveness of this autochthonous hydrocarbonoclastic bacteria in oil spill remediation [18–20]. Therefore, understanding the biochemical pathway is a key feature in environmental bioremediation. With this aim, the production of alkane hydroxylase (EC: 1.14.15.3), lipase (EC: 1.3.3.X) and esterase (EC: 1.3.3.X) was investigated. The *A. borkumensis* alkane hydroxylase system is able to degrade a large range of alkanes up to C32 and branched aliphatic, as well as isoprenoid hydrocarbons, alkylarenes and alkylcycloalkanes. This spectrum is much larger based on knowledge about alkane hydroxylase complexes. This makes the choice of alkane hydroxylase of a unique importance. Furthermore, *A. borkumensis* genome includes 11 genes coding for different lipases/esterases of unknown specificity. Two of these esterases were purified and functionally characterized. They showed generous enzymatic activity that is up to two orders of magnitude better than common esterases, have a large substrate spectrum, exceptional enantioselectivity and chemical resistance, which provides them a competitive advantageous over other esterases from other microorganisms and other enzymes

* Corresponding author.
E-mail address: satinder.brar@ete.inrs.ca (S.K. Brar).

Etude de l'article 01 : Ex-situ biodegradation of petroleum hydrocarbons using *Alcanivorax borkumensis* enzymes

Etant la principale source mondiale d'énergie, le pétrole est devenu un problème majeur en effet, son utilisation extensive a entraîné un déséquilibre écologique important. Différentes méthodes mécaniques et physiques ont été appliquées dont le but d'éliminer ces contaminants, toute fois la biorestauration s'est avérée efficace, cette dernière consiste à utiliser des espèces bactériennes hautement spécialisés et parmi ces bactéries on y trouve la bactérie marine *Alcanivorax borkumensi*. Son utilisation a été dans le but d'étudier ses voies biochimiques par la production d'enzymes en présences d'hydrocarbures pétroliers.

Dans cet article nous avons étudié le potentiel de dégradation enzymatique des hydrocarbures par *Alcanivorax borkumensi*. L'échantillon du sol contaminer à partir d'un site au Québec a été traité et analysé par différents réactifs et méthodes chimique (GC-MS). L'isolement de la bactérie étudié a été réalisé dans des conditions favorables à sa croissance, d'autres analyses biochimique ont été effectué pour mesurer l'activité enzymatique de *Alcanivorax borkumensi* et les différentes concentrations des hydrocarbures.

les résultats de l'étude ont montré que l'efficacité de la dégradation par *Alcanivorax borkumensi* des hydrocarbures étudié (l'hexadécane, l'huile moteur et le BTEX) variait largement entre ces derniers reflétant une complexité dans la structure et longueur de chaîne , en effet nous avons remarqué que chez hexasadécane à des concentration importante , il pouvait faire diminuer l'activité enzymatique et du faite diminuer la dégradation, le BTEX quant à lui était plus difficile à dégrader et pouvait jouer le rôle d'un inhibiteur pour le microorganisme et ses activités. Pour l'huile moteur comme discuté précédemment, sa biodégradation semblait être dépendante de la concentration comme observé avec BTEX. Toute fois *Alcanivorax borkumensi* comparé a d'autre souches cité a enregistré un taux de biodégradabilité élevé par rapport à ces dernières.



Contents lists available at ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech

Short Communication

Biodegradation and dissolution of polyaromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas* sp.

Bhagyashree Tiwari^{a,b,*}, N. Manickam^b, Smita Kumari^b, Akhilesh Tiwari^c^a Department of Molecular and Cellular Engineering, Jacob School of Biotechnology and Bioengineering, Sam Higginbottom Institute of Agriculture, Technology and Sciences, Allahabad 211 007, India^b Environmental Biotechnology Section, CSIR-Indian Institute of Toxicology Research, Lucknow 226 001, India^c Department of Applied Sciences, Indian Institute of Information Technology, Allahabad, India

HIGHLIGHTS

- *Stenotrophomonas* sp. strain IITR87 degraded polycyclic aromatic hydrocarbons.
- Degradation occurred in order for phenanthrene, followed by pyrene and benzo[α]pyrene.
- Dissolution of PAHs increased in the presence of surfactants.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 May 2016

Received in revised form 13 June 2016

Accepted 14 June 2016

Available online xxxxx

Keywords:

Polycyclic aromatic hydrocarbons

Phenanthrene

Pyrene

Benzo[α]pyrene

Surfactants

Biodegradation

ABSTRACT

The aim of this work was to study the biodegradation capabilities of a locally isolated bacterium, *Stenotrophomonas* sp. strain IITR87 to degrade the polycyclic aromatic hydrocarbons and also check the preferential biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). From preferential substrate degradation studies, it was found that *Stenotrophomonas* sp. strain IITR87 first utilized phenanthrene (three membered ring), followed by pyrene (four membered ring), then benzo[α]pyrene (five membered ring). Dissolution study of PAHs with surfactants, rhamnolipid and tritonX-100 showed that the dissolution of PAHs increased in the presence of surfactants.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are widespread contaminants of great environment concern because of their toxic, carcinogenic and mutagenic properties. Polyaromatic hydrocarbons are atmospheric pollutants that consist of fused aromatic ring and do not contain hetero atoms or carry substituent's (Bossert and Bartha, 1986; Deschênes et al., 1996; Garcia et al., 2001). Physical and Chemical properties of PAHs vary with the number of rings, hence their molecular weight also varies. PAHs enter in the environment either by adsorption onto particles emitted from combustion processes, or from spilling of mineral or tar oils (Mastrangelo et al., 1999). Soil pollution by tar oil coming from coal

liquefaction and gasification facilities is one of the considerable contamination sources of PAHs (Park et al., 2002). The increase in the size of the PAH molecule gives it more electrostatic stability and hydrophobicity, thereby it resist solubility for a longer time. Stability and hydrophobicity of PAH molecule are two factors, which contribute to its persistence in environment (Ghisalpa and Küenzi, 1983).

Several studies have been performed on the biodegradation of PHAs. Wei et al. (2014) studied the effect of poly- β -hydroxyalkanoates degradation rate on nitrous oxide production in a denitrifying phosphorus removal system. Napathorn (2014) evaluated the biocompatibilities of random and putative block poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)s (PHBVs) produced by a metabolic reaction-based system. Valentino et al. (2015) studied the fate of β -hexachlorocyclohexane in the mixed microbial cultures (MMCs) three-stage polyhydroxyalkanoates (PHA) production process from cheese whey. Pérez-Lara et al. (2016) studied the susceptibility of solid polyester polyurethanes (PS-PU) of

* Corresponding author at: Department of Molecular and Cellular Engineering, Jacob School of Biotechnology and Bioengineering, Sam Higginbottom Institute of Agriculture, Technology and Sciences, Allahabad 211 007, India.

E-mail address: meethbhagyashree91@gmail.com (B. Tiwari).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.047>

0960-8524/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Etude de l'article 02 : Biodegradation and dissolution of polyaromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas* sp.

Les hydrocarbures aromatiques sont parmi les polluants les plus dangereux pour l'environnement en raison de leur propriété toxique et mutagène. Leur pollution est soit par adsorption ou déversement et peut toucher l'eau et le sol. La biodégradation est un processus de décontamination par des microorganismes parmi ces derniers on y trouve *Stenotrophomonas* sp, l'étude a porté sur *Stenotrophomonas* sp.IITR87.

L'objectif de cette présente étude était de déterminer la capacité de dégradation des HAP par *Stenotrophomonas* sp.IITR87 et de vérifier la dissolution des HAP par les tensioactifs. L'isolement de *Stenotrophomonas* sp.IITR87 s'est fait dans des conditions favorable à sa croissance et en parallèle l'analyses de la capacité de dégradation et de dissolution a été vérifier avec la méthode de Chromatographie en phase liquide à haute performance (UHPLC).

Les résultats obtenus après incubation *Stenotrophomonas* sp.IITR87 à 30° pendant 15 jours et avec la méthode d'UHPLC ont permis de dire que les HAP de faible poids moléculaire étaient facilement dégradables par rapport HAP de poids moléculaire élevé. Le résultat de phénanthrène est venu le confirmer, il a enregistré un taux de dégradation de 96% après 5 jours d'incubation et une élimination complète après 15 jours d'incubation, suivi du pyrène qui a enregistré un taux de dégradation de 32% après 5 jours et a augmenté de 98% après 10 jours. Cependant pour le cas du benzo-a-pyrène sa dégradation était moins importante que les autres en effet, sa dégradation avait diminué après 5 jours d'incubation et elle est restée constante dans la culture et cela revient au fait qu'il soit un HAP de poids moléculaire élevé. En ce qui concerne l'analyse de la concentration de tensioactif avec le chromatogramme ça a donné une augmentation de dissolution des HAP en présence de tensioactif et cela revient au fait que ces derniers ont pu aider *Stenotrophomonas* sp.IITR87 à réduire la tension superficielle entre la phase polaire et non polaire et ont permis à la souche d'utiliser les hydrocarbures comme source d'énergie et du fait permettre leur dégradation.



Contents lists available at ScienceDirect

Marine Pollution Bulletin

journal homepage: www.elsevier.com/locate/marpolbul

The biodegradation of crude oil in the deep ocean

Roger C. Prince^{a,*}, Gordon W. Nash^b, Stephen J. Hill^b^a ExxonMobil Biomedical Sciences, Annandale, NJ 08810, USA^b Dept. of Ocean Sciences, Memorial University, St. John's, Newfoundland A1C 5S7, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 April 2016

Received in revised form 11 June 2016

Accepted 24 June 2016

Available online xxxxx

Keywords:

Oil well blowouts

Biodegradation

Natural attenuation

ABSTRACT

Oil biodegradation at a simulated depth of 1500 m was studied in a high-pressure apparatus at 5 °C, using natural seawater with its indigenous microbes, and 3 ppm of an oil with dispersant added at a dispersant:oil ratio of 1:15. Biodegradation of the detectable hydrocarbons was prompt and extensive (>70% in 35 days), although slower by about a third than under otherwise identical conditions equivalent to the surface. The apparent half-life of biodegradation of the total detectable hydrocarbons at 15 MPa was 16 days (compared to 13 days at atmospheric pressure), although some compounds, such as the four-ring aromatic chrysene, were degraded rather more slowly.

© 2016 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

The 2010 blowout of the Macondo oil well at 1544 m in the Gulf of Mexico (Lubchenco et al., 2012) renewed interest in the effects of pressure on oil biodegradation. Early work by Schwarz et al. (1974, 1975) used microbes collected at the water-sediment interface at 4940 m, 240 km east of Cape Canaveral, FL. Cultures were grown on hexadecane at 0.1 and 50 MPa (equivalent to surface and 5000 m conditions) at both 4 and 20 °C, under aerobic conditions, and growth was substantial at both temperatures and pressures, although somewhat slower at high pressure and low temperature. Bazylinski et al. (1989) isolated aerobic organisms able to grow on hexadecane and naphthalene from sediment cores collected at the Guaymas hydrothermal vent site in 2000 m of water, Cui et al. (2008) isolated aromatic degraders from the Middle Atlantic Ridge at 3542 m, and Tapilatu et al. (2010) isolated alkane degraders from 2400 m in the Mediterranean, although none were tested under high pressure conditions. Grossi et al. (2010) isolated a piezotolerant *Marinobacter* from deep (3475 m) Mediterranean water that grew aerobically at essentially similar rates on hexadecane at 0.1 and 35 MPa. Thus there was good precedence that oil degradation was likely to occur at depth following the Macondo blowout (Lubchenco et al., 2012), although only two or three substrates had been tested, and the growth media had been dramatically high in inorganic nutrients (up to 12.5 mM NH₄NO₃ and 6.2 mM phosphate (Schwarz et al., 1974, 1975; Bazylinski et al., 1989; Cui et al., 2008; Tapilatu et al., 2010; Grossi et al., 2010)), far higher than natural levels in the ocean (Garcia et al., 2009).

The expectation that biodegradation would proceed apace at depth following the Macondo blowout was borne out by Hazen et al. (2010). They found that some hydrocarbon components of the dilute 'plume' of oil entrained in the Gulf of Mexico at 1200 m (<1 ppm oil (Wade et al., 2016; Spier et al., 2013)) were undergoing rapid biodegradation (half-life of days!) despite only background levels of nutrients (Shiller and Joung, 2012).

Nevertheless, the majority of high pressure work has focused on very few hydrocarbons, usually hexadecane and naphthalene. These typically make up much <1% of crude oil hydrocarbons in weathered crude oil, so in this work we have examined the biodegradation of the total GC-detectable hydrocarbons in an artificially weathered oil, and many individual chemical species including those on the USEPA priority pollutant list (Keith and Telliard, 1979). We used environmentally relevant concentrations (Lee et al., 2013) of a dispersed lightly weathered crude oil at high pressure (15 MPa, equivalent to 1500 m) in natural seawater collected near Newfoundland, and followed the biodegradation of the oil by the indigenous microbes at a relevant temperature. As a reference, we compare this process at high pressure to the biodegradation by the same organisms at atmospheric pressure. We find that biodegradation at depth extends to all the saturated and aromatic hydrocarbons that are degraded under surface conditions, and that biodegradation is only mildly slowed by high pressure.

2. Methods

Experiments used unamended seawater collected in Logy Bay from a depth of 8 m and piped into the Cold-Ocean Deep-Sea Research Facility at Memorial University. Incubations were performed in 1 l Teflon (polytetrafluoroethylene) bottles (VWR) with 3 µl (3 ppm by volume) of an artificially weathered (20% loss by evaporation) European crude

* Corresponding author.

E-mail address: roger.c.prince@exxonmobil.com (R.C. Prince).

Etude de l'article 03 : The biodegradation of crude oil in the deep ocean

Après l'éruption du puits de pétrole de Macondo à 1544m dans le golfe en 2010 , le Mexique a renouvelé son intérêt pour les effets de la pression sur la biodégradation Ce qui a amené les chercheurs à s'intéresser à l'étude de la biodégradation sous haute pression et à faire une analyse comparative .

Dans cette article nous avons utilisé des bouteilles en téflon remplie d'eau de mer non modifié et additionné d'huile traité artificiellement, ces bouteilles ont été divisé certains ont été bouchées et secouées vigoureusement puis mis dans des récipients à haute pression pour après être congelé à 5°C, les autres servant comme témoins ont été mis sous pression atmosphérique. Une analyse avec la combine CG/SM a été réalisée.

Les résultats ont montré que la biodégradation du pétrole a été plus étendue et rapide sous pression atmosphérique et légèrement lente à haute pression. Les n-alcane étaient presque entièrement consommés en 7 jours, bien que la biodégradation de ceux ayant le numéro de carbone N 23 était visiblement plus lente à haute pression, la biodégradation des alcanes ramifiés pristane et phytane a été quelque peu plus lente mais ils ont été complètement consommés en 35 jours à 15 MPa. La biodégradation du phénanthrène et de ses congénères alkylés jusqu'à ceux avec l'équivalent de trois substituant méthyle était également pratiquement achevé en 35 jours. Le chrysène, l'aromatique à 4 cycles le plus abondant dans les pétroles bruts, a également été partiellement dégradé à la fin de l'expérience, avec une demi-vie médiane apparente de 100 jours. La biodégradation la plus lente enregistrée ici était celle des methylchrysene.

Etude de l'article 04 : Décontamination des sols pollués par les hydrocarbures

La contamination des sols par les dérivées pétroliers a nécessité le processus de bio remédiation qui est basé sur la décontamination des milieux pollués aux moyens d'activité des microorganismes apte à les dégrader

Ici nous avons étudié des échantillons de sol/boue activé contaminés par les hydrocarbures qui proviennent d'une décharge propre de la société de raffinerie SAMIR. Nous avons analysé les hydrocarbures par la méthode de spectroscopie infrarouge FTIR puis nous avons identifié les microorganismes impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures.

Nos résultats montrent une réduction très faible presque négligeable des hydrocarbures dans les échantillons et cela est apparu logique, car le travail était réalisé avec des échantillons du sol situé dans une décharge anciennement polluée. Le sol était déjà influencé par des phénomènes naturels tel que la bioremédiation. Nous avons caractérisé quelque genre de bactéries *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Klyvera*, *Escherichia coli*. Ces derniers ont été beaucoup étudiés et soulignés comme des genres dégradant les hydrocarbures et d'autres polluants organiques. Nous avons observé une variation dans les paramètres physicochimiques : nous avons observé une augmentation dans la température (40C° à 59C°) puis une diminution jusqu'à qu'elle se stabilise. En parallèle nous avons mesuré une diminution dans le rapport C/N due au forte teneur en azote. Quand l'acidification on a enregistré une faible acidification 48h puis une forte acidification en (120h) selon la quantité différente de la boue présente.

Nos résultats semblent montrer que les objectifs initialement fixés ont été atteints. En fait, la bioremédiation du sol pollué par les hydrocarbures peut être considéré comme une voie écologique pour l'élimination des hydrocarbures.



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere

25 years monitoring of PAHs and petroleum hydrocarbons biodegradation in soil



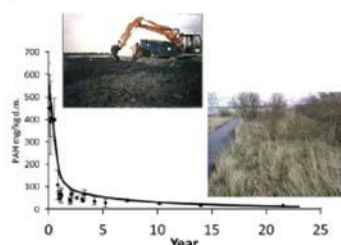
Joop Harmsen, René P.J.J. Rieta*

Wageningen Environmental Research, P.O. Box 47, 6700 AA Wageningen, The Netherlands

HIGHLIGHTS

- Biodegradation of PAHs and TPH has been monitored during 25 years.
- After an initial rapid degradation, a continuous very slow degradation of PAHs is observed.
- Beside 2-, 3- and 4-ring PAHs, also 5- and 6-ring PAHs degrade.
- Using Tenax extractable PAHs and the degradation rate constants, the PAHs degradation during 25 years can be described.
- A residual fraction of high boiling and non-toxic TPH remains and no further very slow degradation is observed.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
Received 1 March 2018
Received in revised form
19 April 2018
Accepted 7 May 2018
Available online 10 May 2018

Handling Editor: Patryk Oleszczuk

Keywords:
Biodegradation
Polycyclic aromatic hydrocarbons
PAH
Petroleum hydrocarbons
Bioavailability
Tenax

ABSTRACT

Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and total petroleum hydrocarbons (TPH) in sediment and soil has been monitored on seven experimental fields during periods up to 25 years. With this unique dataset, we investigated long-term very slow biodegradation under field conditions. The data show that three biodegradation rates can be distinguished for PAHs: 1) rapid degradation during the first year, 2) slow degradation during the following 6 years and 3), subject of this paper, a very slow degradation after 7 years until at least 25 years. Beside 2-, 3- and 4-ring PAHs, also 5- and 6-ring PAHs (aromatic rings) were degraded, all at the same rate during very slow degradation. In the period of very slow degradation, 6% yr⁻¹ of the PAHs present were removed in five fields and 2% yr⁻¹ in two other fields, while in the same period no very slow degradation of TPH could be observed. The remaining petroleum hydrocarbons were high boiling and non-toxic. Using the calculated degradation rates and the independently measured bioavailability of the PAHs (Tenax-method), the PAHs degradation curves of all seven monitored fields could be modelled. Applying the model and data obtained with the Tenax-method for fresh contaminated material, results of long-term biodegradation can be predicted, which can support the use of bioremediation in order to obtain a legally acceptable residual concentration.

© 2018 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

To improve navigation and water management, such as in the Netherlands, dredging activities in waterways are necessary which generate a large volume of dredged material. The often heavily

* Corresponding author.
E-mail address: rene.rieta@wur.nl (R.P.J.J. Rieta).

Etude de l'article 05 : 25 years monitoring of PAHs and petroleum hydrocarbons biodegradation in soil

La contamination des sédiments par les hydrocarbures pétroliers et les hydrocarbures aromatique polycyclique nécessite un traitement efficace pour minimiser les risques environnementaux. En effet la transformation des sédiments en sol lors de la déshydratation permet aux microorganismes aérobies de biodégrader les contaminants dans les sédiments

Ici nous avons étudié la biodégradation rapide, lente et très lente des sédiments sur sept champs expérimentaux à Kreekraksluizen pendant des périodes allant jusqu'à 25 ans. Nous avons analysé les Hydrocarbures Aromatique Polycyclique par la méthode de HPLC et détection par fluorescence, et les hydrocarbures pétroliers par la méthode GC-FID. Nous avons aussi mesuré la biodisponibilité (une méthode d'extraction pour déterminer la fraction biodisponible d'un contaminant dans le sol en mesurant la quantité adsorbée par Tenax). Nous avons mesuré le carbone noir dans les sédiments originaux stockés et estimer la teneur de la matière organique par la méthode Losson-l'inflammation.

Nos résultats montrent que les dégradations les plus élevées sont celles des hydrocarbures aromatiques polycycliques, dans les premières années étaient rapide puis d'une dégradation lente survient dans les années suivantes, une diminution continue de la teneur en HAP (dégradation très lente) au cours des dernières années et la concentration mesurée comme plus stable. Une dégradation rapide des hydrocarbures pétroliers au cours de la première année, suivie d'une dégradation lente au cours des années suivantes. Nous avons mesuré les concentrations résiduelles des sédiments comme stable à mesurable de (2000 mg kg⁻¹ dm.³ à 100 mg kg⁻¹ dm.³) des hydrocarbures pétroliers. Nos résultats montrent également que pendant toute la période de mesure, une partie des HAP se désorbent rapidement et d'autres se désorbent lentement. Nous avons mesuré une diminution dans les deux premières années suivie d'une stabilisation à environ 7% de la MO jusqu'à une légère augmentation. Le carbone noir est présent dans tous les échantillons et agit comme un absorbant puissant.

Pour soutenir la mise en œuvre de la biorestauration et en particulier les longs délais de traitement, la capacité de prédire le résultat de la remédiation est importante.



Original article

Morphological, biochemical and molecular identification of petroleum hydrocarbons biodegradation bacteria isolated from oil polluted soil in Dhahran, Saud Arabia

Fahad A. Al-Dhabaan

Department of Biology, Science and Humanities College, Shaqra University, Alquwayyah, Saudi Arabia



ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 March 2018

Revised 20 May 2018

Accepted 31 May 2018

Available online 31 May 2018

Keywords:

Khurais oil field

Hydrocarbon components

Biodegradation

Morphological features

Biochemical tests

Universal 16S rDNA primers

Degradation %

ABSTRACT

Accumulation of petroleum hydrocarbon residual considered a major environmental problem in the kingdom of Saudi Arabia cause of intensive efforts for oil detecting. Until now, In situ biodegradation considered the most effective method for petroleum hydrocarbon residual biodegradation. The aim of this study is isolation and identification biodegradable capability bacteria from contaminated sites in Khurais oil field, Dhahran, Saud Arabia via Different morphological and biochemical and molecular methods. Furthermore, degradation level in contaminated liquid medium and soil were evaluated. Three bacterial strains were selected from petroleum-contaminated soils of Khurais oil field depending on their capacity to grow in the existence of hydrocarbon components and identified according to morphological, biochemical. Interestingly, 16S rDNA sequencing fingerprinting results confirmed our bacterial identification as *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereu*. Phylogenetic tree was constructed and genetic similarity was calculated according to alignments results. Biodegradation patterns for different three isolates were reflected varied degradation ability for three isolates regarding incubation time. Different features were studied for three biodegrading bacterial strains and identified as *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus*. Remarkable degradation rate % patterns for hydrocarbons residual were recorded for all three isolates with varied.

© 2018 The Author. Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of King Saud University. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Petroleum (crude) oil are compounded of thousands compounds mixture. 50–98% of crude oil is Petroleum hydrocarbons which considered a major component depending on the source of the oil. Different microorganisms could be applied for Petroleum hydrocarbons biodegradation. However, bacteria considered important biodegradable microorganisms which play a critical role in hydrocarbon degradation (Udgire et al., 2015).

One of the initiative efficient, economical and environmental treatment mechanisms for petroleum biodegradation is In situ biodegradation through degrade petroleum and other hydrocarbons from culture via widely distributed microorganisms and

applied for varied hydrocarbon-contaminated soils and waters (Margesin and Schinner, 1997; Whyte et al., 1997). Thus, continuous evaluation for biodegradation rate considered a critical needed for different biodegradable microorganisms (Alquati et al., 2005). Petroleum hydrocarbons biodegradable illumination depends on the indigenous microorganisms to transform or mineralize the organic contaminants (Fig. 1). Many different factors of contaminated soil characterize influence petroleum hydrocarbons bacterial biodegradation such as pH, electrical conductivity, total nitrogen and heavy metal which are important indicators of soil quality, fertility and productivity. Eight hydrocarbon degrading bacteria were specifically detected as *Alcaligen* sp, *Bacillus* sp, *Chromobacterium* sp, *Corynebacterium* sp, *Pseudomonas* sp, *Aeromonas* sp, *Serratia* sp, and *Flavobacterium* sp. (Gayathiri et al., 2017).

Recently, many advanced molecular culture-dependent techniques (like library clone, TGGE/DGGE, LH-PCR, RISA, RT-Q-PCR, FISH, RAPD and RFLP) were developed and considered a helpful tool for isolation and identification new bacterial strains with degradation capabilities (Stancu, 2018).

Powerful points for Molecular especially, rDNA-dependent methods to identify microorganisms are rapidly, precisely and

Peer review under responsibility of King Saud University.



Production and hosting by Elsevier

E-mail address: aim19806150@gmail.com

<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.05.029>

1319-562X/© 2018 The Author. Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of King Saud University.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Etude de l'article 06 : Morphological, biochemical and molecular identification of petroleum hydrocarbons biodegradation bacteria isolated from oil polluted soil in Dhahran, Saud Arabia

A cause de l'accumulation des hydrocarbures pétroliers dans les sols et étant considérés comme un grand problème environnementale dans le royaume d'Arabie saoudite, cette dernière a appliquée des mécanismes différents pour la dégradation des hydrocarbures pétroliers, parmi ces mécanismes : un traitement biologique qui est basé sur l'application des microorganismes (Les bactéries) dit microorganismes biodégradables.

Ici nous avons étudié des échantillons de sol contaminé par le pétrole du champ pétrolifère Khurais. D'abord nous avons utilisé la technique d'enrichissement pour isoler les bactéries dégradant le pétrole brut, ensuite nous avons identifié les isolats bactériens par la caractérisation morphologique, la caractérisation biochimique et nous avons appliqué une technique moléculaire (PCR) pour la l'identification et la confirmation. En dernier lieu nous avons étudié la biodégradation de sol contaminé par le pétrole brut.

Nos résultats d'isolement de l'identification biochimique et moléculaire des souches montrent qu'il y a trois isolats bactériens et sont nommées (A, B, C), de morphologie différente et de caractéristique biochimique différente qui sont responsable de la dégradation de pétrole. Nous avons identifié la souche (A) comme *Bacillus subtilis* avec 99% d'homologie, la souche (B) comme *Pseudomonas aeruginosa* avec 100% d'homologie et la souche (C) comme *Bacillus cereus* avec 99% d'homologie. Comme nous avons évalué une augmentation de taux de dégradation des hydrocarbures par rapport à *Bacillus subtilis* de 20% jusqu'à 70%p par contre nous avons évalué une faible dégradation des hydrocarbures par rapport a *Pseudomonas aeruginosa*. Et nous avons évalué une dégradation plus élevée par rapport à *Bacillus cereus* pour une durée d'incubation variée entre les trois isolats.



Insights into the biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soils by bioaugmentation and nutrient stimulation



Ying Jiang^a, Kirsty J. Brassington^a, George Prpich^a, Graeme I. Paton^b, Kirk T. Semple^c, Simon J.T. Pollard^a, Frédéric Coulon^{a,*}

^a School of Water, Energy and Environment, Cranfield University, Cranfield, MK43 0AL, UK

^b Institute of Biological and Environmental Sciences, Cruickshank Building, University of Aberdeen, Aberdeen, Scotland, AB24 3UU, UK

^c Lancaster Environment Centre, Lancaster University, Lancaster, LA1 4YQ, UK

HIGHLIGHTS

- Improved biodegradation of weathered hydrocarbon residues.
- Nutrient addition is a key parameter for promoting biodegradation.
- Soil grinding reduced effectiveness of biostimulation.
- Reduction of petroleum hydrocarbons in soil not directly correlable to reduction in toxicity.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 April 2016
Received in revised form
8 June 2016
Accepted 10 July 2016
Available online 18 July 2016

Handling Editor: T. Cutright.

Keywords:

Soil contamination
Bioremediation
Weathered petroleum hydrocarbon
Bioaugmentation
Biostimulation

ABSTRACT

The potential for biotransformation of weathered hydrocarbon residues in soils collected from two commercial oil refinery sites (Soil A and B) was studied in microcosm experiments. Soil A has previously been subjected to on-site bioremediation and it was believed that no further degradation was possible while soil B has not been subjected to any treatment. A number of amendment strategies including bioaugmentation with hydrocarbon degrader, biostimulation with nutrients and soil grinding, were applied to the microcosms as putative biodegradation improvement strategies. The hydrocarbon concentrations in each amendment group were monitored throughout 112 days incubation. Microcosms treated with biostimulation (BS) and biostimulation/bioaugmentation (BS + BA) showed the most significant reductions in the aliphatic and aromatic hydrocarbon fractions. However, soil grinding was shown to reduce the effectiveness of a nutrient treatment on the extent of biotransformation by up to 25% and 20% for the aliphatic and aromatic hydrocarbon fractions, respectively. This is likely due to the disruption to the indigenous microbial community in the soil caused by grinding. Further, ecotoxicological responses (mustard seed germination and Microtox assays) showed that a reduction of total petroleum hydrocarbon (TPH) concentration in soil was not directly correlable to reduction in toxicity; thus monitoring TPH alone is not sufficient for assessing the environmental risk of a contaminated site after remediation.

© 2016 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Land contamination from poor historical industrial practices or incidents is a widespread and well recognised environmental issue. In the UK alone, it has been estimated that ca. 300,000 ha of land could be affected by industrial activity leading to contamination

(Environment Agency, 2009). Petroleum hydrocarbons are one the most common contaminant, though a wide range of chemicals may be present (Towell et al., 2011). Once released into the environment, petroleum hydrocarbons are subject to abiotic and biotic weathering reactions e.g. physical and biochemical transformations, interactions with soils, that will change their composition and will influence their fate and biodegradation (Brassington et al., 2007; Stroud et al., 2007; Maletić et al., 2011). The extent of these transformations will vary according to the type of petroleum products present, the soil conditions (e.g. organic

* Corresponding author.

E-mail address: f.coulon@cranfield.ac.uk (F. Coulon).

Etude de l'article 07 : Insights into the biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soils by bioaugmentation and nutrient

Grace aux hydrocarbures pétroliers qui sont l'un des contaminants environnementaux dû aux activités Industrielle, les sols sont exposés à l'altération (modification de leur composition physique et chimique). La biotransformation est la méthode la plus durable pour réduire la toxicité résiduelle des hydrocarbures dans le sol y compris la bioaugmentation et la biostimulation.

Ici nous avons étudié des échantillons de deux sols différents (A et B) dans deux sites commerciaux de raffinerie de pétrole situés au Royaume-Uni, nous avons caractériser physiquement et chimiquement les deux échantillons de sols, l'un a déjà été soumis à une biorestauration sur place et l'autre n'a été soumis à aucun traitement. Nous avons appliqué un certain nombre de stratégies d'amélioration de la biodégradation aux microcosmes y compris la surveillance de la concentration des hydrocarbures, l'analyse de la distribution des hydrocarbures pétroliers dans le sol et l'évaluation de la écotoxicologie du sol pendant la durée de 112 jours.

Nos résultats montrent que la concentration des hydrocarbures dans le sol A été à 22 700 mg kg⁻¹ et pour le Sol B à 31 500 mg kg⁻¹, Les deux valeurs indiquent que les deux sols contenaient des concentrations élevées d'hydrocarbures pétroliers. EN se référant aux expériences sur microcosmes le sol A a donné une fréquence respiratoire inférieur (<200 mg CO₂ kg) et le sol B une fréquence de (~ 275 mg CO₂ kg) , les deux valeurs indiquent que le sol B est plus contaminé que le sol A , nous avons observé aussi une distribution deux fois plus élevée (13 800 mg kg⁻¹)des hydrocarbures aliphatique dans le sol A que dans le sol B et pour hydrocarbures aromatique ils étaient 100 fois plus élevé dans le sol B que dans le sol A. Nous avons évalué une réduction de 50% dans la toxicité pour le sol A et une réduction de 40% pour le sol B après traitement. Nos résultats suggèrent qu'il n'y a pas de corrélation directe entre une diminution totale des hydrocarbures et une réduction de la toxicité. Car il existe plusieurs Causes y compris la modification de la biodisponibilité des hydrocarbures, traitement de biorestauration, interactions complexes sol-contaminant.

CONCLUSION

Le pétrole se présente comme un mélange complexe d'hydrocarbures. Sa dégradation implique une microflore diversifiée du fait de la spécificité des fonctions déprédatives.

Malheureusement à cause des événements récents concernant la pandémie mondiale (COVID 19) le travail s'est porté sur des études d'articles similaires au thème.

RÉFÉRENCE

BIBLIOGRAPHIQUE

ABI AYAD L. (2016). Etude expérimentale et statistique du dépôt spatiotemporel de métaux dans le milieu marin. Cas de la cote dessalage du littoral ouest d'Algérie. Thèse de doctorat. Université Abou-Beker Belkaid de Tlemcen, Tlemcen, Algérie. Page : 9-12.

AI SAAB D. (2007). Etude de la production et de la migration des hydrocarbures dans le bassin du Donets en Ukraine (Aspect économiques et exploitation). Thèse de doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy-I, Nancy, France. Page : 62.

ALBAKJAJI M. (2011). La pollution de la mer Méditerranée par les hydrocarbures liée au trafic maritime .Thèse de doctorat. Université Paris-Est, Paris, France. Page : 22-27.

BADO-NILLE A. (2008). Effets de pollutions par hydrocarbures sur les capacités de défense d'organismes marins. Thèse de doctorat. Université de la Rochelle U.F.R de science et technologie, La Rochelle, France. Page : 8.

BENCHOUK A. (2017). Bioremédiation des sols pollués de pétrole par les microorganismes indigènes et amélioration génétique de leur pouvoir .Thèse de doctorat. Université de Mostaganem des sciences de la nature et de la vie, Mostaganem, Algérie. Page : 7-11.

BOUDERHEM A. (2011). Utilisation des souches bactériennes telluriques autochtones dans la biodétection et la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures. Mémoire de Magistère. Université Kasdi Merbah, Ouaregla, Algérie. Page : 12.

Braud J-C. et André J. (2017). Actualisation des outils de modélisation de propagation des pollutions par hydrocarbures .Mémoire de formations spécialisées. Ecole nationale supérieure des officiers de Sapeurs-Pompiers, France. Page : 10-11.

BRITTON L. (1984). Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. In: Gibson, T.D. (Ed.), Microbial,degradation of organic compounds, pp. 89-129. Marcel Dekker, New York, Basel.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. 2015. Hydrocarbures pétroliers : caractéristiques, devenir et criminalistique environnementale – Études GENV222 et GENV23, Évaluation environnementale stratégique globale sur les hydrocarbures. Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, 41 p. et annexes.

COLOMBANO S., SAADA A., VICTOIRE E., GUERIN V., ZORING V., AMALRIC L., BLESSING M., WIDORY D., HUDE D. et BLANC C. avec la collaboration de **HONNARDO J-C. et GASSIAT C.** (2014). Nature des produits pétroliers et origines du vieillissement : tentative de l'identification de la source via la prise en compte des impacts et l'analyse de l'âge approximatif des déversements. Rapport final. Rapport BRGM RP-64174-FR, 163 p., 62 fig., 33 tabl.

COTTINET D. (2013). Diversité phénotypique et adaptation chez *Escherichia coli* étudiées en millifluidique digitale. Thèse de doctorat. Université de Pierre et Marie Curie, Paris, France. Page : 21.

DAKE L.P. (1978). Fundamentals of reservoir engineering; developments in petroleum science. First Edition. Elsevier science B.V.

DAS N. et CHANDRAN P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants : An Overview. *Biotechnology Research International*. 2011 : 1-13. DOI:10.4061/2011/941810.

FAHAD A. et AL-DHABAAN. (2019). Morphological, biochemical and molecular identification of petroleum hydrocarbons biodegradation bacteria isolated from oil polluted soil in Dhahran. *Saud Arabia. Saudi journal of Biological Science*. 26 : 1247-1252

FOKOU MBOGNE P.M. (2017). Biodégradation augmentée de sols contaminés aux hydrocarbures lourds par ajout des substrats organiques. Mémoire de la maîtrise avec mémoire en génie de l'environnement. Université du Québec à l'école de technologie supérieure, Québec, Canada. Page : 1-15.

GABET S. (2004). Remobilisation d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. Thèse de doctorat de l'université de Limoges, France. Page : 177.

GASPERI J. (2006). Introduction et transfert des hydrocarbures à différentes échelles spatiales dans le réseau d'assainissement parisien. Thèse de doctorat. Ecole national des Ponts et Chaussées, Marne-la-Vallée, France. Page : 18.

GAUTIER C. (2007). Biodégradation des hydrocarbures en milieu poreux insaturé .Thèse de doctorat. Université de Pau et des pays de L'Adour, France. Page : 40-41.

GIBSON T.D. et SUBRAMANIAN V. (1984). Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In: Gibson, T.D. (Ed.), *Microbial degradation of organic compounds*, pp. 181-252. Marcel Dekker, New York, Basel.

HARMSSEN J. et RIETRA R.P.J.J. (2018). 25 years monitoring of PAHs and petroleum hydrocarbons biodegradation in soil. *Chemosphere*. 207 : 229-238.

JIANG Y., BRASSINGTON J.K., PRPICH G., PATON G.I., SEMPLE K.T., POLLARD S.J.T. et COULON F. (2016). Insights into the biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soils by bioaugmentation and nutrient stimulation. *Chemosphere*. 161 : 300-307.

JOUANNIN F. (2004). Etude de la mobilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) contenus dans un sol industriel pollué. Thèse de doctorat. L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Lyon, France. Page : 27.

KADRIT., MAGDOULIS., ROUISSI T. et KAUR BRAR S. (2018). Ex-situ biodegradation of petroleum hydrocarbons using *Alcanivorax borkumensis* enzymes. *Biochemical Engineering Journal*. 132 : 279-287.

KUMAR B.L. et GOPAL SAI D. V. R. (2015). Effective role of indigenous microorganisms for sustainable environment. *Biotech*. 5: 867–876. DOI 10.1007/s13205-015-0293-6

LAXALDE J. (2012). Analyse des produits lourds du pétrole par spectroscopie infrarouge. Thèse de doctorat. Université de Lille 1-Science et Technologie, Lille, France. Page : 22.

LE GENTIL E. (2009). Pollution par les hydrocarbures en Manche et golfe de Gascogne. Risques et prévention entre 1960 et 2004. Université de Bretagne Occidentale-Science de la mer, Brest, France. Page : 27.

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

MARILES HAHNI (2009). Caractérisation de la contamination des Berges des rivières Saint-François et Massaw par des hydrocarbures pétroliers et métaux lourds (Sud du Québec, Canada). Exigence partielle de la maîtrise en science et environnement. Université du Québec, Québec, Canada. Page : 4.

MONTEIL L. (2008-2009). L'évolution de la répression pénale de la pollution maritime par hydrocarbures. Mémoire Master II de droit maritime et des transports, sous la direction de

Monsieur SCAPEL Christian, centre de droit maritime et des transports. Faculté du droit et de science politique d'Aix-Marseille. Université de droit, d'économie et des sciences d'AixMarseille, AixMarseille, France. Page : 8.

NGUYEN T.K.M. (2018). Evaluation de sondes en continu pour la détection rapide d'hydrocarbures dans l'eau brute. Mémoire de Maitrise des sciences appliquées (Génie Civil). Ecole polytechnique de Montréal, Montréal, Canada. Page : 15.

NOEL C. (2014). Suivi de la biodégradation des hydrocarbures par couplage des mesures géophysiques électriques du sol (polarisation provoquée) et des analyses des gaz (concentration du CO₂ et isotopie du Carbone) .Thèse de doctorat. Université d'Orléans, Orléans, France. Page : 21-33.

PRINCE R.C., NASH G.W. et HILL S.J. (2016). The biodegradation of crude oil in the deep ocean. *Marine Pollution Bulletin*. 111 : 354-357.

RHBAL H., SOUABI S., SAFI M., TERTA M., ARAD M., ANOUZLA A. et HAFIDI M. (2020). Décontamination des sols pollués par les hydrocarbures. *Chemistry et Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*. 21 (1) : 001-016.

ROUIDI S. (2014). Evaluation de la contamination par les hydrocarbures des sédiments superficiels (fluviaux et marins) de la région de Skikda (nord-est algérien). Analyse statistiques. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie. Page : 1-15.

SAURET C. (2011). Ecologie des communautés bactériennes marines soumises à une pollution pétrolière influence des facteurs environnementaux, de la prédation et de la récurrence des pollutions. Thèse de doctorat. Université de Pierre et Marie Curie, Paris, France. Page : 1-31.

SWISTEK M. (1992). Caractérisation et valorisation de résidus hydrocarbonés lourds charbonniers et pétroliers. Thèse de doctorat. Université de Metz, Metz, France. Page : 25.

TIWARI B., MANICKAM N., KUMARI S. et TIWARI A. (2016). Biodegradation and dissolution of polyaromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas* sp. *Bioresource Technology*. 216 : 1102-1105.

VERDIN A., LOUNES-HADJ SAHRAOUI A. et DURAND R. (2004). Les agents de la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures polycycliques aromatiques. *Déchets-Revue Francophone d'Ecologie industrielle*, n°36-4°

