

République Algérienne Démocratique et Populaire

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



جامعة عبد الحميد ابن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

HARRAT Marwa

&

AZROUG Nebia

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: Microbiologie fondamentale

THÈME

Etude de l'activité hydrocarbonolaste chez
pseudomonas sp (isolement et pré-identification)

Soutenue publiquement le : 11/07/2019

DEVANT LE JURY

Présidente :	LAISSOUF Ahlem	MCB	(Université de Mostaganem)
Examineur:	BENALI Sid Ahmed	MAA	(Université de Mostaganem)
Encadreur :	CHIALI Fatima Zohra	MCB	(Université de Mostaganem)

Année universitaire : 2018-2019

Remerciement



En premier lieu, nous remercions le bon DIEU, notre créateur, pour la force, le courage et la patience qu'il nous a offert afin d'accomplir ce travail.

Nous adressons nos profonds remerciements à notre promoteur Mm chiali fatima zohra pour son aide et ses conseils durant la réalisation de ce projet.

Nous remercions tout le personnel de la RA1Z, du service exploitation de l'unité 1800 et de la zone 27 en particulier,

Enfin, nos remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail dans les meilleures conditions.

Marwa et Nebia

Dédicace



J'ai toujours pensé faire où offrir quelque chose à mes parents en signe de reconnaissance pour tout ce qu'ils ont consenti des efforts rien que pour me voir réussir, et voilà, l'occasion est venue.



A ceux qui m'ont donné la vie, symbole de beauté et de fierté, de sagesse et de patience.

A ceux qui sont la source de mon inspiration et de mon courage, à qui je dois de l'amour et la reconnaissance.

A ma chère mère et mon cher père.

A mes sœurs et mes frères.

Mes neveux et mes nièces

A mes beaux frères.

A toute ma famille.

A tous mes chers amis

A ma binôme Nebia.

A tous les enseignants

qui ont contribué à ma formation tout au long de ma vie d'étudiante.



Et enfin à tous ceux qui me connaissent.



Harrat Marwa

Dédicace



Ce modeste travail est spécialement dédié à :

Mes chers parents la lumière de ma vie , que Dieu les protège

Mon chère mari Zohir

Et tous Mes frères et mes sœurs

Mes neveux et mes nièces

Et à Toute la famille Azroug

Mes amie

A mon binôme Marwa

Tous les enseignants qui ont contribué de près ou de loin à

la réussite de ma cursus de formation

Et enfin à tous ceux qui me connaissent.



Azroug Nebia

Liste des abréviations

ADN : Acide Desoxyribonucleique.
API : Appareillage et Procédé d'Identification
ARN : Acide Ribonucleique.
ATP : Adenosine triphosphate.
BN : Bouillon nutritif
BTEX : benzène, toluène, éthylbenzène et xylènes
C/N : concentration de nombre.
C/P : concentration de produit.
C° : Degré Celsius
D : Diamètre
DBO5 : demande biochimique en oxygène en 5 jours.
DCO : demande chimique en oxygène.
DO : Densité optique
G, mg : Gramme , milligramme.
GN : Gélose nutritive
h, min, s : heure, minute, seconde.
H₂O₂ : Le peroxyde d'hydrogène
HAM : les hydrocarbures aromatiques monocycliques (HCB)
HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
IGF : introduoce gaz floction .
IGF : introduoce gaz floction
LDC : Lysine décarboxylase
MES : matière en suspension
N, P, K : azote, phosphate, potasiume.
ODC :Ornithine décarboxylase
pH: Potentiel Hydrogène
ppm : Partie par million

RM : Rouge de méthyle

Sp : Espèce non précisée .

T : Température

T.S.I: Triple Sugar Iron agar

UFC : Unité formant colonie

UV: ultra-violet

VF : viande foie

VP : Voges-proskauer

Liste des figures

Figure 1 : Composés hydrocarbonés et non hydrocarbonés présents dans le pétrole brut.....	5
Figure 2 : Représentation des méthodologies chimiques et biologiques permettant d'évaluer les risques écotoxicologiques.....	6
Figure 3 : Diagramme conceptuel des processus physiques et écologiques qui surviennent après un déversement d'hydrocarbures pétroliers dans les eaux de surface.....	8
Figure 4 : communauté microbienne impliquée dans la biodégradation des hydrocarbures pétroliers.....	10
Figure 5 : principe simplifié de la biodégradation aérobie des hydrocarbures.....	15
Figure 6 : Mécanismes d'accession des microorganismes aux hydrocarbures.....	19
Figure 7 : Dégradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by aerobic bacteria. Subterm. ox.: subterminal oxidation. Term. ox.: terminal oxidation. Ortho: ortho cleavage pathway. Meta: meta cleavage patway. CoA: coenzyme A.....	20
Figure 8 : Carte géographique de la localisation de la raffinerie d'Arzew dans la zone industrielle et son voisinage.....	29
Figure 9 : Méthode de dilutions décimales.....	32
Figure 10 : Teste de biodégradation.....	35
Figure11 : Détermination du type respiratoire.....	37
Figure12 : Réaction d'hydrolyse de l'ONPG.....	39
Figure 13 : API 20 E avant inoculation.....	42
Figure 14 : Schéma représentative de la Stratégie minimisé de traitement biologique.....	43
Figure 15 : D.C.O mètre.....	44
Figure 16 : D.B.O mètre.....	45
Figure17 : Appareille HORRIBA OCMA 310 (a) solvant HORIBA (b).....	46
Figure 18 : Les boites de dilution.....	47
Figure 19 : variation de la D.O en fonction du temps.....	48
Figure20 : variation de la D.O en fonction du temps.....	48
Figure21 : variation de la D.O en fonction du temps.....	40
Figure22 : variation de la D.O en fonction du temps.....	49
Figure 23 : La réalisation d'une comparaison graphique pour le bon choix d'isolat la ou les plus performante.....	50
Figure 24 : Aspect macroscopique des isolats (A- Isolat 1, B – Isolat 2).....	50
Figure25 : Aspect microscopique (Coloration de Gram) objectif 100X (A-Isolat1, B- isolat2).....	51

Figure 26 : Croissance sur King A.....	52
Figure 27 : Croissance sur King B.....	53
Figure 28 : Croissance sur GN.....	53
Figure 29 : Croissance sur différent températures.....	54
Figure 30 : Teste catalase. (Isolat 1 et Isolat 2).....	55
Figure 31 : Milieu VF.....	55
Figure 32: Milieu TSI.....	56
Figure 33: Milieu Citrate de Simmons (isolat 1 et isolat 2).....	57
Figure 34 : Milieu Mannitol Mobilité (isolat 1 et isolat 2).....	57
Figure 35 : Milieu Clark et Lubs (VP) (isolat 1).	58
Figure 36 : Milieu Clark et Lubs (RM) (isolat 2).....	58
Figure 37 : Milieu Urée-Indole (isolat 1 et isolat 2).....	59
Figure 38 : Milieu gélatine (isolat 1).....	60
Figure 39 : Milieu gélatine (isolat 2).....	60

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux genres bactériens dégradants isolés à partir des sites contaminé.....	12
Tableau 2 : rapport de biodégradabilité K.....	16
Tableau 3 : Les facteurs affectant la biodégradation des hydrocarbures pétroliers.....	18
Tableau 4 : Quelques biosurfactants et les micro-organismes qui les produisent.....	22
Tableau 5 : méthodes disponibles pour le traitement des eaux contaminé par des produits pétroliers.....	27
Tableau 6 : Les caractéristiques principales des rejets liquides de l'unité de traitement des effluents pour décharges vers la mer.....	30
Tableau 7 : Nombre des microorganismes en UFC/g.....	47
Tableau 8 : Aspect macroscopique des isolats (1 et 2).....	51
Tableau 9 : Aspect macroscopique et microscopique des isolats (1 et 2).....	52
Tableau 10 : Les résultats de la galerie biochimique classique.....	61
Tableau 11 : Mesure du pH à l'entrée et à la Sortie de bac.....	63
Tableau 12 : Mesure de la DCO en (ppm) à L'entrée et à la Sortie de la Station.....	64
Tableau 13 : Mesure de DBO ₅ en (ppm) à L'entrée et à la Sortie de la Station.....	64
Tableau 14 : Mesure de la Teneur en Hydrocarbures en (ppm) à L'entrée et à la Sortie de la Station.....	65

Listes des annexes

Annexe 1 : Composition des milieux de culture

Annexe 2 : Coloration de Gram

Etat frais

Annexe 3 : La galerie API20 E

Annexe 4 : La mesure du Potentielle d'Hydrogène

Demande chimique En Oxygène (D.C.O)

Demande Biochimique En Oxygène (D.B.O)

Détermination de la teneur en hydrocarbures (H.C) dans l'eau

Annexe 5 : Tests des bactéries susceptibles de dégradation des hydrocarbures

Table des matières

Remerciement	
Dédicace	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des annexes	
Introduction.....	1
Partie 1 : état actuelle sur le sujet	
1 Les hydrocarbures pétrolier	3
1.1 Origine	3
1.2 Définition et Classification	3
1.2.1 Hydrocarbures saturés	4
1.2.2 Hydrocarbures aromatiques.....	4
1.2.3 Composés polaires.....	4
1.2.4 Asphaltènes	4
1.3 Pollution de l'environnement par les hydrocarbures et leur impact.....	5
1.4 Moyens d'évaluation de la pollution par les hydrocarbures et de son impact sur l'environnement.....	6
1.5 Comportement des hydrocarbures pétroliers dans l'eau de surface	6
1.6 Potentiel toxique des hydrocarbures	9
2 La biodégradation	10
2.1 Biodégradation et métabolismes.....	10
2.2 La biodégradation	11
2.3 Adaptation des bactéries hydrocarbonoclastes (HCB) aux hydrocarbures.....	11
2.4 Diversité des bactéries hydrocabonolastes	11
2.5 Biodégradation aérobie des hydrocarbures pétroliers par des souches bactériennes ...	13
2.5.1 Rôle des protéobactéries dans la dégradation des hydrocarbures	13
2.6 Les principales méthodes utilisées dans la bioremédiation	16
2.6.1 La bioaugmentation.....	16
2.6.2 La biostimulation.....	16
2.6.3 Rapport de biodégradabilité	16
2.7 Facteurs physiques et chimiques affectant la biodégradation	17
2.8 Le mécanisme de biodégradation des hydrocarbures	19

2.9	Les bio-surfactants.....	21
2.9.1	Biosynthèse et rôle physiologique.....	21
3	Définition de la pollution.....	23
3.1	Pollution des eaux naturelles.....	23
3.2	Différentes origines de pollution.....	23
3.2.1	Origine industrielle.....	23
3.3	Les eaux de production.....	24
3.3.1	Définition.....	24
3.3.2	L'impotence de l'eau dans les procédés de raffinage pétrolier.....	24
3.3.3	Stockage d' Eau des procédés.....	26
3.3.4	Le contenu d'eau de procédé.....	26
4	Traitement des eaux usées résiduares industrielles.....	27
4.1	Le traitement des eaux de procédé.....	27
4.1.1	Traitement Physique.....	28
4.1.2	Traitement primaire.....	28
4.2	Traitement Chimique.....	28
4.2.1	La coagulation :.....	28
4.2.2	La flottation :.....	28
4.3	Traitement secondaire.....	28
4.3.1	Le procédé biologique.....	28

Partie 2 : matériel et méthodes

1	Localisation de la raffinerie d'Arzew dans la zone industrielle.....	29
1.1	Présentation de la Zone 27.....	29
1.1.1	Caractéristiques des rejets (liquides).....	30
2	Échantillonnage.....	30
2.1	Transport des échantillons.....	31
2.2	Enrichissement.....	31
2.3	Isolement.....	31
2.4	La méthode de la dilution décimale.....	31
2.5	Dénombrement de la microflore totale.....	32
2.5.1	Préparation de la solution mère.....	32
2.5.2	Ensemencement par étalement sur gélose nutritive.....	33
2.6	Purification.....	33

2.6.1	Conservation des souches isolées.....	33
2.6.2	Activation des souches	34
2.7	Pré-identification des souches purifiées	34
2.7.1	Teste de biodégradation	34
2.8	Caractérisation des isolats purifiés	35
2.8.1	La croissance sur les milieux King A, King B et GN	35
2.9	Etude morphologique	36
2.9.1	Aspect macroscopique.....	36
2.9.2	Aspect microscopique	36
2.10	Identification biochimique.....	37
2.10.1	L'étude de métabolisme respiratoire	37
2.10.2	Type respiratoire	37
2.10.3	Le métabolisme glucidique	38
2.10.4	Le métabolisme protéique	40
2.10.5	Galerie Api 20e	41
3	Application des isolats 1 et 2 pour l'épuration (traitement biologique) d'eau de procédés de raffinage pétrolier à échelle pilot.....	42
3.1	Échantillonnage	42
3.2	Analyse des échantillons	44
3.2.1	Mesure de potentiel d'Hydrocarbures	44
3.2.2	Demande chimique en oxygène (D.C.O)	44
3.2.3	Demande biochimique en oxygène (D.B.O)	45
3.2.4	Dosage des hydrocarbures totaux.....	46
Partie 3 : résultats et interprétation		
1	Pré-identification des souches purifiées.....	47
1.1	Dénombrement de la microflore totale.....	47
1.2	Tests des bactéries susceptibles de dégradation des hydrocarbures	48
2	Etude morphologique.....	50
2.1	Aspect macroscopique	50
2.2	Aspect microscopique.....	51
2.2.1	Coloration de Gram.....	51
3	Identification biochimique	52
3.1	Croissance sur différent milieux.....	52

3.2L'étude de métabolisme respiratoire.....	53
3.1 Le métabolisme glucidique.....	55
3.2 Le métabolisme protéique	
4 Application des isolats 1 et 2 pour l'épuration (traitement biologique) d'eau de procédés de raffinage pétrolier à échelle pilot.....	62
4.1 Résultats de mesure de potentielle d'Hydrogène	62
4.2 Détermination de la Demande Chimique en Oxygène (DCO)	63
4.3 Détermination de la Demande Biochimique en Oxygène (DBO ₅).....	64
4.4 Détermination de la Teneur en Hydrocarbures (H.C) dans L'eau.....	65
Discussion	66
Conclusion et perspectives	69
Références bibliographiques.....	70
Annexes	
Résumer	

Introduction

Introduction

L'industrie pétrolière est un ensemble des activités qui effectuent plusieurs opérations tels que : le forage, l'extraction, la transportation, le raffinage et la distribution du pétrole. L'industrie pétrolière s'occupe de la chaîne industrielle du pétrole, du gisement jusqu'au consommateur. En réalité, on extrait du pétrole brut (crue oil) et on consomme des produits pétroliers tels que, l'essence, gaz oil, fuel oil, etc. Mais l'industrie pétrolière est en partie à l'origine de quelques problèmes environnementaux dans différentes régions du monde. Par exemple, certaines multinationales pétrolières appauvrissent des régions entières et touchent l'écosystème des régions. La pollution causée par l'industrie pétrolière est due aux différentes opérations, tel que, le forage, la production et le raffinage du pétrole. Les rejets pétroliers sont dus aussi à la composition chimique du pétrole (**Sims et Overcash, 1983 ; Bossert et al., 1984 ; Deziel, 1997**).

Lorsque 'un site est considéré comme étant contaminé par les hydrocarbures, il existe plusieurs technologies disponibles pour le remédier. La biodégradation est basée sur les capacités enzymatiques de certains microorganismes à activité hydrocarbonolaste, l'avantage d'être économique, plus convenable pour la nature et mieux acceptée par l'environnement que les procédés physico-chimiques. Très efficace pour la dépollution (**Sims et Overcash, 1983 ; Bossert et al., 1984 ; Deziel, 1997**).

L'utilisation de méthodes biologiques dans la dépollution des zones contaminées par les hydrocarbures se basant sur le phénomène de la biodégradation par les microorganismes appelés Hydrocarbonoclaste a été mise en évidence dès 1946 par ZoBell. Depuis cette date le nombre d'espèces bactériennes identifiées possédant cette propriété n'a cessé d'augmenter (**Soltani, 2004**).

Les hydrocarbures présentent deux principales voies de dégradation : la dégradation physico-chimique (photo-oxydation) et la dégradation biologique (**Bomboi et Hernandez, 1991 ; Bouloubassi et Saliot, 1993**).

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

Microorganismes aptes à biodégrader les hydrocarbures Ils proviennent de milieux très variés et peuvent vivre dans des conditions extrêmes : des températures en dessous de 0°C ou

Introduction

au contraire, très élevées, dans des milieux mondés ou en plein désert, en présence d'un excès d'oxygène ou milieu anaérobie. En raison de leur pouvoir d'adaptation.

Ces microorganismes sont utilisés pour éliminer les composés xénobiotique. L'existence d'organismes susceptibles de métaboliser les hydrocarbures a été signalée dès le début du 20ème siècle par Sohgen (Gatellier, 1970). Les bactéries sont des acteurs essentiels dans le recyclage des composés organiques de toutes natures, contribuant ainsi à la biodégradation d'une foule de substances utilisées comme source d'énergie ou comme source de carbone directement assimilable par les cellules (**Pelmont, 1995**).

L'objectif de ce travail est d'apporter un plus dans la lutte biologique contre la pollution pas les hydrocarbures pétroliers par la mise en évidence de bactéries indigènes à activité hydrocabonolaste. et l'application de ces dernier à l'échelle pilot dans le but de la biodégradation des eaux de raffinage pétrolier.

1 Les hydrocarbures pétrolier

Les pétroles bruts sont des mélanges extrêmement complexes d'hydrocarbures et de composés non-hydrocarbonés (**Lefebvre, 1978**).

Les hydrocarbures, au sens chimique du terme, sont des composés organiques exclusivement constitués d'hydrogène et de carbone, associés sous la forme de molécules d'une grande diversité, de la plus simple, le méthane, constituant principal du gaz naturel, aux plus complexes que l'on trouve dans les fractions lourdes des pétroles bruts et dans les schistes bitumineux (**Vandecasteele, 2005**).

Les hydrocarbures font partie de la vie quotidienne, ils sont présents de façon ubiquiste dans l'environnement en raison de la multiplicité de leurs origines à la fois naturelles et anthropiques (**Volkman et al., 1992 ; Commendatore et al., 2004**).

1.1 Origine

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

1.2 Définition et Classification

Les hydrocarbures constituent la fraction la plus importante d'un brut pétrolier, ils représentent entre 65 et 95 % de la plupart des pétroles bruts. Les composés pétroliers peuvent être classés en quatre familles principales qui sont présentes en proportions variables selon l'origine : les hydrocarbures saturés (30 à 70 %), les hydrocarbures aromatiques et poly-aromatiques (20 à 40 %), les composés polaires (5 à 25 %) et les asphaltes (0 à 10 %) (**Soltani, 2004**).

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

1.2.1 Hydrocarbures saturés

On distingue les alcanes linéaires, les alcanes ramifiés et les cycloalcanes. Ils sont la famille des molécules composées uniquement de carbone et d'hydrogène. On distingue généralement les molécules linaires et ramifiées (alcanes) des molécules cycliques (cyclanes).

Dans l'environnement, les alcanes présentent une stabilité assez élevée, surtout les alcanes ramifiés dont le carbone tertiaire ou quaternaire conduit à une certaine récalcitrance vis-à-vis des micro-organismes. Cependant, grâce à leur faible solubilité et leur tendance à se lier à la phase solide du fait de leur hydrophobicité, les alcanes ne se trouveront qu'en faible quantité dans la phase aqueuse et seront stabilisés dans les sédiments de l'aquifère. (**Persaud et collab., 1993; Swartz, 1999; USEPA, 2003**).

1.2.2 Hydrocarbures aromatiques

Sont moins abondants que les alcanes, et ne représentent que 10 à 30% des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier. Les hydrocarbures aromatiques sont répartis en deux familles d'hydrocarbures insaturés : les hydrocarbures aromatiques monocycliques (HAM), tels que les BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène, xylènes), et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Le fluorène et le benzo(a)pyrène sont des exemples d'HAP. Les HAP sont reconnus comme étant toxiques pour les organismes aquatiques et plusieurs pays ont établi des critères de qualité des sédiments pour ces derniers (**Persaud et collab., 1993; Swartz, 1999; USEPA, 2003**).

1.2.3 Composés polaires

Ça correspond à des molécules hétérocycliques, Ce sont, en général, des constituants mineurs d'un pétrole brut (**Lefebvre, 1978**). à l'exception des pétroles très lourds ; les dérivés soufrés sont dans la plupart des cas plus abondants que les composés oxygénés ou azotés (**Bertrand et al., 1989**).

- Composés azotés : pyridines, quinoléines,....
- Composés soufrés : mercaptans, sulfures, disulfures,...
- Composés oxygénés : phénols, acides carboxyliques, alcools, aldéhydes. (**Soltani, 2004**).

1.2.4 Asphaltènes

Les asphaltènes regroupent dans une classe des composés de hauts poids moléculaires, insolubles dans le pentane ou l'hexane. Leur structure est mal connue à cause de leur composition chimique complexe (**Bianchi et al., 1988**).

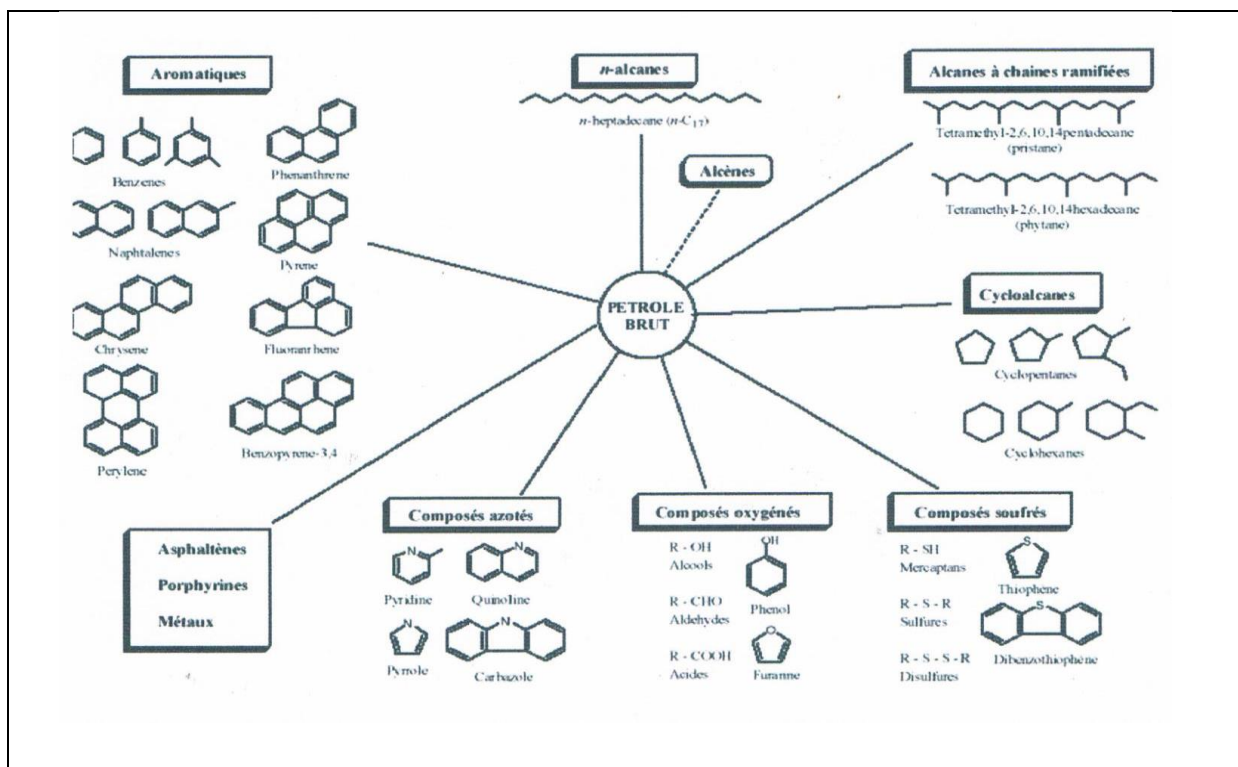


Figure 1. Composés hydrocarbonés et non hydrocarbonés présents dans le pétrole brut (Bianchi et al., 1988).

1.3 Pollution de l'environnement par les hydrocarbures et leur impact

La notion de la pollution est toute relative. On peut considérer qu'il y a pollution par les hydrocarbures lorsque l'action de ceux-ci peut être considérée comme néfaste aux conditions de vie de l'homme directement, ou indirectement, si elle affecte les populations animales et végétales qui lui sont utiles (Bertrand et Mille, 1989).

La pollution est une modification défavorable du milieu naturel (dégradation, altération) qui apparaît en totalité ou en partie comme le sous-produit de l'action humaine (Vogel et Ballerini, 2001).

Les hydrocarbures sont des contaminants environnementaux omniprésents. Ils constituent une classe des produits chimiques organiques dangereux dont certains de leurs effets toxiques sont reconnus comme fortement cancérigènes, génotoxiques, immunotoxique, mutagénique ou tératogénique. Ils représentent une menace pour la santé publique (Eriksson et al., 2003).

1.4 Moyens d'évaluation de la pollution par les hydrocarbures et de son impact sur l'environnement

Peut s'appliquer à différents niveaux d'organisation biologiques, allant de la cellule à la communauté, voire à l'écosystème (Figure 2). Elle intègre ainsi les interactions entre ses

Etat actuel sur sujet

composants et les facteurs abiotiques. Cela permet d'évaluer des effets toxiques sur des systèmes de complexité variable, selon le nombre de niveaux trophiques intégrés d'une part, et selon le degré de représentativité environnementale d'autre part, avec des conditions physico-chimiques contrôlées ou naturelles (**Boudou et Ribeyre, 1997**).

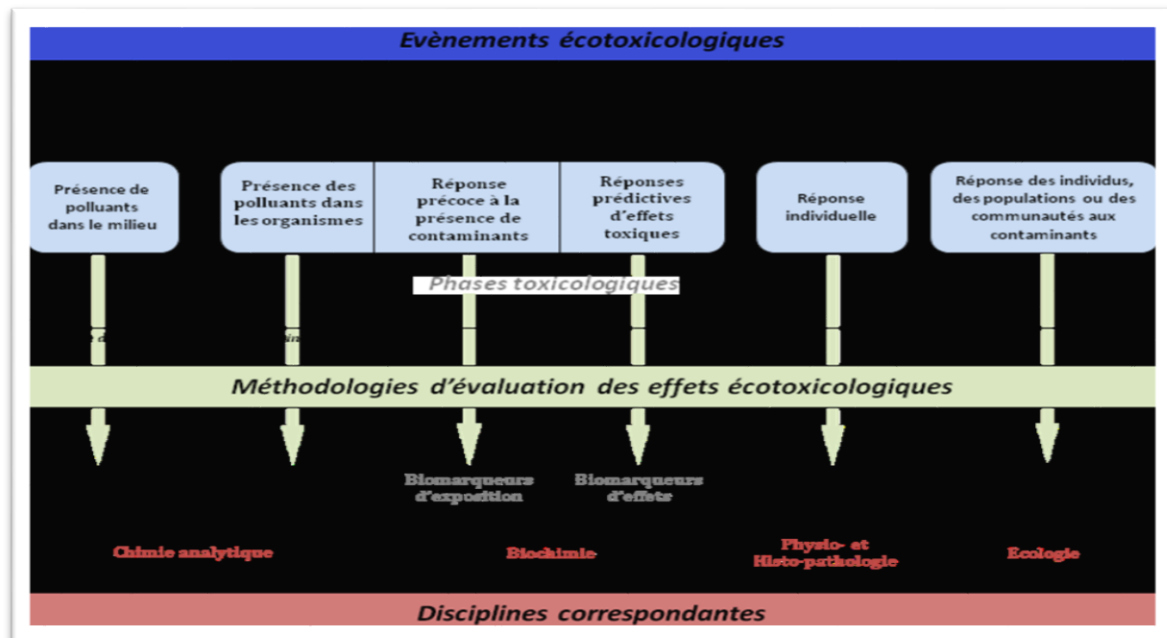


Figure 2 : Représentation des méthodologies chimiques et biologiques permettant d'évaluer les risques écotoxicologiques (modifié d'après **Lagadic et al., 1997**).

1.5 Comportement des hydrocarbures pétroliers dans l'eau de surface

À la suite d'un déversement dans le milieu aquatique, le devenir du pétrole dépend de plusieurs facteurs tels que la nature et la composition du pétrole déversé, le type de milieu (lac, rivière, fleuve, mer, océan), les conditions météorologiques, la direction du vent et des vagues, de même que la température de l'eau et de l'air. Au fil du temps, sous l'influence de facteurs physicochimiques et biologiques, les hydrocarbures pétroliers subiront des transformations qui modifieront leur composition initiale, leur répartition, leur concentration et même leur nature (**Dupuis et Ucan-Marin, 2015**). (La figure 3) illustre les processus majeurs qui affectent le comportement des hydrocarbures pétroliers à la suite d'un déversement dans les eaux de surface. Bien que ce processus n'altère pas la composition chimique des hydrocarbures, il augmente la surface de contamination et accroît les impacts potentiels des hydrocarbures sur les organismes aquatiques. Le deuxième processus majeur est l'évaporation, durant laquelle une portion importante des produits légers passe de la phase liquide à la phase gazeuse, en raison de la

Etat actuel sur sujet

volatilité élevée de ces composés. Ce processus diminue le volume des hydrocarbures dans l'eau, modifie sa composition chimique et peut affecter sa toxicité aiguë, puisque les fractions légères (C1-C8), plus rapidement biodisponibles, sont parfois considérées comme les plus toxiques (**API, 1999**). Malgré le fait que les molécules de la fraction moyenne C10-C12 soient aussi susceptibles de s'évaporer, leur taux d'évaporation est plus faible que celui des produits plus légers. Comme ils vont rester plus longtemps dans l'eau, leur toxicité chronique potentielle est plus élevée. Une température froide ou un couvert de glace vont réduire la possibilité d'évaporation rapide.

Dans un premier temps, les hydrocarbures pétroliers se répandent et se déploient à la surface de l'eau. Bien que ce processus n'altère pas la composition chimique des hydrocarbures, il augmente la surface de contamination et accroît les impacts potentiels des hydrocarbures sur les organismes aquatiques.

Le deuxième processus majeur est l'évaporation, durant laquelle une portion importante des produits légers passe de la phase liquide à la phase gazeuse, en raison de la volatilité élevée de ces composés. Ce processus diminue le volume des hydrocarbures dans l'eau, modifie sa composition chimique et peut affecter sa toxicité aiguë, puisque les fractions légères (C1-C8), plus rapidement biodisponibles, sont parfois considérées comme les plus toxiques (**API, 1999**). Malgré le fait que les molécules de la fraction moyenne C10-C12 soient aussi susceptibles de s'évaporer, leur taux d'évaporation est plus faible que celui des produits plus légers. Comme ils vont rester plus longtemps dans l'eau, leur toxicité chronique potentielle est plus élevée. Une température froide ou un couvert de glace vont réduire la possibilité d'évaporation rapide.

La dissolution est un processus en compétition avec l'évaporation parce que les produits susceptibles de se solubiliser dans la colonne d'eau ont aussi tendance à s'évaporer. Ce processus ne contribue pas de manière importante à la réduction du volume de pétrole déversé. Environ 2 à 5 % des pétroles seraient enlevés de la surface de l'eau par dissolution naturelle (**Neff, 1990**).

La baisse de la température et l'augmentation de la salinité réduisent les phénomènes de dissolution.

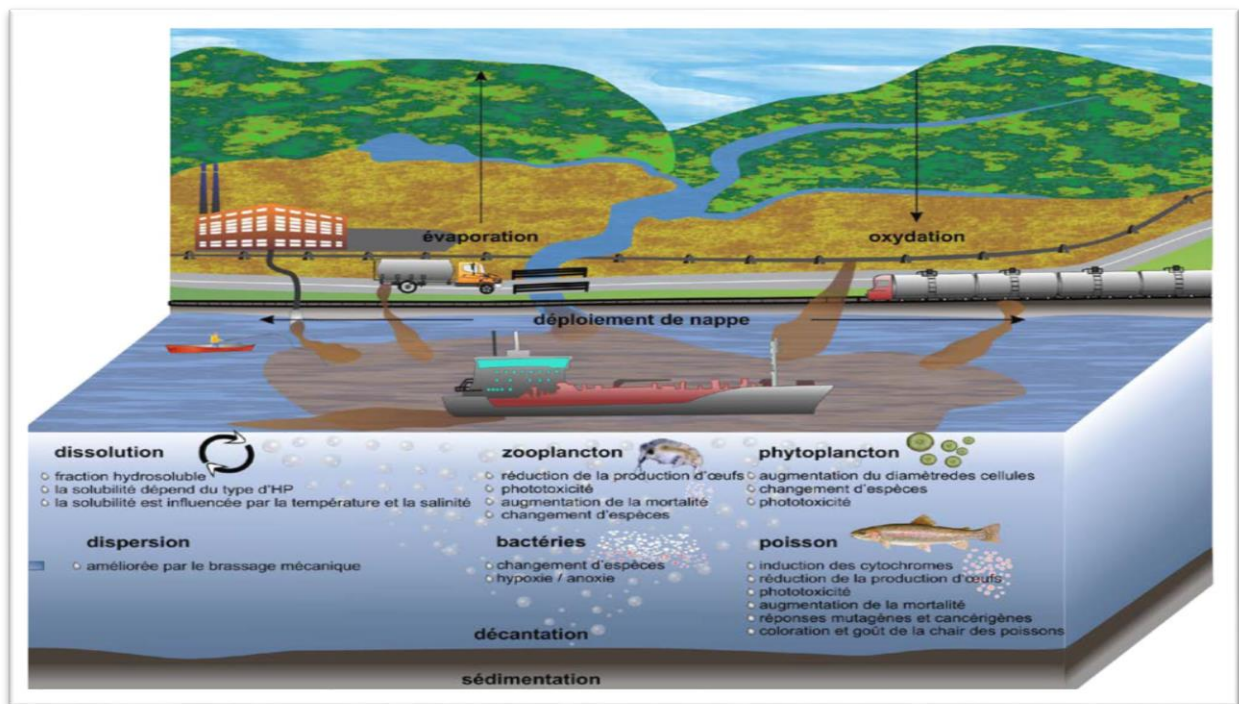


Figure 3 : diagramme conceptuel des processus physiques et écologiques qui surviennent après un déversement d'hydrocarbures pétroliers dans les eaux de surface (adapté de **perhar et arhonditsis, 2014**).

La dispersion naturelle consiste en la formation de gouttelettes d'huile qui s'incorporent dans la colonne d'eau et se présentent sous forme de suspension. Ce processus, sous l'influence du vent et des vagues, apparaît durant les premiers jours d'un déversement. Bien que la dispersion diminue le volume du pétrole à la surface de l'eau, elle n'en modifie pas les propriétés physicochimiques. La dispersion chimique effectuée à l'aide de dispersant peut réduire la quantité d'hydrocarbures en surface. Toutefois, l'utilisation de dispersants augmente l'exposition des organismes pélagiques (i. e. vivant dans la colonne d'eau) aux hydrocarbures. Les dispersants et les pétroles dispersés auraient une toxicité plus élevée que le pétrole en lui-même (**DeLeo et al., 2015**).

L'émulsification, à la différence de la dispersion qui consiste en une suspension d'huile dans l'eau, est un mélange des gouttelettes d'eau dans du pétrole en surface (émulsion d'eau dans du pétrole) qui forment un nouveau composé relativement résistant à l'évaporation et à la dissolution. Ce nouveau composé peut prendre l'apparence d'une mousse brune. Ce processus tend à augmenter le volume qu'occupe le pétrole présent dans l'environnement.

Sous l'action de la lumière, la photooxydation peut transformer chimiquement certains composés de nouvelles substances plus hydrosolubles et plus toxiques à court terme que les composés parents (**Neff, 1990**).

La photooxydation engendre aussi des produits lourds qui ne sont ni hydrosolubles ni liposolubles (Neff, 1990).

La sédimentation concerne, dans la majorité des cas, les fractions plus lourdes qui n'ont pas subi de dissolution ou d'évaporation. Ces fractions d'hydrocarbures pétroliers peuvent adhérer à la matière organique, aux bactéries ou aux particules d'argile de petite taille, s'alourdir et se déposer sur le fond. La sédimentation s'opère aussi par la déposition sous forme de fèces, après le passage des hydrocarbures dans le système digestif des organismes aquatiques, ou par la précipitation directe à la suite de l'augmentation de la densité des résidus pétroliers. La sédimentation des hydrocarbures pétroliers peut commencer immédiatement après un déversement, cependant ce processus dépend fortement de la nature des hydrocarbures, du lieu du déversement, de la présence des matières en suspension et des organismes aquatiques et probablement de la température (Neff, 1990).

1.6 Potentiel toxique des hydrocarbures

Tous les hydrocarbures ne sont pas toxiques, cependant, de nombreux auteurs

S'accordent pour dire que les HAP présentent un potentiel mutagène et cancérigène important.

Par conséquent, ils sont considérés comme étant dangereux pour la santé humaine et l'environnement (Benlahcen *et al.*, 1997 ; Takada *et al.*, 1990 ; Notar *et al.*, 2001 ; Soclo *et al.*, 2000). Les HAP sont en effet des molécules biologiquement actives qui, une fois absorbées par les organismes, se prêtent à des réactions de transformation sous l'action d'enzymes conduisant à la formation d'époxydes et/ou de dérivés hydroxylés. Les métabolites ainsi formés peuvent avoir un effet toxique plus ou moins marqué en se liant à des molécules biologiques fondamentales telles que les protéines, l'ARN, l'ADN et peuvent provoquer des dysfonctionnements cellulaires. Outre leurs propriétés cancérigènes, les HAP présentent également un caractère mutagène dépendant de la structure chimique des métabolites formés. Ils peuvent aussi entraîner une diminution de la réponse du système immunitaire augmentant ainsi les risques d'infection (Jauzein *et al.*, 1995).

2 La biodégradation

2.1 Biodégradation et métabolismes

La biodégradation est l'ensemble des mécanismes de transformation d'un contaminant en différents sous produits, par l'action des micro-organismes (bactéries et microbes...)

(Figure 4)(Head *et al.*, 2006).

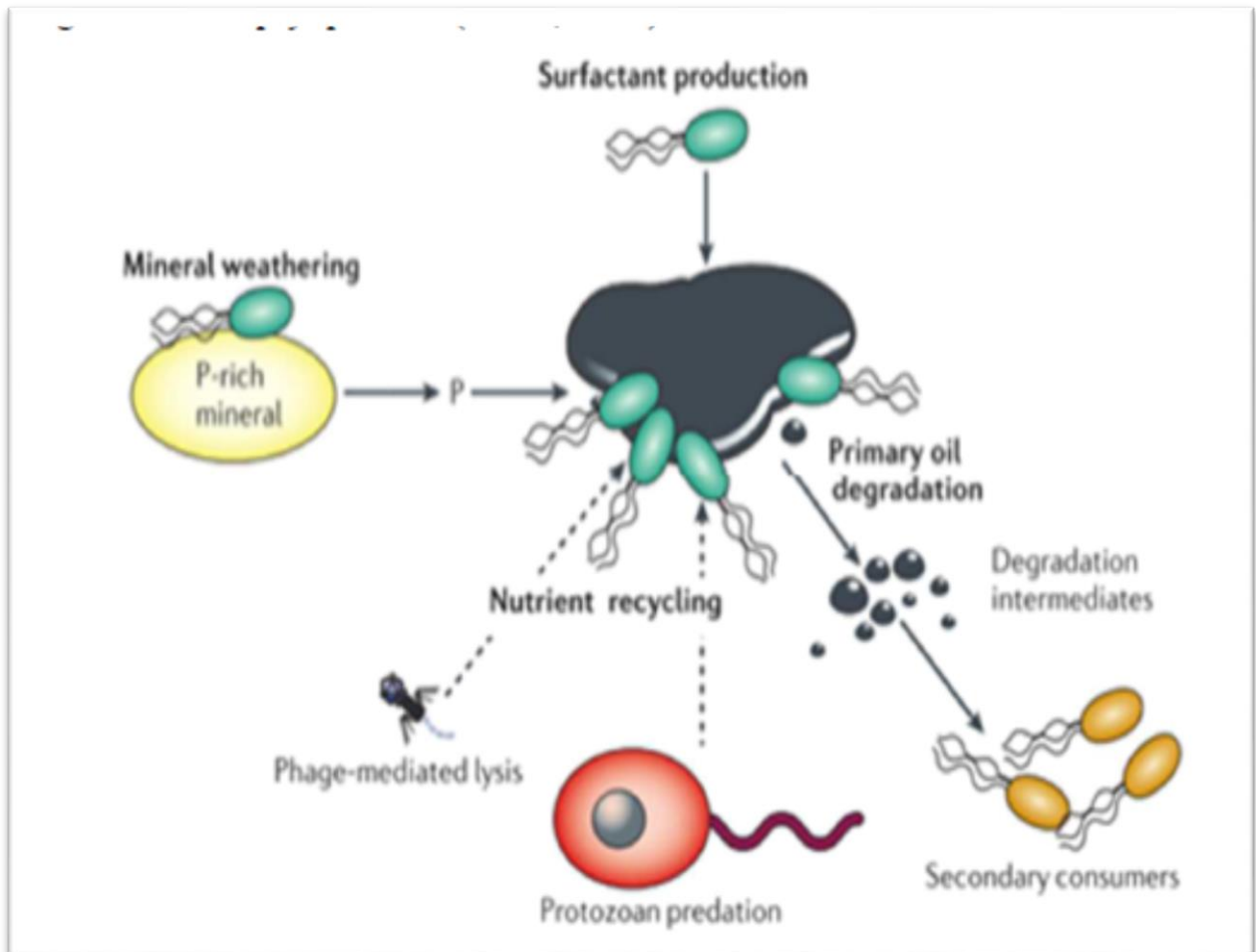


Figure 4 : communauté microbienne impliquée dans la biodégradation des hydrocarbures pétroliers (Head *et al.*, 2006).

Ce processus est destructif, ce qui est particulièrement intéressant pour l'atténuation naturelle à condition que les produits néoformés (métabolites) aient une toxicité moindre. Il en résulte généralement une diminution de la concentration de polluant initial. En revanche, selon les cas, les métabolites peuvent aboutir à un ralentissement ou à une accélération de la vitesse de propagation et un étalement ou à un resserrement du front de migration (Juhász *et al.*, 2000).

2.2 La biodégradation

Est aussi un processus actif d'élimination du pétrole en mer. D'après les expérimentations en laboratoire, toutes les familles d'hydrocarbures sont susceptibles d'être biodégradées. En

pratique, il faut cependant constater que les hydrocarbures saturés, et en particulier les n-alcane, peuvent être dégradés rapidement (quelques semaines), mais que certains hydrocarbures aromatiques lourds fortement alkylés peuvent persister dans le milieu pendant plusieurs années. La biodégradation est surtout active en surface et dans la masse d'eau lorsque le conditionnement du pétrole est convenable (bonne dispersion, présence d'oxygène et de sels nutritifs).

Le processus est beaucoup plus lent si les hydrocarbures sont piégés dans des sédiments anoxiques (**Pierre, 1983**).

2.3 Adaptation des bactéries hydrocarbonoclastes (HCB) aux hydrocarbures

L'adaptation de certaines communautés bactériennes aux hydrocarbures s'explique par trois mécanismes majeurs :

- Le pétrole stimule la prolifération des hydrocarbonoclastes (les milieux pollués chroniquement sont plus riche en hydrocarbonoclastes). En cas d'apport soudain de pétrole, l'abondance relative des ces HCB permet d'assurer la mise en place rapide d'un consortium de dégradation.
- Les bactéries sont capable de transférer les gènes de catabolisme des hydrocarbures par conjugaison, la probabilité pour que ce type d'échange survient dans un environnement chroniquement pollué est plus grande (**Hada et al., 1981, Leahy et al., 1990**).
- Enfin, dans les zones polluées, des mécanismes d'induction des enzymes d'intérêt ont été retrouvés en présence de pétrole (**Suzuki et al., 2001, Priefert et al., 2004**).

2.4 Diversité des bactéries hydrocarbonolastes

Les travaux menés sur la biordégradation des hydrocarbures durant les deux dernières décennies ont permis l'isolement et l'identification d'une grande variété de souches capables de métaboliser les HAP. (Tableau 3).

Etat actuel sur sujet

Tableau1 : Principaux genres bactériens dégradants isolés à partir des sites contaminés.

Gram	Classes	Genres	Références
Gram (-)	Alpha - <i>Proteobacteria</i>	<i>Sphingomonas</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Agrobacterium</i>	(Haritash & Kaushik, 2009; Romine et al., 1999)
	Beta - <i>Proteobacteria</i>	<i>Alcaligenes</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Polaromonas</i>	(Daane et al., 2001; Goyal & Zylstra, 1996; Jeon et al., 2006; Larkin et al., 1999)
	Gamma - <i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Haemophilus</i>	(Abd-Elsalam et al., 2006; Haritash & Kaushik, 2009; Kim et al., 2009; Simon et al., 1993)
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacterium</i>	(Abd-Elsalam et al., 2006)
Gram (+)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arthrobacter</i> ; <i>Rhodococcus</i> <i>Micrococcus</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Terrabacter</i> , <i>Gordonia</i>	(Heitkamp et al., 1988; Kästner et al., 1994; Khan et al., 2002; Krivobok et al., 2003; Larkin et al., 1999; Timmis et al., 2010)
	<i>Nocardioides</i>	<i>Nocardia</i>	(Krivobok et al., 2003; Saito et al., 1999; Zeinali et al., 2007)
	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i> , <i>Paenibacillus</i>	(Bossert & Bartha, 1986 ; Daane et al., 2002; Rochelle et al., 2005)

2.5 Biodégradation aérobie des hydrocarbures pétroliers par des souches bactériennes

2.5.1 Rôle des protéobactéries dans la dégradation des hydrocarbures

L'identification de bactéries possédant des capacités épuratrices peut aussi être réalisée au cours de la bioremédiation des sols pollués. Ainsi, une étude sur l'évolution de la diversité d'un sol pollué aux alcanes et aux aromatiques pendant un processus de bioremédiation a permis de mettre en évidence que le sol pollué est toujours dominé par des micro-organismes de type *Gamma-proteobacteria* (Juhasz et al., 2000). Les bactéries appartenant aux sous – division *Gamma –protéobactéria* et *Beta –proteobacteria* sont toutefois importantes tout au long de la décontamination. Par ailleurs, la plupart des souches bactériennes, caractérisées au cours de ce travail, avaient déjà été identifiées au niveau de sols contaminés par des hydrocarbures (Eriksson et al., 2003). Les *Pseudomonales*, et surtout le genre *Pseudomonas*, sont très souvent, en effet, être impliqués dans les premières phases des procédés de bioremédiation lorsque les polluants sont biodisponibles (Kaplan et kitt, 2004).

Les souches bactériennes responsables de la dégradation des hydrocarbures dans l'environnement appartiennent essentiellement au genre *Pseudomonas*. Mais également aux genres *Alcaligenes*, *Flavobacterim* et *Acinetobacter*.

Le potentiel métabolique intrinsèque des groupes cités est aussi un des paramètres explicatifs de la prévalence de certains genres. Les *Pseudomonas* sont par exemple connus pour leurs capacités à métaboliser une grande variété d'hydrocarbures aromatiques (toluène, m-xylène, naphthalène, phénanthrène) avec un nombre restreint d'enzymes, sans exposition préalable aux polluants (Clarke, 1982; Rojo, 2010). Les *Sphingomonas* sont également étudiés pour le catabolisme de molécules cycliques de type biphényle (substitué ou non), organochlorés, dioxines, oestradiol, ainsi que de différents pesticides (Basta et al., 2005).

Les bactéries pathogène : un pathogène est un membre des espèces microbiennes où la virulence détermine la tendance nuisible de la souche pathogène (Isenberg, 1988). Les bactéries pathogènes possèdent des propriétés génétiques distinctes que leurs apportent significativement une capacité plus grande pour entrer en compétition avec d'autres bactéries afin de préserver leur avantage à l'intérieur d'un hôte spécifique (Falkow, 1988). La pathogénicité microbienne (ou virulence) a été définie comme les mécanismes biochimiques avec lequel les micro-organismes causent la maladie (Finley et Falkow 1989 ; Smith 1991) avec une probabilité variable selon les souches (Finley et Falkow, 1989).

Etat actuel sur sujet

Les *Pseudomonas* sont un groupe d'Organismes hétérogène. Elles peuvent être retrouvées dans l'eau, le sol, colonisant ou pathogènes des plantes, animaux et l'homme.

Pseudomonas est un mot composé de 2 unités : pseudo = faux et Monas = unité. Ce sont en fait des bacilles gram négatives flagellées aux pôles.

Ces bacilles ont un diamètre de 1 µm et une longueur de 4 à 5 µm, pourtant certaines souches (les saprophytes et les phytopathogènes) peuvent être plus long.

Les *Pseudomonas* sont des bactéries aérobie strict, la production de pyocyanine et des pigments fluorescents est caractéristique à certaines souches. *Pseudomonas aeruginosa* produisant la pyocyanine, est aussi dit bacille pyocyanique. Ces pigments sont en fait chelateurs ferriques ou siderophores. **(Zannoni , 1989).**

Classification des *Pseudomonas*

Règne : Bacteria

Division : Proteobacteria

Classe : Gamma-proteobacteria

Ordre : Pseudomonadales

Famille : Pseudomonadaceae

Genre : *Pseudomonas* **(Pitt, 2002).**

Ces nombreuses espèces utilisent des voies métaboliques très variées pour utiliser ces hydrocarbures comme nutriments et, s'il n'est pas possible de décrire ici toutes ces voies métaboliques, il est par contre possible d'en dégager les caractères essentiels et de choisir les plus représentatives comme modèles.

Le point commun à toutes les voies métaboliques de dégradation des hydrocarbures, est que tous les micro-organismes doivent, avant de pouvoir être utilisés comme source de carbone et d'énergie, être convertis tout d'abord en produits appartenant à ce qu'il est convenu d'appeler le « métabolisme central ».

Ce « métabolisme central », commun à tous les êtres vivants, constitue une véritable « épine dorsale biochimique ». En font partie, par exemple, les acides carboxyliques et l'acétyl-coenzyme A utilisés dans le cycle de Krebs pour fournir de l'énergie sous forme d'ATP. Bien qu'il faille éviter les généralisations abusives, le schéma suivant (figure 5) peut s'appliquer aussi bien à la dégradation des alcanes qu'à celle des hydrocarbures aromatiques et tous les micro-organismes hydrocarbonoclastes (c'est-à-dire qui dégradent les hydrocarbures) sont capables d'oxyder un groupement méthyle en groupement carboxylique **(Claude, 1996).**

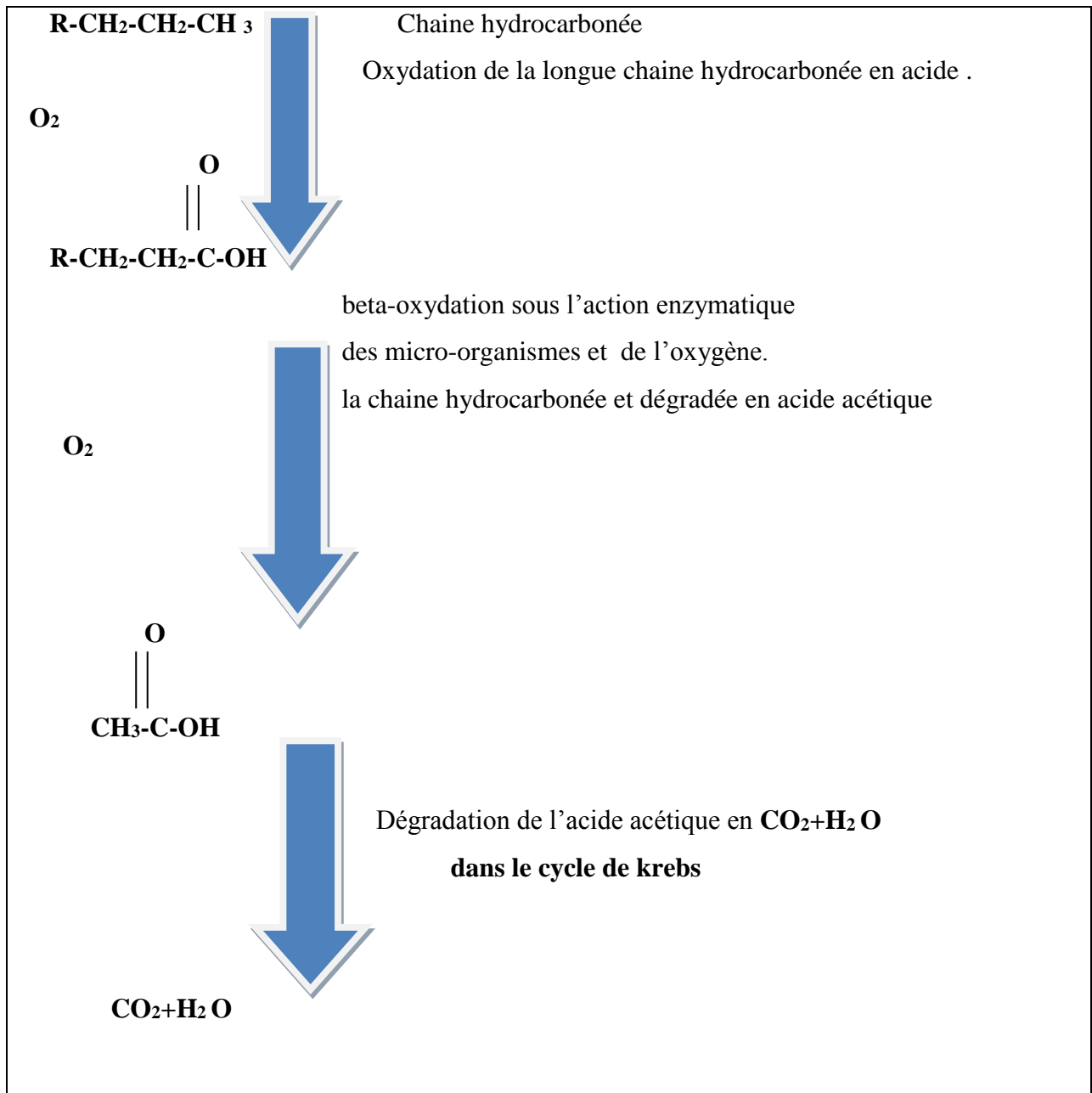


Figure 5 : schéma principale simplifier de la biodégradation aérobie des hydrocarbures (Lecompte, 1995).

2.6 Les principales méthodes utilisées dans la bioremédiation

2.6.1 La bioaugmentation

Cette technique consiste à introduire des cultures de microorganismes dans la zone polluée afin d'augmenter le taux de biodégradation des contaminants. La culture peut comprendre une ou plusieurs espèces de microorganismes capable de dégrader et de décontaminer les sites contenant des hydrocarbures et peuvent être soit autochtones ou bien allochtones (Vogel, 2001).

2.6.2 La biostimulation

Cette technique consiste à stimuler l'activité des populations microbiennes indigènes (Présente dans le sol ou dans les eaux souterraines) par apport de nutriments et par ajustement des conditions du milieu (potentiel d'oxydo-réduction, humidité) (Abdelly, 2007).

2.6.3 Rapport de biodégradabilité

Le taux de biodégradation est un facteur important et doit être pris en compte pour tous événements de contamination aux hydrocarbures survient dans l'environnement. Encore un fois, c'est l'activité microbienne qui est le processus majeur de cette dégradation. Cette dernière peut survenir de façon naturelle. Le rapport de biodégradabilité K est défini par $K = DCO/DBO_5$, il représente la fraction de la DCO qui est biodégradable (CLAUDE, 2002).

Tableau2 : Le rapport de biodégradabilité

Valeur de K	Caractère de l'effluent
1,5	Bonne biodégradabilité
2 à 3	Biodégradabilité moyenne
4 à 5	Biodégradabilité faible
> 5	Non biodégradable

2.7 Facteurs physiques et chimiques affectant la biodégradation

La biodégradation des hydrocarbures est l'un des premiers mécanismes conduisant à la transformation de ces polluants en produits moins toxiques. Les travaux de recherche sur l'oxydation des hydrocarbures par les microorganismes ont montré que ce processus dépend de la structure chimique des hydrocarbures et des conditions environnementales (**Costes et Druelle, 1997**). Les facteurs physicochimiques influant sur la vitesse de biodégradation microbienne sont

- La structure du sol et leur nature (composition structure et surtout diffusion d'oxygène).
- La composition du polluant selon Soltani 2004 (la vitesse de biodégradation est plus élevée pour les hydrocarbures saturés, viennent en suite les aromatiques légers, les aromatiques à haut poids moléculaire) Température (entre 25°C à 37°C.) (**Soltani 2004**).
- Ressources en oxygène ; sous forme d'oxygène pure, air atmosphérique ou le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)
- La pression et l'humidité
- Les nutriments (azote et phosphore en particulier)
- Le potentiel d'hydrogène (entre 6 et 8)
- Effet de la salinité (**Costes et Druelle, 1997**).
- Présence de micro-organismes adaptés : Des micro-organismes déjà adaptés se rencontrent partout dans l'environnement puisque les HAP sont des substances naturelles. Habituellement, plus un site renferme une haute concentration de HAP et plus la proportion de micro-organismes adaptés augmente (**Cemiglia, 1993**).

Tableau 3: Les facteurs affectant la biodégradation des hydrocarbures pétroliers (Oliveira et al., 2015).

Facteurs	Rôle dans la décomposition des hydrocarbures pétroliers
Biodisponibilité	La composition et la concentration en hydrocarbures affectent le taux et l'efficacité de la biodégradation microbienne
Température	Affecte le comportement physicochimique des hydrocarbures (la viscosité, la diffusion, la solubilité). Affecte la physiologie et la diversité des microorganismes indigènes
pH	Inhibe l'activité microbienne en régulant le métabolisme microbien
Oxygène	Bien que la biodégradation des hydrocarbures puisse s'effectuer en conditions anaérobies et aérobies, la biodégradation aérobie présente un rendement beaucoup plus élevé. Une réduction de la concentration en oxygène entraîne donc une réduction de l'efficacité de la biodégradation
Salinité	Les variations de salinité modifient la structure et la diversité des communautés microbiennes indigènes en sélectionnant pour des espèces halophiles ou halotolérantes. Ceci peut avoir un effet indirect sur la biodégradation des hydrocarbures dans les milieux de transition comme les milieux estuariens en ajoutant un facteur de sélection supplémentaire sur les communautés indigènes
Matière Organique	La présence de matière organique entraîne une séquestration des hydrocarbures, diminuant ainsi leur disponibilité pour la biodégradation microbienne
Diversité de la communauté microbienne indigène	La présence de bactéries HCB au sein de la communauté bactérienne indigène favorisera une réponse rapide et efficace lors de l'introduction d'hydrocarbures pétroliers dans le milieu. Une communauté "adaptée" présentera donc une efficacité de dégradation des hydrocarbures supérieure à celle d'une communauté "non-adaptée"

2.8 Le mécanisme de biodégradation des hydrocarbures

Les hydrocarbures peuvent servir de sources de carbone et d'énergie pour la croissance bactérienne (Head et coll., 2006 ; Shao, 2009). Et vue leur large distribution dans l'espace et dans le temps, il n'est pas surprenant de trouver que les bactéries capables de les dégrader sont ubiquitaires (Shao, 2009). Selon Maier et al., 2003 Il y'a deux étapes dans le processus de biodégradation :

La première est l'assimilation du substrat par la cellule (figure 6)

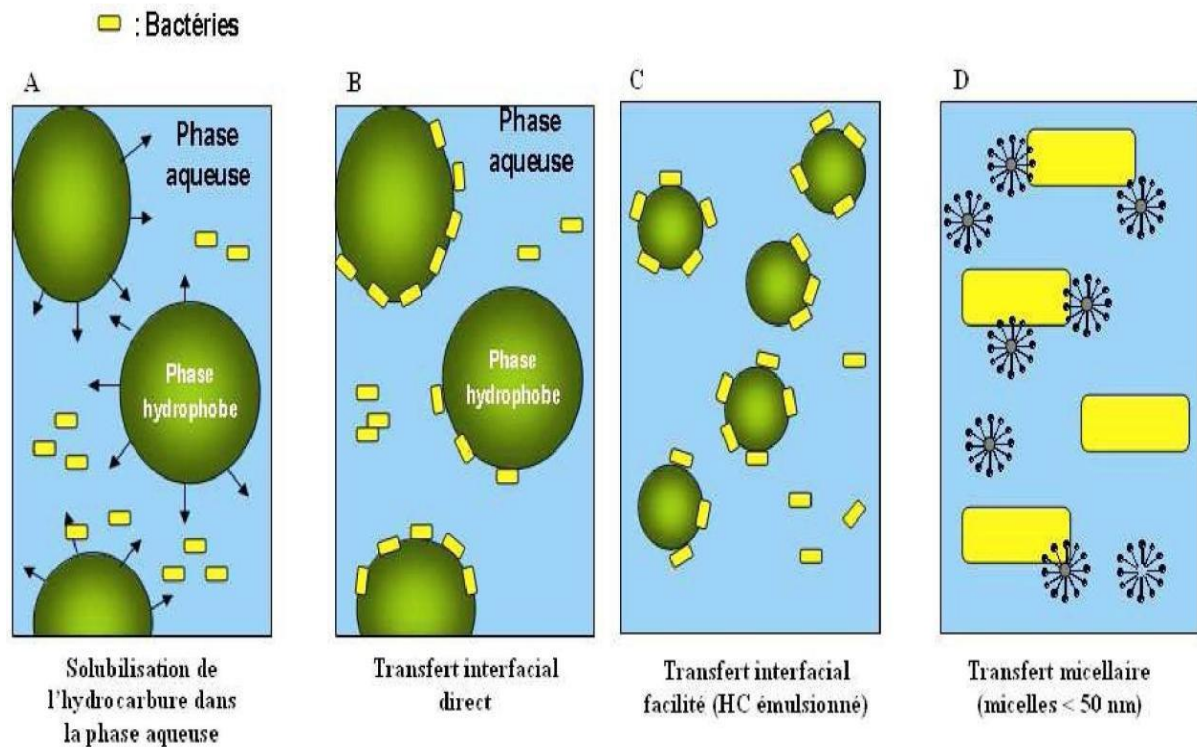


Figure 6 : Mécanismes d'accès des microorganismes aux hydrocarbures (Vandecasteele, 2005).

Et la seconde est le métabolisme du substrat (figure7). Quand la présence d'une voie métabolique appropriée est assurée, la dégradation peut se faire rapidement à condition que le substrat soit disponible sous une forme soluble dans l'eau. Or, les hydrocarbures sont insolubles donc ils vont former un système diphasique avec l'eau du sol. (Maier et coll., 2009).

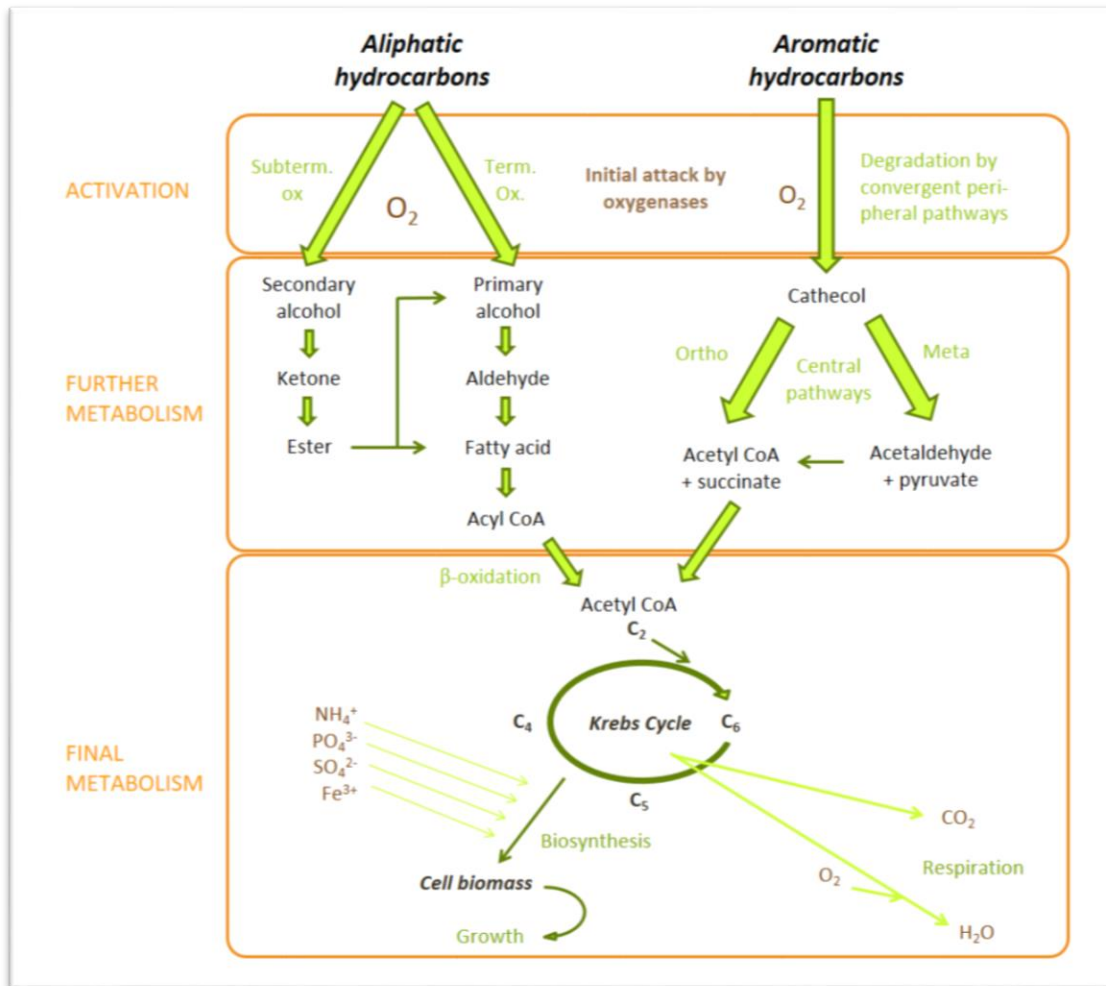


Figure 7 : Degradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by aerobic bacteria. Subterm. ox.: subterminal oxidation. Term. ox.: terminal oxidation. Ortho: ortho cleavage pathway. Meta: meta cleavage pathway. CoA: coenzyme A. (Hopwood and Chater 1988, Das and Chandran 2011, Peixoto, Vermelho et al. 2011, Guzik, Hupert-Kocurek et al. 2013, Kothari, Panchal et al. 2013, Segura and Ramos 2013, Sierra-Garcia and Oliveira 2013).

Avoir que l'insolubilité des hydrocarbures dans l'eau, éliminer se substacle ; l'ajout des surfactants est nécessaire Pour augmenter la solubilité et rendre la biodégradation efficace.

2.9 Les bio-surfactants

Les surfactants (SURFace ACTive AgeNTS) sont des agents à activité de surface (tensioactifs), synthétisés chimiquement ou par voie biologique (biosurfactants) (Al- Arajil et al., 2007) . Les biosurfactants sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe non polaire. Généralement, le groupement hydrophile est constitué d'acides aminés, peptides ou de polysaccharides (mono ou di) ; le groupement hydrophobe est constituée d'acides gras saturés ou non saturés (Desai et Banat, 1997).

2.9.1 Biosynthèse et rôle physiologique

La production de biosurfactants est un phénomène communément observé lors de la croissance d'un microorganisme sur des substrats insolubles dans l'eau et la réduction de la tension superficielle du milieu ainsi que la formation d'une émulsion stable indiquent une production efficace (Pruthi et coll., 1995). Selon Adamson (1990), la présence de surfactant est nécessaire pour obtenir une émulsion stable entre deux liquides purs non miscibles (Krepesky et al., 2007). En effet, ces bactéries synthétisent les biosurfactants (Tableau4) qui sont soit des molécules intracellulaires, extracellulaires ou localisées à la surface de la cellule (Prabhu et coll., 2003) pour faciliter la diffusion des hydrocarbures ou leurs dérivés à l'intérieur de la cellule bactérienne à fin de les dégrader (Al-arajil et coll., 2007). Cependant, les biosurfactants peuvent avoir d'autres rôles aussi importants que l'émulsification, par exemple : l'adhésion aux surfaces solides et la formation de biofilms (Alasan d'*Acinetobacter*), la régulation du niveau énergétique cellulaire (sophorose de *T.bombicola*), l'activité bactéricide (gramicidine, polymexine, surfactine), la pathogénicité de certaines bactéries (rhamnolipides de *Pseudomonas*), ainsi que le piégeage des métaux lourds (Vandecasteele, 2008).

Tableau 4: Quelques biosurfactants et les micro-organismes qui les produisent.

Etat actuel sur sujet

Biosurfactants	Micro-organismes
Sophorolipides	<i>Torulopsis bombicola</i>
Trehalose mycolates	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
Rhamnolipides	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Rubiwettines	<i>Serratia rubidaea</i>
Glycolipides	<i>Torulopsis apicola</i>
Glycolipides	<i>Rhodococcus aurantiacus</i>
Mannosylérthritol lipides	<i>Candida antarctica</i>
Surfactine	<i>Bacillus subtilis</i>
Viscosine	<i>Pseudomonas nuorescens</i>
Lipopeptides	<i>Bacillus licheniformis</i>
Serrawettine	<i>Serratia marcescens</i>
Acides gras	<i>Corynebacterium lepus</i>
Phosphatidyléthanolamine	<i>Rhodococcus erythropolis</i>

3 Définition de la pollution

Les polluants sont émis dans l'atmosphère, évacués dans les eaux usées ou épandus sur les sols, sous forme de gaz, de substances dissoutes ou de particules, la plupart finissent par rejoindre les milieux aquatiques. **(benjebar, 2015)**.

3.1 Pollution des eaux naturelles

La pollution des eaux est définie comme toute modification physique ou chimique de la qualité des eaux, qui a une influence négative sur les organismes vivants ou qui rend l'eau inadéquate aux usages souhaités. Donc on dit que l'eau est polluée, lorsque sa composition ou son état est directement ou indirectement modifiée par l'action de l'Homme **(Ezziane, 2007)**.

On ne voit que ce que l'on cherche...

Pendant des décennies, l'analyse chimique a été consacrée aux produits des activités humaines à grande échelle

3.2 Différentes origines de pollution

3.2.1 Origine industrielle

Les rejets industriels renferment des produits divers sous forme insoluble ou soluble, d'origine minérale et/ou organique, à caractère plus ou moins biodégradable et parfois toxique même à très faible concentration **(Boeglin, 2001)**.

3.2.1.1 Polluants chimiques

Les polluants chimiques des eaux sont regroupés en deux catégories :

- Organiques (hydrocarbures, pesticides, détergents et phénols).
- Minérales (métaux lourds, cyanure, azote et phosphore) **(Mekhalif, 2009)**.

3.2.1.1.1 Polluants organiques

Les effluents sont chargés de matières organiques biodégradables, rejetés par les industries alimentaires et agroalimentaires (laiteries, abattoirs, sucrerie). Ils provoquent la consommation d'oxygène dissous de ces eaux, en entraînant la mort des poissons par asphyxie et le développement de fermentation anaérobie (putréfaction) génératrice de nuisances olfactives **(Mekhalif, 2009)**.

Parmi les polluants organiques les plus importants, nous citerons

3.2.1.1.2 Hydrocarbures

La pollution par les hydrocarbures résulte de plusieurs activités liées à l'extraction du pétrole, à son transport et à l'utilisation de produits finis (carburants et lubrifiants), ainsi qu'aux rejets effectués par les navires (marées noires).

Etat actuel du sujet

Les effets des hydrocarbures dans le milieu aquatique sont considérables. Ils dépendent largement de leur composition (**Galaf, 2003**).

3.2.1.2 Polluants minéraux

Les polluants minéraux les plus importants sont :

3.2.1.2.1 Métaux lourds

Ce sont des éléments en traces qui comprennent principalement le mercure, le cadmium, le plomb, l'argent, le cuivre et le chrome. Ces éléments, bien qu'ils puissent avoir une origine naturelle, proviennent essentiellement de la contamination des eaux par des rejets des activités industrielles diverses (**Keck et al ; 2000**).

3.2.1.2.2 Matières azotées

Les activités industrielles peuvent être à l'origine de rejets plus ou moins riche en azote (élément nutritif) issu des fabrications d'engrais ou des industries chimiques et agroalimentaires.

L'azote existe sous deux formes: la forme réduite qui regroupe l'azote ammoniacal (NH_3 ou NH_4) ou la forme oxydée en ions nitrites (NO_2^-) et nitrates (NO_3^-). Ces derniers interviennent dans le phénomène de l'eutrophisation (**Mekhalif, 2009**).

3.2.1.2.3 Matières phosphatées

Le phosphore a pour origine les industries du traitement de surfaces, les laveries industrielles et les productions agroalimentaires ou d'engrais. Comme l'azote, le phosphore est un élément nutritif, il est à l'origine du phénomène d'eutrophisation, c'est-à-dire, la prolifération excessive d'algues et de plancton dans les milieux aquatiques (**Rodier, 1996**).

3.3 Les eaux de production

3.3.1 Définition

Ont longtemps été considérées comme un sous-produit gênant. À terre, après un traitement plus ou moins poussé en fonction de leur destination, elles sont soit rejetées dans les rivières, soit dans les réseaux de collecte des eaux usées domestiques, soit traitées par évaporation dans des bassins de décantation ou encore injectées dans le sous-sol après un minimum de traitement. En offshore, l'eau est soit rejetée en mer après traitement, soit convoyée vers les terminaux terrestres pour y être traitée (**Estelle, 2011**).

3.3.2 L'impotence de l'eau dans les procédés de raffinage pétrolier

L'eau est indispensable aux multiples activités d'une raffinerie de pétrole. En fait, il faut un baril d'eau douce pour traiter deux barils de pétrole brut. Quant aux effluents rejetés, ils sont de différentes natures : les eaux usées des procédés de raffinage, les eaux de réfrigération atmosphérique, les eaux provenant d'activités connexes et les eaux pluviales.
http://www.mddep.gouv.qc.ca/publications/lois_reglem.htm.

Etat actuel du sujet

Les eaux usées (utilisé pendant le raffinage) de différentes compositions et de diverses origines constituent un problème pour la nature lors du rejet sans subir de traitements physico-chimiques et biologique. Afin de montrer l'intérêt de leur épuration biologique.

L'intérêt consiste à trouver la méthode la plus efficace.

Les eaux de procédé entrent directement en contact avec les substances traitées au cours des processus de séparation, de conversion et d'amélioration des produits pétroliers. Il s'agit des eaux de dessalage, des condensats de distillation (vapeur servant de support pour le transport des produits distillés), des eaux acides (en anglais *sour waters*; vapeur d'entraînement utilisée dans le craquage catalytique et l'hydrotraitement), des rejets de vapocraquage, des eaux provenant de l'alkylation catalytique et du soufflage du bitume. Ces eaux contiennent des hydrocarbures, des composés azotés, sulfurés et oxygénés, c'est-à-dire les éléments que l'on trouve à l'état naturel dans le pétrole. On peut aussi y trouver diverses substances chimiques utilisées dans les procédés (solvants, sodes, acides, amines, détergents, inhibiteurs de corrosion, etc.) de même que des sous-produits dérivés des réactions thermiques et chimiques (phénols, ammoniac, etc.) et de la corrosion des équipements (oxydes métalliques, MES).

http://www.mddep.gouv.qc.ca/publications/lois_reglem.htm.

Les eaux de réfrigération atmosphérique sont utilisées pour refroidir plusieurs unités de traitement, les principales étant les tours de distillation. Ces unités nécessitent des volumes importants d'eau, particulièrement lorsque la raffinerie fonctionne en circuit ouvert alors que l'eau n'effectue qu'un seul passage avant d'être rejetée. Toutefois, les trois raffineries québécoises fonctionnent en circuit semi-fermé et la majeure partie de cette eau est recirculée. Ainsi, l'eau d'appoint n'est prélevée que pour compenser les pertes dues à l'évaporation, aux fuites et aux purges effectuées périodiquement. L'eau depurge qui en résulte est particulièrement chargée en sels dissous qui se sont concentrés dans le système à la suite de l'évaporation. On y trouve également des additifs chimiques tels que des inhibiteurs de corrosion, des produits oxydants, des algicides et des bactéricides. Malgré tout, cette eau est très peu contaminée, car elle n'entre pas en contact avec les matières traitées.

http://www.mddep.gouv.qc.ca/publications/lois_reglem.htm.

D'autres eaux usées sont également générées par des activités connexes : eaux de lavage des sols, eaux de déballastage et de nettoyage des pétroliers, eaux de purge des chaudières, éluats de régénération des échangeurs d'ions, eaux de laboratoire et eaux domestiques. Parmi les plus contaminées, on trouve les eaux de ballasts qui servent à la stabilité des navires (NaCl, hydrocarbures, MES). Les eaux de nettoyage des navires contiennent des détergents et quelquefois de la soude, alors que les eaux de drainage unités de stockage contiennent des

Etat actuel du sujet

hydrocarbures et des phénols. Ainsi, mis à part les eaux domestiques traitées et rejetées dans l'éégout sanitaire, la majeure partie de ces eaux est contaminée et nécessite un traitement *in situ* préalablement à son rejet.

http://www.mddep.gouv.qc.ca/publications/lois_reglem.htm.

3.3.3 Stockage d'Eau des procédés

Les eaux de production ont séjourné pendant des périodes plus ou moins longues dans le réservoir où elles étaient en contact avec l'huile, le gaz et la roche. Comme leur quantité, leur qualité dépend donc de leur origine. Elle varie considérablement en fonction de la région, de la géologie de la formation, des types de fluides, du procédé de récupération, des conditions d'exploitation et du management des puits et du réservoir. Au puits producteur, au voisinage duquel les pressions et les débits varient considérablement, les équilibres établis au sein du réservoir sont fortement perturbés, ce qui impacte directement la composition des eaux. (**Estelle, 2011**).

Le plus souvent, l'eau est produite sous la forme d'une émulsion eau dans l'huile qu'il faut séparer des hydrocarbures. Cette séparation se fait moyennant différents procédés physico-chimiques lors desquels divers additifs sont utilisés, qui se retrouvent dans l'eau après séparation (**Estelle, 2011**).

3.3.4 Le contenu d'eau de procédé

Une eau de production peut donc typiquement contenir :

- Des particules en suspension :
 - minérales : argiles, silice, différents précipités minéraux de calcium, de sulfate et de fer notamment, résidus de corrosion bactérienne comme le FeS (sulfure de fer), etc.,
 - organiques : émulsions résiduelles, bactéries, asphaltènes, etc.
- Des sels dissous de différentes natures,
- Des métaux lourds et radioactifs,
- Des produits organiques dissous :
 - des hydrocarbures et notamment : BTEX, phénols et naphthalènes,
 - des additifs liés au management des puits, à la production (forage, complétion, fracturation, traitement de puits), au conditionnement de l'eau d'injection et à la séparation,
 - des additifs pour l'EOR : alcalins, tensioactifs, polymères, bactéries, etc.
- Des bactéries et des résidus de l'activité bactérienne (biofilm, FeS, etc.),
- Des gaz dissous (**CO₂, O₂, H₂S, etc.**) (**Estelle, 2011**).

Les eaux de production sont donc corrosives, instables, huileuses (émulsions, huile dissoute), elles contiennent des particules en suspension de taille submicronique à millimétrique ; elles sont

Etat actuel du sujet

également biologiquement actives, toxiques (métaux lourds, radioactivité, produits chimiques) et leur salinité peut atteindre la saturation (Estelle, 2011).

4 Traitement des eaux usées résiduaires industrielles

4.1 Le traitement des eaux de procédé

Atitre d'exemple ,les différentes étapes du traitement des eaux de production sont illustrées sur le (tableau 5) ; des procédés de remédiation physico-chimiques qui, perment l'élimination de la pollution colloïdale suivé par le traitement biologique qu'est pour objectif de l'élimination de la pollution dissoute et biodégradable .

Tableau 5 : méthodes disponibles pour le traitement des eaux contaminé par des produits pétroliers (farhadian et al. , 2008).

	Technologie in-situ	technologie ex-situ
Physique	Electo-rémédiation Barriere Injection d'Air Cofinement hydraulique	Electro-remédiation (électrodialyse) Extraction d' Air Ajout de surfactant Adsorption sur charbon actif Filtration membranaire
Chimique	Oxydation (O ₃ , O ₂ , H ₂ O ₂ , CL ₂)	Coagulation, floculation et précipitation Remédiation photocatalytique Oxydation (O ₃ , O ₂ , H ₂ O ₂ , CL ₂)
Biologique	Bioremédiation En-situ	Bioremédiation Ex-situ (aérobie et anaérobie)

4.1.1 Traitement Physique

4.1.1.1 Prétraitement

4.1.1.1.1 - **Dégrillage** il s'agit d'enlever les matières volumineuses de l'effluent.

4.1.1.1.2 - **Dessablage** il a pour but d'extraire le sable et les particules minérales plus ou moins fines en suspension, de manière à éviter l'abrasion des pompes et conduites en aval.

4.1.1.1.3 - **Dégraissage** C'est une opération destinée à réduire les graisses et huiles non émulsionnées par simple entrainement physique en surface.

4.1.2 Traitement primaire

4.1.2.1 - **Déshuilage** permet par gravité suivant la loi de Stokes de réduire la teneur en hydrocarbures libre (**Manuelle opératoire de la station d'épuration (zone 27) de la raffinerie d'Arzew RA1/Z**).

4.2 Traitement Chimique

4.2.1 La coagulation :

Permet de décharger les matières colloïdales.

La floculation a pour but d'accroître le volume et la cohésion du floc formé par la coagulation.

4.2.2 La flottation :

Est un procédé de séparation des floccs formés au niveau de la coagulation et la floculation. Elle est caractérisée par la pressurisation effectuée dans un ballon d'air qui assure un contact intime des microbulles et des floccs formés, cela permet leurs évacuations en surface dans le flottateur (**Manuelle opératoire de la station d'épuration (zone 27) de la raffinerie d'Arzew RA1/Z**).

4.3 Traitement secondaire

4.3.1 Le procédé biologique

Le traitement secondaire est essentiellement une oxydation biologique des matières dissoutes. Les agents de cette oxydation sont des micro-organismes, en particulier des bactéries aérobies susceptibles de se nourrir des matières organiques présentes dans les eaux usées. Les installations de traitement secondaires se présentent donc comme des bassins de culture où l'on met en contact une population bactérienne et l'effluent à traiter en présence d'oxygène.

(**Manuelle opératoire de la station d'épuration (zone 27) de la raffinerie d'Arzew RA1/Z**).

Traitement biologique à culture fixe

4.3.1.1 Les lits bactériens

La microflore se développe à la surface du support sous forme de pellicules membraneuses riche en colonies microbiennes. La pollution contenue dans l'eau et l'oxygène de l'air diffusent à travers le film biologique jusqu'aux micro-organismes épurateurs tandis qu'inversement les sous produits et le dioxyde de carbone s'éliminent dans les fluides en circulation.

(manuelle opératoire de la station d'épuration (zone 27) de la raffinerie d'Arzew RA1/Z).

Biofiltres

Le développement actuel des techniques par cultures fixées sur milieu granulaire vise à réaliser la réaction biologique de dégradation de la pollution par la biomasse épuratrice et la clarification par filtration de l'effluent traité. Elle ne comporte pas de clarification finale par décantation.

(Manuelle opératoire de la station d'épuration (zone 27) de la raffinerie d'Arzew RA1/Z).

4.3.1.2 Le disque biologique

Le dispositif est constitué d'une série de disque en matière plastique à surface ondulée de trois mètres de diamètre environ et montés sur un axe horizontal. Ces disques sont immergés à 40 % approximativement dans un bassin recevant l'eau à traiter. Les disques sont suffisamment espacés de manières à ce que l'eau puisse circuler librement.

Le film biologique qui recouvre les disques est alternativement en contact avec l'eau usée et l'air, l'excès de biomasse se détache des disques et est évacué avec l'effluent puis décanté.

(Manuelle opératoire de la station d'épuration (zone 27) de la raffinerie d'Arzew RA1/Z).

Traitement biologique à culture libre

4.3.1.3 Baoue activée

➤ Principe :

Les micro-organismes épurateurs sont en suspension dans un bassin aéré, on parle alors de procédé à boues activées. Le réacteur est alimenté en continu (eau usée) et la biomasse transforme les polluants :

- Par adsorption ou absorption des matières polluantes sur le floc bactérien.
- Par conversion de la DBO5 en matières cellulaires : croissance de la culture bactérienne et des micro-organismes associés : insolubilisation de la pollution.
- Par oxydation en CO₂ et H₂O qui produit l'énergie nécessaire au fonctionnement

et la production de nouveau matériau cellulaire : transformation de la pollution dissoute en gaz.

(Manuelle opératoire de la station d'épuration (zone 27) de la raffinerie d'Arzew RA1/Z).

1 Localisation de la raffinerie d'Arzew dans la zone industrielle

La raffinerie d'Arzew est considérée comme un important complexe industriel réalisé dans le cadre du premier plan quinquennal dans les années 70 par un groupe japonais (Société Japonaise JAPAN GASOLINE CORPORATION). Elle occupe une superficie de 170 hectares de la zone industrielle sur le plateau d'El Mohgoun à environ 40 kilomètres d'Oran et environ 5 km de la mer méditerranée (figure8). En 1982 d'autres unités ont été rajoutées et en 2010 elle a procédé à la modernisation de ces unités de production avec lancement des projets ambitieux (Bendjebbar, 2015).

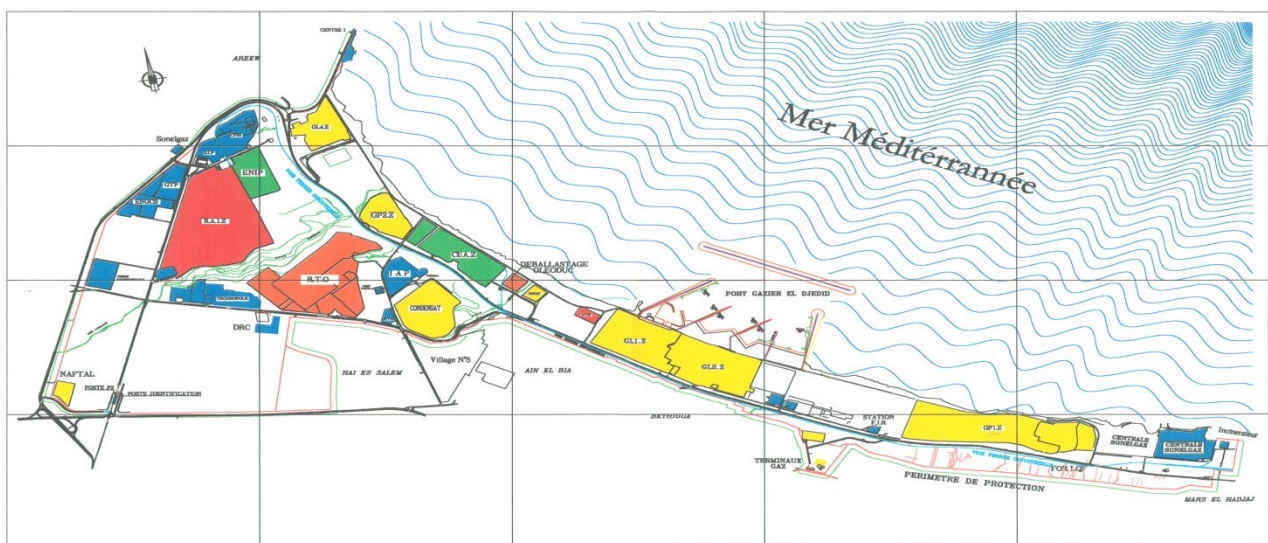


Figure 8 : Carte géographique de la localisation de la raffinerie d'Arzew dans la zone industrielle et son voisinage (Livre de la société nationale de raffinage de pétrole)

- **Pétrochimie et raffinage et stockage associé**
- **Liquéfaction et gaz naturel**
- **Fabrication des engrais**
- **Production électricité/différentes sources**

1.1 Présentation de la Zone 27

La nouvelle unité de traitement des eaux usées (zone 27) a pour but le traitement des drainages des unités de production P1. Elle comporte une nouvelle section de séparation des hydrocarbures, des pompes de relevage des eaux pluviales vers le bac d'orage, spécialement en cas de débit maximum, des sections de traitement secondaires et tertiaires et une section de traitement des boues, qui traite les boues de la zone 27 et les boues provenant de l'unité 1800 (Manuels opératoires de l'unité 1800 et de la zone 27).

Matériel et méthodes

1.1.1 Caractéristiques des rejets (liquides)

Rejets liquides

Tableau 6 : Les caractéristiques principales des rejets liquides de l'unité de traitement des effluents pour décharges vers la mer sont (**Manuels opératoires de l'unité 1800 et de la zone 27**).

Paramètres	Normes
pH	5,5 à 8,5
DBO ₅	30 mg/l
DCO	120mg/l
MES	30mg/l
Phénol	0,5mg/l
Azote total	20mg/l
Hydrocarbures	10mg/l

Cette étude a été réalisée au laboratoire de Microbiologie animale de l'Université de Mostaganem, d'une période de trois mois elle a pour but d'isoler et pré-identifier des micro-organismes impliqués dans la biodégradation des hydrocarbures, à partir d'un sol probablement pollué. Cette étude est basée sur l'étude de l'activité hydrocarbonolaste chez *Pseudomonas sp* isolé à partir du sol (isolat 1, isolat 2, isolat 3 et isolat 4).

2 Échantillonnage

L'échantillon a été prélevé à partir de zone probablement contaminé par le pétrole brut.

L'échantillon est aléatoire représentative.

Les échantillons du sol sont prélevés à partir de 20 cm à 40 cm de profondeur à l'aide d'une spatule sèche et chaque échantillon conservé dans un flacon sèche en verre brun. En suite les échantillons sont tamisés pour éliminer les éléments grossiers et les débris organiques En attendant les analyses, les échantillons de sols sont conservés à l'abri de la lumière à une température environ 4°C pour éviter le stress hydrique qui peut perturber les mesures biologiques (**CHAUSSOD et al., 1992**) ou ne pas passer 4 jours de stockage.

Matériel et méthodes

2.1 Transport des échantillons

Les échantillons sont transportées dans une glacière à 4°C et sont analysés tout suite après leur réception au laboratoire pour que l'échantillon soit représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage tel que préconisé par la norme (N.M08.0.109., 2004).

2.2 Enrichissement

L'enrichissement s'est fait dans le milieu BH par l'ajout de 10 g de sol probablement pollué par les hydrocarbures sont ajouter de 100 ml de BH additionné de la source de carbone (2 % de pétrole brut) (Deziel, 1996). Sous agitation pendant une semaine à 30°C et à l'obscurité (Daane et al., 2001). Le milieu utilisé était le Bushnell-Haas La composition du milieu BH est la suivante : (g/l) : 1,0, KH₂P04; 1,0, K₂HP04; 1,0, NH₄N03; 0,2, MgS04·1H20; 0,05, FeCl3; 0,02, CaCl2·2H20. (Deziel, 1996).

2.3 Isolement

A partir de la culture précédente, une série de dilution est réalisé jusqu'à 10⁻⁶.

2.4 La méthode de la dilution décimale

Suspensions ou solutions obtenues en mélangeant un volume mesuré de la suspension mère (1.1) avec un volume neuf fois égal de diluant et en répétant cette opération sur les dilutions suivantes, jusqu'à obtention d'une gamme de dilutions décimales appropriée pour l'inoculation des milieux de culture.

Principe

Préparation de la suspension mère (1.1), de façon à obtenir une répartition aussi uniforme que possible des micro-organismes contenus dans la prise s'essai.

Préparation, si nécessaire, de dilutions décimales (1.2) en vue de réduire le nombre de microorganismes par unité de volume pour permettre, après incubation, d'observer leur éventuel développement (cas des tubes) ou d'effectuer le dénombrement des colonies (cas des boîtes), comme précisé dans chaque méthode spécifique. (Dhou, 2013)

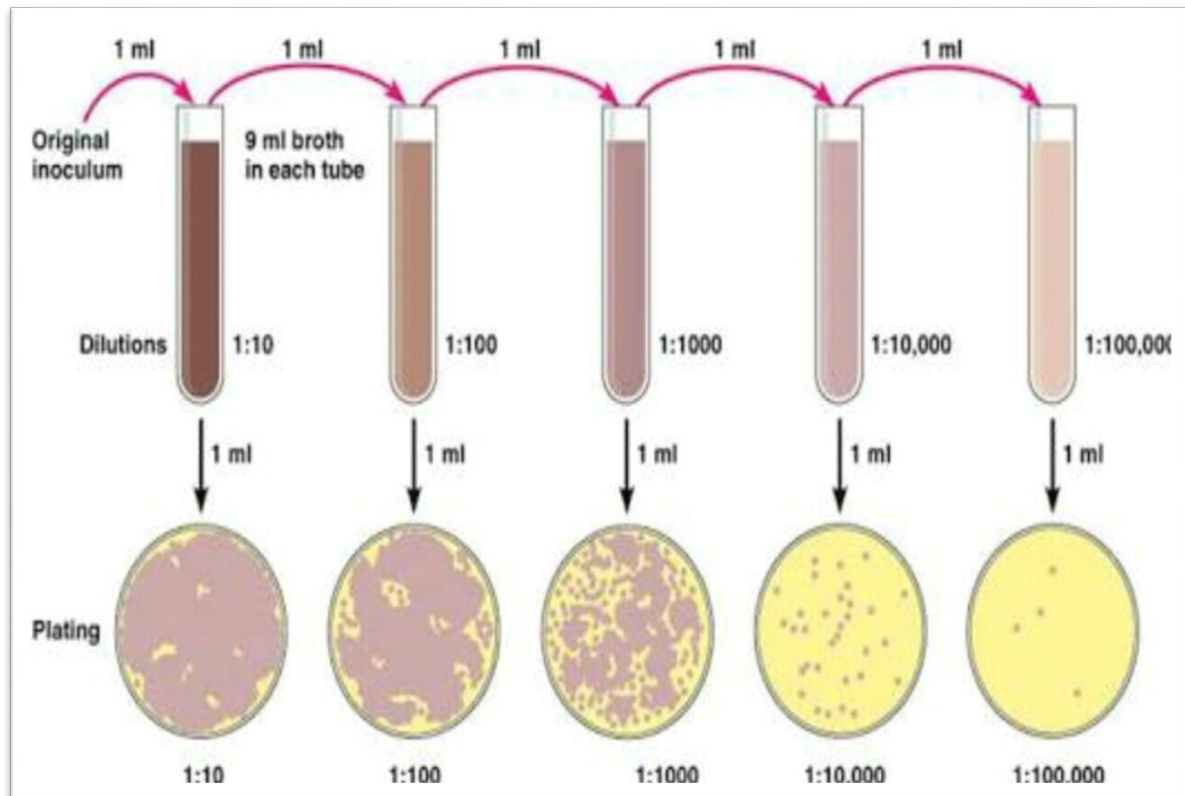


Figure 9 : Méthode de dilutions décimales (Balouiri et al., 2016)

Sur la gélose nutritive 1 ml de chaque dilutions est ensemencé ensuite incubé à 30°C pendant 48h.

Après incubation ; l'obtention des colonies a purifier sur GN.

2.5 Dénombrement de la microflore totale

Afin de dénombrer la microflore existante dans les échantillons de sol contaminés par les hydrocarbures, nous avons procédé à une culture sur gélose nutritive. Pour se faire, une série de dilution variant de 10^{-1} à 10^{-6} a été préparée selon les étapes suivantes:

2.5.1 Préparation de la solution mère

A partir d'un échantillon de sol destiné à l'analyse microbiologique, 1 g de sol est pesé puis introduit dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique préalablement autoclavée . Le tube est ensuite agité énergiquement pendant 2 minutes. Le contenu du tube représente la solution mère (figure9).

Matériel et méthodes

2.5.2 Ensemencement par étalement sur gélose nutritive

Le milieu gélosé préalablement fondu est réparti dans des boîtes de pétri à une hauteur d'environ 3 à 4 mm qu'on laisse ensuite refroidir. 0.1 ml de chaque dilution est prélevé à l'aide d'une pipette Pasteur puis déposé sur la gélose, ensuite étalé sur toute la surface du milieu.

Après 24h à 48h d'incubation à 30°C, les colonies développées sont dénombrées manuellement.

Le nombre de germes par gramme de sol est déterminé en calculant la moyenne arithmétique des résultats obtenus et en tenant compte des facteurs de dilution, selon la formule:

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

Où :

N : nombre des microorganismes en UFC/ ml

n: nombre des colonies dénombrées.

v: Volume prélevé (0.1ml).

d: Dilution (**Marchal ; Bourdon, 1982**).

2.6 Purification

Pour la purification de la microflore qui existe dans les échantillons contaminé par les hydrocarbures, on a suivi les étapes suivantes :

☆ Culture sur la GN par méthode d'ensemencement Incubation à 30°C Pendant 24 à 48 heures .Après incubation et obtention des souches diversifiées, la purification qui mène à des cultures pures s'effectue par repiquage successif des colonies prélevées et puis ensemencées par méthode de stries . (**Martineau, 1996**).

2.6.1 Conservation des souches isolées

Les souches isolées sont conservées dans des tubes à essai contenant le milieu gélose nutritive incliné. Les souches sont ensemencées en stries sur la pente des tubes, puis incubées à 30°C pendant 24 heures. Les tubes dans lesquels il y a eu une croissance seront bouchés et conservés à 4°C pour une durée de 4 à 6 semaines. Afin de pouvoir toujours disposer de souches viables, la réactivation doit se faire tous les mois (**Martineau, 1996**).

Matériel et méthodes

2.6.2 Activation des souches

Un échantillon de chaque type de colonie est prélevé et ensuite purifié par repiquages successifs selon la méthode de stries pour obtenir des colonies bien distinctes

Cette opération consiste à prendre une colonie bien isolée et la déposer dans un boîte de Pétri contient gélose nutritive ordinaire (GN) et (BN). Ensuite les boîtes sont incubées pendant 24 heures à 30°C. (Delarras, 2014).

Le Bouillon Nutritif

Est un milieu largement utilisé pour la culture des micro-organismes peu exigeants. Il est recommandée dans de nombreuses méthodes standardisées d'analyses des aliments, des laitages, de l'eau et d'autres produits(SO 8523. 1992).

2.7 Pré-identification des souches purifiées

2.7.1 Teste de biodégradation

Pré-culture

Prélever une colonie à partir d'un milieu gélosé et la mettre dans un tube à essai contenant 10 ml du milieu BN. Incubation à 30°C pendant 24h sous agitation rotative (160 tour /min)

Elle consiste à réalisée des incubations en milieu liquide (milieu MSM) en utilisant le pétrole brut comme source de carbone (à 2% du volume de milieu) (Vandecasteele et al, 2008).

Dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de milieu MSM on les ensemence par 1% de la pré-culture de chaque souche sélectionnée sur le milieu. L'incubation est effectuée à 30°C avec une agitation à 160 tours/min pendant 7 jours (Vandecasteele et al, 2008) avec quelque modification (Figure10). Le milieu de sels minéraux utilisé pour les expériences de biodégradation était le Bushnell-Haas La composition du milieu BH est la suivante :(g/l): 1, 0, KH₂P₀₄; 1, 0, K₂H₂P₀₄; 1, 0, NH₄N₀₃; 0,2, MgS₀₄·1H₂₀; 0,05, FeCl₃; 0,02, CaCl₂·2H₂₀. (Deziel, 1996).



Figure 10 : Suivi de la cinétique de croissance des souches isolées et purifiées par mesure de la densité optique.

Le suivi de la croissance bactérienne est réalisé en mesurant (D.O) au moyen d'un spectrophotomètre UV- visible à une longueur d'onde de 600 nm. Cette mesure est considérée comme indicateur biologique direct de la biodégradation

2.8 Caractérisation des isolats purifiés

2.8.1 La croissance sur les milieux King A, King B et GN

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

Milieu King A

C'est un milieu sélectif utilisé pour la mise en évidence de la pyocyanine : La pyocyanine est un pigment qui bleuit le milieu, soluble dans le chloroforme et l'eau sa production est favorisée par la présence d'ions inorganiques dans le milieu et la culture se fait à 30°C pendant 24 à 72 h(King et al., 1954). Le pigment pyocyanine produit permet l'identification de *Pseudomonas aeruginosa* (Marchal ; Bourdon, 1982).

Milieu King B

C'est un milieu sélectif utilisé pour la recherche de la production de la pyoverdine qui jaunit le milieu. (King et al., 1954). sur le milieu King B la production du pigment pyoverdine est favorisé, ce pigment jaune verdâtre fluorescent produit par *Pseudomonas aeruginosa* et d'autres *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*). La pyoverdine se manifeste par une coloration vert fluorescent du milieu de culture (Marchal ; Bourdon, 1982).

Matériel et méthodes

Milieu de la gélose nutritive (GN)

C'est un milieu non sélectif contenant une base nutritive ordinaire permettant la culture des bactéries non exigeantes comme les *Pseudomonas*. Il met en évidence la production des deux pigments ; la pyoverdine et la pyocyanine. La culture se fait à 30°C pendant 24 à 72 h. (Lapage ; Mitchell, 1970).

2.9 Etude morphologique

2.9.1 Aspect macroscopique

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification

Les éléments d'identifications macroscopiques sont :

La forme des colonies : rondes, irrégulières,...etc.

La taille des colonies par la mesure du diamètre : punctiformes ou plus

L'élévation : convexe, concave, plate.

L'opacité : opaque, translucide ou transparente.

La surface : lisse, rugueuse, sèche, dentelée,... (Jourdain ; Charissou, 2007).

2.9.2 Aspect microscopique

permet de déterminer la forme, l'arrangement et la mobilité des bactéries .Il consiste en l'observation d'une goutte de suspension bactérienne, préparée avec de l'eau physiologique et placée entre lame et lamelle. L'observation se fait au microscope photonique à grossissement X 100 (Singleton, 1999).

2.9.2.1 Etat frais

Il s'agit de déterminer si la bactérie est mobile ou non. Ce test permet également de déterminer la forme, l'arrangement et la mobilité des bactéries. Il consiste en l'observation d'une goutte de suspension bactérienne, préparée avec de l'eau physiologique et placée entre lame et lamelle. L'observation se fait au microscope optique de type Bently laboscop 200 au grossissement x100(annexe2) (Delarras, 2014).

2.9.2.2 Coloration de Gram

La coloration de Gram est une méthode rapide qui permet de caractériser la présence de bactéries sur des échantillons de tissus cellulaires et de distinguer les bactéries à Gram positif des bactéries à Gram négatif en se basant sur les propriétés chimiques et physiques de leurs parois (annexe2).

Matériel et méthodes

2.10 Identification biochimique

2.10.1 L'étude de métabolisme respiratoire

Test de catalase

Sur une lame en verre bien nettoyée on met une goutte de l'eau distillée, puis on dissocie un fragment de culture bactérienne, en formant une suspension et on ajoute une goutte d'eau oxygénée.

Le dégagement d'oxygène se traduit par effervescence qui est un résultat positif visible à l'œil nu, l'absence d'effervescence est un résultat négatif.



2.10.2 Type respiratoire

Le milieu viande foie

La détermination du type respiratoire s'effectue sur la gélose viande foie semi-solide. Le milieu est régénéré au bain-marie, refroidi à une température de 45 °C, coulé dans des tubes à essai stériles. Les tubes sont ensuite stérilisés et inoculés à l'aide d'une pipette pasteur et incubés à une température 30 °C pendant 24 heures (figure10) (Prescott, 2002).

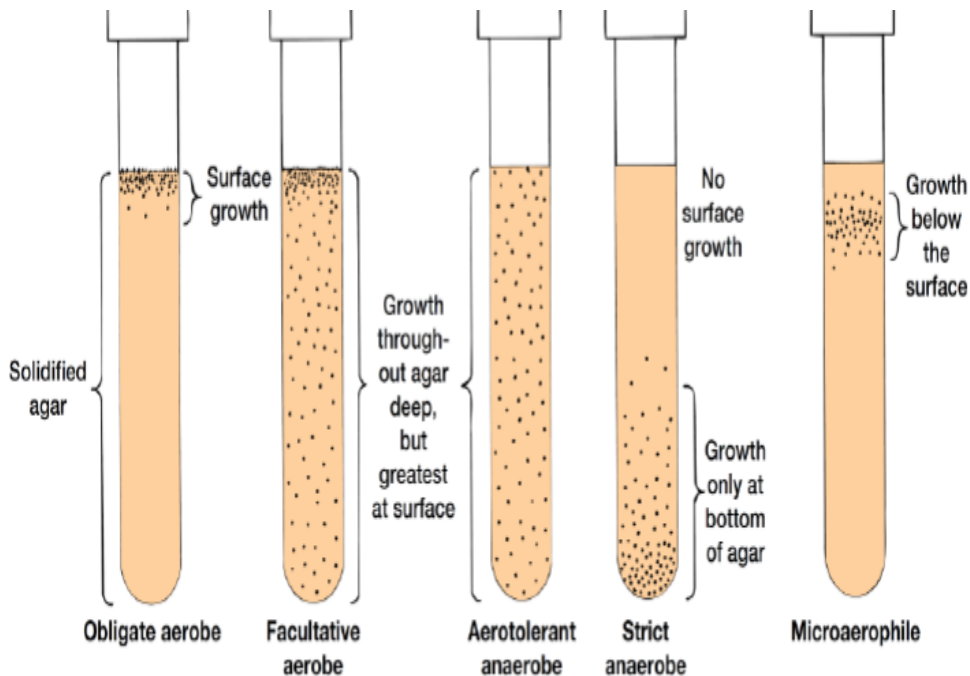


Figure11: Détermination du type respiratoire (Prescott, 2002).

Matériel et méthodes

2.10.3 Le métabolisme glucidique

2.10.3.1 Utilisation du lactose et du saccharose, fermentation du glucose et la production d'H₂S (gélose TSI)

La gélose TSI Agar (Triple Sugar Iron) est utilisée pour déterminer la fermentation de glucides et la production d'acide sulfhydrique pour identification des bacilles Gram négatifs. (MacFaddin, 1985 ; Forbes ,2002).

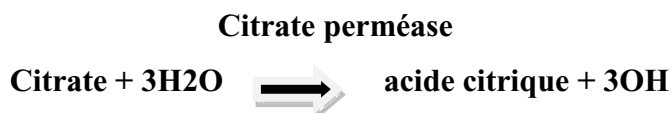
Hajna a développé la formulation de la gélose TSI Agar en ajoutant du saccharose à la formulation de la gélose Kligler Iron Agar, qui contient un sucre double (dextrose et lactose), L'ajout de saccharose a accru la sensibilité du milieu en facilitant la détection des bacilles fermentant le saccharose et celle des fermentant de lactose et/ou de dextrose. (Hajna, 1945)

2.10.3.2 Recherche de Citrate perméase

Citrate de simmon

Ce milieu permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie. Ce caractère est intéressant pour discriminer les bactéries entre-elles et ainsi de les identifier. Le substrat ici est le citrate. Il est ici la seule source de carbone et d'énergie pour la bactérie. Seules les bactéries possédant une enzyme citrate perméase seront donc capables de se développer sur ce milieu. L'utilisation de citrate provoque l'alcalinisation du milieu selon la réaction suivante

<http://romain.ferry.pagesperso-orange.fr/micro/matmicro/micmil/milcits/cit0000.htm#lect>



2.10.3.3 Milieu clark et lubs

Le milieu de Clark et Lubs permet de différencier les *Enterobacteriaceae* avec les réactions au rouge de méthyle et de Voges-Proskauer. Le rouge de méthyle différencie le processus de fermentation, il est jaune au-dessus d'un pH de 6,3 et rouge en dessous de 4,2. La production d'acétylméthylcarbinol se révèle par l'apparition d'une coloration rouge en surface du milieu. Ce test est réalisé lors de l'identification de très nombreuses bactéries (Gram + et Gram -). La β -galactosidase est une enzyme qui intervient dans le métabolisme du lactose. L'utilisation du lactose par la bactérie requiert deux enzymes:

- la lactose perméase qui permet au lactose de pénétrer dans la bactérie

Matériel et méthodes

• la β -galactosidase qui catalyse l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose. La recherche de la β -galactosidase ne présente d'intérêt que pour les bactéries lactose -. En effet, toutes les bactéries lactose + sont

β -galactosidase +. La recherche de l'enzyme est donc inutile. (holt et al.,1994)

2.10.3.3.1 Test au rouge de méthyle (RM)

Clark et Lubs 1915 ont utilisé le rouge de méthyle comme indicateur de la production d'acides dans le milieu. Ce test, connu maintenant sous le nom de réaction au rouge de méthyle, permet de différencier les germes produisant beaucoup d'acides à partir du glucose et entraînant une chute du pH en dessous de 4,4, de ceux qui ne font pas baisser le pH. Le rouge de méthyle ajouté dans le milieu de culture permet de visualiser la différence de pH (milieu rouge à pH < 4,4 ; orange à pH 5,0–5,8 ; jaune à pH > 6,0) (Clark ; Lubs 1915).

2.10.3.3.2 Réaction de voges-proskauer (VP)

Voges et Proskauer 1898 ont décrit une coloration rouge fluorescente apparaissant après addition d'hydroxyde de potassium dans des cultures de certains germes en milieu glucosé. Cette coloration était due à l'oxydation de l'acétylméthyl-carbinol en diacétyl réagissant avec la peptone du milieu qui vire alors au rouge. Durham observa une réaction positive avec *Enterobacter aerogenes* et pas avec *Escherichia coli* ; puis on a mis en évidence une relation inverse entre la réaction au rouge de méthyle et celle de Voges-Proskauer pour les coliformes fermentant le lactose (Voges ; Proskauer. 1898).

2.10.3.4 Recherche de la β -galactosidase ou ONPG - hydrolase

Pour dégrader activement le lactose, les microorganismes doivent posséder deux enzymes ; la perméase et la β -galactosidase. L'ONPG soit β -galactoside possède une structure analogue au lactose. Le lactose est formé de molécules de glucose et de galactose, Tandis que l'ONPG est composée d'une molécule d'orthonitrophényl liée à un galactose. L'hydrolyse de l'ONPG (composé incolore) libère l'orthonitrophényl qui est responsable de la coloration jaunâtre du milieu (Marchal et Bourdon, 1982). La réaction (figure 12) se déroule comme suite:

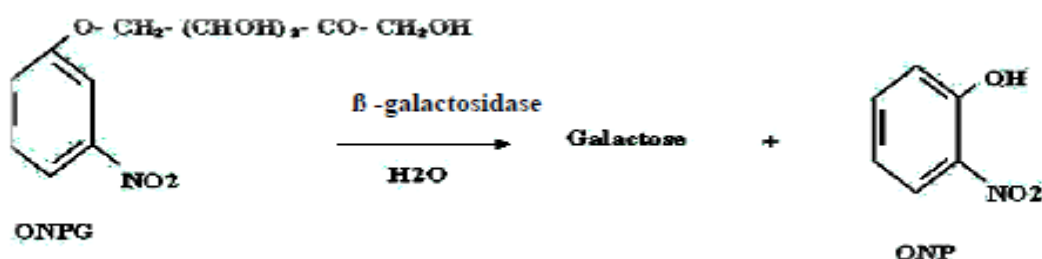


Figure12: Réaction d'hydrolyse de l'ONPG (Marchal et Bourdon, 1982).

Matériel et méthodes

2.10.3.5 Mannitol Mobilité

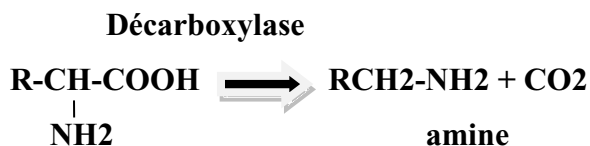
Le Mannitol est un produit de réduction de D-Mannose. Sa dégradation conduit à la formation du fructose dont l'attaque aboutit à la formation des acides à chaînes très courtes (Acide acétique, Acide formique). Le milieu Mannitol mobilité permet la recherche simultanément de la fermentation du Mannitol et la mobilité des bactéries (**Marchal ; Bourdon, 1982**).

- La fermentation du Mannitol entraîne le virage du milieu au jaune.
- Les souches mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement.

2.10.4 Le métabolisme protéique

Recherche des décarboxylases (ODC, LDC, ADH)

Les décarboxylases scindent les acides aminés entraînant la formation de l'amine correspondant avec la libération de CO₂ selon la réaction suivante:



Acide aminé

Il s'agit d'enzymes induites dont la synthèse est favorisée par un pH acide (pH entre 3.5 et 5.5) et des conditions d'anaérobiose (**Marchal ; Bourdon ,1982**).

Les décarboxylases sont:

- Lysine décarboxylase (LDC): Lysine $\xrightarrow{\quad}$ Cadavérine + CO₂.
- Ornithine décarboxylase (ODC): Ornithine $\xrightarrow{\quad}$ Putricine + CO₂.
- Argénine dihydrolase (ADH): Argénine $\xrightarrow{\quad}$ Agmatine + CO₂.

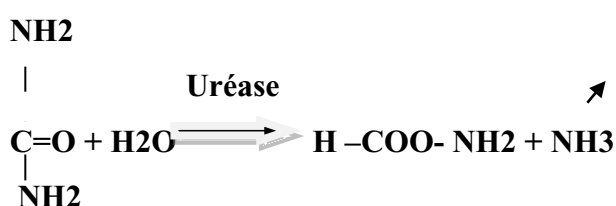
2.10.4.1 Urée –indole

est un milieu permettant l'identification de germes, particulièrement des entérobactéries, par la recherche d'une enzyme appelée uréase ce qui provoque une réaction acidifiant le milieu qui fait virer l'indicateur coloré. (**Rasmussen, 1999**).

Ce test s'effectue en utilisant un milieu riche en tryptophane exempt d'indole (ou milieu urée-indole). L'indole produit par la bactérie est mis en évidence par le réactif de Kovacs (**Marchal ; Bourdon, 1982**).

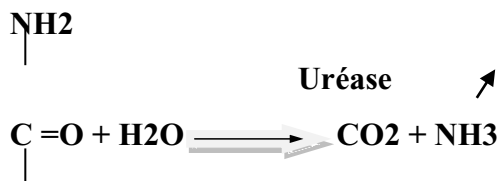
Recherche de l'uréase

Toutes les bactéries hydrolysent l'urée grâce à la réaction suivante:



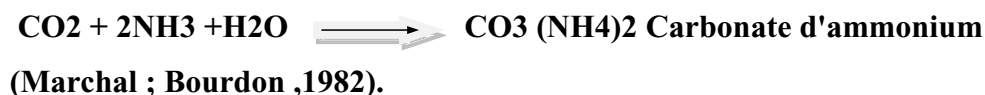
Matériel et méthodes

Seule, une uréase très active aboutit finalement à la réaction :



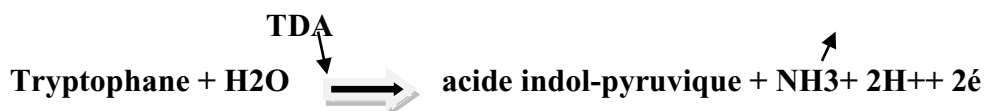
NH₂

Le CO₂ et le NH₃ en présence d'eau se combinent en donnant le carbonate d'ammonium selon la réaction:



2.10.4.2 Recherche de la tryptophane-désaminase (TDA)

La désaminase agit sur le L- tryptophane en donnant l'acide indole-pyruvique. Ce dernier donne avec le perchlorure de fer une coloration brune (Marchal ; Bourdon, 1982). Selon la réaction:



2.10.4.3 Gélatine Recherche de gélatinase (Collagénase)

La gélatine nutritive, milieu solide à 22°C et en-dessous, est utilisée pour la recherche de la liquéfaction de la gélatine et la numération des germes à 20°C.

La gélatine est liquéfiée de façon caractéristique par certains germes protéolytiques ; bien que les milieux à la gélatine aient été largement supplantés par les milieux gélosés dans la plupart des cas, la gélatine nutritive est toujours utilisée pour différencier les microorganismes par leur pouvoir protéolytique (Marchal ; Bourdon, 1982).

2.10.5 Galerie Api 20e

API 20 E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux (Appelbaum et al.1980 ; DEellaras 2015) et en particulier *pseudomonas* , comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le Tableau d'Identification en fin de notice (annexe 3). (Appelbaum et al., 1980)



Figure 13 : la galerie API20E avant inoculation.

3 Application des isolats 1 et 2 pour l'épuration (traitement biologique) d'eau de procédés de raffinage pétrolier à échelle pilot.

Ce travail a été réalisé au zone 27 à la raffinerie D'Arzew, afin d'appliquée les isolats à un échelle minimisé, les analyses sont effectuée au laboratoire de la raffinerie, durant une période de 45 jours.

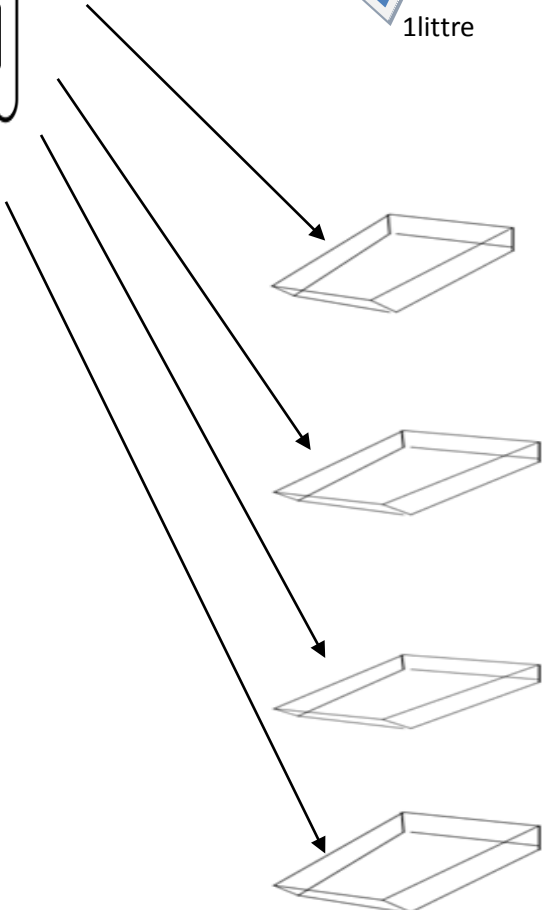
3.1 Échantillonnage

Les échantillons instantanés sont prélevés en milieux dynamiques en une seule prise dans un intervalle généralement inférieur à 15 minutes¹. Les échantillons instantanés sont principalement utilisés lorsque l'on veut (**Julie, 2007**).

L'échantillons ont été ainsi prélevés au cour de traitement a partir de la sortie **IGF**. Ces échantillons sont répartis en quatre aquariums (qui représentent l'échelle pilot) de quantité égaux de 1l, dans un system de réaction continue injecter de différentes concentration d'inoculum (schéma).

L'échantillon de l'eau est de couleur jaune ; trouble avec odeur désagréable.

Inoculum
bactérienne



Les bac représentent
l'échelle pilot

Figure 14 : Schéma représentative de la Stratégie minimisé de traitement biologique

Matériel et méthodes

3.2 Analyse des échantillons

Les paramètres analysés concernent les caractéristiques suivantes

- pH
- Demande chimique en oxygène
- Demande biochimique en oxygène (D.B.O)
- Hydrocarbures

Ces analyses sont réalisées d'une manière exhaustive sur tous les aquariums.

3.2.1 Mesure de potentiel d'Hydrocarbures

La détermination du **PH** de l'eau est liée à la nature de l'eau c'est à dire sa tendance acide ou basique. La notion du PH présente un intérêt dans certaines industries principalement celle liées à des phénomènes de corrosion, un **PH** d'une solution acide permet de se rendre compte de l'effet corrosif sur les canalisations (annexe 4) **ASTM D1293 (Volume 31)**

3.2.2 Demande chimique en oxygène (D.C.O)

PRINCIPE : La plupart des substances organiques et inorganiques oxydables présentes dans l'eau sont oxydées par une solution standard de Bichromate de Potassium dans l'Acide Sulfurique. L'excès de Bichromate de Potassium est titré par une solution standard de Fer et d'Ammonium en utilisant de l'Ortophénanthroline Ferreuse comme indicateur (annexe 4) **NF-T90101 Ou ASTM D1252.**

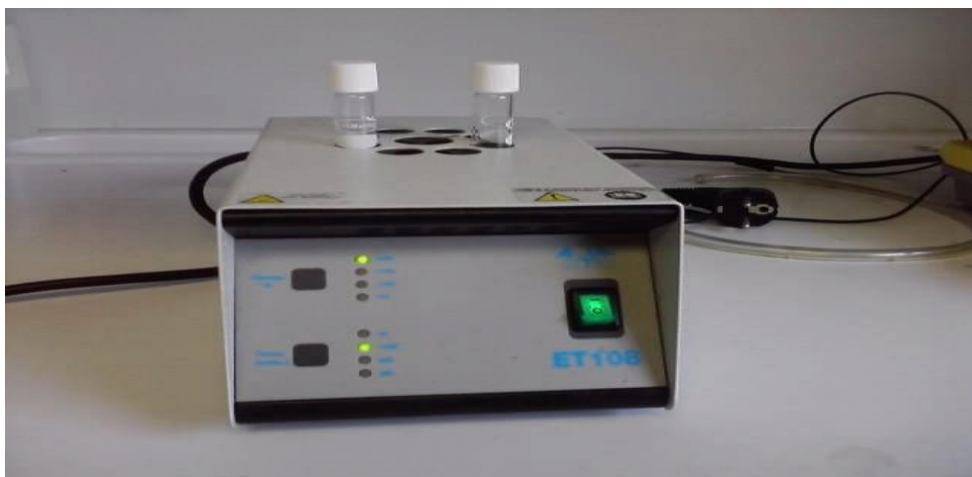


Figure 15: DCO mètre

3.2.3 Demande biochimique en oxygène (D.B.O)

PRINCIPE : Un échantillon définit en fonction du résultat attendu est placé dans un flacon raccordé à un manomètre. L'oxygène consommé par les bactéries se transforme en gaz carbonique conformément à la réaction :

Substance organique + Oxygène + Bactérie = CO₂ + H₂O + Energie et sel nutritif

La dépression ainsi entraînée est mesurée et affichée directement sur un manomètre gradué en mg/l d'Oxygène consommé.

Appareillage : Six flacons fixés à un support en acier inoxydable sont raccordés à des manomètres indépendants. Appareil de forme compacte avec des agitateurs magnétiques incorporés permettant une lecture aisée en mg/l d'Oxygène.

Un groupe froid et un chauffage peuvent leur procurer une thermostatisation efficace à (20° C ± 0.5) et homogène par un ventilateur incorporé ou incubateur réfrigérant pour le genre de DBO mètre type MANOMETRIQUE (annexe4) NF T90-103



Figure16 : DBO mètre

3.2.4 Dosage des hydrocarbures totaux

Les hydrocarbures totaux ont été caractérisés quantitativement. L'analyse quantitative des hydrocarbures totaux est effectuée à l'aide d'un analyseur d'hydrocarbures à infrarouge de type HORIBA (figure a). Ces hydrocarbures totaux sont constitués par des produits hydrocarbonés extractibles par le solvant (figure b) polychlorotrifluoroéthylène (S-316). La concentration de l'échantillon en hydrocarbures s'affiche dans l'appareil en mg/l(annexe 4)(**Livre de la société nationale de raffinage de pétrole**).

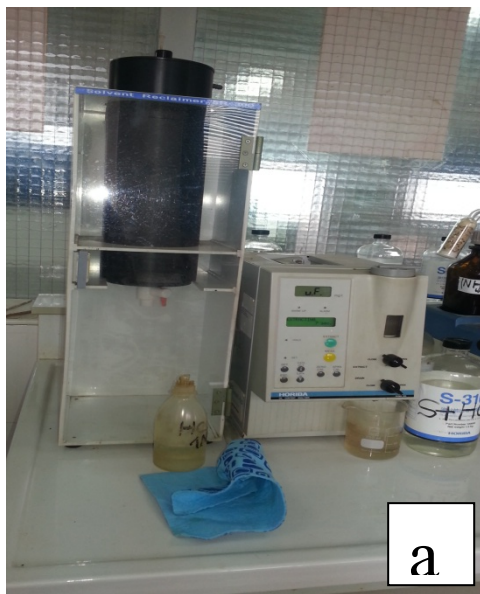


Figure17: appareille HORRIBA OCMA 310(a) solvant HORIBA(b).

1 Application des isolats 1 et 2 pour l'épuration (traitement biologique) d'eau de procédés de raffinage pétrolier à échelle pilot.

Ce travail a été réalisé au zone 27 à la raffinerie D'Arzew, afin d'appliquée les isolats à un échelle minimisé, les analyses sont effectuée au laboratoire de la raffinerie, durant une période de 45 jours.

1.1 Échantillonnage

Les échantillons instantanés sont prélevés en milieux dynamiques en une seule prise dans un intervalle généralement inférieur à 15 minutes¹. Les échantillons instantanés sont principalement utilisés lorsque l'on veut **(Julie, 2007)**.

L'échantillons ont été ainsi prélevés au cour de traitement a partir de la sortie **IGF**. Ces échantillons sont répartir en quatre aquariums (qui représentent l'échelle pilot) de quantité égaux de 1l, dans un system de réaction continue injecter de différentes concentration d'inoculum (schémafigure14).

L'échantillon de l'eau est de couleur jaune ; trouble avec odeur désagréable.

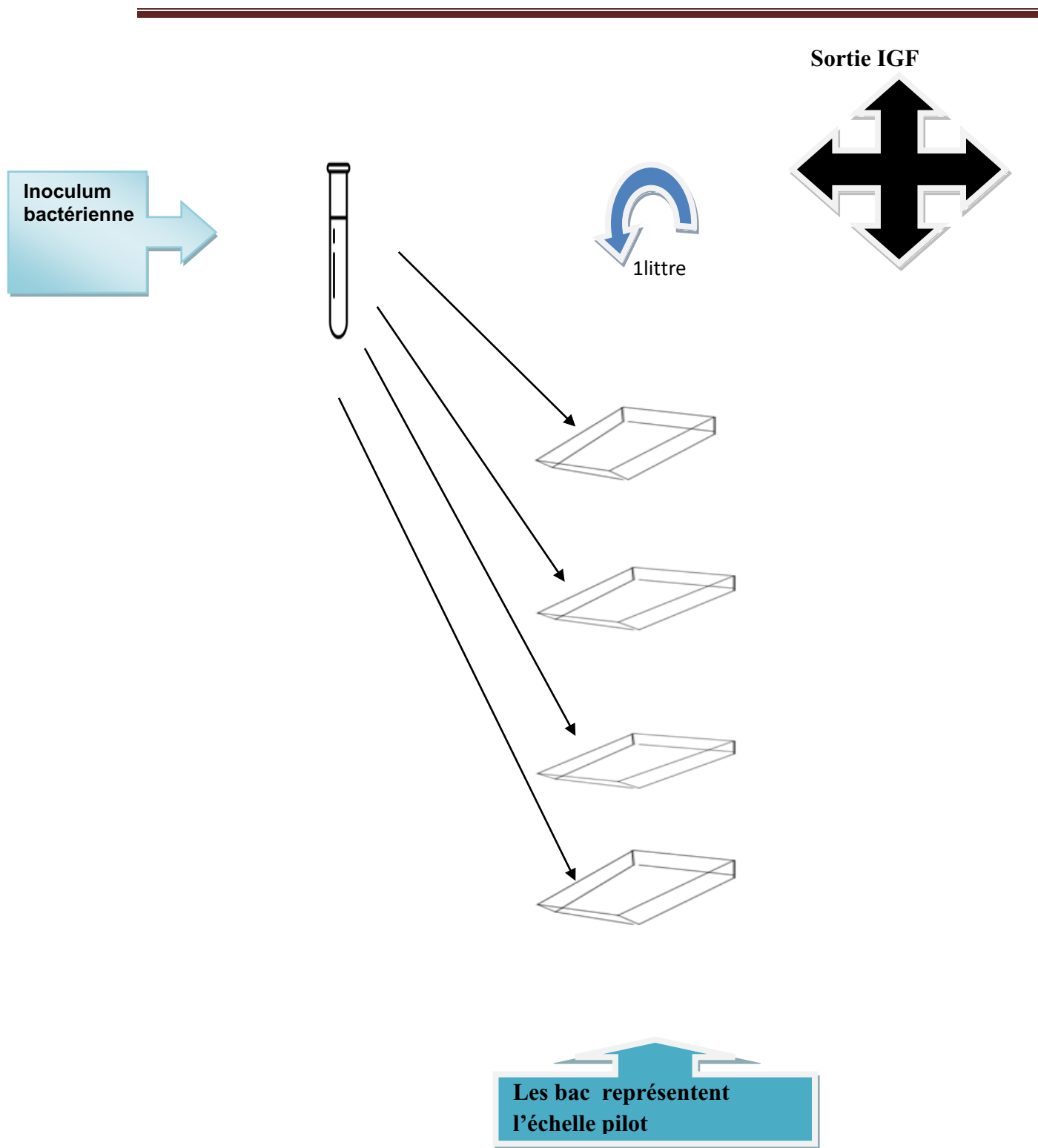


Figure 14 : Schéma représentative de la Stratégie minimisé de traitement biologique

1.2 Analyse des échantillons

Les paramètres analysés concernent les caractéristiques suivantes

- pH
- Demande chimique en oxygène
- Demande biochimique en oxygène (D.B.O)
- Hydrocarbures

Ces analyses sont réalisées d'une manière exhaustive sur tous les aquariums.

1.2.1 Mesure de potentiel d'Hydrocarbures

La détermination du **PH** de l'eau est liée à la nature de l'eau c'est à dire sa tendance acide ou basique. La notion du PH présente un intérêt dans certaines industries principalement celle liées à des phénomènes de corrosion, un **PH** d'une solution acide permet de se rendre compte de l'effet corrosif sur les canalisations (annexe4) **ASTM D1293 (Volume 31)**

1.2.2 Demande chimique en oxygène (D.C.O)

PRINCIPE : La plupart des substances organiques et inorganiques oxydables présentes dans l'eau sont oxydées par une solution standard de Bichromate de Potassium dans l'Acide Sulfurique. L'excès de Bichromate de Potassium est titré par une solution standard de Fer et d'Ammonium en utilisant de l'Ortophénanthroline Ferreuse comme indicateur (annexe4) **NF-T90101 Ou ASTM D1252.**

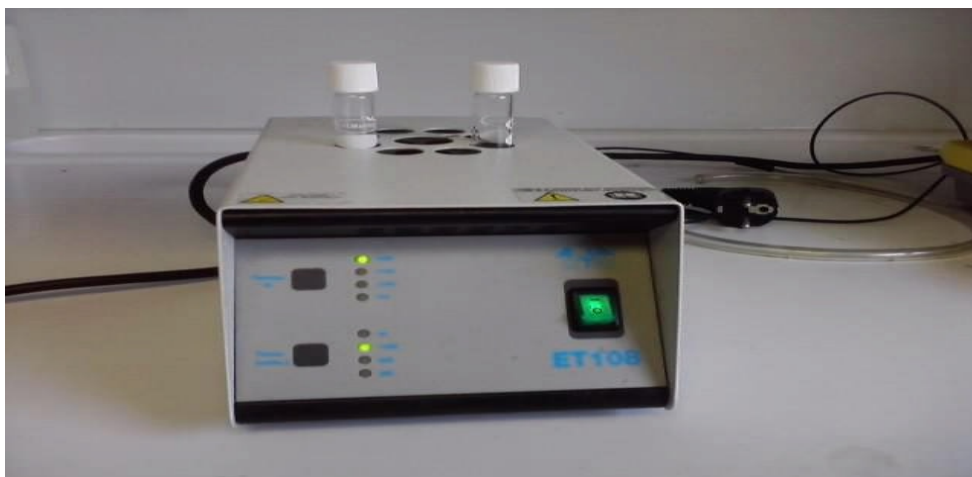


Figure 15: DCO mètre

1.2.3 Demande biochimique en oxygène (D.B.O)

PRINCIPE : Un échantillon définit en fonction du résultat attendu est placé dans un flacon raccordé à un manomètre. L'oxygène consommé par les bactéries se transforme en gaz carbonique conformément à la réaction :

Substance organique + Oxygène + Bactérie = CO₂ + H₂O + Energie et sel nutritif

La dépression ainsi entraînée est mesurée et affichée directement sur un manomètre gradué en mg/l d'Oxygène consommé.

Appareillage : Six flacons fixés à un support en acier inoxydable sont raccordés à des manomètres indépendants. Appareil de forme compacte avec des agitateurs magnétiques incorporés permettant une lecture aisée en mg/l d'Oxygène.

Un groupe froid et un chauffage peuvent leur procurer une thermostatisation efficace à (20° C ± 0.5) et homogène par un ventilateur incorporé ou incubateur réfrigère pour le genre de DBO mètre type MANOMETRIQUE (annexe4) NF T90-103



Figure16 : DBO mètre

1.2.4 Dosage des hydrocarbures totaux

Les hydrocarbures totaux ont été caractérisés quantitativement. L'analyse quantitative des hydrocarbures totaux est effectuée à l'aide d'un analyseur d'hydrocarbures à infrarouge de type HORIBA (figure a). Ces hydrocarbures totaux sont constitués par des produits hydrocarbonés extractibles par le solvant (figure b) polychlorotrifluoroethylene (S-316). La concentration de l'échantillon en hydrocarbures s'affiche dans l'appareil en mg/l(annexe 4)(Livre de la société nationale de raffinage de pétrole).



Figure17: appareille HORRIBA OCMA 310(a) solvant HORIBA(b).

1 Pré-identification des souches purifiées

1.1 Dénombrement de la microflore totale.

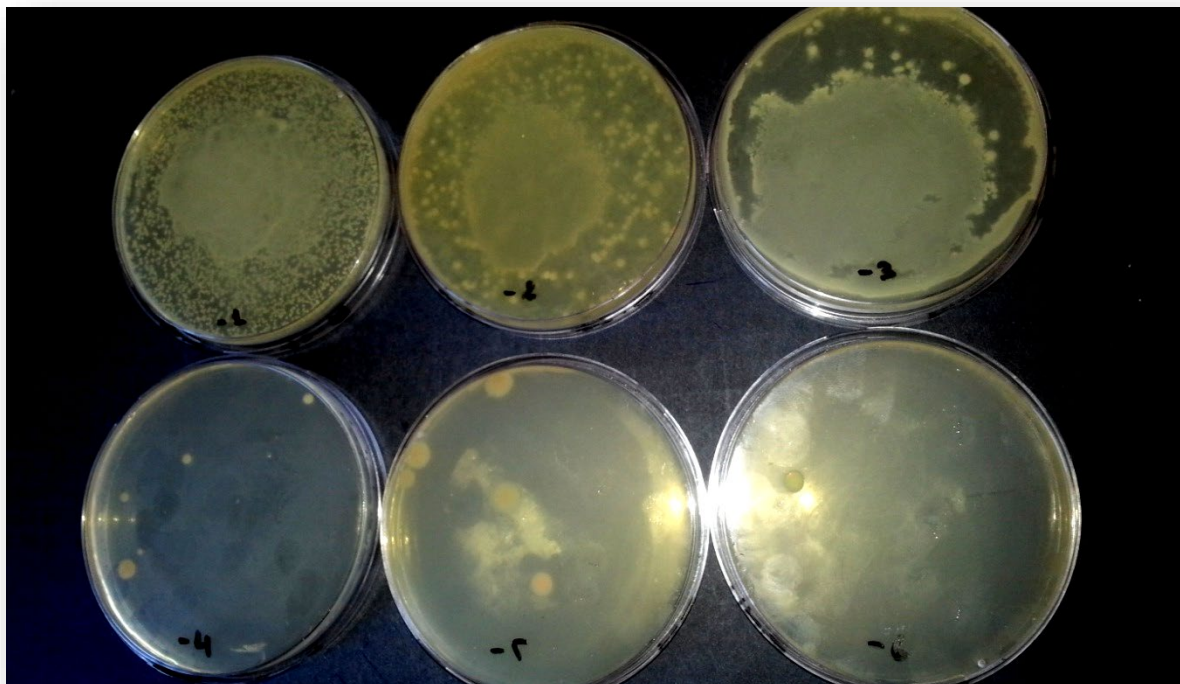


Figure 18 : Les boîtes de dilution décimale.

Tableau 7 : Nombre des microorganismes en UFC/g.

Dilution UFC/g	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
La flore totale	Indénombrable	Indénombrable	$19 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^6$

1.2 Tests des bactéries susceptibles de dégradation des hydrocarbures

Isolat 01

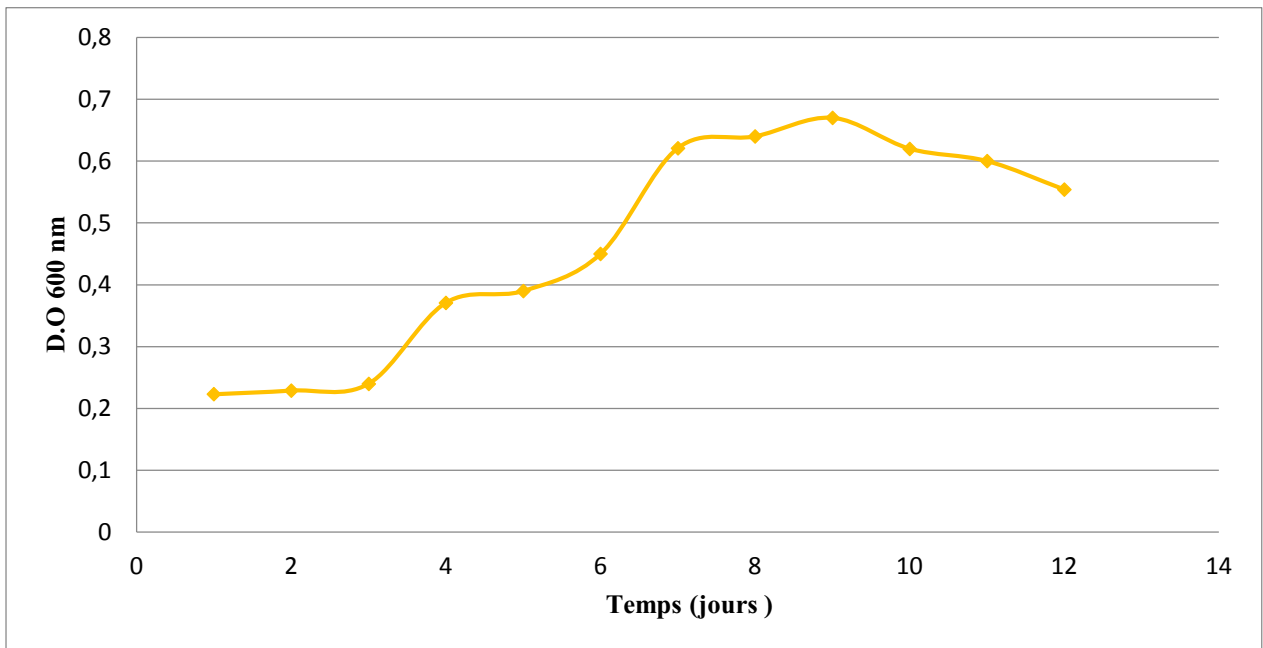


Figure 19: variation de la D.O en fonction du temps.

Isolat 2

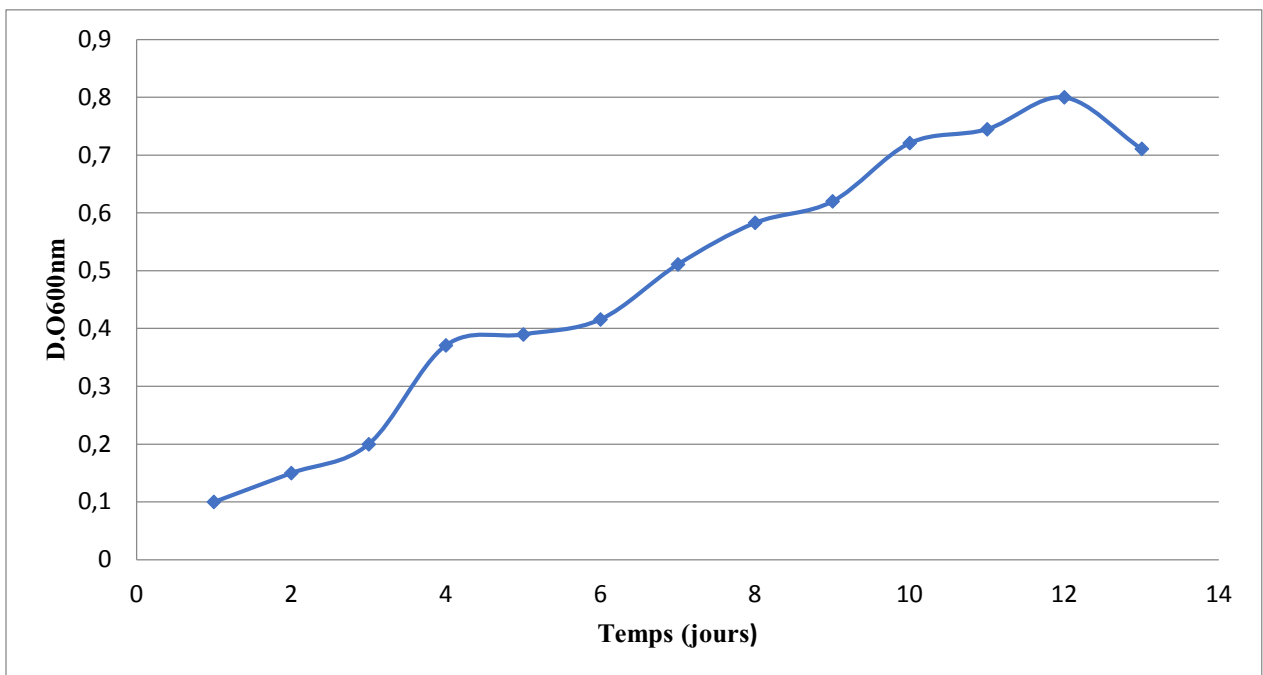


Figure 20 : variation de la D.O en fonction du temps.

Isolat 03

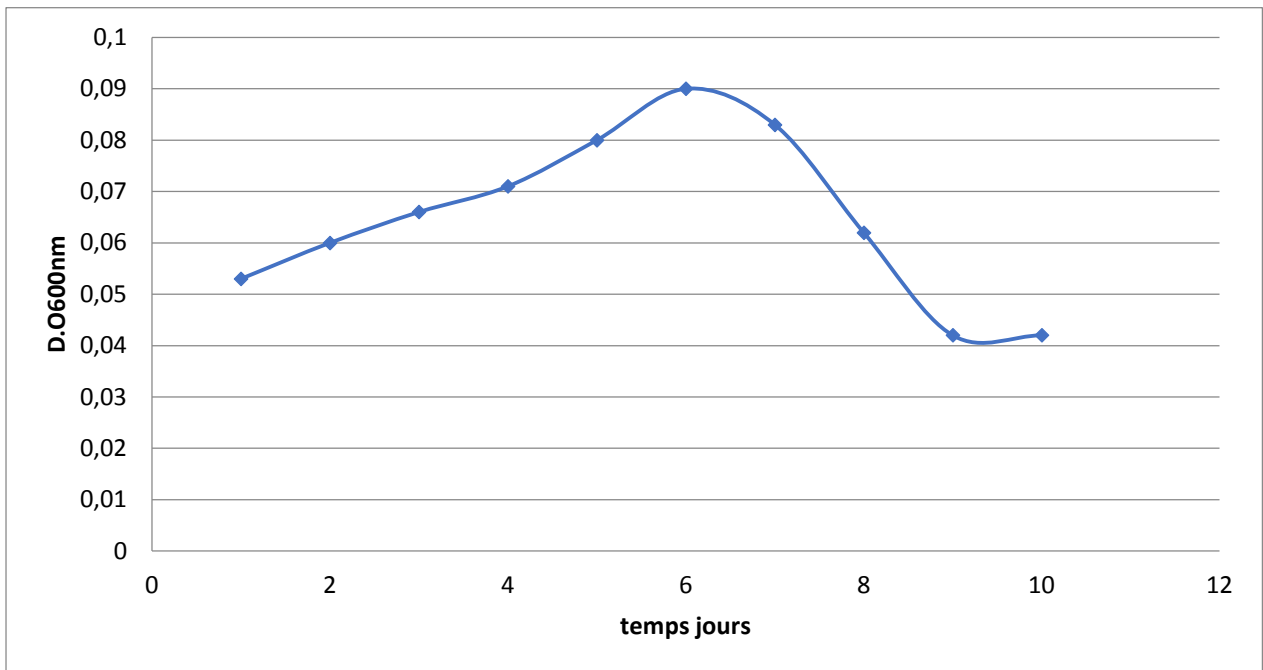


Figure 21 : variation de la D.O en fonction du temps.

Isolat 04

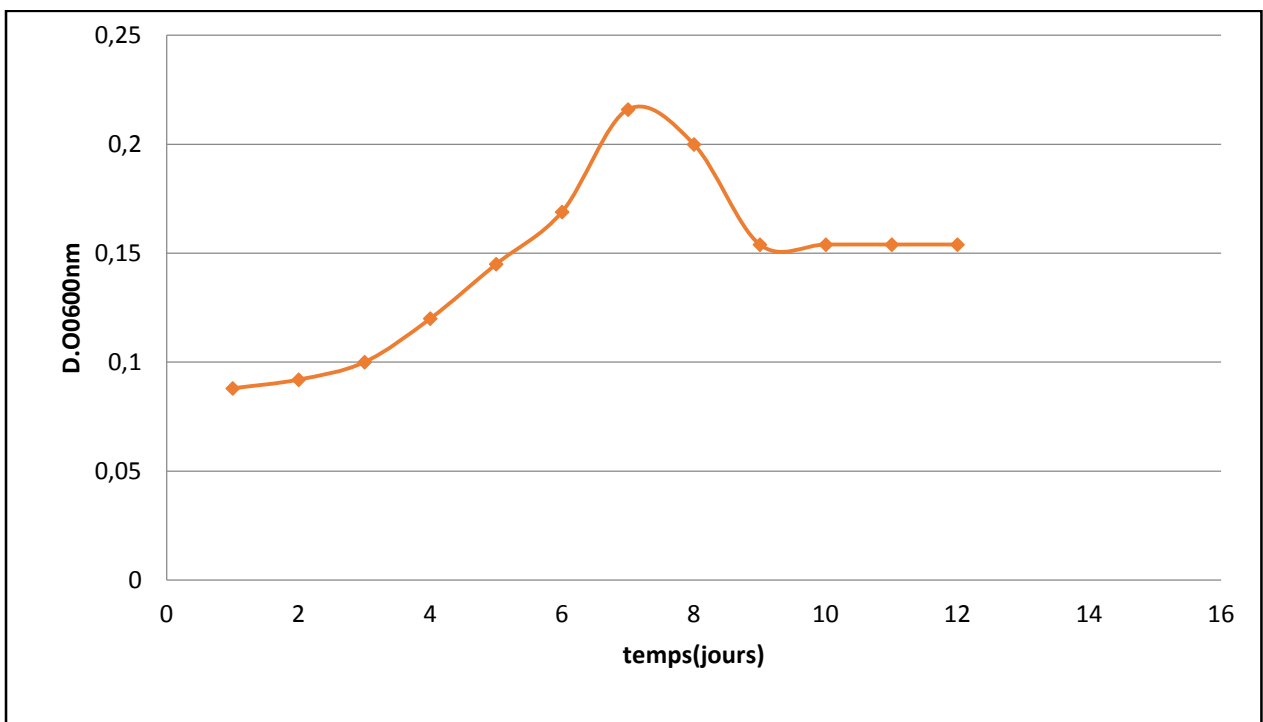


Figure 22 : variation de la D.O en fonction du temps.

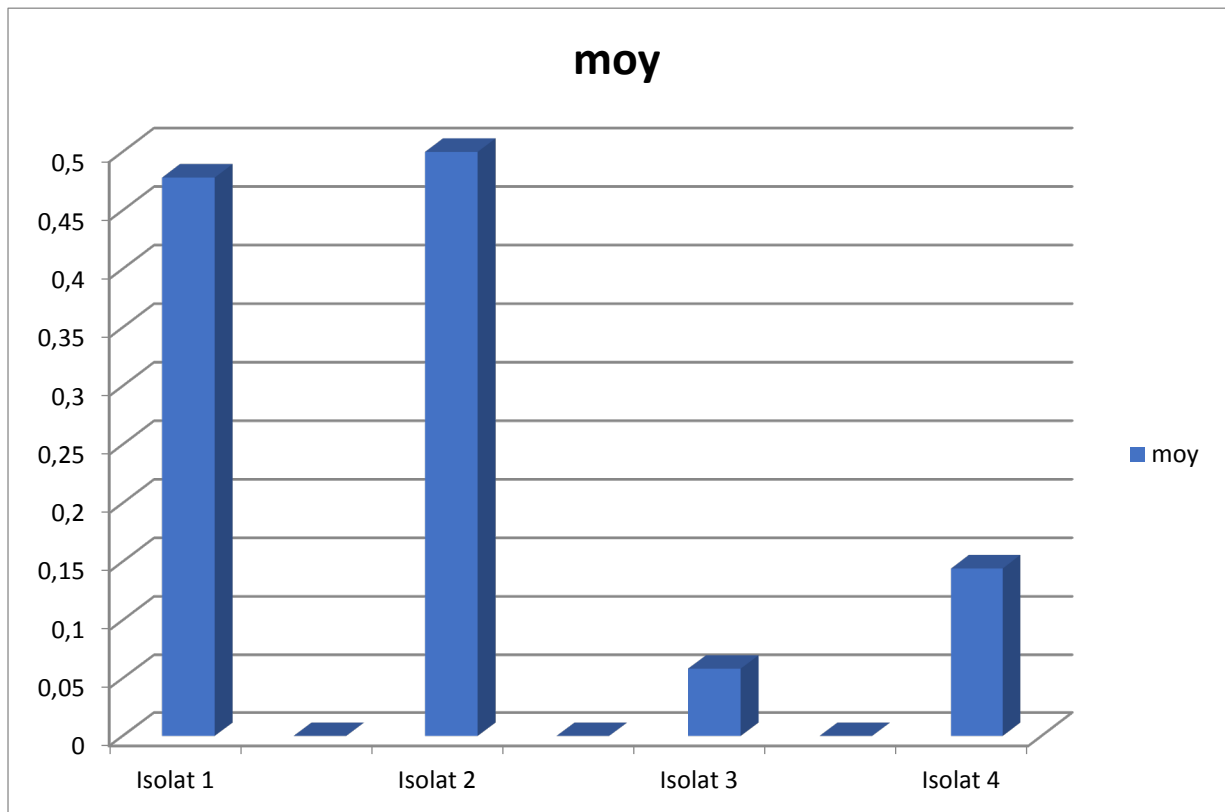


Figure 23 : La réalisation d'une comparaison graphique pour le bon choix d'isolat la ou les plus performante.

Caractérisation des isolats purifiés

2 Etude morphologique

2.1 Aspect macroscopique

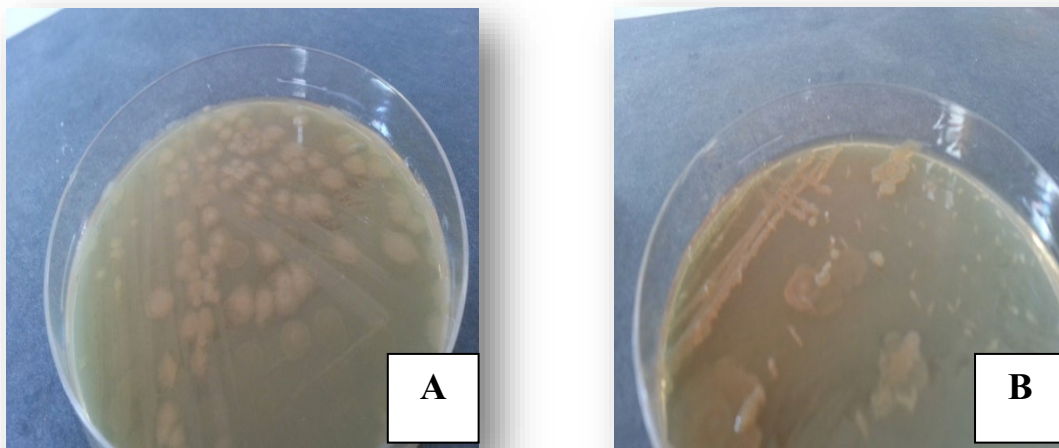


Figure 24 : Aspect macroscopique des isolats (A- Isolat 1, B – Isolat 2).

Tableau 8 : Aspect macroscopique des isolats (1 et 2).

Isolat	Isolat 1	Isolat 2
Diamètre	1 mm	1mm
Hauteur	Bombé	Convexe
Couleur	Vert fluorassent	Blue
Forme	Ronde à irrégulier	Irrégulier
opacité	Translucide	Translucide
Consistance	Muqueuse	Muqueuse
Surface	Lisse brillante	Brillante
Odeur	+ou -	+ou -

2.2 Aspect microscopique

2.2.1 Coloration de Gram

Après la coloration de Gram les souches purifiées sont apparues sous forme des bacilles roses. Elles possèdent des parois à Gram négatif (**Figure 25**).

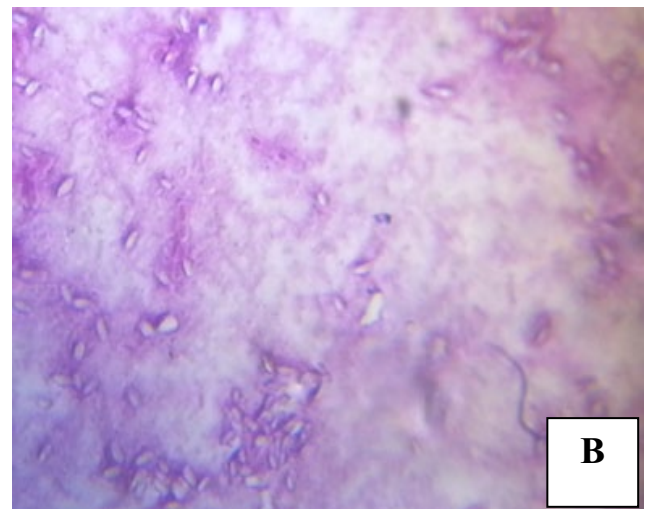
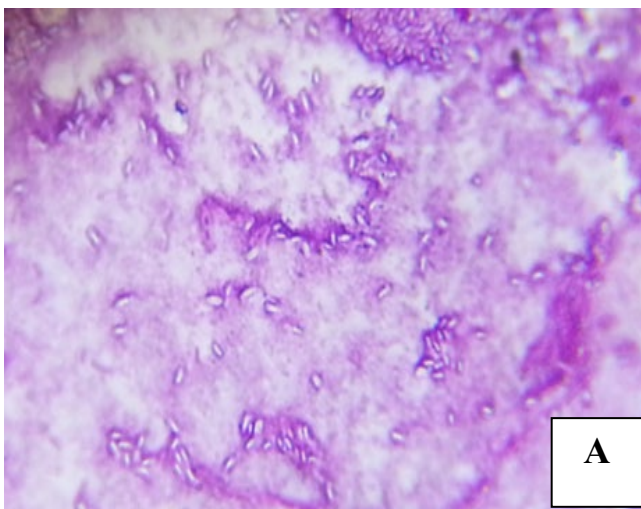


Figure25 : Aspect microscopique (Coloration de Gram) objectif 100X (A-Isolat1, B-isolat2)

Tableau 9 : Aspect macroscopique et microscopique des isolats (1 et 2).

Isolat	Isolat 1	Isolat 2
Gram	Négative	Négative
Mobilité	Mobile	Mobile
Mode d'association	Isoler	Isoler
Forme	Petite bacille	Petite bacille

3 Identification biochimique

L'ensemble des figures représentés les déférent testes

3.1

Croissance sur différent milieux

**King
A**

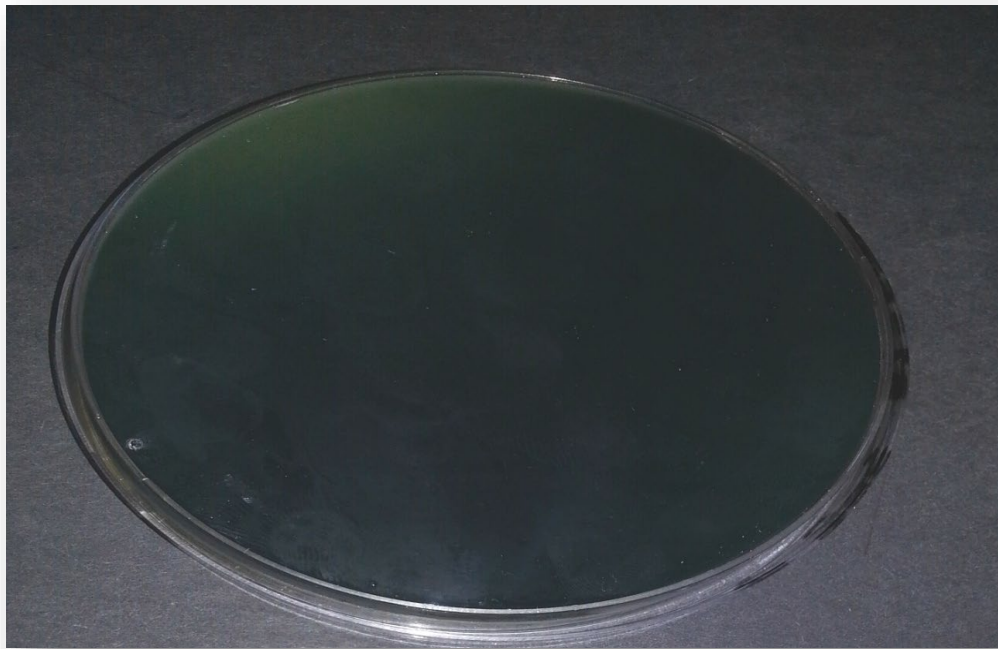


Figure26 : Croissance sur King A.

King
B



Figure 27 : Croissance sur King B.

GN



Figure 28 : Croissance sur GN.

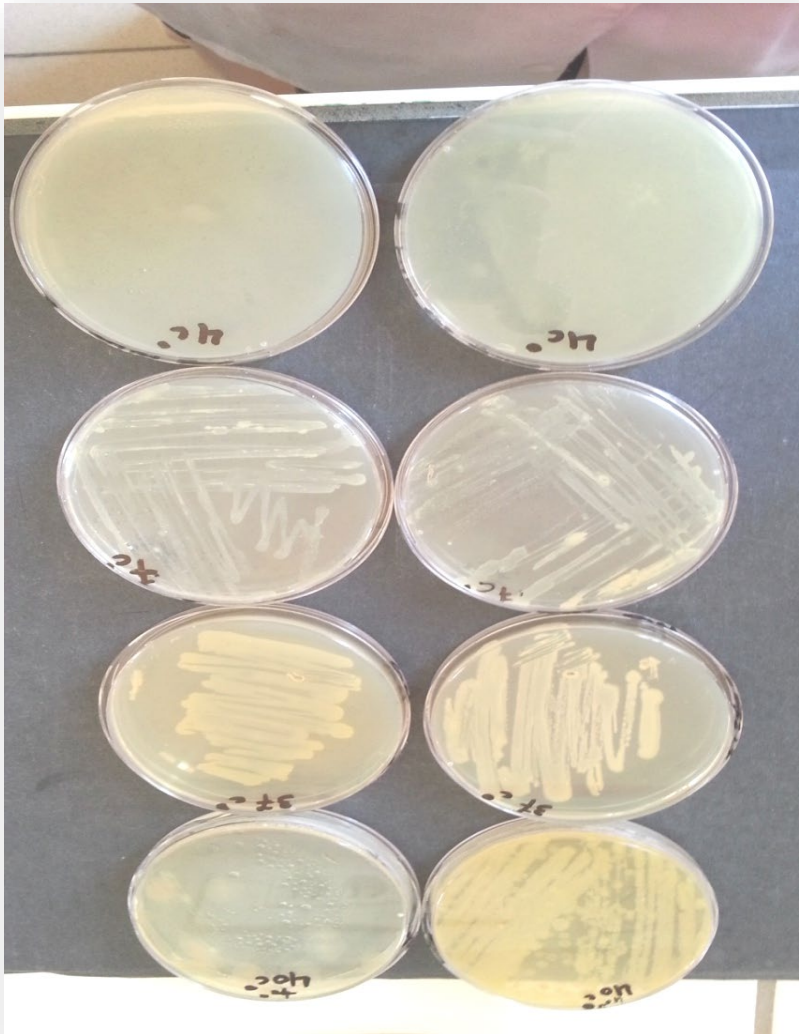
4°C	
7°C	
37°C	
40°C	

Figure 29 : Croissance sur déférent températures

3.2 L'étude de métabolisme respiratoire

Test de catalase

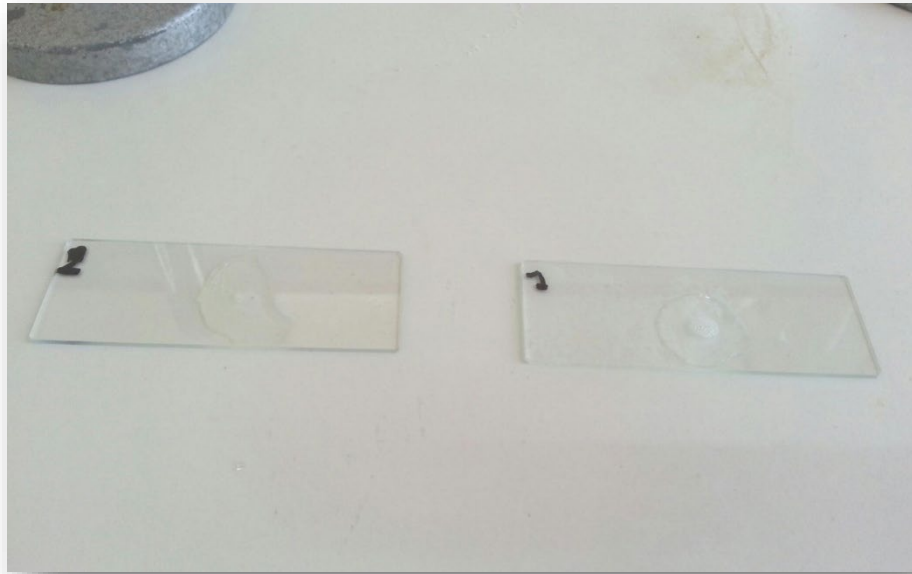


Figure 30 : Test catalase. (Isolat 1 et Isolat 2)

Type respiratoire

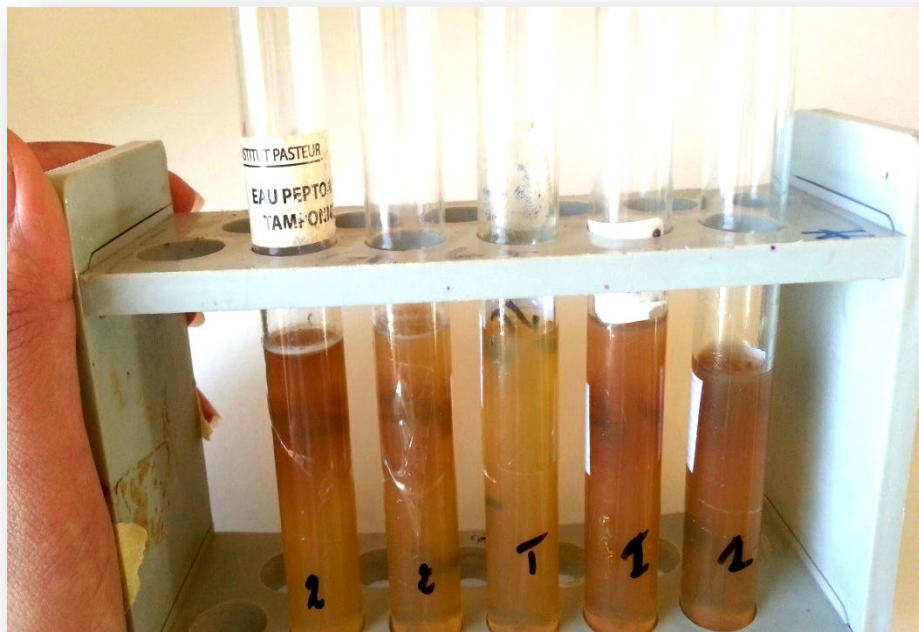


Figure 31 : milieu VF

3.3 Le métabolisme glucidique

Le métabolisme des glucides est dévoilé par l'utilisation de milieux de culture contenant un ou plusieurs glucides comme source de carbone et d'énergie. Les milieux utilisés sont respectivement : milieu TSI (tri sugar iron), milieu mannitol-mobilité, bouillon Clark et Lubs pour l'étude des dérivés d'acide pyruvique et milieu Citrate de Simmons.

Le métabolisme glucidique

Métabolisme
des sucres

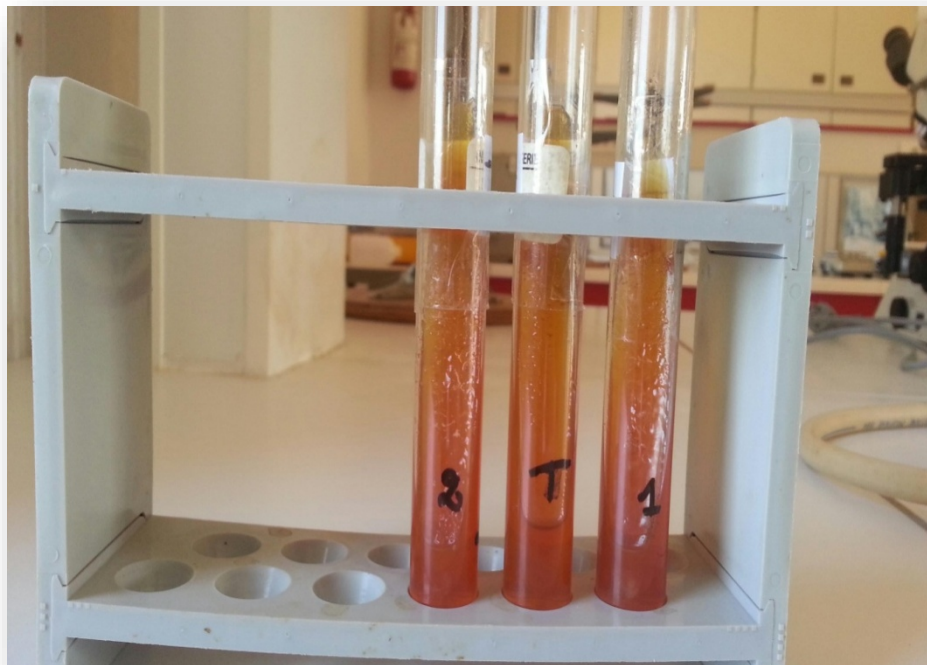


Figure 32 : milieu TSI.

**Recherche
de la citrate
Perméase**



Figure 33 : milieu Citrate de Simmons (Isolat 1 et Isolat 2).

**Fermentation
du
Mannitol
Et
confirmation
de la
mobilité**

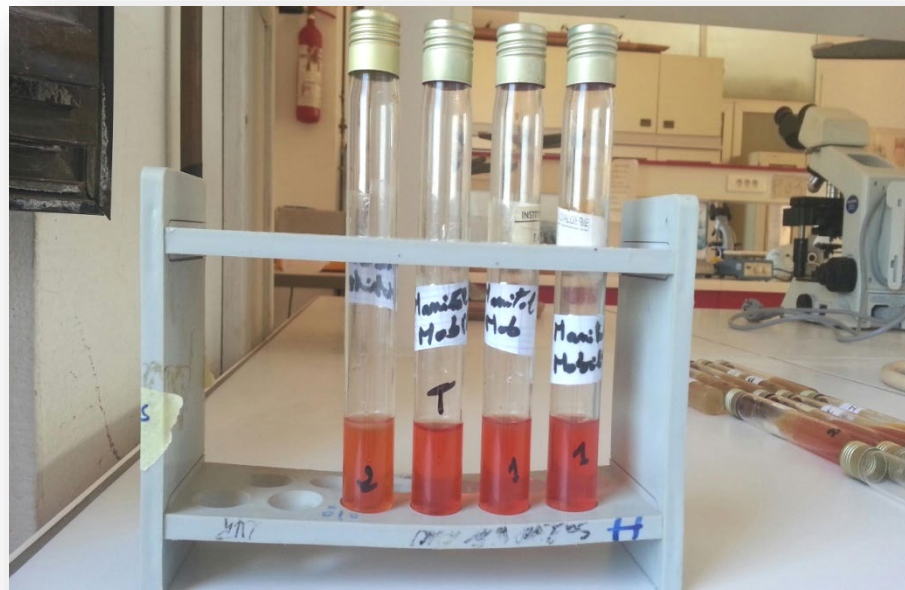


Figure 34 : milieu Mannitol Mobilité (Isolat 1 et Isolat 2) .



Figure 35 : Teste Clark et Lubs (VP) (Isolat 1).


Recherche
de type de
fermentation



Figure 36 : Teste Clark et Lubs (RM) (Isolat 2).

3.4 Le métabolisme protéique

La présence de protéases telle que la gélatinase et d'uréase est un caractère très important dans l'identification de certains genres bactériens.

Le métabolisme protéique	
<p>Hydrolyse de l'urée Et production D'indole</p>	 <p>Figure 37 : milieu Urée-indole (Isolat 1 et Isolat 2)</p>

**Recherche de
la gélatinase**



Figure 38 : milieu Gélatine (isolat 1)

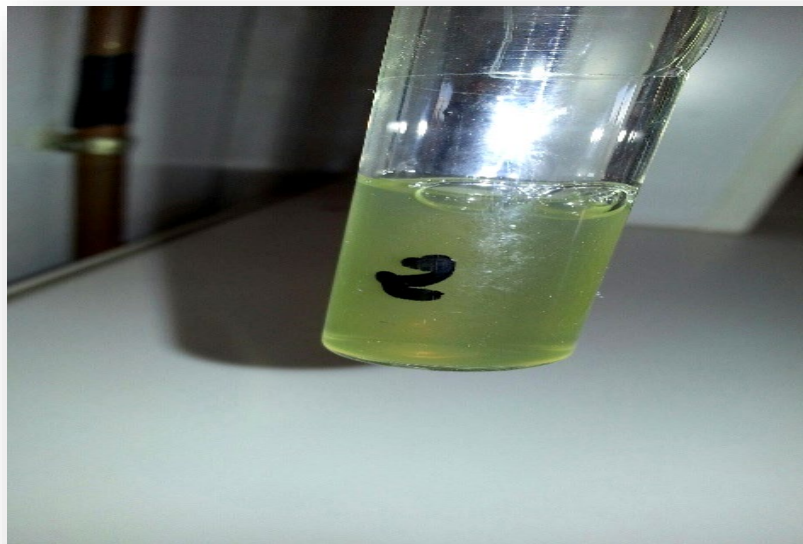


Figure 39 : milieu Gélatine (Isolat 2).

Tableau 10 : Les résultats de la galerie biochimique classique.

Isolat	Isolat 1	Isolat 2
Croissance sur différent milieux		
King A	+	+
King B	+	+
GN	+	+
L'étude de métabolisme respiratoire		
Catalase	+	+
Type Respiratoire	Aérobie stricte	Aérobie stricte
Le métabolisme glucidique		
Glu (fermentation)	-	-
Glu	+	+
Sac	-	-
H ₂ S	-	-
Mannitol	-	-
ONPG	-	-
Citrate perméase	+	+
VP	-	-
RM	+	+
Le métabolisme protéique		
TDA	-	-
LDC	+	+
ODC	+	+

Résultat

ADH	+	+
Urée	-	-
indole	-	-
gélatinase	+	+
Croissance à différentes température		
04°C	+OU -	+OU-
07°C	+	+
37°C	+	+
40°C	+	+

4 Application des isolats 1 et 2 pour l'épuration (traitement biologique) d'eau de procédés de raffinage pétrolier à échelle pilot.

Les analyses physico- chimiques des eaux usées industrielles après leur traitement physique au niveau de l'unité objet de cette étude ont pour but d'évaluer qualitativement ces eaux tout en déterminant les différents paramètres tels que : le pH, teneur en hydrocarbure, demande biochimique en oxygène (DBO5), demande chimique en oxygène (DCO); Les analyses ont été effectuées selon les normes et les techniques réglementaires et ce depuis l'échantillonnage jusqu'à l'obtention des résultats voir tableau suivant.

Les résultats des analyses réalisées au niveau du laboratoire de la raffinerie sont présentés sur les tableaux suivants :

Les valeurs présent à l'entrée du bac et les valeurs de sortie analyser sont les valeurs de sortie vers mer (SVM).

4.1 Résultats de mesure de potentielle d'Hydrogène

L'analyse appuyée sur la norme ASTM D 1293 pour l'évaluation des résultats obtenus dans ce test.

Ce test a pour principe, la mesure de la différence de potentiel existant entre une électrode de verre et une électrode de référence plongeant dans une même solution, le potentiel de l'électrode est lié à l'activité des ions H⁺.

Tableau 11 : Mesure du pH à l'entrée et à la Sortie de bac.

Jours	L'horaire	L'entrée	Sortie	
Dimanche	10 :00	9,4	7,7	7,5
	12 :00	7,1	7,0	6,7
	14 :00	7,2	7,1	6,8
Lundi	10 :00	7,1	6,8	6,6
	12 :00	6,8	6,6	6,2
	14	7,5	7,2	7
Mardi	10 :00	7,4	6,8	6,3
	12 :00	7,2	7	6,7
	14 :00	7,9	7,7	7,2
Mercredi	10 :00	7,6	7,3	6,9
	12 :00	6,9	6,7	6,3
	14 :00	7,9	7,7	7,4
Jeudi	10 :00	6,6	6,5	6,2
	12 :00	7,0	6,9	6,4
	14 :00	7,3	7	7
			Isolat 1	Isolat 2

4.2 Détermination de la Demande Chimique en Oxygène (DCO)

Ce test a pour principe, La détermination de l'excès de dichromate avec une solution titrée de sulfate de fer (II) et d'ammonium. Le calcul de la DCO à partir de la quantité de dichromate de potassium réduite

Tableau 12 : Mesure de la DCO en (ppm) à L'entrée et à la Sortie de la Station.

Les Jours	L'entrée de Station	La Sortie	
Dimanche	81	18	15
Lundi	108	72	66
Mardi	26	18	16
Mercredi	60	10	7
Judi	150	62	60
Dimanche	106	48	42
Lundi	163	67	61
Mardi	133	85,5	70
Mercredi	233	65	60
		Isolat 1	Isolat 2

4.3 Détermination de la Demande Biochimique en Oxygène (DBO₅)

La Norme AFNOR NF T90- 103 a servi de référence dans cette mesure. Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau et la figure suivants.

Tableau 13 : Mesure de DBO₅ en (ppm) à L'entrée et à la Sortie de la Station.

Les Jours	L'entrée de Station	la Sortie	
Dimanche	30	15	11
Lundi	60	30	25
Mardi	50	20	17
Mercredi	60	10	8
Judi	47	30	26
Dimanche	60	20	18
Lundi	30	10	7
		Isolat 1	Isolat 2

4.4 Détermination de la Teneur en Hydrocarbures (H.C) dans L'eau

La teneur en hydrocarbures doit répondre à la norme AFNOR NF M07-203.

Méthode : par analyseur d'hydrocarbures OCMA-310.

Tableau 14 : Mesure de la Teneur en Hydrocarbures en (ppm) à L'entrée et à la Sortie de la Station.

Les Jours	Horaire	L'entrée de la Station	La Sortie	
Dimanche	10 :00	26	172	98,8
	12 :00	28	55	80
	14 :00	36	0	0
Lundi	10 :00	85	160	123
	12 :00	26	71	90
	14 :00	48	0	0
Mardi	10 :00	39	164	100
	12 :00	52	45	63
	14 :00	48	0	0
Mercredi	10 :00	133	170	103
	12 :00	54	30	56
	14 :00	93	0	0
Judi	10 :00	42	177	133
	12 :00	68	55	70
	14 :00	55	0	0
			Isolat 1	Isolat 2

Discussion

Discussion

Le début des résultats montre que l'échantillon de sole contient une quantité importante des micro-organismes qui se diminue par les dilutions.

La mesure de la concentration microbienne en fonction du temps (jour) au moyen spectrophotomètre à UV -visible à une longueur d'onde à 600 nm se qui nous permet de constater la variation de biomasse au cours de temps des quatre isolats au cours de croissance dans le milieu minérale (BH) additionné de 2% de pétrole brute comme seule source de carbone en fonction du temps ce qui nous a permis de tracer les courbes représentées par la (figure 17 ;18 ;19 ;20)

D'après la figure 23 on observe un contraste de trajectoire de croissance pour les quatre isolats. La croissance pour les quatre isolats commence par un $DO = 0,09$, puis on observe une augmentation de la croissance de T_0 jusqu'à le 1er jour après la semaine d'enrichissement puis une augmentation exprimée par une phase de croissance exponentielle longue. Cette augmentation ralentie correspond à la phase stationnaire par la stabilité d'évolution des valeurs, observée surtout chez les isolats 3 et 4. Les isolats atteignent une valeur maximale ($DO_{isolat1} = 0,711$) ($DO_{isolat2} = 0,8$) ($DO_{isolat3} = 0,09$) ($DO_{isolat4} = 0,169$). Cette DO atteint son maximum au cours d'incubation.

Selon Akmouci Les variations des densités optiques (DO) constatées dans les milieux de culture des différents isolats peuvent être dues à la distribution différente de ces bactéries entre les deux phases de culture, ou par leur vitesse d'adaptation au substrat utilisé (Akmouci, 2009).

Dans un second temps, l'identification morphologique et biochimique des isolats nous oriente vers les bacilles Gram négative

Dans un premier temps, une attention particulière est portée sur l'identité des souches sélectionnées. La présence des pigmentation caractéristique (La pyoverdine est un pigment de couleur jaune-verte et La pyocyanine de couleur bleu) lors de la croissance sur les milieux King A et King B et GN nous oriente vers *Pseudomonas sp.* Dans la deuxième édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (<http://www.bacterio.cict.fr/>).

Dans un second temps, l'observation de *Pseudomonas* à l'état frais entre lame et lamelle sous microscope optique à l'immersion a montré que la bactérie est mobile ce résultat est confirmé par le trouble obtenu sur milieu mannitol-mobilité (Leyral et Joffin, 2014).

Discussion

C'est un bacille gram négatif mobile, en paires, isolait, ou en chaînes (**Gaignard, and Luisetti, 1993; Kersters et al., 1996; Young, 2010**). Sur gélose nutritive, les colonies sont rondes, blanches et lisses (**Gaignard, and Luisetti, 1993**).

La détermination du métabolisme respiratoire est effectuée par la production de peroxyde d'hydrogène en aérobiose se qui est confirmé par la détermination du types respiratoire par la culture seulement en haut (**Leyral et Joffin ,2014**).

Le glucose est oxydé en présence d'oxygène atmosphérique (**wood, 1955**).

La capacité de la dégradation de glucose chez les isolats traduit par leur pouvoir de croitraient ; Par ailleur l'incoloration du milieu TSI traduit l'absence de la voix fermentative des glucose lactose et saccharose et également de mannitol, la non apparition de gaz dans le culot et ni de colonies noires signifiée qu'il n'ya pas la production de H₂S. Avoir l'utilisation du citrate comme seul source de carbone (**Dellaras ,2014**).

La dégradation du lactose par les microorganismes passe par sa transformation en glucose, sous l'action β -galactoside -perméase et β -galactosidase ; sur ONPG s'appariait par une coloration jaune due à sa hydrolyse (**Leyral et Joffin ,2014**).

La différenciation entre la fermentation acides mixte et butanediolique est réalisé par inoculation du milieu Clark et Lubs , vu que l'absence d' un composé rouge qui résulte d'une réaction entre diacétyle formé t avec le groupement guanidine de α - naphthol (**Leyral et Joffin ,2014**).donc les *pseudonomas* sont VP négative ; l'autre voie est comfirmé par la présence de la coloration rouge par l'ajout de rouge de méthyle se qui conclus que les *pseudomonas* ont une voie fermentative acides mixte .

Les *Pseudomonas* sp utilisent de nombreux acides aminés comme sources de carbone, d'azote et d'énergie. Cette capacité d'assimilation permet leur discrimination infra spécifique (**Palleroni, 1984**)

L'existence de plusieurs voies de catabolisme de la lysine apparaître être que le métabolite caractéristique de ces dernier (**Chang et Adams ,1971**).justifier la manifestation du virage de couleur.

L'arginine représente une source d'azote intéressante dans les milieux riches en matière organique. Elle constitue une source d'énergie en aérobiose et en anaérobiose. La complexité du catabolisme de l'arginine révèle l'intérêt de ce substrat pour les microorganismes (**Cunin et al., 1986**). Elle est d'une grande importance physiologique puisqu'elle génère des substrats à haut niveau d'énergie, et constitue donc un mode d'élaboration d'ATP en anaérobiose (**Stanier et al., 1966**). C'est la seule voie fermentative connue chez ces bactéries (**Latour et Lemanceau, 1997**). Le métabolisme oxydative de la lysine et l'ornithine chez les

Discussion

pseudomonas est négative (**Dellaras ,2014**) se qui et traduit par l'absence de l'acidification des milieux de cupules (pas de coloration).

Leyral et Joffin indique que le milieu urée –indole permet la recherche de les voies enzymatiques qui conduisent à l'hydrolyse de l'urée et formation d'indole, se qui est traduit par un virage de couleur .qu'elle est absent chez les isolats étudier (**Leyral et Joffin, 2014**).

La production de protéases extracellulaires, comme évidence l'hydrolyse de la gélatine, est une propriété universelle de *P. aeruginosa*, présente chez *P. fluorescens* mais absente chez *P.putida* (**Stanier et al., 1966**).

Dans la présente étude les souches de *pseudomonas* peuvent conserver une forte capacité de croissance en déférente températures, les *pseudomonas* croitront dans des températures optimale de 30à45°C, font parties des psychotrophes (**Dellaras, 2014**) par une croissance à des températures 4à 7°C.

L'application à échelle pilote des stratégies de la dépollution biologique par les *pseudomonas* isoles conduit à des performant et répond aux normes déjà citées (partie expérimentale) ,pendant des durées de temps très courtes avec des concentrations de polluant différente et élevée.

Les isolats montrent des pouvoirs d'adaptation et résistance aux différents contaminants tels que le furfurool.

Conclusion et perspectives

Conclusion

Vu la consommation importante de l'eau dans le procédé de raffinage, l'opération d'épuration des effluents constitue un objectif primordial afin de garantir une économie substantielle de l'eau pour sa réutilisation ou son rejet ver mère. Aussi la politique de préservation de l'environnement instauré par les normes de concentration minimales des composants restent les limites à ne pas dépasser. Pour se but là la biodégradation des hydrocarbures pétrolier est l'objectif de la première partie de cette étude qui recrute des méthodes pasteuriennes classique d'isolement et pré-identification des bactéries à activité hydrocabonolaste , qui se traduit par l'évolution de la cinétique de croissances au cour de temps de ces isolats ;dans la deuxième partie du travaille l'application à échelle pilote de ces isolats afin de voie leur performances en réponse stimulant de l'hydrocarbure, plusieurs méthodes ont été utilisées par application à l'échelle pilot . Le dosage des hydrocarbures pétrolier, la détermination de la demande chimique en oxygène (DCO), la détermination de la demande biochimique en oxygène (DBO₅).

Perspectifs

- La réalisation des analyses physico-chimique pour confirmé que le sol est contaminé ou non
- Identification moléculaire : La composition en pairs de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s pour les souches étudiées.
- Application de la stratégie minimisée à échelle industriel.

Malgré la haute performance des *pseudomonas* isolés présente des inconvénients

- Elimination de la pathogénicité.
- Elimination du gène responsable de la formation de biofilme.

Références

- Bosch R, Garcia. Valdes E, Moore E. R.,** (1999). Genetic characterization and evolutionary implications of a chromosomally encoded naphthalene degradation
- BOSSERT, I, W, Kachel et Bartha.,** 1984. « Fate of hydrocarbons during oil sludge disposal in soil » . *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 47' no. 4 p, 763-767.
- Boudou A et Ribeyre F.,** 1997. Aquatic ecotoxicology: from the ecosystem to the cellular and molecular levels. *Environ. Health Perspect.* 105, 21-35.
- Bouloubassi, I., & Saliot, A.,** (1993). Investigation of anthropogenic and natural organic inputs in estuarine sediments using hydrocarbon markers (NAH, LAB, PAH). *Oceanologica Acta* 16(2), 145-161.
- BRGM _A. Saada,C.,** (2014) Nowak et N. Coquereau. Etat des connaissances sur l'atténuation naturelle des hydrocarbures - Rapport intermédiaire: résultat de la phase 1. Rapport BRGM/RP-53739-FR, 107 pages, 13 fig, 2 ann.

C

- Cerniglia, C.E.,** 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotechnol.* 4:331-338.
- Chang YF et Adams E 1971** introduction of separation metabolic for L-lysine and D-lysine in *Pseudomonas putida*. *Biochem Biophys Res Comm* 45,570_577
- CHAUSSOD Rémi, Marilena ZUVIA , Marie-Christine BREUIL ,et Jean-Marie HETIER,** Biomasse microbienne et « statut organique » des sols tropicaux: exemple d'un sol vénézuélien des Llanos sous différents systèmes de culture, 1992.
- chimiques et biologiques ". Juin 2002.
- Clark W.M. and Lubs H.A.,** (1915). *J. Inf. Dis.*, 17, 160-173.
- Clarke, P. H.** (1982). The metabolic versatility of pseudomonads. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 48(2), 105-30.
- CLAUDE CARDOT.** Génie de l'environnement. Les traitements de l'eau " procédés physico
- Claude.D** , 1996 , la génie génétique appliqué aux bactéries hydrocarbonolastes ,in la houilles blanche N°51996 ,France, pp39_48 .
- Cojan I, Renard M.,** 1997. Sédimentologie. Dunod, Paris, 2ème édition, collection Sciences Sup., p. 481.
- Commendatore, M.G. & Esteves, J.L.,** (2004). Natural and anthropogenic hydrocarbons in sediments from the Chubut River (Patagonia, Argentina). *Marine Pollution Bulletin* 48: 910-918.

Références

Conditions in Enrichment Cultures from Northern Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(1) : 275-284.

- Costes J.-M. et Druelle V.** 1997. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques dans l'environnement : La Réhabilitation des anciens sites industriels. *Revue de l'Institut Cunin, R., Glansdorff, N., Piérard, A. and Stalon, V.*, 1986. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol. Rev.* **50**: 314-352.

D

- Delarras Camille.**, (2014). Pratique en microbiologie de laboratoire. 42540 ST-JUST-LA-PENDUE. DEPOT LEGAL MAI 2014.
- Deleo, D.M., D.V. Ruiz-Ramos, I.B. Baums Et E.E. Cordes**, 2015. "Response of Deep-Water Corals to Oil and Chemical Dispersant Exposure", *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, [En ligne],
- Deziel. E.**, 1997. (Impact des micro-organismes sur la biodisponibilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques). Projet de recherche pour doctorat. École Polytechniques et Institut Armand Frappier, 49.
- Dupuis, A. Et F. Ucan-Marin**, 2015. Analyse documentaire de la toxicologie aquatique des huiles de pétrole : un aperçu des propriétés du pétrole et de ses effets sur le biote aquatique, Secrétariat canadien de consultation scientifique du ministère des Pêches et des Océans, Document de recherche, 2015/007, vi + 55 p.

E

- Erikson M, Sodersten E , Yu Z , DalhammarG , Mohn W.W.**,(2003). Dégradation of polycyclicAromaticHydrocarbons at LowTemperatureunderAerobicand Nitrate ReducingConditions in Enrichment Cultures fromNorthemSoils. *Qppl Environ. Microbiol.* 69 (1) : 275-284.
- Erikson M., Sodersten E., Yu Z., Dalhammar G., Mohn W. W.** (2003). Degradation of
- Estelle Tardy.**, 2011 professionnels de l'exploration pétrolière ou de la recherche (BRGM, BEPH, INERIS, IFP, IFPEN, l'Agence Internationale de l'Energie AEI-IEA, Total, Toreador, Vermillon, Editions TECHNIP, Universités de Pau, Toulouse, Ecole Nationale des Ponts et Chaussées, etc.). Vous pouvez trouver dans l'annexe de nombreux liens vers les écrits ayant servis à préparer cet exposé. Européennes, p.116.
- Evans F.F. Rosado A. S, Sebastian G. V, Casella R, Machado P. L, HolmströmC, Kjelleberg S, Elsas J. D, Seldin L.**, (2004). Impact of oil contamination and

Références

biostimulation on the diversity of indigenous communities in soil microcosms . FEMS Microbiology Ecology, 49 : 295-305 .

Ezziane. S., (2007) : traitement des eaux de rejets, le Mémoire Présenté pour obtenir le Diplôme de Magister, Université HASSIBA BEN BOUALI de CHLEF, p : 186.

F

Faiza Mekhalif., (2009) : réutilisation des eaux résiduaires industrielles épurées comme eau d'appoint dans un circuit de refroidissement.

Falkow , S. , (1988). Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. reviews of infectious diseases; 10:8274-8276.

Farhadian M. Vachelard C , Duchez D , Larroche C ., (2008) . In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater. A review. Bioresource Technology , 99 : 5296-5308.

Feix I, Wiart J., (1995). Les micropolluants organiques dans les boues résiduaires de stations d'épuration urbaines ADEME, Angers, 191.

Fiechter, A., 1992. Biosurfactants: moving towards industrial application. Trends Biotechnol.

Finley B.B. Falkow,S. (1989). Common themes in microbial pathogenicity. microbiol.rev 53: 210-230.

Forbes, B.A., D.F. Sahn, and A.S. Weissfeld., 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.

Français du pétrole, vol.52, n°4.

G

Gaignard, J.L., and Luisetti, J., (1993). *Pseudomonas syringae*, bactérie épiphyte, glaçogène et pathogène. Agronomie 13, 333–370.

Galaf F. & Ghannam ., (2003) : Contribution à l'élaboration d'un manuel et d'un site web sur la pollution du milieu marin », mémoire de troisième cycle, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat.

Gatellier C., (1970). La microbiologie du pétrole. Revue de l'institut français de pétrole. 25 : 04.

Georgiou,G.,S.Lin,et M.M.Sharma.,1992. Surface-active compounds from microorganisms. Bio/Technology 10:60-65.

Grimm A. C, Harwood C. S., (1999). Nah Y, a catabolic plasmid-encoded receptor required for chemotaxis of *Pseudomonas putida* to the aromatic hydrocarbon naphthalene . J. Bacteriol 181 :3310-13316.

H

Références

- Hada, H.S. & Sizemore, R.K.** (1981). Incidence of plasmids in marine *Vibrio* spp. isolated from an oil field in the northwestern Gulf of Mexico. *Applied and environmental microbiology* 41(1):199-209.
- Haferburg, D., R. Hommel, R. Claus, et H. Kleber.**, 1986. Extracellular microbial lipids as
- Hajna, A.A.**, 1945. Triple-sugar iron agar medium for the identification of the intestinal group of bacteria. *J. Bacteriol.* 49:516-517.
- Holt, Krieg, Sneath, Staley and Williams (ed.)**, 1994. *Bergey's Manual™ of determinative bacteriology*, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
- Hommel, R. K. et C. Ratledge.**, 1993. Biosynthetic mechanisms of low molecular weight surfactants and their precursor molecules. *In Biosurfactants: production, properties, applications. Surfactant science vol. 48*, Marcel Dekker. Inc., New York.
- <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsr2.2015.02.028>.
- <http://romain.ferry.pagesperso-orange.fr/micro/matmicro/micmil/milcits/cit0000.htm#lect>
- hydrocarbures et des composés halogénés. *Bull Soc. Fr. Microbiol.*, p 204-209.
- hydrocarbures et des composés halogénés. *Bull.Soc.Fr.Microbiol.*, 16(3) : 204- 209.
- hydrocarbures. *In Microorganismes dans les écosystèmes océaniques. Bianchi M. (ed).* Paris:Masson, pp. 343-385.

I

- Isenberg, H.D.(ed)** .,1992. *ClinicalMicrobiologyProceduresHandbook* . American Society for Microbiology, Washington, D.C.

J

- Jacques, M. A.**, 1994. *Écologie quantitative et physiologie de la communauté bactérienne épiphyllée de Cichorium endivia var. latifolia L.* Thèse de doctorat, université de Paris-XI, Orsay, 123 p.
- Jean-Noel Joffin et Guy Leyral.**, 2014. *Microbiologie Technique*. Achevé d'imprimer en France par Jouve en juin. .
- Johnsen A.R, Bendixen k , Karlson U.**, (2002) . Détection of microbial growth on polycyclic aromatic hydrocarbons in microtiter plates by using respiration indicator WST- Appl. Environ. Microbiol. 68 : 2683-2689.

Références

Jourdain M. et Charissou A., (2007) devenir des polluants organiques dans les sols lors de la biodégradation naturelles et après biotraitement : Identification des composés métabolites et des cinétique. Edition Record. P : 32-61.

Juhasz, A.L., Naidu, K., (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic Hydrocarbons : a review of the microbial of benzo [a]pyrene. *International Biodeterioration and Biodégradation*. 45 : 57-88.

Julie Rochefort, biogéog., M., 2007 sc. ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs du Québec guide d'échantillonnage à des fins d'analyses environnementales : cahier 2 – échantillonnage des rejets liquides, centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, édition courante.

K

Kaplan C.W ' Kitts C. L., (2004). Bacterial succession in a petroleum land treatment unit, *Appl. Environ. Microbiol.* 70 : 1777-1786.

Keck G, Vernus E., (2000) : Déchets et risques pour la santé, Techniques de l'ingénieur, Paris, p : 2450.

Kerstens, K., Ludwig, W., Vancanneyt, M., De Vos, P., Gillis, M., and Schleifer, K.H., (1996). Recent changes in the classification of the Pseudomonads: an overview. *Systematic and Applied Microbiology* 19, 465–477.

King, E. O., Ward, M. K et Raney, D. E., (1954). Deux médias simples pour la démonstration de pyocyanine et de fluorescéine. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301-307.

Kosaric, N., (ed). 1993. Biosurfactants: production, properties, applications. Surfactant science series vol. 48, Marcel Dekker, Inc., New York.

Krepesky, N., DA Silva, F.S., Fontana, L.F., Crapez, M.A.C., 2007. Alternative.

L

Latour, X. and Lemanceau, P., 1997. Carbon and energy metabolism of oxidase-positive saprophytic fluorescent Pseudomonas spp., *Agronomie*, 17: 427–443.

Leahy, J. G., and R. R. Colwell (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment, *Microbiological Reviews*, 54(3), 305-315. Review on the hydrocarbon fate within combined sewers.

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

Lefebvre, G. (1978). Chimie des hydrocarbures. Publication de l'Institut Français du Pétrole. 284 p.

Références

Lefebvre, G., (1978). Chimie des hydrocarbures. Publication de l'Institut Français du Pétrole.
284 p.

Livre de la société nationale de raffinage de pétrole p188.

M

MacFaddin, J.F., 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore.

Maier R. M., Pepper I. L., Gerba C. P., 2009. Environmental Microbiology, 2 ème édition, 598 p.

Manuelle Opérateur De La Station D'épuration (zone 27) de la raffinerie d'Arzew RA1/Z
Manuels opératoires de l'unité 1800 et de la zone 27.

Marais" urban catchment (1994 - 2005). J. Gasperi, V. Rocher, R. Moilleron et G. Chebbo.

Marchal N. et Bourdon J.L., (1982). Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed. Doin. Paris, pages : 482.

Martineau B., (1996). Systématique bactérienne, Guide d'identification des bactéries aérobies. Edition DECLARIE ; Montréal.

Melle Mekhatria Fatima et Melle Belmokhtar Zohra., 2013.2014. Diagnostic des équipements de la nouvelle station d'épuration de raffinerie d'Arzew (ZONE 27). Faculté de chimie. Département de génie chimie, USTOMB. Année universitaire.
Methodology For Isolation Of Biosurfactant-Producing Bacteria, Braz. J. Biol., Microbial Surfactant. (AsPac) J. Mol. Biol. Biotechnol., Vol. 15, p. 99-105.

Mochalova, O.S., Antonova, N.M. et Gurvich, L.M., 2002. The role of dispersants in

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

Mr Hamel Boualem Youcef et Mr Chriba Mohamed., 2013. Suivi de la construction d'une nouvelle station d'épuration substituant l'ancien système de séparation physique PPI/API de la raffinerie d'Arzew RA1/Z. faculté des sciences. Département de chimie industrielle, USTO.

N

Neff, J.M. 1990. "Composition and Fate of Petroleum and Spill-Treating Agents in the Marine Environment", Sea Mammals and Oils: Confronting the Risks, édité par J.R. Geraci et D.J. St-Aubin, Academic Press, p. 1-33.

NF T90-103

NF-T90101 Ou ASTM D1252

Références

Norme marocain., 2004 .08.0.109. Microbiologie alimentaire –Dénombrement des Enterobacteriaceae par comptage des colonies à 30°C.

Obtained By Acetone Precipitation, *Biotechnol. Techniq.* Vol. 9, p. 271–276.

O

Oliveira, V., Gomes, N.C., Almeida, A. Silva, A.M., Silva, H.& Cunha, A. (2015). Microbe-assisted phytoremediation of hydrocarbons in estuarine environments. *Microb. Ecol* 69:1-12.

P

Palleroni, N.J., 1984. **Genus I. Pseudomonas Migula.**, 1894. In: Krieg, N.R., Holt, J.G.(Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. I. Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA, pp. 141–171.

Pelmont J., (1995). Bactéries et environnement, adaptation biologique, Tome 1, OPU. P 875.

PERSAUD, D., R. JAAGUMAGI ET A. HAYTON. 1993. Guidelines for the protection and management of aquatic sediment quality in Ontario. Ministère de l'Environnement et de l'Énergie de l'Ontario, 27 p.

Pierre MICHEL., 1983. Impact des hydrocarbures sur la flore et la faune marines rapport collectif redigé sous la direction de pierre michel octobre.

Pitt T. L.(2002), Cross infection of Cystic fibrosis patients with *Pseudomonas aeruginosa* *Thorax* 57(11) :921.

Polycyclic Aromatic Compounds. Accepté

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons at Low Temperature under Aerobic and Nitrate-Reducing

Prabhu Y., Phale P., 2003. SB PP2 Novel Metabolic Pathway, Role of Biosurfactant And Cell Surface Hydrophobicity In Hydrocarbon Assimilation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*

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

Priefert, H., X.M. & O'Brien, XM.(2004). Indene bioconversion by a toluene inducible dioxygénase of *Rhodococcus* sp.124. *Applied microbiology and biotechnology* 65 (2):168-176.

productswithantimicrobialactivity: a review of the literature. *Journal of ethnopharmacology* 23, 127-149.

Pruthi V., Cameotra S. S., 1995. Rapid Method For Monitoring Maximum Biosurfactant

Références

Resources, 2,202-205.

R

Rios, J., Recio, M., Villar, A., 1988. Screening methods for natural

Rodier J, Bazin C, Boutin J-P, Chambon P, Champsaur H, Rodi L. (1996) : L'analyse de l'eau : Eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer. 8^{ème} édition, Dunod, Paris, France, p : 879 - 1260.

Rojo, F. (2010). Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(5), 658-684.

Romero M.C, Cazau M.C, Giorgieri S, Arambarri A. M., (1998) . Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream . *Environ. Pollut.* 101 : 355-359.

Rosenberg, E., 1986. Microbial surfactants. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 3:109-132.

S

Shao Z., 2009. Enrichment And Isolation Of Hydrocarbons Degraders, Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology , Edition Springer Berlin Heidelberg part 3, Vol.4, p. 3777-3785.

Sims. R. C, et Overcash., 1983. (Fate of polynuclear aromatic compounds « PNAS » in soil-plant systems). *Residue Rev* , vol . 88. P. 1-68.

Singleton P., (1999). Bactériologie, Edition Dunod 4^{ème} édition Paris. P.415.

Soltani M. (2004) Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram négative hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse de doctorat de l'Université Paris 6. Spécialité analytique. P: 45-47.

Soltani, M ., (2004). Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes variation en fonction de la source de carbone. Thèse de Doctorat, Université de Pierre et Marie curie Paris 6. 284 p.

Stanier, R.Y, Palleroni, N.J. and Doudoroff, M., 1966. The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43: 159-271.

Suzuki, K., N. Ogawa, N. & Miyashita K .(2001). Expression of 2- halobenzoate dioxygenase genes (cbdSABC) involved in the degradation of benzoate and 2- halobenzoate in *Burkholderia* sp. TH2. *Gene* 262 (1-2):137-145.

T

Tarayre. C. 2012 Bioremédiation de sols pollués aux hydrocarbures. Editions Universitaires

Références

the processes of oil transformation and oxidation in aquatic environment. Water

Tissot B.P. et Welte D.H. (1984). Petroleum formation and occurrence. A new approach to oil and gas exploration. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp 120-128.

upper pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. Gene 236 : 149-57.

V

Vandecasteele J. P., (2008). Petroleum Microbiology, Editions TECHNIP, Paris, 816p.

Vandecasteele, J-P., (2005). Microbiologie pétrolière— concepts, implications environnementales, Applications industrielles. Volume 1. Publications de l'institut français du pétrole, Paris, 412p.

Vogel T., Ballerini D. (2001). Biorestauration des sols et des aquifères contaminés par des

Vogel T., D Ballerini. 2001. Biorestauration des sols et des aquifères contaminés par des

Voges O. and Proskauer B., (1898). *Z.f. Hyg.*, 28, 20-22.

Vol. 61, p. 342–351.

Vol.67,p. 117-124.

Volkman, J., Holdsworth, D., Neill, G. & Bavor, H., (1992). Identification of natural, anthropogenic and petroleum hydrocarbons in aquatic sediments. *The Science of the Total Environments* 112: 203-219.

W

Woodwa., 1955 pathways of carbohydrate degradation in *pseudomonas fluorescens* Rev 9 ,222 ,223

Y

Young, J.M., (2010). Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Pathology* 92, S1.5–S1.14.

Z

Zajic, J. E. et W. Seffens., 1984. Biosurfactants. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 1:87-107.

Zannoni D. , (1989) . The respiratory chains of pathogenic *Pseudomonas* . *BIOCHIMIA ET*

Annexe 1

Composition des milieux du culture

Gélose nutritive (GN) (Lapage& Mitchell, 1970)

Extrait de viande.....	1,0g
Extrait de levure	3,0g
Peptone.....	5,0g
Chlorure de sodium	5,0g
Agar	15,0g
Eau distillée	1000ml

pH 7,4

Bouillon nutritif(Guiraud, 1998)

Extrait de viande.....	1g
Peptone.....	5g
Chlorure de sodium	5g
Eau distillée	1000ml

pH=7

Milieu King A (King et al., 1954)

Peptone dite "A"	20,0g
Glycérol.....	10,0ml
Sulfate de potassium	10,0g
Chlorure de magnésium.....	1,4g
Agar	12,0g
Eau distillée.....	1000 ml

pH 7,2

Milieu King B (King et al., 1954)

Peptone dite "B"	20,0g
Glycérol	10,0ml
Hydrogénophosphate de potassium.....	1,5g
Sulfate de magnésium heptahydraté.....	1,5g
Agar	12,0g
Eau distillée.....	1000ml

pH 7,2

Mannitol- Mobilité (Van Schothorst& Van beek, 1987)

Hydrolysats tryptique de caséine.....	10,0g
Mannitol	7,5g
Rouge de phénol.....	0,4 mg
Nitrate de potassium.....	1,0g
Agar.....	3,5g
Eau distillée.....	1000ml

pH 7,6

CitratedeSimmons(<http://romain.ferry.pagesperso-orange.fr/micro/matmicro/micmil/milcits/cit0000.htm#lect>).

Ammonium dihydrogenophosphate.....	1g
Phosphate dipotassique.....	1g
Chlorure de sodium.....	5g
Citrate de Sodium.....	2g
Sulfate de magnésium.....	0,2g
Bleu de Bromothymol.....	0,08g
Agar.....	18g

PH=6,6±0,17

Bouillon Clark et Lubs(Institut Pasteur,2003)

Tryptone.....	2g
Peptone bactériologique.....	5g
Phosphate dipotassique.....	5g
Glucose.....	5g

PH=7,8.

Eau physiologique(Institut Pasteur,2003)

Chlorure.....	9g
---------------	----

PH=7

TSI Agar (Institut Pasteur,2003)

Digestion pancréatique de caséine	10,0 g
Digestion peptique de tissu animal	10,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Lactose	10,0 g
Saccharose	10,0 g
Dextrose	1,0 g

Sulfate d'ammonium ferreux	0,2 g
Thiosulphate de sodium	0,2 g
Rouge de phénol	0,025 g
Gélose	13,0 g

Annexe 2

Coloration de Gram

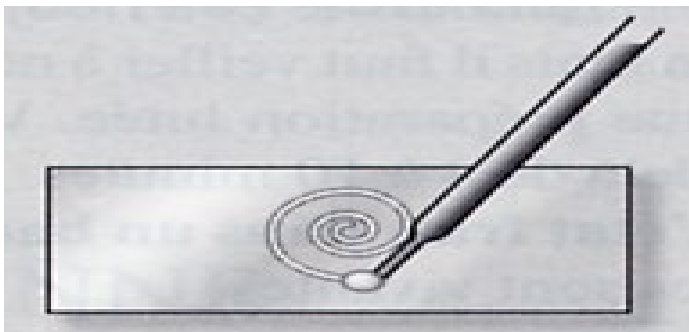
Matériel Nécessaire pour la coloration de gram

- une lame
- du Violet de Gentiane (ou Violet Cristal sous forme sèche)
- du lugol
- de l'alcool (éthanol à 95°) très peu dilué
- de la Fuschine fraîchement préparée
- de l'eau déminéralisée
- du papier filtre
- microscope photonique : objectif x 40 et x100

TECHNIQUE

Réalisation du frottis:

Étaler sur 1 à 2 cm par un mouvement circulaire en partant du centre de lame



Le frottis réalisé doit être

MINCE et HOMOGENE, étendu sur la lame sans toucher les bords

Réalisé sur une lame PROPRE et DEGRAISSEE, une goutte d'eau déposée en surface doit s'y étaler complètement.

Séchage

- à la température du laboratoire, si possible
- ou bien à **chaleur douce** : platine chauffante à 37° ou au-dessus de la veilleuse du bec bunsen, à hauteur suffisante. NE JAMAIS CHAUFFER BRUTALEMENT

Coloration

Principe Cette coloration est une coloration complexe qui permet de différencier les bactéries d'après

leur forme et leur affinité pour les colorants.

La coloration permet de distinguer les bactéries GRAM + des GRAM – grâce à leurs différences de nature de paroi. Les bactéries à Gram négatif ont une paroi plus fine et riche en lipides, alors que les bactéries Gram positifs ont une paroi épaisse et pauvre en lipide.

Observations

On peut noter la morphologie des bactéries et la coloration de celles-ci : les bactéries violettes sont dites Gram positives, celles qui sont roses sont dites Gram négatives. On peut également noter l'homogénéité de coloration de la bactérie.

Etat frais

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

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

Luter la lame avec de la paraffine fondue.

Observer immédiatement au microscope (objectifx40, condenseur non relevé au maximum, diaphragme non complètement ouvert).

<http://www.microbiologie-medicale.fr/examenmicroscopique/etatfrais.htm>

Annexe 3

La galerie API20 E























Microtube	Substrat	Caractere recherche	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β -galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d' α -naphthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO ₂ / N ₂	Nitrates (NO ₃)	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		

Figure : les resultat de la galerie API 20 N .

Annexe 4

La mesure du Potentiel d'Hydrogène

Le couple d'électrodes de verre pour le **PH** ne permette d'effectuer que des mesure relatives, en outre les tensions d'électrodes sont soumises à une certaine dérivée c'est pourquoi il est nécessaire de procéder à un étalonnage avec des solutions tampons à **PH** connu. Cet étalonnage permet donc d'harmoniser l'échelle du **PH** de l'appareil de mesure avec le couple de mesure employé

Demande chimique En Oxygène (D.C.O)

Mode Opérateur

İ Homogénéiser l'échantillon en mélangeant si c'est nécessaire.

İ Mettre 50 ml d'échantillon dans ballon à fort rond, si la prise d'essai est <50.

İ Les échantillons contenant plus de 800 mg / l en C.O.D sont dilués.

İ Placer 50 CC d'eau déminéralisée dans un autre ballon, en qualité de blanc, ajouter 1 g de HgSO₄, 5 ml de H₂SO₄ et plusieurs billes de verre dans le ballon.

İ Ajouter 25 CC de solution standard de PotassiumK₂Cr₂O₇ à 0.25, placer le réfrigérant sur le ballon.

İ Ajouter 70 ml de Ag₂ SO₄ – H₂ SO₄ , doucement à travers le réfrigérant .

İ Débuter le chauffage, et refluer pendant 2h

İ Mettre sur le réfrigérant un petit Becher

İ Diluer la solution acide jusqu'à 300 ml.

İ Laisser le ballon refroidir, le laver ensuite avec 25 ml d' H₂O distillée.

İ Refroidir à température ambiante.

İ Ajouter 8 à 10 gouttes de Phénontrolines et titrer l'excès de Dichromate avec la solution standard de Sulfate de Fer et d'Ammonium 20.25 N. la couleur passe du vert au rouge violace.

Calcul

$$D.C.O = \frac{(A - B) \times N \times 8000}{S}$$

A = ml de [(NH₄)₂ SO₄] FeSO₄ livrer pour titrer le blanc .

B = ml de [(NH₄)₂ SO₄] FeSO₄ livrer pour titrer l'échantillon .

N = normalité du titrant.

S = quantité d'échantillon.

Demande Biochimique En Oxygene (D.B.O) Nf T90-103

Technique Manometrique :

- ✓ Sélectionner le volume approprié d'échantillon conformément aux échelles de détermination DBO
- ✓ Mesurer la quantité à analyser après avoir ajuster le PH entre 6.5 et 8.3 faite glisser l'échelle graduée qui convient. (On peut utiliser une série de six tests pour le même échantillon)
- ✓ Placer le barreau d'agitation magnétique, Ajouter deux pastilles de potasse (KOH) + 5 ml de solution tampon nutritive.
- ✓ Appliquer un léger film de (Graisse Silicone) sur les deux faces de la lèvre de cupule
- ✓ Placer les flacons sur l'appareil, brancher la prise et mettre en marche l'agitateur.
- ✓ Les bouchons du manomètres étant ouverts, visser les serrer légèrement.
- ✓ Placer l'appareil manométrique dans l'enceinte thermostat pour incubation à 20 c + (- 0.5) Attendre environ 30 m pour atteindre l'équilibre de température.
- ✓ Serrer lentement les bouchons des manomètres et visser les bouchons des flacons.
- ✓ Desserrer les boutons sur les échelles manométriques et aligner le Zéro sur le sommet des colonnes de mercure

Lire sur l'échelle des résultats de DBO après 5 jours d'incubation.

Détermination de la teneur en hydrocarbures (H.C) dans l'eau

Méthode : Par analyseur d'hydrocarbures OCMA-310

Principe : procédure de calibration

Réactifs

- Le solvant S-316
- Acide chlorhydrique
- Eau distillée
- L'huile lourde B

Appareillage:

- Analyseur d'hydrocarbures OCMA-310
- Bécher
- Fiole

Mode opératoire :

- Prendre 15 ml de solvant avec de l'huile lourde B, de la fiole avec la seringue et le

verser dans la cuve d'extraction. Ajouter comme indiqué dans le manuel une goutte d'acide chlorhydrique. Ensuite ajouter 15 ml d'eau distillée

- Lancer l'extraction pendant 40 secs
- Vérifier que la valeur d'échelle (SPAN VALUE) est correcte
 - Ouvrir la vanne d'extraction
 - Attendre la stabilisation de la mesure (sans appuyer sur le bouton mesure)
 - Fermer la vanne d'extraction
 - Ouvrir la vanne de DRAIN
 - Fermer la vanne de DRAIN
 - Répéter de (1) à (5) une seconde fois
- Ouvrir la vanne d'extraction et appuyer sur le bouton Mesure
- Appuyer sur le bouton span cal lorsque la valeur est stabilisée

Annexe 5

Tests des bactéries susceptibles de dégradation des hydrocarbures

Isolat 1 : variation de la D.O en fonction du temps

tem ps	Dimanche			Lundi			Mardi			mercredi			jeudi		
D.	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.4	0.6	0.6	0.6	0.7	0.7	0.6	0.5	0.3	0.2
O	23	29	40	71	90	50	12	40	70	11	02	00	54	00	35

Isolat 2 : variation de la D.O en fonction du temps

tem ps	Dimanche			Lundi			Mardi			mercredi			jeudi		
D.	0.1	0.1	0.2	0.3	0.3	0.4	0.5	0.5	0.6	0.7	0.7	0.8	0.7	0.6	0.5
O	00	50	00	71	90	16	11	83	20	12	45	00	11	90	09

Isolat 03 : variation de la D.O en fonction du temps

tem ps	Dimanche			Lundi			Mardi			mercredi			jeudi		
D.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.	0.0	0.0	0.0	0.	0.	0.	0,	0,	0,
O	53	60	66	71	80	09	83	62	42	42	42	42	42	42	42

Isolat 04 : variation de la D.O en fonction du temps

temp s	Dimanche			Lundi			Mardi			mercredi			jeudi		
D.O	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,	0
	88	92	00	20	45	69	16	00	54	54	54	54	54	1	5
														4	4

Résumer :

l'industrie pétrolière est en partie à l'origine de quelques problèmes environnementaux dans différents régions du monde. Lorsque 'un site est considéré comme étant contaminé par les hydrocarbures, il existe plusieurs technologies disponibles pour le remédier. La biodégradation est basée sur les capacités enzymatiques de certains microorganismes a activité hydrocarbonolaste, L'objectif de ce travaille est d'évaluer les capacités de biodégradation du pétrole par les bactéries isolées à partir des sols probablement contaminés ;l'application des stratégies d'épuration en présence des *Pseudomonas* isolait et pré identifier par les methodes pasteriennes classique , avec application a echeele pilote . La preidentification nous oriente vers le genre de *Pseudomonas* ou son degradation est totale des hydrocarbures .

Mots clés : hydrocarbure, eau de procédées, biodégradation, *Pseudomonas*, echelle pilote

Abstract :

the oil industry is partly responsible for some environmental problems in different parts of the world. When a site is considered to be contaminated with hydrocarbons, there are several technologies available to address it. Biodegradation is based on the enzyme capacitires of certain microorganisms with hydrocarbon activity, The objective of this work is to evaluate the biodegradation capabilities of the oil by bacteria isolated from likely contaminated soils, the application of purification strategies in the presence of *Pseudomonas* isolated and identified by the classical pasterian methods, with pilot application. Pre-identification leads us to the genus of *Pseudomonas* where its degradation is total .

Keywords : hydrocarbon process water; biodegradation , *pseudomonas*

#

#

#

#

#

Pseudomonas

Preidentification

Pseudomonas

Ⓒ

Résumer :

La pollution causée par les hydrocarbures pétrolier est relativement liée au activiter humaine qui cause des conditions environnementale néfastes à la vie. il existe plusieurs technologies disponibles pour le remédier. Les eaux de procédé de raffinage origines constituent un problème majeure lord son rejet sans subir de traitements physico-chimiques et biologique. Afin de montrer l'intérêt de leur épuration biologique.

La biodégradation est basée sur les capacités enzymatiques de certains microorganismes a activité hydrocarbonolaste telle que les *Pseudomonas* ; L'objectif de ce travaille est d'évaluer les capacités de biodégradation du pétrole par les bactéries isolées à partir des sols probablement contaminés ;l'application des stratégies d'épuration en présence des *Pseudomonas* isolait et pré identifier avec concentration différentes (D.O 0,5et 1 pour chaque isolat) conduit à une forte biodégradation des polluants par une diminution de leur concentration. ... Jusqu'à 0.

Mots clés : hydrocarbure, eau de procédées, biodégradation, *Pseudomonas*

Abstract :

Pollution caused by petroleum hydrocarbons is relatively related to human activity that causes life-threatening environmental conditions. there are several technologies available to remedy it, The initial refining process water is a major problem in its release without undergoing physico-chemical treatment and biological To show the value of their biological purification. Biodegradation is based on the enzyme capacities of certain microorganisms with hydrocarbon activity such as pseudomonas ; The objective of this work is to assess the biodegradation capabilities of oil by bacteria isolated from likely contaminated soils ; the application of purification strategies in the presence of pseudomonas isolated and pre-identified with different concentration (D.O 0.5 and 1 for each isolate) leads to high biodegradation of pollutants by decreasing their concentration.... Up to 0.

Keywords : hydrocarbon process water; biodegradation , *pseudomonas*

: الملخص

التلوث الناجم عن الهيدروكربونات البترولية مرتبط نسبيا بنشاط الانسان والذي يسبب ظروف بيئية قاتلة.

ونظرا لذلك تمة تكنولوجيات للتصدي لهذه الظاهرة. مياه عمليات التكرير تشكل مشكل اساسي عند رميها بدون معالجة فزيائية- كيميائية و بيولوجيا . تعتمد المعالجة البيولوجية على القدرات الإنزيمية لبعض الكائنات الدقيقة ذات نشاط تحليلي ك *Pseudomonas* ;

الهدف من هذه العمل هو تقييم قدرات النشاط التحليلي للبترول من طرف البكتيريا المعزولة من تربة غالبا ملوثة، تطبيق استراتيجيات المعزولة والمتعرف عليها بتراكيز كثافة ضوئية مختلفة (0.5، 1) تقود الى نشاط تحليلي قوي *Pseudomonas* تصفية بحضور للملوثات مع انخفاض لتركيزها الى الصفر