

République Algérienne Démocratique et Populaire

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



جامعة عبد الحميد بن باديس  
مستغانم  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE  
**MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES**

Présenté par

M<sup>lle</sup> AID Kheira

M<sup>lle</sup> ZAFRANE Houria

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN BIOLOGIE**

**Spécialité: Génétique fondamentale et appliquée**

**THÈME**

**Etude de potentiel de dégradation des  
hydrocarbures par le genre pseudomonas isolé de  
sites pollués**

Soutenue publiquement le 03/07/2019

DEVANT LE JURY

Président : Mr .NEBBACH. S

Examineur : Mme.SIDHOM. W

Encadreur : Mme.BEKENNICHE. N

*Thème réalisé au Laboratoire de Microbiologie de l'université de Mostaganem.*

Année universitaire 2018/2019

# Remerciements

Avant toute chose, nous remercions " **Dieu** " qui nous a donné la  
Patience, le courage et la volonté pour réaliser ce mémoire  
Pais et salut sur notre premier éducateur (محمد صلى الله عليه و سلم) le prophète pour ce qu'il a  
donné à l'humanité.

Notre encadreur le **Mm. Benkenniche.N** Pour la confiance qu'il nous a accordée en  
acceptant cet encadrement  
Pour sa disponibilité tout au long de l'élaboration de ce mémoire, pour son aide, ses critiques  
et ses suggestions, et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire.

Nous remercions **Mr. Nabbeche.S.** d'avoir accepté la présidence du jury de la  
soutenance.

Nous remercions **Mr. Sidhom.W** qui a accepté d'examiner ce modeste travail.  
Nous tenons aussi à remercier **Mr.Chibani . A.** pour ses encouragements, ses conseils,  
qui ont été pour nous d'un grand apport.

Nous voudrions remercier aussi les techniciens du laboratoire de microbiologie  
**Djillali, , Abaidi** et particulièrement **Hafida** pour sa patience, son aide précieuse et ses  
valeureux conseils.

Finalement, nous remercions tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à  
l'accomplissement de ce mémoire.

A vous tous, un grand **Merci**

A. KHEIRA  
Z. HOURIA

# Dédicace

*Avant tout, je remercie mon dieu qui m'a donné le courage*

*Et la volonté de terminer ce mémoire.*

*Je dédie ce travail aux plus proches à mon cœur :*

*Et mes parents qui m'ont encouragé pour réaliser mon rêve après des  
longues années d'étude, que dieu les protège et leur prête santé et longue  
vie.*

*Et mes très chers sœurs : Achoura, Fatima, Cherifa et Ritadj.*

*Et mes très chers frères : Mohamed, Hakim et Amin.*

*Et mon meilleure ami(es) : Hayat.*

*Et mon très cher binôme Houria.*

*Et à mon encadreur Mme. Benkenniche merci pour votre disponibilité et  
vos précieux conseils.*

*A. H.F.R.A.K*

# Dédicace

*Avant tout je remercie Allah pour les tout je dédie ce modeste travail :*

*A mes très chers parents Maman et Papa sources de tendresse et la force de courage d'étude.*

*Je vous remercie d'être toujours à ma coté de me soutenir, aimer, protéger et pour tous ce que vous avez fait pour moi.*

*A mes chères frères et mes sœurs fatima, nasira, nadia et samra et fathi, nor adin, mouhamed.*

*A mes meilleurs amis : Rachida, Djamila et Athlem.*

*A mon très cher binôme Kheira.*

*A tout la promotion de biologie de Biologie 2018/2019.*

*A tout les enseignants(e).*

*Z. HOUSSA*

# Résumé

---

## **Résumé :**

Les hydrocarbures constituent un polluant majeur des sols. La biodégradation des produits pétroliers par le biais des microorganismes de sol a apparus comme une méthode d'intérêt de point de vue économique et écologique. Le but de notre étude était d'isoler et d'identifier les espèces de bactériens présents dans le sol pollué par des hydrocarbures: pétrole brut. Nous avons identifié neuf (**09**) isolats bactériens isolés initialement à partir du sol contaminé par le pétrole (**C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9**).L'identification est basé sur les études morphologiques (étude macroscopique et microscopique) et biochimiques (les différentes tests biochimiques d'orientation pour identifier du nos isolats).

La capacité des souches isolées à dégrader le pétrole brut a été réalisée dans un milieu solide par une méthode de spray et la croissance bactérienne a été suivie dans un milieu liquide additionné d'une seule et unique source de carbone : le pétrole, par spectrométrie UV.

**Mots clés :** Les hydrocarbures, la biodégradation, microorganismes, pétrole brut.

*Pseudomonas*

## Résumé

---

### **Summary:**

Hydrocarbons are a major pollutant of soils. Biodegradation of petroleum products through soil microorganisms has emerged as a method of economic and ecological interest. The purpose of our study was to isolate and identify the bacterial species present in the soil polluted by hydrocarbons: crude oil. We identified nine (09) bacterial isolates isolated initially from petroleum-contaminated soil (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9). The identification is based on morphological studies (study macroscopic and microscopic) and biochemical (the deferent biochemical tests of orientation to identify our isolates).

The capacity of the isolated strains to degrade the crude oil was carried out in a solid medium by a spray method and the bacterial growth was followed in a liquid medium supplemented with a single source of carbon: the oil, by UV spectrometry.

**Key words:** Hydrocarbons, biodegradation, microorganisms, crude oil. Pseudomonas

### المخلص

الهيدروكربونات هي ملوث رئيسي للتربة. برز التحلل الحيوي للمنتجات البترولية من خلال الكائنات الحية الدقيقة في التربة كوسيلة من الفوائد الاقتصادية والبيئية. كان الغرض من دراستنا هو عزل وتحديد الأنواع البكتيرية الموجودة في التربة الملوثة بالهيدروكربونات: النفط الخام. حددنا تسعة (09) عزلة بكتيرية معزولة مبدئيًا عن التربة الملوثة بالنفط (C1، C2، C3، C4، C5، C6، C7، C8، C9). يعتمد التعرف على الدراسات المورفولوجية (دراسة المجهرية والمجهري) والكيمياء الحيوية (اختبارات الكيمياء الحيوية المختلفة من التوجه لتحديد العزلات لدينا).

تم تنفيذ قدرة السلالات المعزولة على تحطيم النفط الخام في وسط صلب بواسطة طريقة الرش، وتم تتبع نمو البكتيريا في وسط سائل يستكمل بمصدر وحيد للكربون: النفط، بواسطة قياس الطيف بالأشعة فوق البنفسجية.

**الكلمات المفتاحية:** الهيدروكربونات، التحلل الحيوي، الكائنات الحية الدقيقة، النفط الخام, *Pseudomonas*

## Liste des Abréviations

**L** : Litre.

**µl** : Microlitre.

**ml** : Millilitre.

**mm** : Millimètre.

**Cm** : Centémetre.

**S** : Seconde.

**m** : Minute.

**h** : Heure.

**rpm** : rotation par minute.

**pH** : Potentiel d'hydrogène.

**°C** : Degré Celsius.

**%** : Pourcentage.

**g** : Gramme.

**Mg** : Milligramme.

**HAP** : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.

**GN**: Gélose nutritive.

**BN** : Bouillon nutritif.

**MSM** : minéral Salt medium.

**HA** : Hydrocarbures aliphatiques.

**HCP** : Hydrocarbures pétroliers.

**QSP** : Quantité Suffissante Pour.

**C** : Carbones.

**H** : Hydrogène.

**CMN**: *Corynebacterium*, *Mycobacterium* et *Nocardia*.

**Fe** : Fer.

**N**: Azote.

## Liste de la figure

<b>Figure 1</b> : Les diverses formes de contamination sols et leurs conséquences.....	04
<b>Figure 2</b> : pollution de sol par les décharges.....	06
<b>Figure 3</b> . Structure moléculaire de base des principaux hydrocarbures pétroliers.....	10
<b>Figure 4</b> : Représentation schématique du devenir d'une pollution pétrolière à la surface du sol.....	13
<b>Figure 5</b> : Dégradation aérobie de la matière organique.....	21
<b>Figure 6</b> : Dégradation anaérobie de la matière organique.....	21
<b>Figure 7</b> : Localisation des régions de prélèvement d'échantillons.....	33
<b>Figure 8</b> : Schématisation de la méthode de dilution de l'échantillon du sol dans L'eau physiologique stérile.....	35
<b>Figure 9</b> : Etalement de 0.5ml de chaque dilution sur le milieu de culture.....	35
<b>Figure 10</b> : Schéma d'isolement et dénombrement des bactéries telluriques.....	36
<b>Figure11</b> : Protocole de test de nitrate réductase.....	40
<b>Figure 12</b> : sol pollué par les hydrocarbures.....	45
<b>Figure 13</b> : aspect macroscopique de quelques souches.....	45
<b>Figure14</b> : Résultat positif pour le test catalase.....	49
<b>Figure15</b> : résultat de test nitrate réductase.....	50
<b>Figure16</b> : résultat de test viande foie.....	51
<b>Figure17</b> : résultat de test citrate de simmons.....	51
<b>Figure18</b> : résultat de test gélose à d'amidon.....	52
<b>Figure19</b> : résultat de test de rouge de méthyle(RM).....	53
<b>Figure20</b> : résultat de test VP.....	53
<b>Figure 21</b> : Les résultats des tests biochimiques obtenus (King A et B).....	54

**Figure 22:** interactions des souches qui ont réagissent avec le pétrole dans le milieu liquide.....58

**Figure23 :** Cinétique de croissance des souches bactériennes durant la biodégradation du pétrole.....59

## Liste de tableau

<b>Tableau 1 :</b> Les pollutions rencontrés sur 54 en sites en cours d'évaluation ou de réhabilitation/ surveillance/ dépollution.....	07
<b>Tableau 2.</b> Composition élémentaire des hydrocarbures pétroliers.....	10
<b>Tableau 3 :</b> Propriétés des principaux hydrocarbures pétroliers.....	14
<b>Tableau 4 :</b> Différentes techniques de traitement biologique des sols pollués.....	19
<b>Tableau 5 :</b> observations macroscopiques de souches isolées.....	46
<b>Tableau 6 :</b> les différents caractères des souches isolées.....	47
<b>Tableau 7 :</b> résultat de test de nitrate réductase.....	50
<b>Tableau 8 :</b> résultat de test de RM et VP.....	52
<b>Tableau 9 :</b> Résultats du testes biodégradation de pétrole brut des souches d'échantillon « C ».....	55

# Sommaire

Remerciements

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste d'abréviation

Introduction.....01

## **PARTIE I : BIBLIOGRAPHIQUE**

### **CHAPITRE I : POLLUTION**

I.1 La Pollution.....03

I.1.1. La Pollution du sol.....03

I.1.1.1. Types de pollution du sol.....05

I.1.1.1. pollution ponctuelle.....05

I.1.1.1.2.Pollution diffuses.....05

I.1.1.2.. L'origines de pollution du sol.....05

I.1.1.2.1. Pollution d'origine humaine.....05

I.1.1.2.2. Pollution due à l'environnement... ..05

I.1.1.3. Types de polluants.....06

I.1.1.4. Nature des polluants.....07

I.1.1.5. Pollution par les hydrocarbures et leurs impacts.....07

### **CHAPITRE II : LES HYDROCARBURES PETROLIERS**

II. Hydrocarbures pétroliers.....09

II.1. Généralité sur les hydrocarbures.....09

II.2. Classification.....10

II.2.1. Hydrocarbures saturés.....	11
a. Alcanes linéaires.....	11
b. Alcanes ramifiés.....	11
c. Cycloalcanes.....	11
II.2.2. Hydrocarbures aromatiques.....	11
II.2.3. Composés polaires.....	11
II.2. 4.Résines Asphaltènes.....	12
II.3. Devenir des hydrocarbures dans l'environnement.....	12
II.3.1.Evaporation.....	13
II.3.2.Solubilisation.....	13
II.3.3.Emulsification.....	14
II.3.4.Sédimentation.....	14
II.3.5.Photo-oxydation.....	15
II.3.6.Biodégradation.....	15
II.4. Biodétection de la pollution du sol par les hydrocarbures.....	16
II.5.Traitement des sols pollués par les hydrocarbures.....	16
II.5.1. Traitements physiques.....	17
II.5.2. Traitements thermiques.....	17
II.5.3. Traitements chimiques.....	17
II.5.4.Traitements biologiques.....	18

### **CHAPITRE III : BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES.**

III. La Biodégradation des hydrocarbures.....	20
III.1. introduction sur la Biodégradation .....	20
III.2. Types de biodégradation.....	20
III.2.1. Biodégradation aérobie.....	20
III.2.2. Biodégradation anaérobie.....	21
III.3. Microorganismes dépolluants le sol.....	22
III.4. Facteurs influençant la biodégradation des hydrocarbures.....	22
III.4.1.Structure et nature du sol.....	22
III.4.2.Composition chimique des hydrocarbures.....	22
III.4.3.Humidité.....	23

III.4.4. Température.....	23
III.4.5. Salinité.....	24
III.4.6. Potentiel d'hydrogène (pH).....	24
III.4.7. Taux d'oxygène.....	24
III.4.8. Contenu en nutriments.....	25
III.5. Biodégradation par type d'hydrocarbures.....	25
III.5.1. Biodégradation des hydrocarbures saturés.....	25
III.5.2. Biodégradation des hydrocarbures aromatiques.....	25.

## **CHAPITRE IV : *PSEUDOMONAS***

IV. Les Pseudomonas .....	28
IV.1. Définition .....	28
VI.2. Classification de genre pseudomonas.....	28
IV.2.1. La classification phénotypique.....	28
IV.2.2. La classification phéno-tyypique.....	29
IV-2 .3. La classification chémio-taxonomique.....	30
IV.3. Txonomie des pseudomonzs : Historique et outils d'identification.....	31
IV.4. Habitatdes pseudomonas.....	31

## **PARTIE II : EXPERIMENTALE**

### **CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODE**

I.1. Echantillonnage.....	33
I.2. Milieux de culture .....	33
II : Méthode.....	34
II.1. Isolement.....	34
II.2. Dénombrement.....	36

II.3. Purification des souches bactériennes.....	36
II.4. Conservation des souches.....	36
II.5. Identification.....	37
II.5.1.Etude morphologique.....	37
II.5.1.1.L'aspect macroscopique.....	37
II.5.1.2.Aspect microscopique.....	37
II.5.1.2.1.Coloration simple.....	38
II.5.1.2.2.Coloration de gram.....	38
II.5.2.Etude biochimiques (les tests d'orientations).....	39
II.5.2.1.Recherche de la catalase.....	39
II.5.2.2.Recherche de nitrate réductase.....	40
II.5.2.3.Recherche de Citrate de Simmons.....	41
II.5.2.4.Recherche de Gélose à d' Amidon.....	41
II.5.2.5.Recherche de métabolites formé à partir de l'acide pyruvique ; rouge de méthyle (RM) test de voges –proskauer VP.....	42
II.5.2.5.1. Test RM (rouge de méthyle).....	42
II.5.2.5.2. test VP (vosges-proskauer).....	42
II.5.2.6.Recherche de viande foie (Gélose VF).....	42
II.5.3.Sélection des souches apparentées au genre <i>Pseudomonas</i> .....	43
II.5.3.Culture sur milieu sélectif King.....	43
II.6. Test de dégradation du pétrole brut en milieu solide (MSM agar).....	43
II.7. Test de dégradation du pétrole brut en milieu liquide.....	44

## **CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSIONS**

II.1. Analyse physico-chimique.....	45
-------------------------------------	----

II.1.1. Caractéristiques du sol étudié.....	45
II.2. Caractéristiques des isolats purifiés.....	45
II.3. Identification des souches isolées.....	46
II.3.1. Examen macroscopique.....	46
II.3.2. Examen microscopique.....	46
II.4. Tests biochimiques.....	49
II.4.1. Test de catalase.....	49
II.4.2. Recherche de nitrate réductase.....	50
II.4.3. Recherche de type respiratoire.....	50
II.4.4. Recherche de Citrate de Simmons.....	51
II.4.5. Recherche de Gélose à d' Amidon .....	51
II.4.6. Recherche de métabolites formé à partir de l'acide pyruvique ; rouge de méthyle (RM) et test de voges –proskauer VP.....	52
II.4.6.1. test RM (rouge de méthyle).....	52
II.4.6.2. Test de Voges –proskauer VP.....	53
II.5. Pré identification des souches isolées.....	54
II.5.1. Les <i>Pseudomonaceae</i> .....	54
II.6. Test de biodégradation.....	55
II.6.1. Test de dégradation du pétrole brut en milieu solide (MSM agar).....	55
II.6.2. Test de dégradation du pétrole brut en milieu liquide.....	58
II.7. Détection de l'activité de biodégradation des bactéries.....	58

## **Conclusion**

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

# Introduction

### Introduction

Une pollution est définie comme une nuisance ou un risque pérenne pour les personnes ou l'environnement. La définition de pollution est donc très large et elle permet de comprendre aussi bien des polluants d'origine naturelle que des polluants liés à l'activité humaine (anthropique). La problématique de la pollution des sols et en particulier la pollution ponctuelle n'a pas été prise en compte que très tardivement malgré les conséquences négatives que cela peut entraîner pour la santé et l'environnement. La qualité des sols peut également en être altérée (**Mbonigaba et al, 2009**).

La pollution par les hydrocarbures en milieu terrestre, qu'elle soit chronique ou accidentelle constitue l'un des phénomènes de pollution les plus préoccupants, Cette pollution peut avoir un impact soit direct ou indirect, sur la santé humaine et l'équilibre des écosystèmes. Lorsque des hydrocarbures sont déversés dans l'environnement, différents processus d'altération ont lieu. Ces processus génèrent des changements des propriétés physicochimiques des hydrocarbures qui ont lieu plus ou moins rapidement, mais commencent immédiatement après le déversement dans l'environnement. Ces changements dépendent souvent des conditions environnementales et du type d'hydrocarbures déversés, soit de la composition chimique. Les processus d'altération des hydrocarbures sont l'évaporation, l'émulsification, la dispersion naturelle, la dissolution, la photooxydation, la sédimentation, l'interaction avec des particules fines et la biodégradation. Le devenir des hydrocarbures dans l'environnement à la suite d'un déversement dépend de ces processus.

La biodégradation correspond à la décomposition de polluants organiques par des micro-organismes (bactéries, champignons ou algues). Les polluants sont alors convertis en dioxyde de carbone (lorsque la biodégradation est totale), en eau et en énergie pour constituer de la biomasse. Biodégradation des hydrocarbures pétroliers est observée dans des conditions aérobies et anaérobies, la vitesse peut être augmentée par l'addition de bactéries produisant des biosurfactants, car le facteur exogène est un élément crucial pour améliorer la biodisponibilité des polluants et donc être dégradé efficacement (**Kaczorek et Olszanowski, 2011**).

Les microorganismes jouent un rôle primordiale dans la biodégradation, ils sont très divers dans la nature et composés de bactéries, champignons (**Yadav et Hassanizadeh, 2011**). Un certain nombre d'espèces bactériennes sont connues pour la dégradation des

hydrocarbures et la plupart d'entre elles sont isolées à partir des sols contaminés. Plusieurs espèces microbiennes sont recensées et qualifiées aptes à dégrader des hydrocarbures telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Mycobacterium* spp., *Haemophilus* spp., *Rhodococcus* spp., *Paenibacillus* spp (Haritash et Kaushik, 2009).

Notre étude s'inscrit dans cette optique et le principal objectif de ce travail était une caractérisation complète et l'identification des isolats qui sont isolées à partir d'un sol polluée par les hydrocarbures.

L'ensemble des travaux entrepris a été mené avec deux objectifs :

- ✓ La première partie, L'étude de la biodégradation des hydrocarbures comme le pétrole brut par les bactéries isolées de sites pollués.
- ✓ La deuxième partie, représente le travail pratique et qui indique les différentes techniques mises en œuvre afin de caractériser les neuf souches isolées et l'étude le capacité de dégradation du pétrole brut et la croissance de ces souches. Les résultats obtenus avec ces différentes méthodes sont comparés et discutés dans la troisième partie. Enfin la dernière partie concernera la conclusion finale et soulignera les perspectives de ce travail.

***Partie I :***  
***bibliographique***

# Chapitre I

## *La Pollution*

## I.1 La Pollution

La pollution est une modification défavorable du milieu naturel qui apparait, en totalité ou en partie, comme un sous-produit de l'action humaine, au travers des effets directs ou indirects. Ces modifications génèrent des conséquences néfastes sur les milieux écologiques en général et sur l'homme et sa santé en particulier.

Il y a des nombreuses définitions qui en été données par les experts. Parmi celles-ci nous retiendrons la suivante publiée dans un rapport rédigé par le comité scientifique de la maison blanche intitulé : Pour restaurer la qualité de notre environnement. « C'est une modification défavorable du Milieu naturel qui apparait en totalité ou en partie comme un sous-produit de l'action humaine, au travers d'effets directs ou indirects altérant les critères de répartition des flux d'énergie .des niveaux de radiation, de la constitution physico-chimique du milieu naturel et de l'abondance des espèces vivantes (**Emilia K, 2004**).

La définition de pollution est donc très large et elle permet de comprendre aussi bien des polluants d'origine naturelle que des polluants liés à l'activité humaine (anthropique) (**Emilia K, 2004**).

### I.1.1. La Pollution du sol

La problématique de la pollution des sols et en particulier la pollution ponctuelle n'a pas été prise en compte que très tardivement malgré les conséquences négatives que cela peut entraîner pour la santé et l'environnement.

La pollution des sols est une problématique d'actualité. Avec son impact direct sur l'environnement et par conséquent, sur la santé des hommes, des animaux et des végétaux, la pollution des sols est un véritable problème qui mobilise autant les pouvoirs politiques que les citoyens.

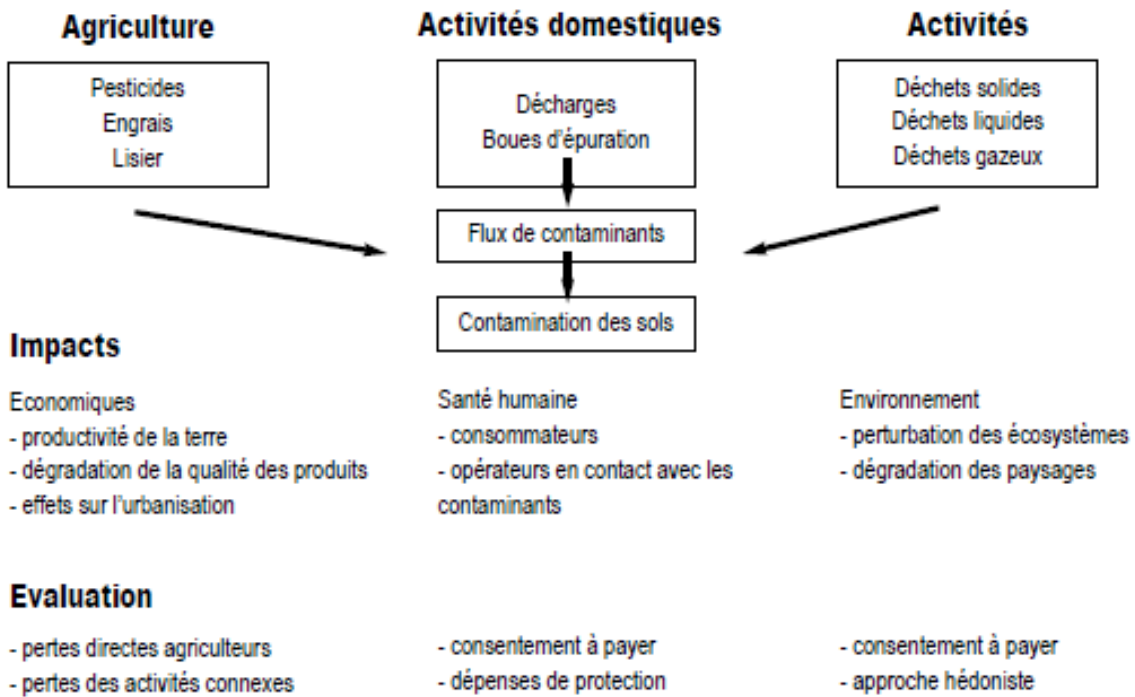
La notion de pollution des sols désigne l'ensemble des formes de pollution touchant tous les types de sols, qu'ils soient forestiers, agricoles, urbains. La pollution engendre une dégradation du sol et de son biotope et résulte de la dissémination de substances toxiques, éventuellement radioactives ou d'organismes pathogènes, susceptibles d'entraîner des altérations biologiques, physiques et/ou chimiques, plus ou moins importantes sur

l'écosystème. Les sources responsables de cette pollution résultent : d'épandage d'engrais, ou de pesticides, décharge publique et les déchets industrielles (**Hamelin et al, 2000**).

D'emblée, Monas et al évoquent le caractère relativement nouveau (vingtaine d'années) de la prise de conscience d'un risque sanitaire en présence de sols contaminés. Ils soulignent également la relative urbanisation à proximité d'anciens sites industriels et la parfois très large médiatisation de certains de ces sites.

Ils citent comme activités, potentiellement sources de contamination des sols, les activités portuaires, aéroportuaires et ferroviaires, les activités agricoles et horticoles, les bases militaires, l'extraction de minerais et l'industrie métallurgique, les cimenteries, les productions de charbon, l'industrie chimique et pétrochimique, les usines à gaz, etc. (**Figure 1**) (**Monas et al, 2004**).

**Sources**



**Figure 1** : Les diverses formes de contamination sols et leurs conséquences (**Monas et al, 2004**).

### **I.1.1.1 Types de pollution du sol**

On distingue deux types de pollution du sol :

#### **I.1.1.1.1. Pollutions ponctuelles**

Dépôt ou épandage de polluants sur une surface restreinte, que l'on peut assimiler à une source (**Jeannot *et al*, 2001**).

#### **I.1.1.1.2. Pollutions diffuses**

Épandage ou retombée de polluants sur une grande surface (**Jeannot *et al*, 2001**).

### **I.1.1.2. Origines de pollution du sol**

#### **I.1.1.2.1 Pollution d'origine humaine :**

Les pollutions d'origine humaine, dites aussi anthropiques, ont de nombreuses formes en pouvant être locales, culturelles, ponctuelles, accidentelles, diffuses, chroniques, génétiques, volontaires, etc. cette pollution est une diffusion directe ou indirecte dans l'environnement de polluants. Ce sont souvent des sous-produits involontaires d'une activité humaine, comme les émissions des pots d'échappement. Les déchets de produits de consommation courante. (**Soltani M, 2004**).

#### **I.1.1.2.2 Pollution due à l'environnement :**

Ces pollutions peuvent être :

- Les conséquences directes ou indirectes de catastrophes naturelles, tels que le volcanisme.
- Une pollution liée à des phénomènes naturels, tels que les éruptions solaires.
- Une pollution d'un captage d'eau potable par un animal qui fera ses besoins à proximité, ou qui serait mort et en décomposition dans l'eau.

La nature et le degré de contamination d'un sol sont donc très variables selon l'origine de la pollution, les activités locales, la topographie du lieu, etc.....les pollutions multiples sont courantes. Un polluant dans le sol devient dangereux s'il devient mobile et qu'il atteint sa cible (hommes, eaux souterraines ou superficielles, écosystèmes,.....). Un sol pollué devient alors un problème de santé publique si le polluant atteint la nappe phréatique ou le cours d'eau avoisinant, si ceux-ci sont destinés à l'alimentation en potable

On distingue 3 grandes catégories de sites pollués :

Les anciennes décharges réalisées sans respecter les règles techniques actuelles et notamment les décharges situées sur des sous-sols fragiles et pour lesquels une pollution des eaux souterraines a été constatée. A l'époque de l'exploitation de ces décharges, les connaissances techniques et scientifiques sur les nuisances et les risques engendrés par les stockages de déchets étaient réduites, voire inexistantes.

Les dépôts de déchets ou de produits chimiques abandonnés à la suite de faillites d'entreprises ou résultant de pratiques frauduleuses d'importation ou d'élimination de déchets (**figure 2**).

Les sols pollués par des retombées, des infiltrations ou des déversements de substances polluantes, liés à l'exploitation passée ou présente d'une installation industrielle ou à un accident de transport.



**Figure 2** : pollution de sol par les décharges. (Soltani M, 2004).

### **I.1.1.3 Types de polluants**

Les polluants eux-mêmes avec leurs caractéristiques intrinsèques ; on trouvera ainsi les principales propriétés et grandeurs associées à prendre en compte, une classification des polluants basée sur la relation propriétés-comportement, et une description du comportement de familles types. On note ici que cette classification diffère un peu de celle présentée dans le guide méthodologique pour l'analyse des sols pollués (**Jeannot et al, 2000**). Les groupes de composés pétroliers polluants pour lesquelles la biodépollution est Possible sont :

- Les hydrocarbures pétroliers (gasoils, fuel, kérosène, huiles minérales).
- Les déchets d'exploitation du pétrole (boues et résidus d'huiles goudrons) (**Bliefert et Perraud, 2004**).

**I.1.1.4 Nature des polluants**

Le tableau ci-dessous reprend les polluants rencontrés sur les 54 en sites en cours d'évaluation ou de réhabilitation/surveillance/dépollution.

**Tableau 1** : les polluants rencontrés sur les 54 en sites en cours d'évaluation ou de réhabilitation/surveillance/dépollution

nom du polluant	nombre de sites où la pollution est rencontrée	pourcentage de sites où la pollution est rencontrée	valeurs nationales (ordre d'importance) nr = non renseigné
Hydrocarbures totaux	32	59,3%	35,90 % (1)
Solvants halogénés	15	27,8%	10,65 % (6)
HAP	14	25,9%	14,49 % (2)
Pb (plomb)	14	25,9%	13,60 % (3)
Cr (chrome)	9	16,7%	11,60 % (4)
Solvants non halogénés	9	16,7%	nr
Cu (cuivre)	8	14,8%	10,76 % (5)
Cd (cadmium)	7	13,0%	4,97 % (10)
Ni (nickel)	6	11,1%	7,58 % (9)
Zn (zinc)	6	11,1%	9,97 % (7)
Cyanures	5	9,3%	nr
Hg (mercure)	4	7,4%	nr
Hydrocarbures aromatiques	3	5,6%	nr
As (arsenic)	3	5,6%	8,74 % (8)
Mn (manganèse)	2	3,7%	nr
PCB-PCT	1	1,9%	nr
Mo (molybdène)	1	1,9%	nr
Ba (baryum)	1	1,9%	nr
Amiante	1	1,9%	nr
Type de pollution inconnu	2	3,7%	nr

**I.1.1.5. Pollution par les hydrocarbures et leurs impacts**

La pollution des sols par les hydrocarbures est présente dans près de 60 des cas, soit presque 2 fois plus que la moyenne nationale (les valeurs nationales sont issues du site internet du Ministère de l'Ecologie et du développement Durable). Les hydrocarbures sont utilisés dans de nombreuses activités industrielles. Ces pollutions sont dues. Pour la majorité des cas, à des fuites dans les réservoirs dégradés ou à des déversements accidentels. On les retrouve dans toutes les zones du département. Les impacts de la pollution par les

hydrocarbures sont multiples. Les aspects les plus évidents sont les grandes catastrophes très médiatisés (**Soltani, 2004**).

Les hydrocarbures constituent un polluant majeur des sols. Les sols contaminés par les hydrocarbures présentent un danger lors d'un contact direct avec l'Homme ou l'animal ou lors de leur transfert dans les chaînes alimentaires. C'est le phénomène de bioaccumulation avec le piégeage par les végétaux et les animaux des polluants ou de leurs produits de dégradation jusqu'à des teneurs atteignant les seuils de toxicité (**Scriban, 1999**).

# Chapitre II

*Les hydrocarbures  
pétroliers*

### II. Hydrocarbures pétroliers

#### II.1. Généralité sur les hydrocarbures

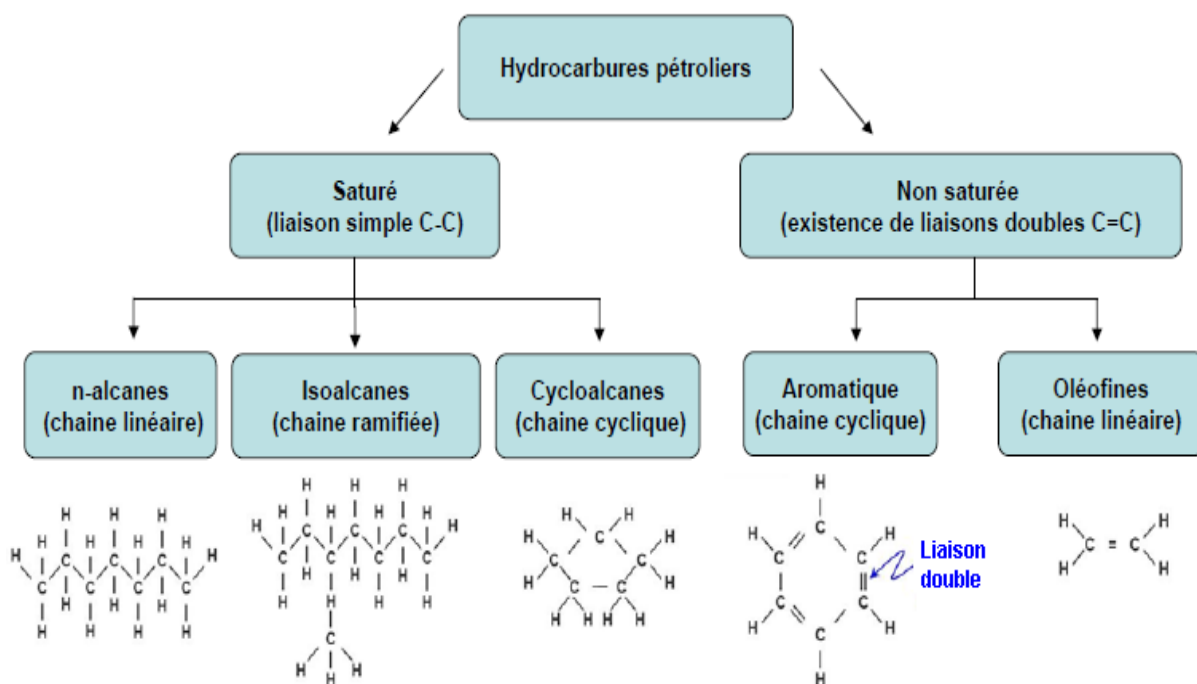
Le terme « hydrocarbure pétrolier » est un terme générique qui désigne les mélanges de composés organiques présents dans des matières géologiques comme l'huile, le bitume et le charbon ou dérivés de ces matières (**Guermouche M'Rassi, 2013**).

Les hydrocarbures pétroliers contiennent principalement des molécules composées d'atomes de carbone et d'hydrogène. D'autres constituants mineurs sont également présents dans les hydrocarbures pétroliers, comme des métaux et des composés polaires qui contiennent de l'azote, du soufre ou de l'oxygène. Les molécules polaires de faible masse moléculaire sont appelées des résines, les plus lourdes étant regroupées sous l'appellation d'asphaltènes. La composition élémentaire des hydrocarbures pétroliers est présentée dans le **Tableau 2**.

On distingue trois séries distinctes d'hydrocarbures : la série aliphatique, la série alicyclique et la série aromatique. Les hydrocarbures aliphatiques (HA) sont constitués de chaînes carbonées linéaires qui peuvent être saturées ou posséder une ou plusieurs doubles ou triples liaisons (alcanes/alcènes/alcynes). Les hydrocarbures alicycliques peuvent également être saturés ou posséder une ou plusieurs doubles liaisons, on parle alors respectivement de cyclanes et de cyclènes (**Arnaud, 1983**). Cependant, la structure cyclique est incompatible avec les triples liaisons du fait de leur géométrie linéaire, à moins que la molécule ne contienne un minimum de 8 carbones (cyclynes). Il existe aussi des hydrocarbures bi- voir tricycliques (**Arnaud, 1983 ; Brandt, 1992**). Enfin, la série aromatique ne comprend que des hydrocarbures insaturés. Elle rassemble tous les composés renfermant un ou plusieurs noyaux aromatiques. Les hydrocarbures aromatiques contenant plusieurs noyaux aromatiques accolés sont appelés hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). (**Figure3**).

**Tableau 2.** Composition élémentaire des hydrocarbures pétroliers (Speight, 2014)

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



**Figure 3.** Structure moléculaire de base des principaux hydrocarbures pétroliers (Colombano et al, 2008).

## II.2. 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. Ces hydrocarbures peuvent être classés en quatre familles principales qui sont présentes en proportions variables selon leur origine: les hydrocarbures saturés (30 à 70 %), les hydrocarbures aromatiques et

polyaromatiques (20 à 40 %), les composés polaires (5 à 25 %) et les asphaltènes (0 à 10 %) (NEFF, 1979). Selon (Syakti, 2004), les hydrocarbures pétroliers sont classés comme suit:

### II.2.1. Hydrocarbures saturés

Parmi les hydrocarbures saturés on distingue:

#### a. Alcanes linéaires

Les alcanes linéaires (*n*-alcanes,  $C_nH_{2n+2}$ ), dont la longueur de leur chaîne varie de 7 à 40 atomes de carbone constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier).

#### b. Alcanes ramifiés

Les alcanes ramifiés les plus abondants sont les *iso*-alcanes (groupement méthyle en position 2). Les autres composés ramifiés antéiso (groupement méthyle en position 3) ou polyramifiés tels que les isoprénoïdes (exemple: pristane, phytane) sont beaucoup moins nombreux. Ces composés se trouvent dans le pétrole brut à des proportions sensiblement égales à celles des *n* alcanes.

#### c. Cycloalcanes

Les cycloalcanes renferment des composés cycliques (à 5 ou 6 atomes de carbone) saturés et le plus souvent substitués. Quelques dérivés polycycliques sont aussi présents et, certains d'entre eux tels que les stéranes et les triterpanes sont caractéristiques d'un pétrole brut. Cette famille peut représenter entre 30 et 50 % des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut (Guermouche M'Rassi, 2013).

### II.2.2 Hydrocarbures aromatiques

Plusieurs familles d'hydrocarbures aromatiques et polyaromatiques dont le nombre de noyaux varie de 2 à 6 sont présentes dans les pétroles bruts. Ces composés sont dominés par des composés mono-, di- et tri-aromatiques. Les cycles aromatiques peuvent être agencés de manière linéaire (anthracène), angulaire (phénanthrène) ou groupé (pyrène). Au sens strict, ils ne contiennent donc que des atomes de carbone et d'hydrogène (Vandecasteele, 2005 ; seo et al, 2009). Les HAPs se subdivisent en deux groupes : les légers, dont la masse molaire est comprise entre 150 et 180  $g \cdot mol^{-1}$  (HAP de moins de quatre cycles) et les lourds (au moins quatre cycles) ; dont les masses molaires varient de 200 à 280  $g \cdot mol^{-1}$ .

### II.2.3. Composés polaires

Les composés polaires correspondent à des molécules hétérocycliques, telles que :

- Les composés oxygénés (phénol, acides carboxyliques, alcools, aldéhydes.....).
- Les composés soufrés, (mercaptans, sulfures, disulfures).
- Les composés azotés (pyridines, quinoléines). **(Soltani, 2004)**.

Les dérivés soufrés sont dans la plupart des plus abondants que les composés oxygénés ou azotés **(Guermouche M'Rassi, 2013)**.

### II.2. 4.Résines et asphaltènes

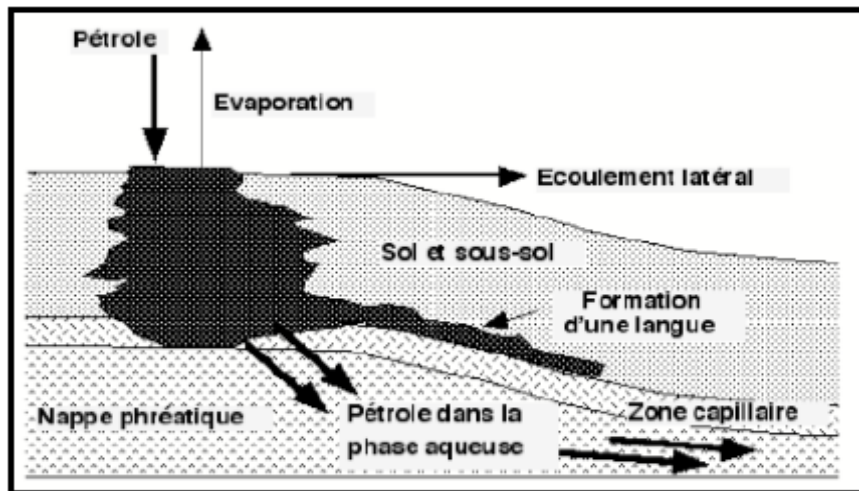
Les résines contiennent des structures aromatiques (polycondensées ou non) dont le nombre de cycles est supérieur à 6 **(Speight, 2004)**. Les asphaltènes sont définis selon leur solubilité, à savoir que c'est une classe d'hydrocarbures qui précipitent à la suite de l'addition, dans le pétrole brut, d'un excès de *n*-alcanes tels que le *n*-pentane ou le *n*-heptane et sont solubles dans les solvants aromatiques tels que le toluène ou le benzène.

Cette définition opérationnelle est utilisée en raison du fait que les asphaltènes contiennent entre 10<sup>5</sup> et 10<sup>6</sup> molécules de différentes formes et tailles, et que, par conséquent, il n'est pas possible de décrire simplement leur structure chimique. Les asphaltènes sont ainsi constitués de plusieurs centaines de composés qui ont des solubilités similaires, mais qui peuvent avoir des structures, tailles et formes différentes **(Tharanivasan, 2012)**.

### II.3. Devenir des hydrocarbures dans l'environnement

C'est par des processus physiques, chimiques et biologiques qu'un hydrocarbure va pouvoir être déplacé, transformé ou éliminé, après avoir été réparti dans l'environnement **(Soltani, 2004)**.

Parmi les propriétés intrinsèques, généralement considérés comme critiques dans l'évaluation du risque potentiel d'une substance, on peut citer la structure moléculaire, la solubilité dans l'eau et les solvants, la pression de vapeur, la taille des particules et le spectre d'adsorption (ultraviolet et visible), ainsi que les capacités d'adsorption sur les solides et l'effet éventuel d'agents dispersants. Parmi les différentes altérations que peut subir un hydrocarbure, on cite les facteurs environnementaux qui sont **(figure 4)** :



**Figure 4** : Représentation schématique du devenir d'une pollution pétrolière à la surface du sol. (Morgan et Watkinson, 1989).

### II.3.1 Evaporation

L'évaporation est un processus qui débute immédiatement après un déversement d'hydrocarbures et peut se poursuivre pendant quelques jours. Elle correspond au transfert des composés volatils plus légers, comme les aliphatiques, les BTEX et les HAP de faible masse moléculaire, vers l'atmosphère (Neff *et al*, 2000). Cette perte des composés volatils entraîne la modification de certaines propriétés physiques des hydrocarbures, telles que la densité et la viscosité. Les principaux facteurs qui influent sur le processus d'évaporation sont la volatilité des composés présents et les conditions atmosphériques, telles que la température du milieu, la présence de vent ou de soleil.

De façon générale, lors de déversements d'hydrocarbures pétroliers, l'évaporation est le processus qui induit la plus grande perte de masse pour les hydrocarbures légers. Ainsi, quelques jours après un déversement, les pétroles bruts légers peuvent perdre jusqu'à 75 % de leur volume initial et les bruts moyens, jusqu'à 40 %. En revanche, les hydrocarbures lourds ne perdent pas plus de 10 % de leur volume dans les premiers jours suivant un déversement (Fingas, 2013).

### II.3.2.Solubilisation

La solubilité est la capacité d'une substance à se dissoudre dans la colonne d'eau. Un hydrocarbure est d'autant plus soluble que sa masse moléculaire est faible et que sa polarité est élevée. La solubilisation des hydrocarbures permet d'accélérer les réactions de dégradation (photooxydation et biodégradation), par l'augmentation de l'interface eau-pétrole (Asia, 2012). Plus la proportion d'hydrocarbures légers sera importante, plus la solubilité du produit

pétrolier dans l'eau sera significative. C'est ce qui explique les différences de solubilité entre les différents hydrocarbures pétroliers présenté dans le **Tableau 3**.

Il est importants de noter, que ces hydrocarbures solubles sont parmi les plus dangereux pour l'environnement, ils sont difficiles à éliminer et sont adsorbés par la faune et la flore (**Rouidi, 2002**).

**Tableau 3** : Propriétés des principaux hydrocarbures pétroliers (**Fingas, 2013**)

Propriété	Unité	Essence	Diesel	Pétrole brut		Mazout intermédiaire	Mazout lourd n°6
				Léger	Lourd		
Viscosité	mPa.s <sup>-1</sup> (15 °C)	0,5	2,0	5 à 50	50 à 50 000	1 000 à 15 000	10 000 à 50 000
Point d'écoulement	°C	-	-35 à -10	-40 à 30	-40 à 30	-10 à 10	5 à 20
Densité	g/ml (15 °C)	0,72	0,84	0,78 à 0,88	0,88 à 1,00	0,94 à 0,99	0,96 à 1,04
Densité API	degré API	65	35	30 à 50	10 à 30	10 à 20	5 à 15
Solubilité dans l'eau	mg/l	200	40	10 à 50	5 à 30	10 à 30	1 à 5
Point d'éclair	°C	-35	45	-30 à 30	-30 à 60	80 à 100	> 100
Tension interfaciale	mN/m <sup>-1</sup> (15 °C)	27	27	10 à 30	15 à 30	25 à 30	25 à 35

### II.3.3.Emulsification

Deux types d'émulsions peuvent se former : eau dans l'huile appelée "mousse Chocolat" et huile dans l'eau. Les émulsions eau dans l'huile sont constituées par des hydrocarbures de haut poids moléculaires. Ces émulsions difficilement dégradables sont les précurseurs des résidus goudronneux retrouvés sur les plages, alors que les émulsions « huile dans l'eau » facilitent l'élimination des hydrocarbures (**Soltani, 2004**).

### II.3.4.Sédimentation

La sédimentation est le passage du pétrole de la surface vers le fond. Les gouttelettes d'hydrocarbures dispersées peuvent interagir naturellement avec les matières en suspension (MES) présentes dans la colonne d'eau, tels que les minéraux argileux ou la matière organique, pour former des agrégats hydrocarbures-MES (**Gong et al, 2014 ; Fitzpatrick et al, 2015**). La formation d'agrégats hydrocarbures-MES est due à des interactions de charges

électriques (ponts cationiques) entre les surfaces des particules et les composés polaires des hydrocarbures (**Bandara et al, 2011**). Notons que les hydrocarbures dissous peuvent également interagir avec les sédiments par agrégation directe pour former les agrégats hydrocarbures-MES ou par adsorption sur les sédiments (**Lee, 2002**). Ce phénomène est d'ailleurs capital en termes d'exportation de la surface vers le fond, notamment en eau océanique profonde (**Dachs et al, 2002**). La sédimentation conduit à la constitution d'agrégats de haute densité difficilement dégradables par voie naturelle.

### II.3.5.Photo-oxydation

La photo-oxydation, ou oxydation photochimique, est un processus d'altération des hydrocarbures qui est modulé par différents facteurs, notamment le spectre et l'intensité lumineuse du rayonnement solaire et la composition chimique des hydrocarbures déversés (**Prince et al, 2003**). Dans le cas des sols, ce phénomène n'a lieu que dans les premiers centimètres de la surface (**Park et al, 2001**). L'efficacité de ce phénomène dépend de la nature des hydrocarbures et de la présence de composés non hydrocarbonés (**Bertrand et Mille, 1989**). Ainsi, la photooxydation touche plus particulièrement les composés aromatiques qui sont plus photosensibles que les composés aliphatiques. Parmi ces derniers, les composés ramifiés sont plus facilement photo-oxydés que les n-alcanes (**Wilcke, 2000**).

### II.3.6.Biodégradation

La biodégradation est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement. Les microorganismes en sont responsables, en particulier les bactéries (**Vogel, 2001**). Les hydrocarbures sont alors utilisés par les microorganismes comme source de carbone pour produire de l'énergie.

La biodégradation microbienne complète des hydrocarbures produit du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), de l'eau ainsi que de petits alcanes et des hydrocarbures cycliques. Ces biodégradations peuvent survenir en conditions aérobies ou en conditions anaérobies, par utilisation des sulfures ou du méthane (**Caldwell et collab, 1998; Heider et collab, 1998; Spormann et Widdel, 2000**). Plus la structure moléculaire des hydrocarbures est complexe, plus le taux de biodégradation est faible. La biodégradation des hydrocarbures est influencée par plusieurs paramètres dont les principaux sont la texture du sol, ses caractéristiques biologiques, sa structure, la concentration et les caractéristiques physico-chimiques et la

concentration des polluants ainsi que les facteurs environnementaux (p. ex., concentrations d'oxygène et de nutriments, température, salinité et pression) (Kumar et Gopal, 2015)

### II.4. Biodétection de la pollution du sol par les hydrocarbures

Il paraît nécessaire de donner quelques définitions concernant la notion de bioindication qui, avec l'avancement des travaux de recherche, se diversifie et recouvre en réalité plusieurs concepts. Garrec et Van Haluwyn (2002) considèrent le terme de bio-indicateur comme « un simple relais ne faisant référence qu'à des effets observables au niveau de l'individu se traduisant par des altérations morphologiques, tissulaires ou physiologiques (croissance et reproduction) ». Les auteurs prennent ainsi la réaction au niveau individuel.

Lorsque la réaction se situe au niveau populationnel et/ou communautaire (disparition ou apparition d'espèces, variation densitaire), on utilisera le terme de bio-intégrateur. Un troisième concept relève également des processus biologiques mais se situe au niveau infra-individuel : altérations moléculaires, biochimiques, cellulaires ou physiologiques non visibles à l'œil. Il s'agit de la notion de bio-marqueur dont on peut donner la définition de **lagadic et al (1997)**: « Un bio-marqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant ». Plusieurs auteurs ont étudié les répartitions des dégradeurs des HAP dans l'environnement (**kaistner et al.1994 ; mahmood et rama rao, 1994 ; muller et al, 1997**). La plupart de ces études ont trait aux bactéries des sols.

### II.5. Traitement des sols pollués par les hydrocarbures

Les hydrocarbures sont connus pour représenter un risque certain pour la santé humaine et les écosystèmes, si leur concentration et leur mobilité sont trop importantes. Afin d'éviter la diffusion des HCP des sites contaminés vers les profondeurs des sols, des mesures doivent être prises en considération. Le choix d'une méthode particulière de dépollution va dépendre, au préalable, de certains paramètres comme le type de polluant et de la variabilité de son comportement (volatilité, adsorbabilité, polarité...), de la diversité des conditions locales (nature du sol, de la nappe, accessibilité, disponibilité de surfaces utilisables à proximité, zone urbaine ou non), de voir s'il s'agit d'une pollution récente ou ancienne, de son étendue ou non. En plus, les exigences économiques et administratives sont à prendre en compte. Tout ceci nécessite donc, au préalable, un diagnostic (**vogel, 2001**).

En fonction de ces différents aspects, trois catégories d'actions peuvent être menées :

- Les méthodes *ex situ* qui consistent en l'excavation des sols contaminés. On parlera de méthode "**hors site**" si le sol est évacué vers un centre de traitement spécialisé, ou de méthode "**sur site**" si le sol excavé est redéposé sur le site pour être traité.
- Les méthodes *in situ* pour lesquelles l'opération de dépollution s'effectue sans excavation du sol. Cette option est souvent choisie pour traiter des sites en activité ou lorsque la zone polluée est trop étendue pour avoir recours à l'excavation (**ballerini et vandecasteele, 1999**).

La dépollution peut être mise en œuvre en utilisant les procédés suivants :

### II.5.1. Traitements physiques

Actuellement, les traitements physiques constituent la majorité des techniques mises en œuvre. Elles consistent à séparer et concentrer les polluants, sans les modifier ou les détruire. Les procédés d'extraction, de lavage et de confinement sont les plus souvent utilisés (**Scriban, 1999**).

### II.5.2. Traitements thermiques

Dans les techniques basées sur un traitement thermique, la chaleur est utilisée pour modifier physiquement ou chimiquement les polluants (**Soltani, 2004**). Deux techniques *in situ* sont utilisées, l'incinération et la désorption, et sont employées pour la décontamination des sols pollués par les produits organiques. Ces technologies consistent à utiliser les hautes températures pour détruire les polluants en CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O et plus différents autres résidus de combustion (**Gabet, 2004**).

### II.5.3. Traitements chimiques

Les traitements chimiques ont pour but de détruire les polluants ou de les transformer en une forme moins nocive pour l'environnement ; et ceci par l'intermédiaire de réactions chimiques se produisant entre le polluant et le réactif ajouté. Ils peuvent être applicables *in situ* ou après excavation des sols. La majorité des procédés exigent que les sols soient sous forme de boues ou que les contaminants soient mobilisés dans un milieu liquide (**Masten et Davies, 1997**).

### II.5.4. Traitements biologiques

Les procédés biologiques permettent de dégrader les polluants par l'action de microorganismes (bactéries, champignons). Ils peuvent être utilisés seuls ou en complément d'une autre technique. La décontamination par voie biologique consiste donc à stimuler un phénomène naturel pour augmenter le rendement afin de détruire le polluant organique qui sera utilisé comme source de carbone. La décontamination se fait *in situ* en introduisant dans le site de traitement les éléments nécessaires au développement de la biomasse ou bien *ex situ* dans le cas le sol excavé traité (Colin, 2000). Les procédés de traitements biologiques sont : le bioventing, le biosparging, le pompage et traitement, le traitement bioréacteur (bioslurry) et Traitement en tas (bioterre et landfarming) représentés dans représentés dans le **tableau 4**.

## CHAPITRE II : LES HYDROCARBURES PETROLIERS

**Tableau 4 :** Différentes techniques de traitement biologique des sols pollués (Scriban, 1999).

Type de traitement		Principe du Traitement	Type de pollution	Avantages et Inconvénients
Traitement in-situ.	" Bioventing "	Aération de la zone insaturée (au dessus du niveau de la nappe phréatique)	Composés organiques semi-volatils (gazole)	- procédé lent. - rendement limité. - utilisé sur les hydrocarbures aliphatiques. - plus limité pour les hydrocarbures polycycliques et chlorés.
	"Biosparging "	Injection d'air dans la nappe phréatique (au niveau de la zone saturée)	Composés volatils tel que solvants chlorés et hydrocarbures pétroliers volatils (essences, kérosène)	Le rendement du procédé peut eut atteindre 99%.
	Pompage et traitement	Traitement des pollutions des zones saturées ou insaturées du sol. L'eau pompée est traitée à la surface et enrichie en nutriments minéraux, oxygène et parfois en microflore adaptée au polluant, avant d'être réinjectée dans les poches contaminées du sol.	Composés organiques.	Procédé lent.
Traitement ex-situ	Traitement en tas	"Land-farming"	Hydrocarbures (fuel)	- durée importante. - coût peu élevé. - nécessité de l'espace
		Terre biologique (bioterre)	Hydrocarbures (fuel, solvants Chlorés, kérosène)	- coût modéré. Nécessité de l'espace.
	Bioslurry (traitement en bioréacteur)	Traitement du sol pollué dans un ou plusieurs réacteurs sous forme de boue avec ajout d'ingrédients nécessaires à la biodégradation ; Contrôle des paramètres physicochimiques tel que le pH.	Composés organiques hydrocarbonés semi- ou non volatils (gasoil, fuel, HAP)	- bon rendement. - contrôle précis des paramètres physicochimiques.

# Chapitre III

*Biodégradation  
des  
hydrocarbures*

### III. Biodégradation des hydrocarbures

#### III.1. introduction sur la biodégradation

Biodégradation est l'ensemble des mécanismes de transformation d'un contaminant en différents sous produit par l'action des microorganismes. Ce phénomène peut s'effectuer à n'importe quel milieu (sol, eau) ainsi que dans différentes phase du polluant (liquide, solide, gazeuse) (**Iecomte, 1995**).

La biodégradation est l'un des mécanismes majeurs d'atténuation naturelle puisqu'elle permet la perte en masse des contaminants de façon significative en conditions favorables. C'est pourquoi la compréhension du phénomène de biodégradation, qui amènera à l'identification des vitesses de dégradation, est importante dans l'étude du potentiel d'atténuation naturelle. Néanmoins, ce phénomène met en jeu de nombreux mécanismes et est dépendant d'un grand nombre de paramètres, ce qui rend difficile la compréhension totale du processus et la quantification de sa contribution à l'atténuation naturelle

Des micro-organismes sont naturellement présents dans les sols et les eaux souterraines. Pendant la biodégradation, ils vont transformer les nutriments disponibles en composés utiles pour la production d'énergie et la croissance cellulaire, en facilitant le transfert d'électrons entre les donneurs et les accepteurs. En résultera une oxydation du donneur d'électrons (en général la matière organique et les hydrocarbures) et une réduction de l'accepteur d'électrons (composés oxydés tels que l'oxygène, les nitrates, les sulfates.....)

#### III.2. Types de biodégradation

##### III.2.1. Biodégradation aérobie

Selon **Zhenpeng et al, (2002)**, La biodégradation aérobie d'une substance organique est le degré de modification physique et chimique que subit cette matière organique par les microorganismes. La figure 1 illustre les processus de biodégradation d'une substance organique en condition aérobie. Celle-ci peut être affectée par la modification de l'un des facteurs suivants :

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

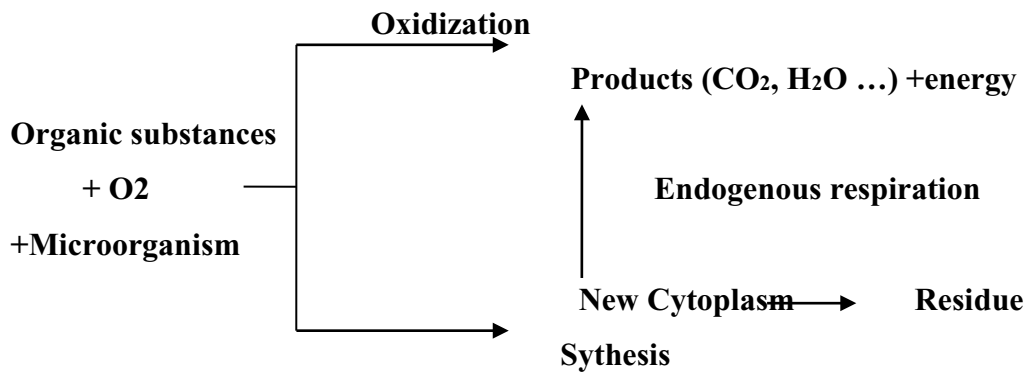


Figure 5 : Dégradation aérobie de la matière organique (Zhanpeng et al, 2002).

### II.2.2. Biodégradation anaérobie

Les hydrocarbures sont maintenant reconnus comme une source potentielle de carbone et d'énergie permettant le développement de microorganismes en conditions anaérobie. La dégradation des hydrocarbures par les microorganismes dans des conditions aérobie est bien connue depuis plus d'un siècle, alors que l'utilisation de ces composés dans des conditions anoxiques (sédiments profonds et réservoirs de pétrole) n'a été étudiée que durant la dernière décennie. En effet, il est largement admis que pour les bactéries dégradant les hydrocarbures en aérobie, la présence d'oxygène moléculaire est indispensable pour l'activation enzymatique initiale des hydrocarbures (Britton, 1984; Gibson et Subramanian, 1984).

La biodégradation anaérobie d'une substance organique est le degré de modification physique et chimique que subit cette matière organique par les microorganismes en conditions d'anaérobie (figure 6). (Hongwei et al, 2003).

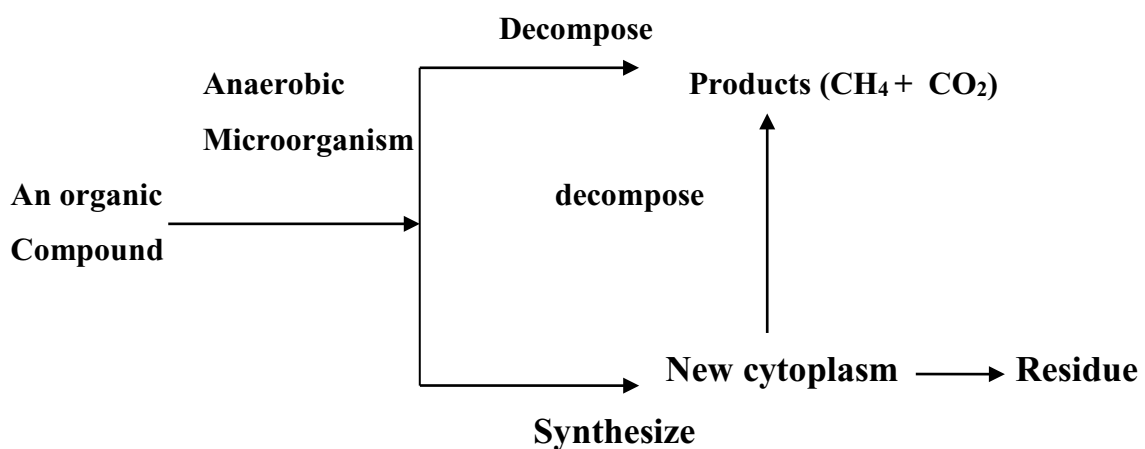


Figure 6: dégradation anaérobie de la matière organique (Hongwei et al, 2003).

### III.3. Microorganismes dépolluants le sol

Le sol est composé de matière minérale provenant de l'érosion des roches et de matière organiques (l'humus) provenant de la décomposition partielle des végétaux **(Dovet, 1996)**. Les microorganismes sont des êtres vivants microscopiques généralement unicellulaires qui prolifèrent naturellement dans tous les milieux et dans des conditions très variables **(Bousseboua, 2002)**.

Le sol comprend des bactéries, des champignons, des protozoaires, des algues et des virus **(Soltani, 2004)**.

### III.4. Facteurs influençant la biodégradation des hydrocarbures

Les travaux de recherche sur l'oxydation des hydrocarbures par les microorganismes ont montré que ce processus dépend de la structure des hydrocarbures et des conditions environnementales **(Leahy et colwelli, 1990)**. Les facteurs physico-chimiques influant sur la vitesse de biodégradation microbienne sont :

#### II.4.1. Structure et nature du sol

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

La taille des pores et les propriétés de l'eau et la de l'air dans ces pores sont des facteurs spécifiques de chaque sol **(Girard et al, 2005)**. Les particules élémentaires du sol sont généralement liées entre elles par les forces électrostatiques formant des agrégats plus au moins volumineuses groupés en unités structurales du sol. En effet, les agrégats tendent à diminuer l'activité microbienne dans le sol de manière indirecte. Par un ralentissement de la diffusion de l'oxygène et l'apport des nutriments à l'intérieur de l'unité structurale et par la protection mécanique des substrats qu'elle renferme **(Girard et al, 2005)**

#### III.4.2. Composition chimique des hydrocarbures

Les hydrocarbures pétroliers diffèrent par leur susceptibilité aux attaques microbiennes. Ainsi, la vitesse de biodégradation est plus élevée pour les hydrocarbures saturés, viennent ensuite les aromatiques légères, les aromatiques à haut poids moléculaire et les composés polaires ayant la vitesse de dégradation la plus faible **(Soltani, 2004)**.

La biodégradabilité des pétroles bruts est très fortement dépendante de leur composition, à une température déterminée. Un pétrole léger est plus susceptible d'être biodégradé qu'un pétrole

lourd (**Soltani, 2004**). En général, ils sont classés selon leur sensibilité aux attaques microbiennes de la manière suivante : n-alcanes > Alcanes ramifiés > aromatiques à faible poids moléculaire > alcanes cycliques > aromatiques à haut poids moléculaire > stéranes-hopanes (**Van Hamme et al, 2003**).

### III.4.3.Humidité

L'humidité est un paramètre important dans les processus de dégradation des composés organiques simples ou complexes. Il est connu que les faibles humidités inférieures à 2% limitent la vitesse de biodégradation (**Davis et Madsen, 1996**).

Inversement, des teneurs trop élevées vont influencer sur la perméabilité des sols aux gaz et générer des conditions de limitations de transfert d'oxygène et donc de limitation de métabolisme microbien aérobie (**Ballerini, 1999**). Les bactéries sont influencées par la concentration osmotique et la disponibilité en eau dans le sol, pour cela, **Gabet (2004)** a signalé que pour une meilleure activité de biodégradation, l'humidité doit être de 25 à 90%.

### III.4.4.Température

La température est un paramètre pouvant influencer la biodégradation du pétrole en modifiant son état physique, sa composition chimique, l'activité physiologique des microorganismes et par conséquent la vitesse de dégradation des hydrocarbures, ainsi que la nature et la concentration des espèces microbiennes présentes (**leahy et colwell, 1990**). Une diminution de la température est généralement accompagnée par une diminution de la vitesse de biodégradation qui peut être expliquée par une décroissance de l'activité enzymatique. Des températures plus élevées ont pour effet d'augmenter la vitesse de biodégradation (**sikkema et al, 1995**).

Le maximum de l'activité métabolique des microorganismes est généralement observé à une température comprise entre 30 et 40 °C. Au-delà de la température optimale de croissance et de biodégradation on assiste à une augmentation de la toxicité des hydrocarbures et une diminution de l'activité métabolique. **roling et al (2004)** mentionnent une inhibition totale de la biodégradation au-delà de 80-90 °C après l'isolement des bactéries thermophiles.

### III.4.5. Salinité

Les fortes salinités constituent une barrière naturelle pour la biodégradation des hydrocarbures. Des chercheurs ont trouvé que la biodégradation des hydrocarbures est maximale pour une concentration en sel de 0,4 M et diminue lentement pour des valeurs supérieures et inférieures à celle-ci (**Soltani, 2004**).

**Thiele –Bruhn et Brummer, (2004)** ont montré que la vitesse de la biodégradation des hydrocarbures décroît lorsque la salinité passe de 3,3 à 28,4%, et ils ont attribué ces résultats à une réduction générale des vitesses métaboliques des microorganismes.

### III.4.6. Potentiel d'hydrogène (pH)

Les biotopes naturels peuvent avoir des valeurs de pH très variables, allant 2,5 à 11,0. Des valeurs extrêmes de pH pourraient avoir une influence négative sur la capacité des microorganismes à dégrader les hydrocarbures. La croissance des bactéries hétérotrophes et des champignons étant favorisées par un pH proche de la neutralité (**Leahy et Colwell, 1990**).

**Liebeg et Cutrigh, 1999 et Straube et al, (2003)** ont trouvé que la dégradation des hydrocarbures est plus élevée dans des conditions légèrement basiques.

### III.4.7. Taux d'oxygène

L'étape initiale du catabolisme des hydrocarbures par bactéries et les champignons inclut l'oxydation de ces substrats par l'intermédiaire d'hydroxylases et dioxygénases, pour lesquelles l'oxygène moléculaire est indispensable. Les conditions aérobies sont, nécessaires pour cette voie d'oxydation microbienne des hydrocarbures dans l'environnement (**Leahy et Colwell, 1990**).

La concentration en oxygène a été identifiée comme une variable limitant de la vitesse de la biodégradation du pétrole dans les sols, **Marin et al, (2001)**, ont constaté une augmentation de la dégradation des hydrocarbures totaux de 10% par la bactérie *Acinetobacter calcoaceticus*. Après un apport supplémentaire d'oxygène par agitation. Théoriquement, 3,5g d'oxygène sont nécessaires pour l'oxydation complète de 1g de pétrole (**Soltani, 2004**).

### III.4.8. Contenu en nutriments

Le rejet des hydrocarbures dans les environnements qui contiennent des éléments nutritifs inorganiques en faibles concentration. Conduit généralement à des rapports carbone/azote et carbone/phosphore très élevés, défavorables pour la croissance microbienne (**leahy et colwell, 1990**).

Le pétrole lui-même contient de tels nutriments en petites quantités, mais ils sont toujours présents sous forme de composés hétérocycliques (exemple : dérivés de la pyridine et du pyrrole pour l'azote) ou organométalliques complexes ; ils ne sont donc pas utilisables par les microorganismes. L'azote et le phosphore sont donc des facteurs limitant la biodégradation des hydrocarbures dans les sols (**Bertrand et Mille, 1989**).

### III.5. Biodégradation par type d'hydrocarbure

En aérobiose, de nombreuses bactéries ont développé des stratégies enzymatiques qui leur permettent d'incorporer un ou deux atomes d'oxygène à la molécule cible. Cette réaction d'oxydation rend l'hydrocarbure plus hydrophile et par conséquent plus facilement dégradé par le métabolisme bactérien. Les réactions impliquées dans ces processus font le plus souvent appel à l'action d'oxygénases (mono- ou dioxygénase). L'acquisition par les organismes des gènes de dégradation des hydrocarbures se fait le plus souvent par transfert horizontal via des plasmides, des transposons (**Phale et al, 2007**).

#### III.5.1. Biodégradation des hydrocarbures saturés

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

Les alcanes à chaîne moyenne (C5-C10) sont utilisés notamment par des espèces de bactéries du genre *Pseudomonas* comme *P.aeruginosa*, *P. putida* et *P. oleovorans* qui ont été particulièrement étudiées (**Kaistner et al.1994 ; Vandecasteele, 2005**). Les alcanes à chaîne

longue (C10-C20) sont très bien utilisés par les microorganismes, plus rapidement que les alcanes moyens. Les bactéries remplissant ce rôle appartiennent en particulier aux groupes des *Corynebacterium*, *Mycobacterium* et *Nocardia* (CMN); notamment au genre *Rhodococcus*, c'est le cas de la souche *Rhodococcus* Q15 capable d'utiliser une large gamme des alcanes (C10 à C21) et à des températures allant de 0 °C à 30°C, (**Whyte et al, 1998**). De plus, les alcanes à très longue chaîne (>C20) sont également dégradés par les microorganismes, mais l'utilisation de ces substrats solides à température ambiante a été moins étudiée (**Ballerini et Vandecasteele, 1999**).

Le catabolisme des n-alcanes commence par l'hydroxylation du carbone situé à une extrémité de la chaîne (oxydation terminale) correspondant au bilan réactionnel d'une monooxygénase (**Truffaut et al, 2001; Morgan et al, 1994**), selon la réaction suivante:



Le système enzymatique impliqué est bien connu chez la souche *Pseudomonas oleovorans*, modèle de référence pour la dégradation des alcanes. Ce système comprend trois composantes: Une hydroxylase membranaire (gène alkB) qui catalyse l'oxydation de la molécule, ainsi qu'une rubridoxine-Fe<sup>2+</sup> couplée à une rubrédoxine réductase qui assurent le transport d'électrons (**Vandecasteele, 2005**). En ce qui concerne les alcènes, le cas des doubles liaisons terminales a été étudié. Ces alcènes sont biodégradables et leur métabolisme est proche de celui des alcanes. Plusieurs modes d'attaques ont été mis en évidence, mais l'oxydation du groupement méthyle terminal est considérée comme le mécanisme majeur (**Ballerini et Vandecasteele, 1999**).

### III.5.2. Biodégradation des hydrocarbures aromatiques

En aérobiose, la plupart des voies cataboliques des hydrocarbures aromatiques convergent vers des intermédiaires hydroxylés tels que les catéchols ou leurs dérivés (protocatéchuate, gentisate). Les enzymes qui catalysent ces transformations sont des monooxygénases et des dioxygénases. D'autres dioxygénases vont agir ensuite pour réaliser l'ouverture du cycle aromatique de ces intermédiaires selon un clivage en position ortho ou méta. Ainsi, les dioxygénase impliquées dans le catabolisme des hydrocarbures aromatiques par des microorganismes du sol illustrent bien leur nature et leur capacité à s'adapter à différentes sources de carbone (**Mesarch et al, 2000; Truffaut et al, 2001; Sakamoto et al, 2001**). La dégradation des hydrocarbures monoaromatiques est essentiellement le fait de

bactéries Gram négatives, telles que les espèces de *Pseudomonas* (*P.putida* 01G3, *P.putida* PaW1, *P.pseudoalcaligenes* KF707, *P.putida* F1, *P.mendocina* KR1, *Burkholderia cepacia* G4, *Ralstonia pickettii* PKO1), mais également Gram positives du groupe des *Corynebacterium*, *Mycobacterium* et *Nocardia* (CMN) (Hanson et al., 1999 ; Ballerini et Vandecasteele, 1999 ; Parales et al., 2000 ; Chablain et al., 2001 ; Suenaga et al., 2001).

# Chapitre IV

*Pseudomons*

### *IV. Les Pseudomonas*

#### **IV.1. Définition**

Les *Pseudomonas* est un genre appartenant au groupe des *gammas proteobacteria*, ils forment un large groupe colonisant le sol, les plantes et l'eau. Ces bactéries Gram négatives, non sporulantes, sont aérobies obligatoires, à l'exception de certaines souches pouvant utiliser le NO<sub>3</sub> comme accepteur final d'électrons. Leur mobilité est assurée par plusieurs flagelles polaires, et elles ont un métabolisme mésophile et chimioorganotrophe, la plupart étant saprophytes (**Bossis et al, 2000**). Quelques espèces comme *P. syringae*, sont phytopathogènes et certaines peuvent causer des infections chez l'être humain, particulièrement *P. aeruginosa*, reconnu comme pathogène opportuniste et causant des infections pulmonaires mortelles chez les patients atteints de fibrose kystique (**Mavrodi et al, 2001**). Plusieurs études ont souligné le degré de diversité au sein de *P. fluorescens*, ce qui a mené à la subdivision de cette espèce en différents biovars (**Bossis et al, 2000**).

Les différentes espèces de *Pseudomonas* qui colonisent la rhizosphère possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique. Premièrement, leur capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population est remarquable (**Haas et Keel, 2003**).

Cette grande rhizo-compétence vient sans doute de leur taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres rhizobactéries et de leur capacité à métaboliser efficacement plusieurs composés des exsudats racinaires (**Chin-A-Woeng et al, 2003**). De plus, ces bactéries sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire et se prêtent aisément aux manipulations génétiques (**Fenton et al, 1992 ; Chin-A-Woeng et al, 2001**).

#### **IV.2. Classification de genre pseudomonas**

##### **IV.2.1. La classification phénotypique**

Des décennies durant, les bactéries ont été caractérisées, regroupées ou identifiées sur la base de caractères phénotypiques : morphologie, pigmentation, réaction vis-à-vis de certains colorants, formation de spores, production d'acide par la dégradation de sucres ou résistance à certains inhibiteurs (**Bossis et al, 2000**). Ces méthodes simplifiées de caractérisation demeurent encore la base des systèmes d'identification et de classification des espèces du *Pseudomonas*.

Les études de **Jensen (1965)**, qui a classé une grande collection de *Pseudomonas* fluorescents en 82 biotypes, et ceux de **Lelliot et al. (1966)**, **Stanier et al. (1966)** ont contribué dans l'amélioration de la classification de ce groupe et sa subdivision en espèces et biotypes. La classification du genre *Pseudomonas* sur des bases phénotypiques a été reprise même dans l'édition du **Bergey's manual of determinative bacteriology (1974)** avec l'introduction du G+C comme caractère génétique.

**Bossis et al. (2000)** ont proposé une clé dichotomique pour l'identification des *Pseudomonas* fluorescents en se basant sur des caractères phénotypiques tels que la fluorescence, l'oxydase, la capacité de réduire la gélatine, le tréhalose et bien d'autres caractères. Cette clé dichotomique permet de discriminer entre les deux principaux groupes de ces *Pseudomonas* à savoir *P. fluorescens* et *P. putida*.

La découverte plus tard du caractère de renaturation de l'ADN a permis de confirmer la classification phénotypique des *Pseudomonas*, par les essais d'hybridation ADN/ADN ce qui a permis à **Palleroni et al. (1973)** de classer le groupe en cinq sous classes d'ARNr. Néanmoins l'éloignement phénotypique des différents groupes d'ARNr a conduit **Peix et al. (2009)** à établir que seules les espèces du groupe ARN appartiennent au genre *Pseudomonas*.

### IV.2.2. La classification phéno-génétique

Les premiers changements majeurs dans la taxonomie de *Pseudomonas* furent apportés par **Woese et al. (1984)** qui ont proposé une nouvelle classification de ces espèces sur la base de leurs ARN ribosomiaux. Toutefois ce nouveau schéma d'identification n'a pas été pris en considération dans l'édition 1994 du **Bergeys Manual**. Plus tard **Kerstens et al. (1996)** ont repris les propositions de **Woese et al. (1984)** dans leurs rapports pour classer les proteobactéries sur la base de l'ARNr 16s en 15 genres. A partir de 1990, le séquençage de l'ARNr 16s est appliqué pour l'ensemble des bactéries nouvellement isolées. Partiel au début pour être ensuite appliqué sur l'ensemble du génome. Le séquençage du gène codant l'ARNr 16S et le développement des modèles mathématiques des arbres représentant les similitudes des séquences ont permis une classification phylogénétique des procaryotes (**Peix et al., 2009**).

Les résultats des études de similarité d'ARNr chez le genre *Pseudomonas* ont été très frappantes, car ils ont clairement indiqué que le genre était en fait une entité multi-génériques qui pourrait être divisée en au moins cinq groupes lointainement apparentés et qui méritent d'être classés en genre indépendants (et éventuellement en famille ou ordre) (**Palleroni et al. (1973)**).

En analysant les séquences du gène codant pour l'ARNr de 128 espèces de *Pseudomonas* **Peix et al. (2009)** ont conclu que 57 seulement appartenaient au groupe des *Pseudomonas sensu stricto*; la comparaison de 1073 nucléotides les a subdivisées en 7 classes (Mezaache, 20112):

- Le groupe des *P. syringae*.
- Le groupe des *P. chlororaphis*.
- Le groupe des *P. fluorescens*.
- Le groupe des *P. putida*.
- Le groupe des *P. stutzeri*.
- Le groupe des *P. aeruginosa*.
- le groupe des *P. pertucinogena*.

### IV.2.3. La classification chimio-taxonomique

Les études taxonomiques polyphasiques et l'analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S ont largement contribué à la stabilisation de la taxonomie de *Pseudomonas*. Toutefois, la valeur de la chimio-taxonomie pour aider à délimiter les taxons est encore largement négligée.

Plusieurs paramètres chimiques et biochimiques ont été utilisés pour la différenciation entre les espèces de *Pseudomonas*. C'est ainsi que **Janse et al. (1992)**, avaient analysé les acides gras d'une collection de phytopathogènes opportunistes, pour clarifier la position taxonomique de souches de *P. marginalis* incluses dans le groupe de *P. fluorescens*. De même que **Meyer et al. (2002)** ont utilisé le siderotypage des *Pseudomonas* fluorescents et non fluorescents ce qui a conduit à la mise en évidence de pyoverdines spécifiques aux espèces. Actuellement, les techniques les plus modernes d'analyse des biomolécules sont appliquées pour la taxonomie des *Pseudomonas*. En effet, l'empreinte génétique par spectroscopie à fluorescence (spectres d'émission de fluorophores intrinsèques: NADH, tryptophane et un complexe d'acides aminés aromatiques et d'acides nucléiques), a permis une discrimination entre les genres *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Xanthomonas* ou *Stenotrophomonas* avec une grande sensibilité. Mais aussi, entre les espèces de *P. chlororaphis*, *P. lundensis*, *P. fragi*, *P. taetrolens* et *P. stutzeri* groupé séparément de *P. putida*, *P. pseudoalcaligenes* et *P. fluorescens* (**Mezaache, 2012**).

### IV.3. Taxonomie des *Pseudomonas* : Historique et outils d'identification

Le genre *Pseudomonas* a été décrit par **Migula (1894)**. Ses membres sont très répandus dans les habitats naturels tels que le sol, les plantes, les animaux et l'eau (**Palleroni, 1984**). Les études nutritionnelles de **Stanier et al. (1966)** ont montré que la capacité des souches de *Pseudomonas* pour utiliser différents composés comme seule source de carbone et de l'énergie fournit l'essentiel pour la caractérisation phénotypique du genre. Les groupes d'espèces diffèrent considérablement dans leur exigence nutritionnelle.

La classification du genre *Pseudomonas* a servi de référentiel pour des bâtonnets droits, strictement aérobies, de couleur crème, Gram-négatifs et souvent mobiles par un ou plusieurs flagelles polaires. Cette classification a subi de multiples réévaluations sur la base des caractéristiques physiologiques, moléculaires et phénotypiques (**Sneath et al, 1981**), hybridation de l'ADN (**Palleroni, 1984**), similarité dans la séquence du gène de l'ARNr 16S (**Anzai et al, 2000**) et données chimio-taxonomiques (**Oyaizu et Komagata, 1983**; **Vancanneyt et al, 1996**).

### IV.4. Habitat des *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* ont souvent une versatilité nutritionnelle très large, ce qui leur permet de vivre dans des niches écologiques naturelles très diverses. A cause de la richesse de leurs voies métaboliques, elles sont souvent capables de résister à de nombreuses conditions environnementales ce qui favorise la sélection de certaines espèces dans certains milieux particuliers.

Dans le sol, les *Pseudomonas* représentent une grande fraction de la communauté microbienne partageant leur milieu avec des commensaux représentant principalement les genres *Bacillus* et *Actinomyces*. On les retrouve particulièrement sur les systèmes racinaires des plantes, *P. brassicacearum* et *P. thivervalensis* ont été isolés respectivement de plants d'ail et de riz (**Achouak et al, 2000**). *P. rhizosphaerae*, *P. lutea* et *P. argentinensis* isolé de la rhizosphère de l'herbe (**Peix et al, 2005**), d'autres ont été isolées à partir de la phyllosphère des plantes le cas de *P. lurida* de la phyllosphère de l'herbe (**Behrendt et al, 2007**) alors que d'autres peuvent même coloniser les tissus internes des plantes (**Ramesh et Joshi, 2009**).

Les bactéries de cette famille sont relativement rares au contact de l'homme ; on les retrouve très rarement sur la peau ou les muqueuses, et plus souvent dans la flore intestinale.

Elles vivent principalement dans l'eau douce et dans le sol (souches dulçaquicoles). Des souches marines existent aussi, certaines halophiles stricts et d'autres halophiles facultatives, qui appartiennent à diverses espèces dulçaquicoles, en particulier du groupe fluorescent (**Le Minor et Véron, 1989**).

Elles peuvent aussi grâce au caractère psychotrope de nombreuses souches, détériorer des denrées alimentaires, des médicaments ou des réactifs biologiques conservés au froid (**Le Minor et Véron, 1989**).

***Partie II :***  
***Expérimental***

materiel et methode

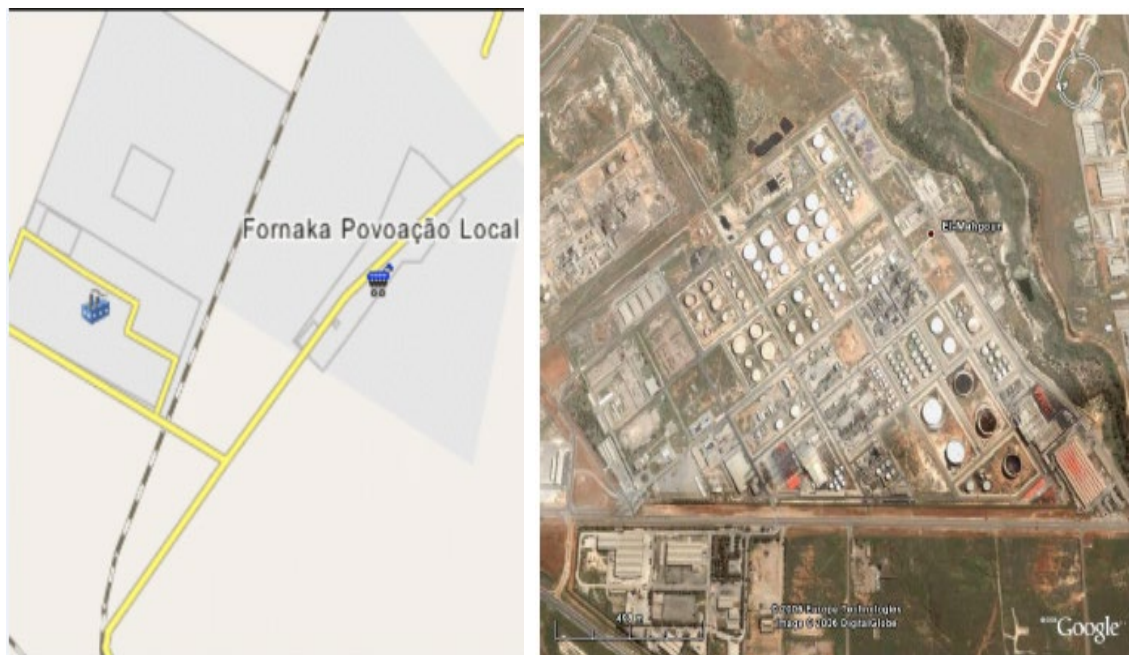
## I : Matériel et Méthode

### I.1. Echantillonnage :

Les échantillons de sol contaminé par les hydrocarbures, à partir de la zone industrielle de FORNAKA, affiliée à d'Arzew : compagnie pétrolière, selon des distances et profondeurs bien déterminées.

Les prélèvements ont été réalisés à l'aide d'une spatule stérile à une profondeur de 10 et 20 cm. Déposer les échantillons dans des flacons stériles et conservés à 4°C à l'obscurité.

A partir de ce échantillon nous avons isolé et identifier des bactéries qui ont un potentiel de biodégradation, nous avons étudié leur implication dans la biodégradation des hydrocarbures.



**Figure 7** : Localisation des régions de prélèvement d'échantillons.

### I.2. Milieux de culture :

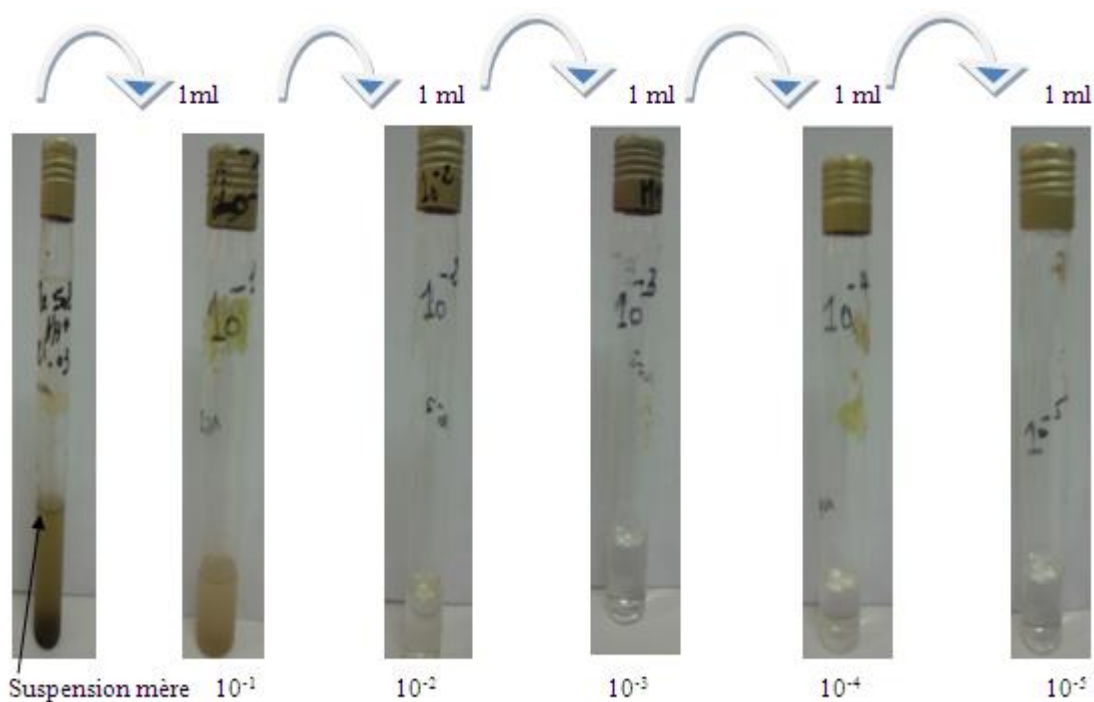
- ❖ **Le milieu de Gélose Nutritive (GN)** : a été utilisé pour l'isolement et la purification des Microorganismes.
- ❖ **Le milieu de Bouillon Nutritif (BN).**

- ❖ **Les milieux King A et King B (voir annexe 1)** permettent la différenciation entre les espèces de *Pseudomonas* par la mise en évidence de leurs pigments spécifiques. La production de pigments est favorisée par la composition du milieu (**Marchal et Bourdon, 1982**).
- ❖ **Le milieu King A** favorise la production de pyocyanine, pigment permet l'identification de *Pseudomonas aeruginosa*. Les cultures typiques sont colorées en bleu-vert.
- ❖ **Le milieu King B** favorise la synthèse de la pyoverdine, pigment vert fluorescent produit par *Pseudomonas aeruginosa* et d'autres *Pseudomonas* (*P.fluorescens*, *P.putida*).
- ❖ **Le milieu MSM (Minéral Salt Medium)** a été utilisé pour tester la capacité de dégradation des hydrocarbures. Le pH du milieu MSM a été ajusté à 7.2
- ❖ **Le milieu de Clark et Lubs** : Ce milieu permet d'étudier une voie de fermentation du glucose: la voie du butane diol.
- ❖ **Milieu de citrate de Simmons** : Ce milieu permet l'étude de l'utilisation, par la bactérie, du citrate (acide organique) comme seule source de carbone.
- ❖ **Milieu de Gélose à d'Amidon** : le but de gélose de recherche l'hydrolyse de l'amidon par l'amylase, afin de voir si la bactérie est capable ou non de dégrader l'amidon. L'hydrolyse de l'amidon permet de différencier les espèces des genres *Pseudomonas*, *Bacillus*.
- ❖ **Milieu de nitrate réductase** : Ce milieu utilisé pour rechercher la production d'une enzyme la nitrate- réductase. Cette étude va donc consister à mettre en évidence la mobilité nitrite ou la disparition des nitrates initiaux.
- ❖ **Milieu de viande foie (Gélose VF)**: Ce milieu utilisé pour la recherche de mode respiratoire des bactéries, ainsi que pour l'isolement en profondeur des anaérobies.

## II : Méthode

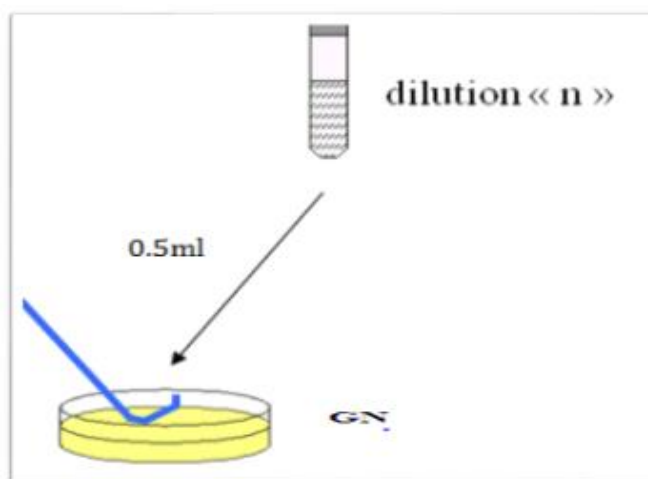
### II.1. Isolement

1g de sol a été prélevé renfermant les sols pollués par les hydrocarbures dans un tube contenant 9 ml de Bouillon Nutritif (enrichissement), Puis versé dans des tubes contenant 9 ml d'eau physiologique stérile et agitée pendant quelque minute au vortex pour assurer l'homogénéisation. Une série de dilutions a été faite à partir de la solution mère allant de  $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-5}$ .



**Figure 8 :** Schématisation de la méthode de dilution de l'échantillon du sol dans L'eau physiologique stérile.

- Un volume de 0.5 ml de chaque dilution a été étalé avec un étaloir stérile sur la surface Des boites Pétri contenant le milieu Gélose Nutritive (GN) (**figure9**)



**Figure 9 :** Etallement de 0.5ml de chaque dilution sur le milieu de culture.

-Les boîtesensemencées ont été incubées à 37°C pendant 24heurs.

## II.2.Dénombrement

Le dénombrement a été effectué sur des boîtes de pétri présentant des colonies bactériennes après 24 heure d'incubation à 37 °C.

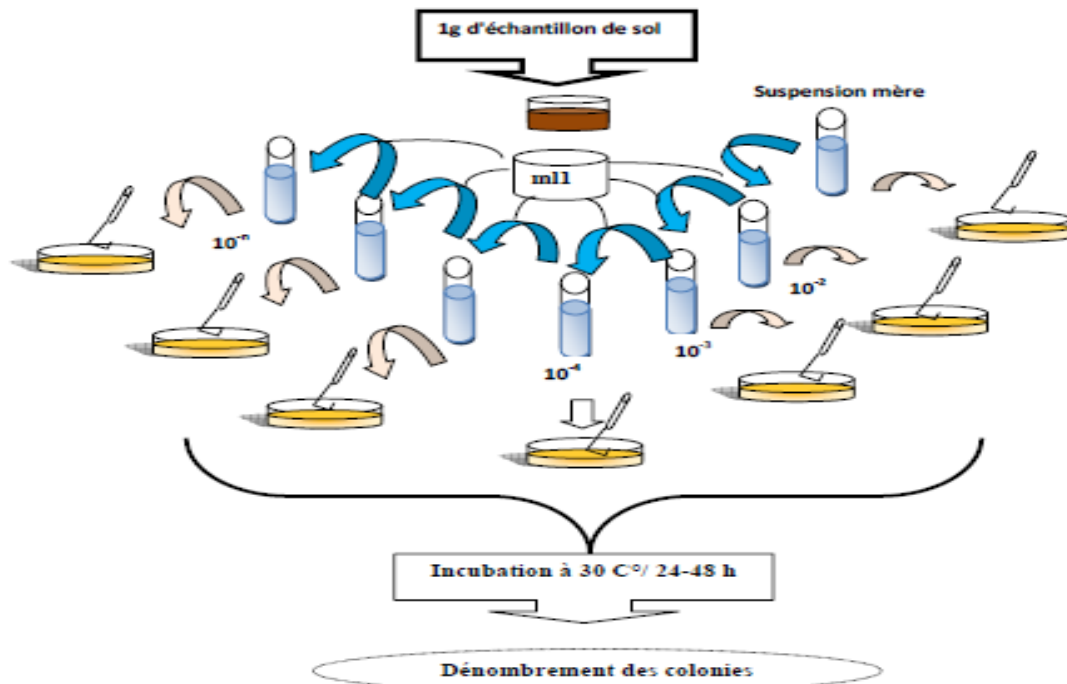


Figure 10 : Schéma d'isolement et dénombrement des bactéries telluriques.

## II.3. Purification des souches bactériennes

Après 24 h d'incubation, nous passons à l'étape de purification des cultures. Celle-ci nous permet d'obtenir des cultures pures à partir des différentes colonies isolées. La sélection des colonies est basée sur l'aspect macroscopique des colonies à savoir la couleur, la forme, le diamètre, l'opacité. Un échantillon de chaque type de colonie est prélevé et ensuite purifié par repiquages successifs et alternés en milieu solide jusqu'à l'obtention au sein d'une boîte de Pétri de colonies identiques par l'aspect et la couleur.

## II.4. Conservation des souches

A partir d'une boîte de pétri qui contient des colonies bien purifiées, prélever une colonie bien isolée.

- ensemercer dans un milieu BN, incuber a 37 °C /24 avec agitation.
- centrifuger à 6000 rpm pendant 10 min dans des tubes Eppendorf (1ml de la suspension bactérienne)
- éliminer le surnageant et garder le culot.
- ajouter 0.8ml BN stérile et 0.2 solution glycérol stérile à l'Eppendorf qui contient le culot.
- vortexer et conserver a -20 °C (congélation).

### II.5. Identification

L'identification est basée sur la détermination des caractères morphologiques et biochimiques (**Lamouliatte *et al*, 1992**).

Sur chacun des boites servant aux dénombrements, nous classons les colonies en catégories selon leur aspect macroscopique. Dans chaque catégorie, nous choisissons aléatoirement une colonie supposée représentative parmi celles, observées pour réaliser les premiers tests d'orientation.

Chaque colonie suspectée est purifiée trois fois par isolement sur le milieu King A, King B et gélosé nutritive. Pour une identification préliminaire de ces bactéries, nous sommes basés sur :

#### II.5.1.Etude morphologique

**II.5.1.1.L'aspect macroscopique** : permet de faire une caractérisation primaire et on observe :

- La forme des colonies (rondes, irrégulières.....).
- La taille des colonies.
- La chromogènes (couleur des colonies).
- L'opacité (opaque, transparente, translucide).
- La surface (lisse, rugueuse, sèche...).
- L'élévation (concave, convexe, plante).

#### II .5.1.2.Aspect microscopique :

L'observation microscopique consiste à observer les cellules bactériennes (grossissement ×100), de connaître leur monde d'association et aussi leur mobilité

### II .5.1.2.1. Coloration simple

La coloration simple nous a permis de connaître la forme des bactéries ,leur aspect et leur taille, nous a aussi permis d'observer leur morphologie sous microscope optique avant de faire les test biochimiques et de prendre nos photos.

### II .5.1.2.2. Coloration de gram

C'est une double coloration qui nous permet de connaître la forme, l'arrangement, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées.

Cette coloration permet de classer les bactéries selon leur capacité à fixer le cristal violet. Celles qui possèdent une couche de peptidoglycane mince sont décolorées lors du lavage à l'éthanol (Gram -), alors que celles qui possèdent une couche de peptidoglycane épaisse vont retenir le colorant (Gram +). La consistance et la valeur de la coloration de Gram correspond à des différences biochimiques entre la paroi des bactéries Gram positif et les bactéries Gram négatif (**Marchal et Bourdon, 1982**).

#### ▪ **Technique :**

Il existe de nombreuses variantes de la coloration de Gram qui différent par la composition des réactifs et leur temps d'action.

#### ○ **Coloration par le violet de gentiane**

\_ placer le frottis fixé dans le flacon de violet de gentiane.

\_ Laisser agir 1 minute.

\_ Sortir la lame.

#### ○ **Mordantage par lugol**

\_ Recouvrir le frottis (placé sur le porte-lame, au dessus de la cuve à coloration) de lugol.

\_ Laisser agir 1min (ou un temps au moins égal à celui de l'action du violet de gentiane).

Eliminer l'excès de lugol et rincer la lame à l'eau distillée.

#### ○ **Décoloration par l'alcool**

\_ Recouvrir le frottis d'alcool (éthanol) et laisser agir 30 s.

\_ Laver le frottis à l'eau distillée (les 2 cotés de la lame).

○ **Recoloration par la fuchsine**

- \_ Placer le frottis dans le flacon de fuchsine.
- \_ Laisser agir 1 min.
- \_ Sortir la lame et la rincer à l'eau distillée (des 2 cotés)

Sécher la lame entre 2 feuilles de papier essuie-tout.

▪ **Observations**

Examiner à l'objectif x1000, à l'immersion (avec une goutte d'huile), avec éclairage important (diaphragme ouvert).

Noter :

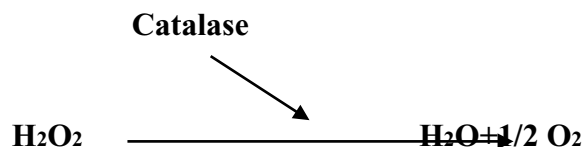
- La morphologie : voir fiche correspondante.
- Indication sur la taille : taille moyenne, petite taille, grande taille.
- Le gram : bactéries à gram positif (violet) ou à gram négatif (rose)
- Le groupement : par 2, amas, chainettes .....
- La proportion de chaque type de bactéries (quand il y en a plusieurs....) l'interprétation de coloration de gram n'est possible que si la confiance en la technique réalisée est totale. En cas de doute, une vérification s'impose.

**II.5.2. Etude biochimiques (les tests d'orientations)**

L'étude biochimique nous oriente sur le métabolisme suivi par les bactéries étudiés et les enzymes qu'ils possèdent. Ces tests ont été réalisés en utilisant la galerie biochimique pour les souches microbiennes. Les épreuves biochimiques permettent, en général, de distinguer les espèces, même étroitement apparentées entre elles (**Tortora et al, 2003**)

**II.5.2.1. Recherche de la catalase**

La catalase est un enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) avec dégagement d'oxygène selon la réaction suivante :



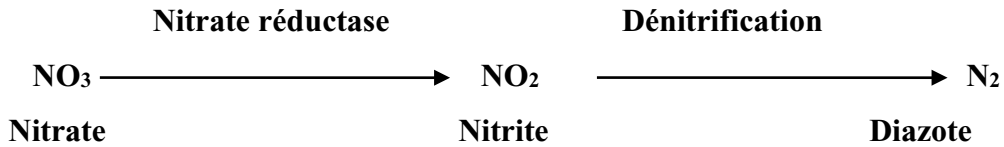
**-Technique :**

Sur la lame et à l'aide d'une pipette Pasteur, on dépose une colonie bactérienne à laquelle on ajoute de l'eau oxygénée (à 10 volumes). La présence d'une catalase est révélée par

l'apparition immédiate de bulles de gaz qui correspondent à l'oxygène dégagé (Tortora *et al*, 2003).

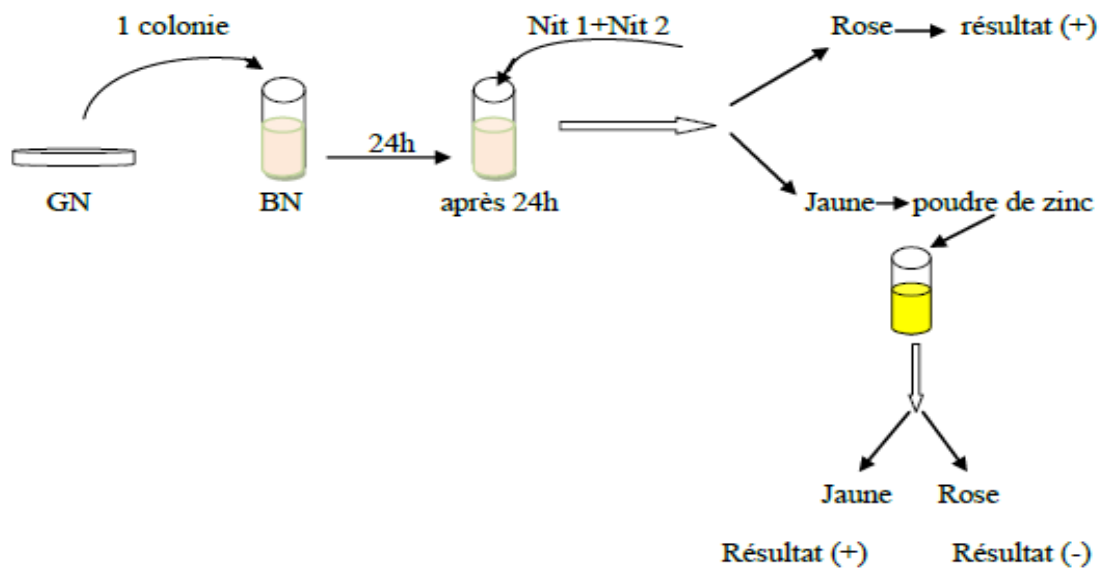
**II.5.2.2. Recherche de nitrate réductase**

L'étude de réduction des nitrates se fait par la mise en évidence des nitrites formés. Ces derniers en milieu acétique ou sulfurique, donnent une coloration rose. Les nitrates peuvent aller également jusqu'au stade azote (N<sub>2</sub>).



A une culture de 24 à 48h d'incubation à 30°C en bouillon nitraté, cinq gouttes des réactifs de Nit 1 puis Nit 2 ajoutés. Après agitation, la lecture est immédiate. Plusieurs cas de figures peuvent se présenter :

- Lorsque la coloration est jaune ou rouge ; les nitrates sont réduits en réduites, on parle de nitrate réductase positive (NR+).
- Lorsque le milieu reste incolore, de la poudre de zinc est ajouté (réducteurs des nitrates), après cinq minutes les tubes sont de nouveau observés :
  - Si le milieu devient rose ou rose, il reste des nitrates, donc ces derniers n'ont pas été réduits par la bactérie : nitrate réductase négative (NR-).
  - Si le milieu reste incolore, il ne reste plus de nitrates, les bactéries les ont réduit au-delà du stade nitrites : nitrate réductase positive (NR+) (Tortora *et al*, 2003)



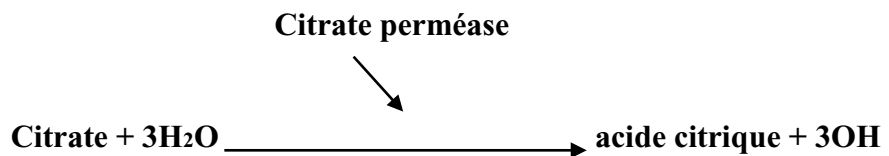
**Figure11** : protocole de test nitrate réductase

**-Technique**

- Cultiver la bactérie dans un bouillon nitraté.
- Incuber à 30°C pendant 18 h.
- Ajouter trois gouttes NR 1 puis trois gouttes NR 2.

**II.5.2.3. Recherche de Citrate de Simmons**

Le milieu utilisé est le citrate de Simmons (de couleur verte), qui ne contient que le citrate ( $C_6H_5O_7$ ) comme seule source de carbone qui est le citrate de sodium. 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 (**marchal et bourdon, 1982**):



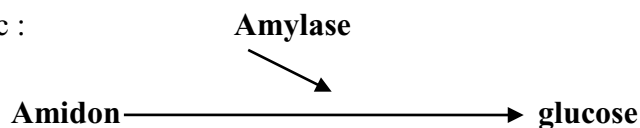
**-Technique**

- Ensemencer le milieu au citrate de Simmons à partir d'une culture prélevée sur un milieu gélosé.
- Incuber à 30°C pendant 24h.

**II.5.2.4. Recherche de Gélose à d'Amidon**

L'amidon est une macromolécule glucidique constituée d'un enchainement de glucose. L'amylase quand à elle est une enzyme capable de dégrader l'amidon substrat.

On obtient donc :



En présence d'iode l'amidon change de couleur et vire au bleu foncé /sombre.

Après l'incubation l'ajout de di-iode ( $I_2$ ), contenu dans le lugol, sur la gélose à l'amidon permet de mettre en évidence autour des colonies la présence ou non d'amidon et donc d'amylase.

### **II.5.2.5. Recherche de métabolites formé à partir de l'acide pyruvique ; rouge de méthyle (RM) test de voges –proskauer VP**

Le milieu de clark et lubs permet l'étude des produits de fermentation du glucose : différenciation entre les fermentations « acides mixte » et « butylène glycolique »

#### **II.5.2.5.1. Test RM (rouge de méthyle)**

Ce test la mise en évidence, grâce au rouge méthyle, de la fermentation acide mixte par acidification d'un milieu glucosé après fermentation du glucose.

#### **II.5.2.5.2. test VP (voges-proskauer)**

Ce test permet la mise en évidence de la production d'acétoïne (ou 3-hydroxy-butanone) au cours de la fermentation butylène glycolique : en présence d'une base forte (soude ou potasse) et d' $\alpha$ -naphthol, l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygène.

#### ➤ **Technique**

-Ensemencer un milieu de Clark et Lubs.

-Incuber 24h à 30°C.

-Après incubation ajouter le Rouge de Méthyle, une coloration jaune (RM-) donc le Ph est faiblement acide et rouge (RM+) donc un très acide.

Après incubation ajouter 10 gouttes de KOH ou NaOH (réactif VP1) et 10 gouttes d' $\alpha$ -naphthol (réactif VP2), incliner le tube pour permettre une bonne oxygénation et attendre quelques minutes jusqu'à une heure. La présence d'acétoïne (bactérie VP positive) se traduit par une coloration rose en surface mais pouvant diffuser dans tout le milieu.

#### **II.5.2.6. Recherche de viande foie (Gélose VF)**

Le milieu viande foie permet de déterminer le type respiratoire d'une bactérie, c'est-à-dire définir son comportement vis-à-vis du dioxygène.

Certaines bactéries ne peuvent vivre qu'en son absence, d'autres qu'en sa présence, d'autres encore sont indifférents.

### ➤ **Technique**

- régénérer pendant 20 minutes au bain d'eau bouillant : élimination des gaz dissous pour la création d'un gradient partiel en O<sub>2</sub>
- ensemencer, à l'aide d'une pipette pasteur fermée et chargée en remontant en remontant en spirale dans la gélose. Le tube doit être en surfusion (45°C).
- solidifier, puis mettre à l'étuve 24h à 37°C.

### **II.5.3.Sélection des souches apparentées au genre *Pseudomonas* :**

A partir des souches conservées, différentes cultures ont été effectuées pour distinguer les genres pouvant appartenir au groupe des *Pseudomonas*.

### **II.5.3.Culture sur milieu sélectif King :**

#### ➤ **Croissance sur milieu King (King A et King B)**

Les milieux de King (milieu King A et milieu King B permettent de différencier entre elles les différences espèces du genre *Pseudomonas*, par la mise en évidence de la production de pigments spécifiques. La technique est comme suit :

- A partir d'une culture sur gélose (faire une suspension), ensemencer le milieu en faisant une strie à la surface de la gélose avec l'anse (ou en déposant une goutte de suspension). L'incubation est réalisée en aérobiose.

### **II.6. Test de dégradation du pétrole brut en milieu solide (MSM agar)**

Une procédure a été établie sur un milieu solide (MSM+Agar) pour la détection les microorganismes capable de dégrader les hydrocarbures non volatiles sur un milieu solide.

#### ➤ **Protocole**

- Lancer une culture des neuf (9) souches pures dans du bouillon nutritif et incubé pendant 24 heures à 37 °C.
- Centrifuger la culture à 3000t/min pendant 10 minutes, récupérer le culot et effectuer un lavage avec MSM liquide 3 fois.
- Laver l'Agar puis préparer MSM solide, le couler dans boîtes préalablement numérotées et les laisser solidifier.

- Après solidification de la Gélose ( verser une grande couche de gélose), étaler 100  $\mu$ l de pétrole filtré sur la surface des boîtes puis laisser sécher devant le bec benzène 3 heures de temps.
- A partir des différents culots, prendre avec une anse stérile une goutte et déposer sous forme de spots le concentré de culture dans les carreaux appropriés à chaque souche.
- Laisser sécher devant le bec benzène puis incuber à l'abri de lumière à 30 °C pendant 7 à 15 jours (incubation de certaines souches peut durer jusqu'à 21 jours).
- Faire la lecture des boîtes tous les jours pour voir s'il y a apparition de zones. (**Hohzoh Kiyohara, 1982**)
- 

### **II.7. Test de dégradation du pétrole brut en milieu liquide**

La capacité des souches bactériennes isolées à dégrader le pétrole brut a été testée dans un milieu minéral liquide : Minéral Salt medium (MSM). Neuf (9) souches de bactéries différentes ont été sélectionnées pour réaliser ce test.

#### ➤ **Protocole**

- Lacer une culture des souches isolées dans du bouillon nutritif et incuber à 37°C pendant 48 heures.
- Effectuer une centrifugation, récupérer les culots et les laver 3 fois avec MSM liquide.
- Après le dernier lavage, récupérer les culots et lui ajouter 2 ml de MSM.
- A l'aide d'une micropipette, ajouter 40  $\mu$ l de pétrole brut comme seule source de carbone (C), dans les tubes contenant 9ml de milieu de MSM liquide.
- Ensemencer les culots préalablement lavés dans les tubes à 37 °C pendant 7 à 15 jours sous agitation continue.
- Faire le suivi de la croissance bactérienne par mesure de la DO par spectrométrie à une longueur d'onde de 595 nm de 0 heure jusqu'à 15 jours et à des intervalles réguliers de 2 jours (avec MSM comme Blanc). (**Jyothi K, K Surendra Babu 2012**)

# Résultats et discussions

## II.1. Analyse physico-chimiques

### II.1.1. Caractéristiques du sol étudié

La caractéristique physico-chimique d'échantillon de sol pollué par les hydrocarbures prélevé à distance de 10 à 20 cm.

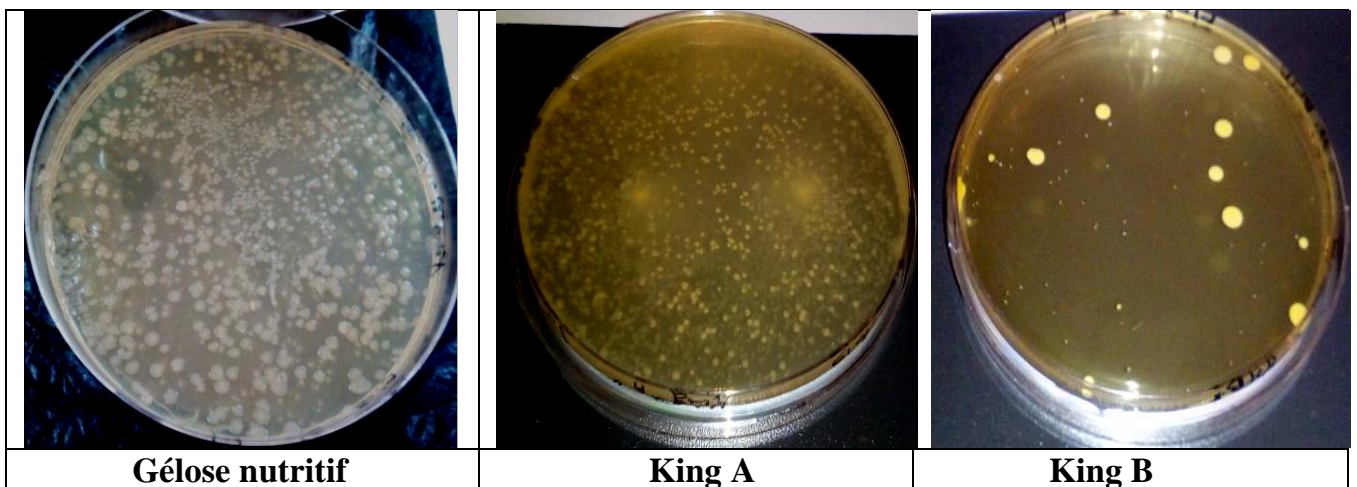
La structure de nos échantillon étudié, on observe une distribution hétérogènes des particules de différentes tailles la grande à un diamètre 2 à 4 cm et la petite à 1 à 2 mm, une couleur marron foncé des granules, noir et marron avec une forte odeur des hydrocarbures et une visqueux-té importante. **Figure 12.**



**Figure 12** : sol pollué par les hydrocarbures.

### II.2. Caractéristiques des isolats purifiés

L'isolement des bactéries à partir des sols pollués par les hydrocarbures a permis d'obtenir une croissance bactérienne pendant 24 heures sur les milieux : gélose nutritif, King A et King B.



**Figure 13** : aspect macroscopique de quelques souches

### II.3. Identification des souches isolées

#### II.3.1. Examen macroscopique

L'étude macroscopique a permis d'isoler 09 colonies distinctes par les caractéristiques regroupées dans le tableau .

**Tableau 5** : observations macroscopiques de souches isolées.


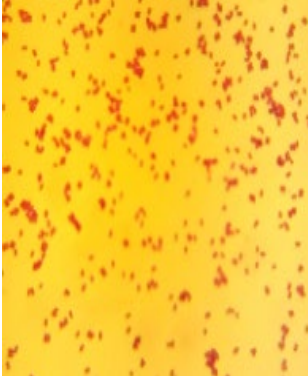
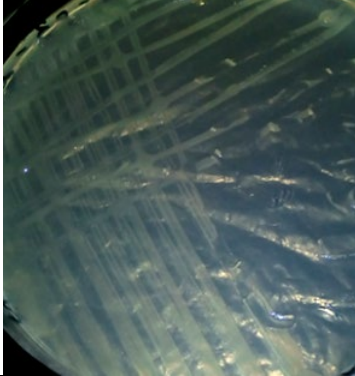
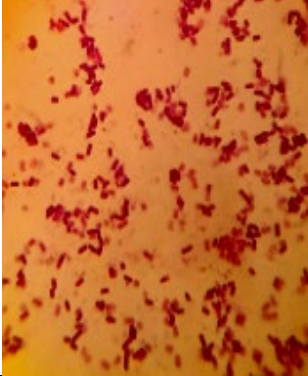

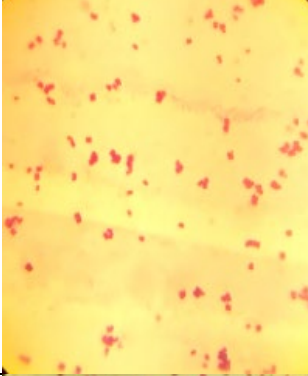
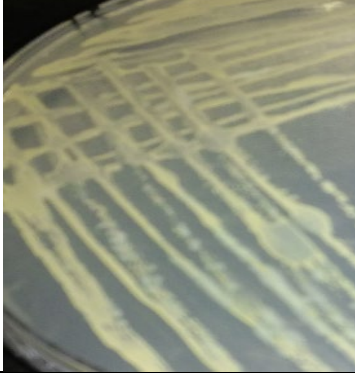
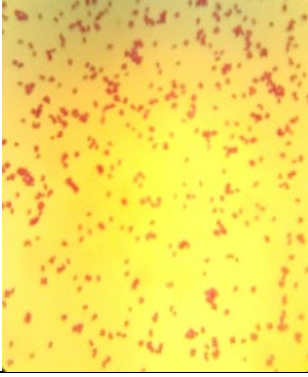
	Taille	couleur	Forme	Elévation	Contour	surface	Consistance
<b>C1</b>	grande	Jaune	ronde	plate	régulière	lisse	visqueuse
<b>C2</b>	petite	Jaune	ronde	convexe	régulière	lisse	visqueuse
<b>C3</b>	grande	Jaune	ronde	convexe	régulière	lisse	visqueuse
<b>C4</b>	moyenne	Jaune	ronde	convexe	régulière	lisse	crémeuse
<b>C5</b>	moyenne	blanche	ronde	convexe	régulière	lisse	visqueuse
<b>C6</b>	moyenne	blanche	irrégulière	convexe	irrégulière	rigoureuse	crémeuse
<b>C7</b>	moyenne	Jaune	irrégulière	convexe	irrégulière	lisse	crémeuse
<b>C8</b>	petite	blanche	irrégulière	convexe	irrégulière	lisse	visqueuse
<b>C9</b>	petite	Beige	irrégulière	convexe	irrégulière	rigoureuse	Crémeuse

#### II.3.2. Examen microscopique


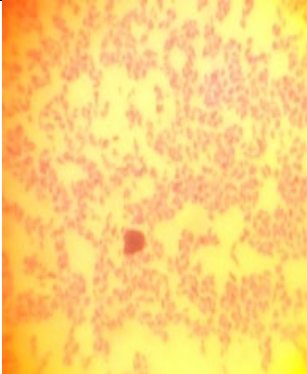



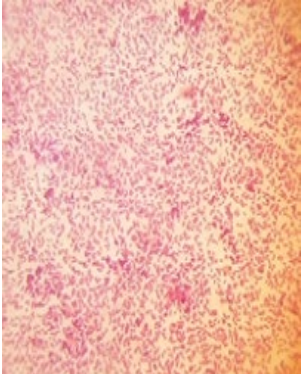

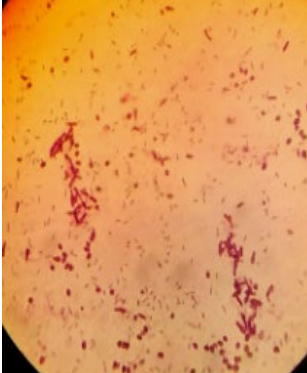
L'observation microscopique a été réalisée suivant deux étapes : après une observation à l'état frais et après coloration de Gram et au bleu de méthylène. Les résultats obtenus sont donnés dans le **tableau 6**.


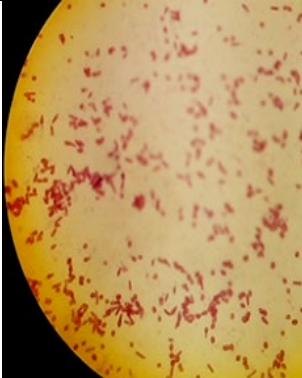
Les résultats consignés dans le **tableau 6**, montrent une variété de types bactériens. Les bactéries isolées sont généralement mobiles. Elles présentent différentes formes : bacille, coccobacille ou cocci. Elles sont assemblées en différents arrangements soit en paire, en amas, en chaînettes ou même isolées. Elles présentent aussi une paroi de Gram positive ou négative. La coloration au bleu de méthylène a révélé la présence de spore uniquement chez les bacilles, les coques et les colibacilles en sont dépourvus.

**Tableau 6** : les différents caractères des souches isolées.

Souches	Observation macroscopique	Observation microscopique	La forme des cellules	Gram
C1			Coques isolé et en amas	-
C2			Coques en amas	-
C3			Coques en amas	-
C4			Coques en titrât et en amas	-

## CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSIONS

C5			Bacilles isolés	-
C6			Bacilles moyens isolés	-
C7			Bacilles courts isolés	-
C8			Bacilles moyens	-

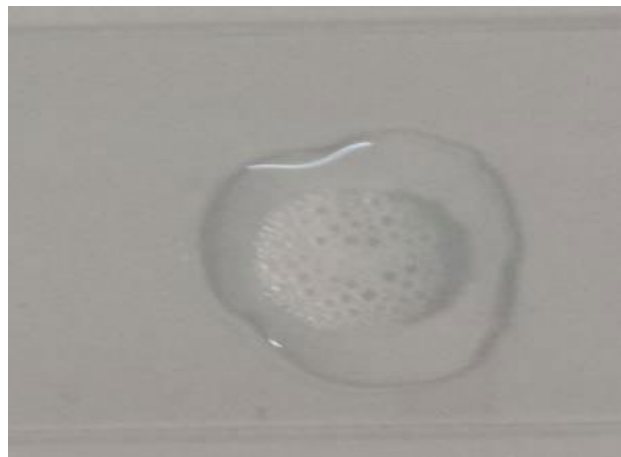
C9			Coccobacilles isolés	-
----	---	--	----------------------	---

Le tableau précédent montre la richesse de notre collection, on observe une variété de couleur, de formes, d'aspect et aussi différentes formes sous microscope : il y a les bacilles moyens, courts, avec différentes associations (en courtes, isolés). Puis viennent les coques avec leur association en amas, en têtards, isolés. Les coccobacilles, eux ne sont pas nombreux.

**II.4. Tests biochimiques**

**II.4.1. Test de catalase**

L'apparition des bulles de gaz après l'addition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, révèle une réaction positive et tous les isolats sont dites oxydase positives.



**Figure14** : Résultat positif pour le test catalase.

**II.4.2. Recherche de nitrate réductase**

- Le milieu devient rouge : Présence de nitrate. Donc la bactérie possède un nitrate réductase (NR+) comme les isolats (C1, C2, C3, C4, C5, C8 et C9).

-Le milieu reste inchangé : on ajoute alors de la poudre de zinc qui joue le même rôle que le nitrate réductase vis-à-vis des nitrates :

- Pas de coloration : les nitrates ont été transformés par la bactérie au-delà des nitrates. La bactérie possède cette enzyme, résultats (NR+) comme les isolats (C6 et C7).

**Tableau 7** : résultat de test de nitrate réductase.

Echantillon	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
NR	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Zinc	/	/	/	/	/	+	+	/	/



**Figure15** : résultat de test nitrate réductase

**II.4.3. Recherche de type respiratoire**

Les résultats obtenus sur le milieu viande-foie (VF) montrent que tous isolats se développent uniquement dans la partie supérieure du milieu dans les tubes, ce sont des bactéries aérobies strictes.

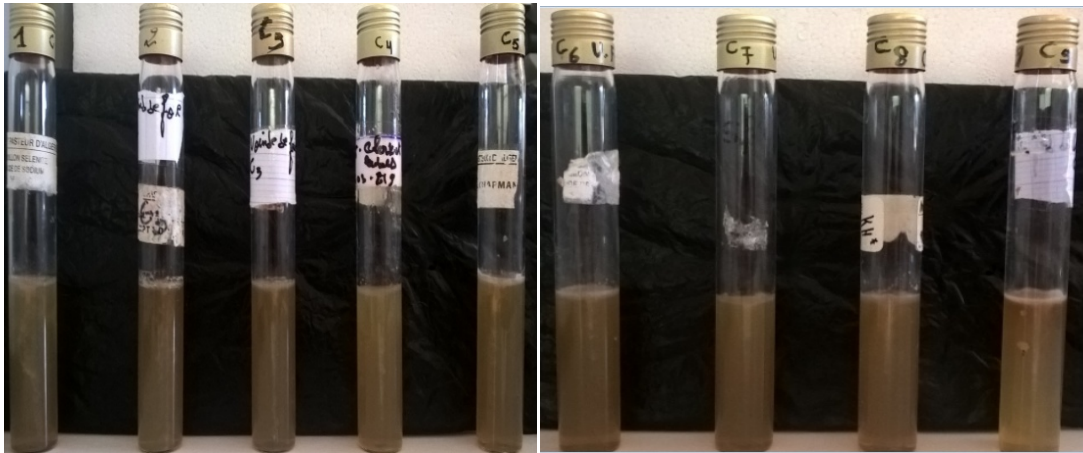


Figure16 : résultat de test viande foie.

#### II.4.4. Recherche de Citrate de Simmons

Reste d'une coloration verte dans tout les tubes alors Les neuf souches sont citrate (-).

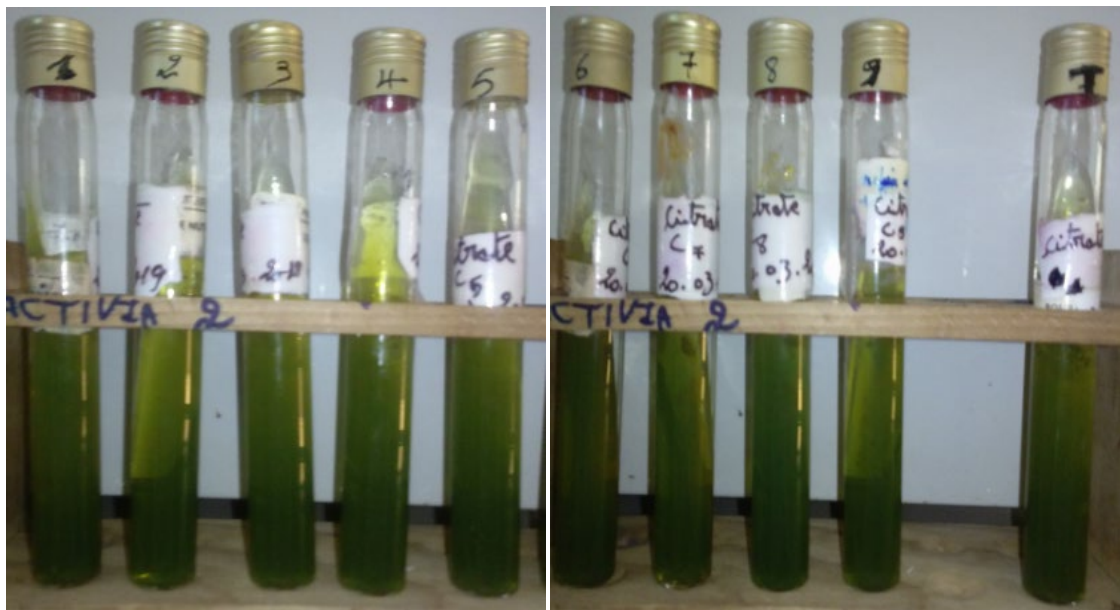
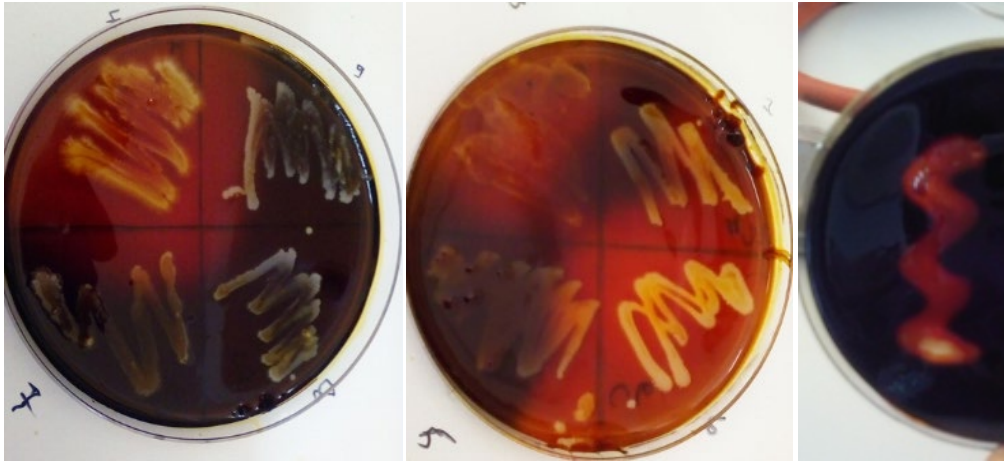


Figure17 : résultat de test citrate de simmons

#### II .4.5. Recherche de Gélose à d'Amidon

-L'amidon a été dégradé la bactérie possède l'amylase (enzyme) comme les isolats (C4 et C6), donc Amidon (+) et amylase (+).

-présence d'amidon autour de la culture la bactérie ne possède donc pas l'amylase comme les isolats (C1, C2, C3, C5, C7, C8 et C9), alors Amidon (-) et Amylase (-).



**Figure18** : résultat de test gélose à d'amidon.

#### II.4.6. Recherche de métabolites formé à partir de l'acide pyruvique ; rouge de méthyle (RM) et test de voges –proskauer VP

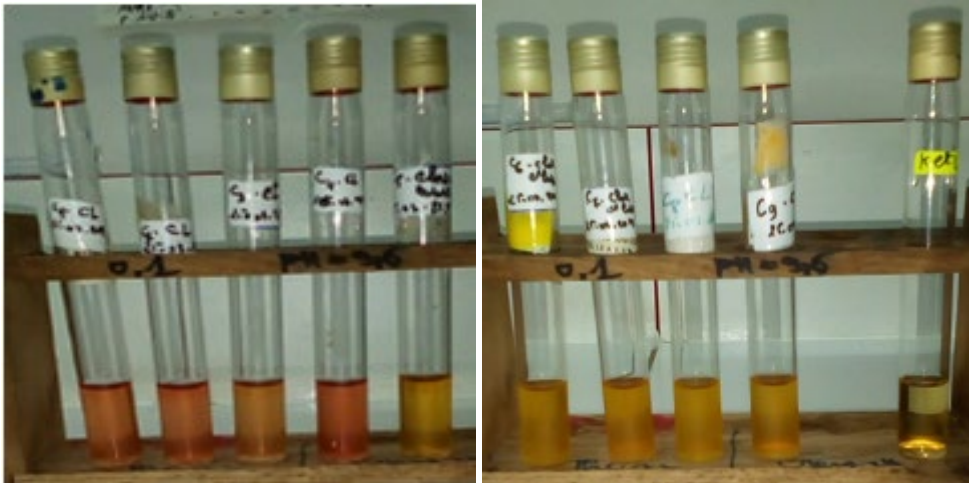
**Tableau 8** : résultat de test de RM et VP.

Echantillon	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
RM	+	+	+	+	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-

##### II.4.6.1. test RM (rouge de méthyle)

-Présence de la coloration rouge que les isolats (C1, C2, C3, C4) après l'addition de rouge de méthyle au moment de la lecture des résultats, révèle que les isolats sont RM +

-L'absence de la coloration rouge que les isolats (C5, C6, C7, C8, C9) après l'addition de rouge de méthyle au moment de la lecture des résultats, révèle que les isolats sont RM-, le milieu est dit légèrement acide ou alcalin,



**Figure19** : résultat de test de rouge de méthyle(RM).

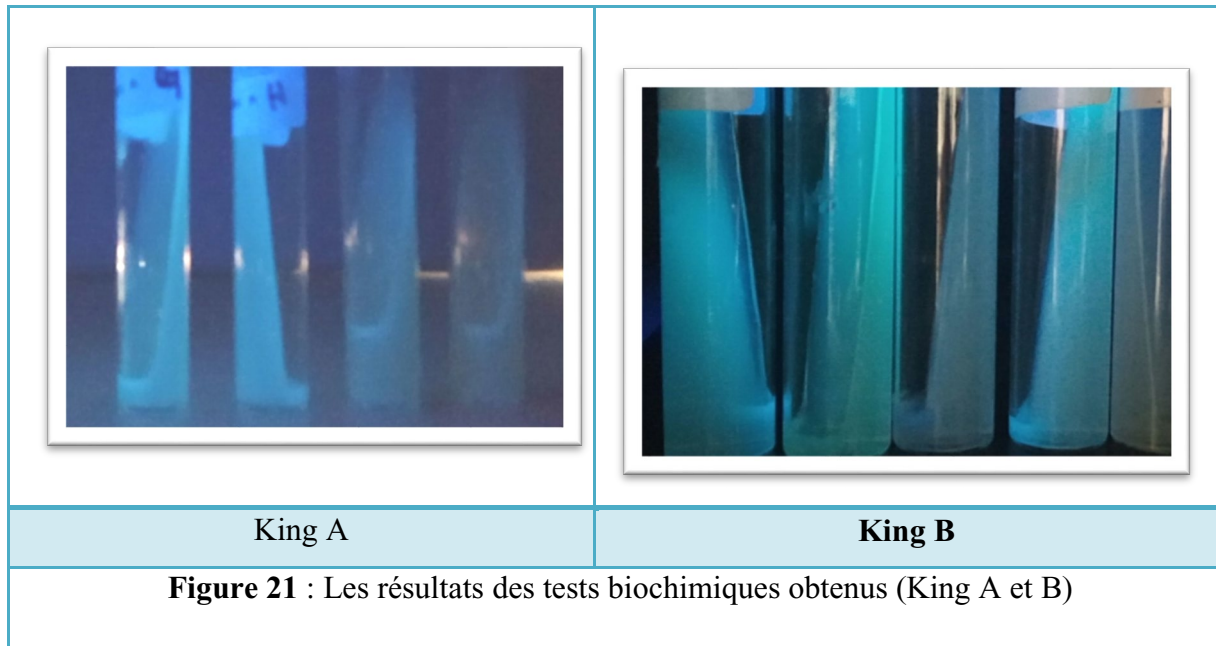
### II.4.6.2. Test de Voges –proskauer VP

- Pour le test VP l'absence d'une coloration rouge, signifie l'absence d'acétoineet absence de fermentation du glucose par la voie butylène glycolique (pas de production d'acétoine), la souche est dite VP négative.



**Figure20** : résultat de test VP.

**II.5.Pré identification des souches isolées :**



**II.5.1.Les *Pseudomonaceae***



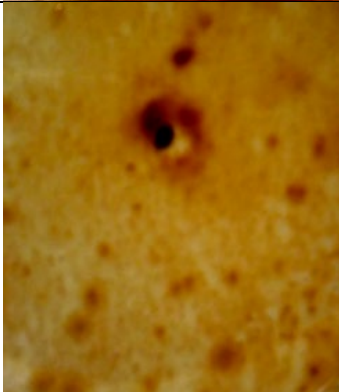
D’après sa morphologie macroscopique, les souches ont été affiliées au genre *Pseudomonas* en raison de la morphologie de ses petites colonies circulaires, lisses et brillantes. Ces souches ont une forme bacillaire, isolées ou en amas avec les caractéristiques suivantes : Gram négatif, oxydase positive, catalase positive, non sporulées. Ceci nous a orientés vers la culture de ces souches sur milieux King A et King B spécifiques des *Pseudomonas*.

La révélation d’une couleur bleu verte sur King A et un jaune verdâtre fluorescent sur King B confirme l’appartenance au genre *Pseudomonas* (**Figure 21**). Ces bactéries ont un caractère aérobie strict, ADH et citrate positif (Bergey, 1984 ;Larpen, 1992 ; Prévôt, 1961 et Singleton, 1999).


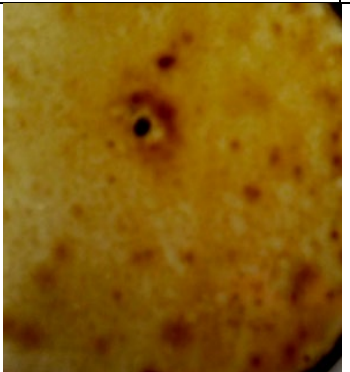
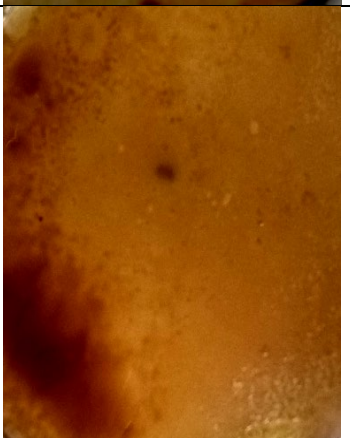

**II.6. Test de biodégradation**

**II.6.1. Test de dégradation du pétrole brut en milieu solide (MSM agar)**



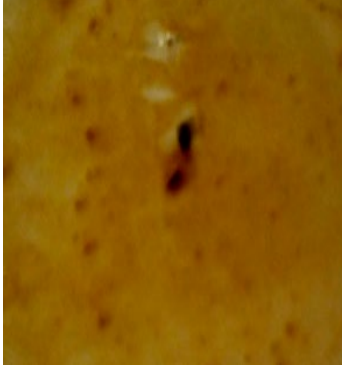
**Tableau 9** : Résultats du testes biodégradation de pétrole brut des souches d'échantillon « C ».

Souches	Photos	Zone de dégradation	Diamètre	Croissance bactérienne
Témoin		négative	0mm	Négative
C1		négative	0mm	Négative croissance
C2		Positive zone	3mm	Positive croissance

## CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSIONS

C3		Négative zone	0mm	Négative croissance
C4		Positive zone	4mm	Positive croissance
C5		Négative zone	0mm	Négative croissance
C6		Positive zone	6mm	Négative croissance

## CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSIONS

C7		Positive zone	8mm	Positive croissance
C8		Positive zone	3mm	Négative croissance
C9		Positive zone	2mm	Positive croissance

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

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

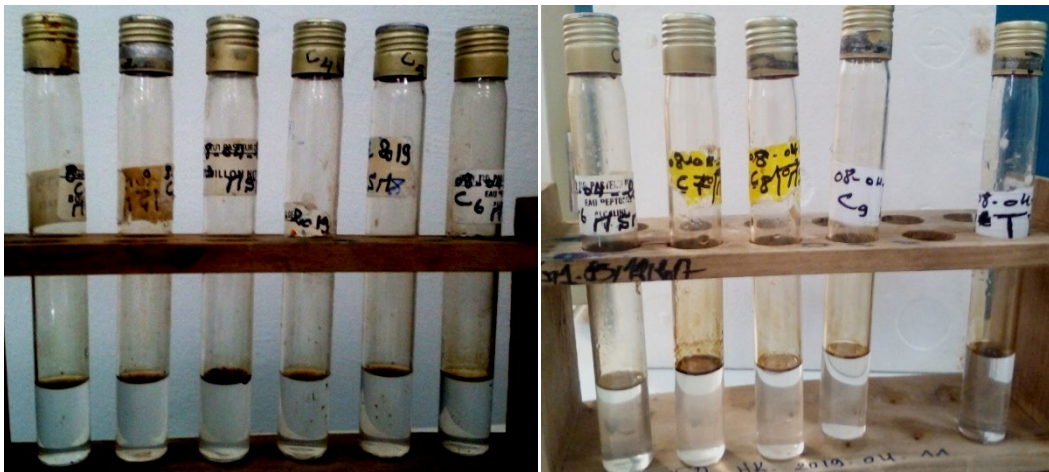
Dans quelques cas, il y a eu des colonies qui ont montré une dégradation du pétrole vaporisé sur la gélose, et qui ont donné des zones beaucoup plus importantes que celles observées dans le travail de ce dernier. Le diamètre des zones varie de 2mm à 8mm, et cela est important.

### II.6.2. Test de dégradation du pétrole brut en milieu liquide

La biodégradation des hydrocarbures dans un milieu liquide est la plus difficile dans le domaine de la recherche vu le problème d'évaporation de ces derniers qui peut causer problème dans le cas des calculs de la quantité dégradée, ou être évaporé avant même le commencement du phénomène de dégradation.

La méthode utilisée par certains auteurs était réalisée pour tester la capacité de cette souches à dégrader le pétrole brut dans un milieu minéral (MSM) contenant 40  $\mu$ l de pétrole brut, dans notre cas, on a pris des souches qui ont déjà montre une dégradation du pétrole sur milieu solide.

Dans notre travail, 09 souches préalablement isolées d'échantillon pollué ont été testées dans un milieu liquide, MSM additionné par une source de carbone.

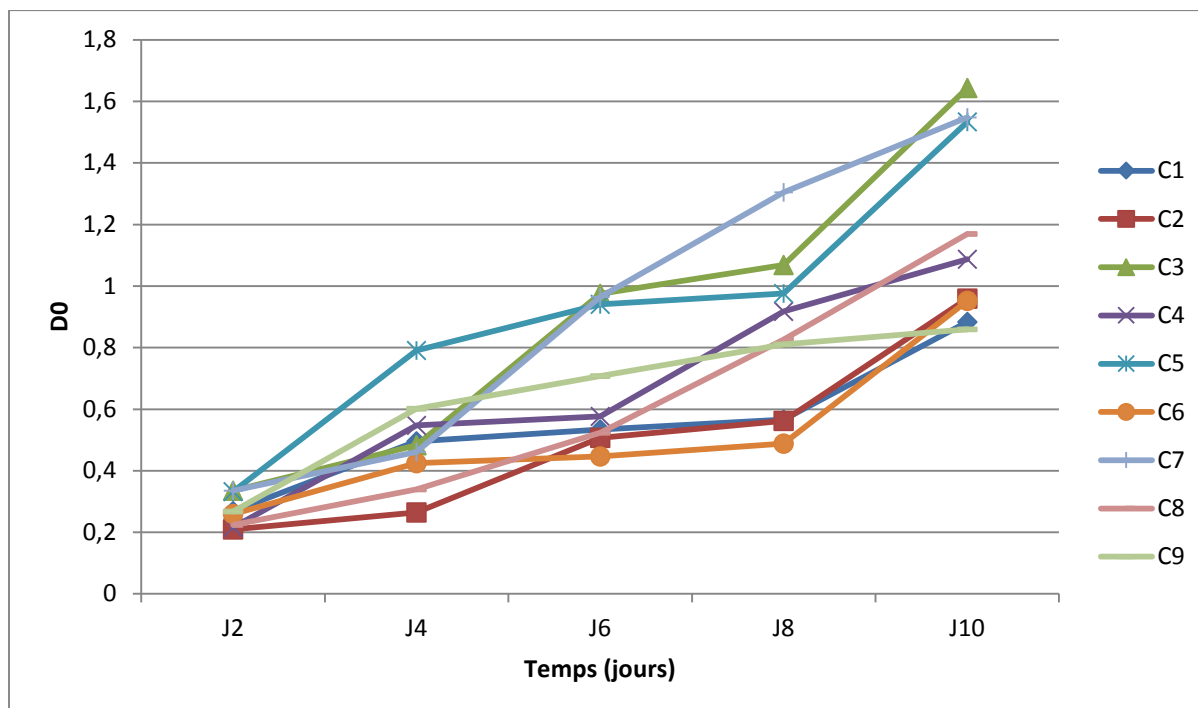


**Figure 22:** interactions des souches qui ont réagissent avec le pétrole dans le milieu liquide.

### II.7. Détection de l'activité de biodégradation des bactéries

Un sol qui contient des hydrocarbures va modifier l'activité des microorganismes. Ceux-ci doivent donc adapter leur activité enzymatique afin de pouvoir s'y attaquer. Les bactéries vont ensuite subir une période de forte croissance au cours de laquelle ils seront capables d'assimiler les produits de la dégradation des hydrocarbures. Cette biodégradation peut prendre plusieurs mois. Une fois qu'ils ont consommé les composés les plus facilement dégradables, leur nombre diminue jusqu'à atteindre de nouveau la taille d'une population normale. (Ce qui explique l'écart au niveau de nombre des souches isolées entre les deux

échantillons). Parfois, seule une partie des polluants est dégradés car les hydrocarbures se lient partiellement à la matière organique du sol et deviennent alors moins accessibles aux microorganismes. Le niveau de dégradation des pétroles (mélange de composés facilement dégradables et de composés récalcitrants) est donc totalement dépendant de la diversité métabolique des bactéries hydrocarbonoclastes présentes dans l'environnement pollué. La diversité des espèces bactériennes est un facteur décisif dans la réponse des communautés bactériennes à ce type de variation environnementale. (Sauret C.,2011).



**Figure23** : Cinétique de croissance des souches bactériennes durant la biodégradation du pétrole

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

Par ailleurs, l'augmentation de la biomasse microbienne correspondrait à la phase exponentielle, phase durant laquelle la dissolution du substrat «hydrocarbure pétrole» suffit aux besoins métaboliques des souches. Ainsi, La stabilisation de la concentration microbienne au-delà d'une heure montre que le niveau des exigences nutritionnelles surpassent la vitesse de dissolution du substrat, la biodisponibilité deviendra alors limitant (ROCHA et al. 2007).

# Conclusion

### Conclusion

Les sols contaminés par le pétrole brut permettent aux différents microorganismes de dégrader les hydrocarbures de vivre. Ces derniers peuvent accélérer la biodégradation des produits la production de substances dénommées bactéries hydrocarbonoclastes.

Les hydrocarbures pétroliers sont des polluants organiques qui sont soumis à la biodégradation dès que les micro-organismes capables de les utiliser se sont développés.

La biodégradation est une méthode de dépollution *in situ* qui peut être envisagée pour dégrader de contaminants organiques. C'est une de contamination par voie biologique efficace, mais le suivi de ce type de dépollution se fait actuellement en ayant recours à des forages coûteux, trop peu nombreux par rapport au nombre nécessaire pour réaliser un suivi géochimique/analytique significatif et réaliste. L'objectif de notre travail est d'isoler et de caractériser les souches hydrocarbonoclastes productrices de biosurfactant, présentes dans nos échantillons de sols contaminés par le pétrole brut. Le travail de mémoire a consisté à tester ces nouveaux outils de monitoring à l'échelle du laboratoire, en colonnes, puis à les mettre en œuvre sur un véritable site pollué en cours de dépollution.

Les résultats d'isolement bactériens de sol contaminés, nous ont permis d'isoler neuf souches bactériennes. En se basant sur leurs caractères microscopiques (toutes les souches à Gram-), macroscopique et biochimique.

Les genres bactériens isolés et identifiés peuvent être exploités, utilisés dans la dégradation des zones polluées par les hydrocarbures et dans la production des biosurfactants qui représentent des substances intéressantes dans différentes applications.

# References Bibliographiques

## Référence Bibliographique

1. **Mbonigaba J.J.M., Nzeyimana I, Bucagu C, Culot M, (2009)** Caractérisation physique, chimique et microbiologique de trois sols acides tropicaux du Rwanda sous jachères naturelles et contraintes à leur productivité. *Biotechnol.Agron. Soc. Environ.* 13 (4): 545-558.
2. **Yadav B.K and Hassanizadeh M.S,( 2011).** An Overview of Biodegradation of LNAPLs in Coastal (Semi)-arid Environment.
3. **Water Air Soil Pollut., (2011),** 220:225–239. DOI 10.1007/s11270-011-0749-1.
4. **Haritash A.K. and Kaushik C.P,(2009).** Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials.*, 2009.169: 1–15.
5. **Emilia K, (2004).** Traitement des pollutions industrielles : Eau, Air, Déchets, Sols, Boues.
6. **Hamelin R, Laprte J.et Ptc A, (2000) –** Environnement et nuisances Edition Clartés. P 157.
7. **Monas I., Caillard J-F., Lesaffre B, (2004),** Plan National Santé Environnement, rapport final de la commission d'orientation, Agence Française de sécurité sanitaire environnementale, 246 pages.
8. - <https://sites.google.com/site/pollusiond-elenvironnement/les-types-de-pollution>.
9. **Jeannot.R, lemiere.B, Chiron.S** avec la collaboration de : F. Augustin, D.Darmendrail, **(2001)-** Guide méthodologique pour analyse des sols pollués (Document du BRGM 298).Editions BRGM
10. **Blifert C et Perraud R., (2004).** Chimie de l'environnement air, eau, sols, déchet. De Boeck université. P (369 ,372-375).
11. 7-<http://www.alcor-controles.fr/audit-pollution-solls.html>.consulté le 13/03/2012.
12. - <http://www.ademe.fr/midi-pyrenees.a-6-01-a> consulté le 13/03/2012
13. **Soltani M., (2004).** Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Doctorat en Chimie Analytique de l'université Paris 6, 284 p.
14. **Guermouche M'Rassi A, (2013)** caractérisation moléculaire des bactéries impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures, Thèse de doctorat, Université d'Oran, 129 p.

16. **Speight, J.G. (2014).** The chemistry and Technology of petroleum-Fifth Edition. CRC Press, Etats-unis, 984p.
17. **Arnaud P. (1983).** "Cours de Chimie Organique." Enseignement de la Chimie, Tome 1, 505 p.
18. **Brandt P. (1992).** "La Nomenclature en Chimie Organique". Beauchevin (Belgique).
19. **Colombano, S., V. Guerin, A. Saada, D. Hiez et H. Bomer. (2008).** Journée technique d'information et de retour d'expérience de la gestion des sols pollués. Les Diagnostiques Objectifs, enjeux & moyens. IN Gouvernement de France, ministère de l'Écologie, du Développement durable et de l'Énergie.
20. [http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/etude\\_de\\_cas\\_TAUW.pdf](http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/etude_de_cas_TAUW.pdf).
21. **Neff J.M, (1979).** Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment, source, fate and biological effect, applied science, Essex, England, 262.
22. **Syakti A.D (2004).** Biotransformation des hydrocarbures pétroliers et effets sur les acides gras phospholipidiques de bactéries hydrocarbonoclastes marines. Thèse de doctorat, Université de droit, d'Economie et des Sciences (Aix Marseille III), Marseille, France pp.
23. **Vandecasteele J.P. (2005).** Les hydrocarbures naturels dans l'environnement. In Microbiologie pétrolière. Technip (ed). Paris : IFP publication, pp. 41-73.
24. **Seo J.S, Keum Y.S, Li Q.X. (2009).** Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *Internatione Journal of Environmental Research and Public Health* 6(1): 278-309
25. **Speight J.G. (2004).** Petroleum asphaltenes - part 1 - asphaltenes, resins and the structure of petroleum. *Oil & Gas Science and Technology - Rev.IFP*, 59(5):467-477.
26. **Tharanivasan, A. K. (2012).** *Asphaltene Precipitation from Crude Oil Blends, Conventional Oils, and Oils with Emulsified Water*. Thèse de doctorat en philosophie présentée au Department of chemical and petroleum engineering, Université de Calgary, 174 p.
27. **Morgan P. et Waykinson R.J. (1989).** Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 8:305- 333.
28. **Neff, J. M., S. Ostazeski, W. Gardiner et I. Stejskal. (2000).** Effects of weathering on the toxicity of three offshore Australian crude oils and a diesel fuel to marine animals. *Environmental Toxicology and Chemistry*.19 (7):1809-1821.
29. **Fingas M. (2013).** The Basics of oil spill cleanup. CRC Press, États-Unis.

30. **Asia L, (2012).** Analyse des hydrocarbures dans des sédiments superficiels de zones côtières Méditerranéennes (Golfe de Fos, Rade de Marseille et Massif des Calanques). Thèse de Doctorat en Sciences de l'Université d'Aix-Marseille en Chimie Analytique. 175 p.
31. **Rouidi, S., (2002).** Cartographie de la pollution par les hydrocarbures totaux au niveau de la plate forme pétrochimique de Skikda. Mémoire de Magistère, Université Mentouri, Constantine, 112 p.
32. **Gong, Y., X. Zhao, Z. Cai, S. E. O'Reilly, X. Hao et D. Zhao. (2014).** A review of oil, dispersed oil and sediment interactions in the aquatic environment: Influence on the fate, transport and remediation of oil spills. *Marine Pollution Bulletin*. 79(1-2): 16-33.
33. **Fitzpatrick F.A., M.C., Boufadel R., Johnson K., Lee T.P., Graan A.C., Bejarano Z., Zhu D., Waterman D.M., Capone E., Hayter S.K., Hamilton T., Deffer M.H., Garcia, Et J.S., Hassan. (2015).** Oil-particle interactions and submergence from crude oil spills in marine and freshwater environments – Review of the science and future science needs. U.S. Geological Survey Open-file report 2015-1076, 33 p.
34. **Bandara U. C., P. D. Yapa et H. Xie. (2011).** Fate and transport of oil in sediment laden marine waters. *Journal of Hydro-Environment Research*. 5(3): 145-156.
35. **Lee K. (2002).** Oil-particle interactions in aquatic environments: influence on the transport, fate, effect and remediation of oil spills. *Spill Science & Technology Bulletin*. 8(1) : 3-8.
36. **Dachs, J., Lohmann, R., Ockenden, W.A., Méjanelle, L., Eisenreich, S.J. et Jones, K.C. (2002).** Oceanic biogeochemical controls on global dynamics of persistent organic pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 36 (20): 4229-4237.
37. **Prince R. C., R. M. Garrett, R. E. Bare, M. J. Grossman, T. Townsend, J. M. Suflita, K. Lee, E. H. Owens, G. A. Sergy, J. F. Braddock, J. E. Lindstrom ET R. R. Lessard. (2003).** The roles of photooxidation and biodegradation in long-term weathering of crude and heavy fuel oils ». *Spill Science & Technology Bulletin*. 8(2): 145-156.
38. **Park J.H., Zhao X. et Voice T.C. (2001).** Biodegradation of non-desorbable naphthalene in soils. *Environmental Science and Technology*. 35: 2734-2740.
39. **Bertrand J.C. et Mille G. (1989).** Devenir de la matière organique exogène. Un modèle: les Hydrocarbures. Microorganismes dans les écosystèmes océaniques. Bianchi

- M., Marty D., Bertrand J.C., Caumette P., Gauthier M.J. et al.éd.s. Masson publ. Paris: 343-385.
40. **Wilcke W. (2000).** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in soil- a *Review. Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163: p. 229-248.
  41. **Vogel T, Ballerii D. (2001).** Biorestauration des sols et des aquifères cotamiés par des hydrocarbures et des composes halogogées. *Bull.soc.Fr.Microbiol*, 16(3) : 204-209.
  42. **Heider, J., A. M. Spormann, H. R. Beller et F. Widdel. (1998).** « Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons ». *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 22, no 5, p. 459-473.
  43. **Spormann, A., et F. Widdel. (2000).** « Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria ». *Biodegradation*, vol. 11, no 2-3, p. 85-105.
  44. **Kumar Baduru Lakshman et Gopal Sai D. V. R. (2015).** Effective role of indigenous microorganisms for sustainable environment. *Biotech.* 5:867–876. DOI 10.1007/s13205-015-0293-6
  45. **Vogel T, et Ballerini D, (2001).** Biorestauration des sols et des aquifères contaminés par des hydrocarbures et des composés halogénés. *Bull.Soc.FR.Microbiol.* 16(3) : 204-209.
  46. **Ballerini D. et Vandecasteele J.P, (1999).** La restauration par voie microbiologique des sols contaminés par les polluants organiques. In : *Biotechnologie*, coordinateur R. Scriban, 5ème édition, Edition Tech et Doc, pp. 835-865.
  47. **Scriban R, (1999).** *Biotechnologie : restauration par voie biologique des sols.*
  48. **Soltani, M., (2004).** Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Doctorat en Chimie Analytique de l'université Paris 6, 284 p.
  49. **Gabet S, (2004).** Remobilisatio d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. *Thèse de doctorat de l'université de limoges, Spécialité Chimie et Microbiologie de l'Eau*, p.177.
  50. **Masten S.J. ET S.H.R. Davies, (1997)** Efficacy of in-situ ozonation for the remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soils, *J.comtam. Hydrol*, 28:327-335.

51. **Colin F, (2000)**.pollution localisée des sols et sous sols par les hydrocarbures et par les solvants chlorés, à l'initiative du comité de l'environnement de l'académie des sciences. rapport N° 44, *édition TEC et DOC*, p 417.
52. **Scriban R, (1999)**. Biotechnologie. 5ème édition, Tec et doc. Lavoisier, Paris, France.
53. **Lacomte P, (1995)**. Les sites pollués, traitement des sols et des eaux souterraines. *Edition lavoisier, TEC & DOC*,p 198.
54. **Leahy S.E, colwell R.R (1990)** .microbial Degradation of hydrocarbons in the Environment *microbial.Rav*.54:305-315.
55. **Girard M, Walter C, Berthelin N, More L. (2005)**.sol et environnement. Exercices et étude de cas. Dunod .p.799.
56. **Van Hamme J.D; Singh A, Ward O.P, (2003)**. Recent advances in pétroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67: 503- 549.
57. **Gabet S, (2004)**. Remobilisation d'd'Hydrocarbures Aromatiques(HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tenioactif d'origine biologique. These de dactorat l'uiversite de limoges. Spécialité Chimie et Microbiologie de l'Eau.P.177.
58. **Scriban R. (1999)**. Biotechnologie. 5eme édition. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris. P. 149-159.
- 59-**Liebeg E.W, Cutright T.J, (1999)**. The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macron nutrients in a PAH contaminated soil.*Int.Biodeter.Biodegr*, 44, 55-64.
- 60- **Straube W.L.N, Hansen C.C, Ringleberg L.D, Pritchard P.H, Jones- Meehan J, (2003)**, Remediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) through landfarminig with biostimulation and bioaugmetation. *Acta Biotechnology*, 23: 179-196.
- 61 - **Thiele-Bruhn S, Brummer G.W (2004)**. Fractioated extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from polluted soils: estimation of PHA fraction degradable through bioremediation. *Eur. J. Soil Sci*. 55: 567-578.
- 62- **Parales R.E, Bruce C.N, Schmide A, Wackett L.P, (2000)**. Biodégradation, Biotransformation, and biocatalysis (B3). *Appl.Environ. Microbiol*. 68 (10): 4699- 470.
- 63- **Roling W.F, de Brito Couto I.R, Swannell R.P, Head I.M. (2004)**. Response of Archaeal communities in beach sediments to spilled oil and bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 2614-2620.

- 64- **Sikkema J, DE bont J.A.M, Poolman B, (1995)**, Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*. 59: 201-222
- 65- **Marin M.M, Smits T.H.M, Van Beilen J.B, Roojo F, (2001)**. The alkane hydroxylase gene of *Burkholderia cepacia* RR10 is under catabolite repression control. *Journal OF Bacteriology* 183: 4202-4209.
- 66- **Bertrad J.C,Mille G. (1989)**. Devenir de la matière organique exogée. Un modèle : les hydrocarbures. In *microorganismes dans les écosystèmes océaniques*. Bianchi M . (ed). paris :Masson,pp.343-385.
- 67- **Phale P.S, Basu A, Majhi P.D, Deveryshetty J, vamsee-Krishnas C, Shrivastava R. (2007)**. Metabolic Diversity in Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* 11(3): 252-279.
- 68-**vandecasteele j .P, (2005)**. Les hydrocarbures naturels dans l'environnement. In *Microbiologie pétrolière*. Technip (ed). Paris : IFP publications, pp. 41-73.  
Microbiologie pétrolière, Ed technip .Volume 2.
- 69- **Whyte L. G., Hawari J., Zhou E., Bourbonniere L., Inniss W. E., Greer C.W. (1998)**. Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2578-2584.
- 70-**Ballerini et Vandecasteele (1999)** .Traitements biologique des sols .Technique de l'ingénieur, traité Environnement, G 2 620 : 1- 6 .
- 71-**Morgan p., Watkinson r.J et Ratledge C, (1994)**. Biodegradation of Components of petroleum .In: *Biochemistry of microbial degradation* .Ed Kluwer Academic Publishers.1-31.
- 72-**Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. and Gardan, L., (2000)**. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* .20: 51-63.
- 73- **Mavrodi, O.V., McSpadden Gardener, B.B., Mavrodi, D.V., Bonsall, R.F., Weller, D.M. and Thomashow, L.S., (2001)**. Genetic diversity of *phlD* from 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* species. *Phytopathol.* 91: 35-43.

74- **Haas, D., et C. Keel. (2003).** Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* **41**: 117-153.

75-**Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloemberg, G.V. and Lugtenberg. B.J.J., (2003).** Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytologist.* **157**:503–523.

76-**Chin-A-Woeng, T. F.C., Thomas-Oates, J. E., Lugtenberg, B. J.J. and Bloemberg, G. V., (2001).** Introduction of the *phzH* gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 extends the range of biocontrol ability of phenazine-1-carboxylic acid-producing *Pseudomonas* spp. strains. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**:1006-1015.

77-**Fenton, A.M., Stephens, P.M., Crowley, J. O'Callaghan, M. and O'Gara, F., (1992).** Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3873-3878

78-**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.

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

80-**Sneath, P. H. A., Stevens, M. and Sackin, M. J. (1981).** Numerical taxonomy of *Pseudomonas* based on published records of substrate utilization. *Antonie van Leeuwenhoek*, **47**:423–448.

- 81-**Oyaizu, H. and Komagata, K. (1983).** Grouping of *Pseudomonas* species on the basis of cellular fatty acid composition and the quinone system with special reference to the existence of 3-hydroxy fatty acids. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 29:17–40.
- 82-**Vancanneyt, M., Segers, P., Torck, U., Hoste, B., Bernardet, J.-F., Vandamme, P. and Kersters, K. (1996).** Reclassification of *Flavobacterium odoratum* (Stutzer 1929) strains to a new genus, *Myroides*, as *Myroides odoratus* comb. nov. and *Myroides odoratimimus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.*, 46:926–932.
- 83-**Achouak, W., Sutra, L., Heulin, T., Meyer, J.M., Fromin, N., Degraeve, S., Christen, R. and Gardan, L., (2000).** *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Syst. Evolution. Microbiol.*, 50 :9–18.
- 84-**Behrendt, U., Ulrich, A., Schumann, P., Meyer, J-M and Spröer, C., (2007).** *Pseudomonas lurida* sp. nov., a fluorescent species associated with the phyllosphere of grasses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 (5): 979-985.
- 85- **Ramesh R.; Joshi A. A.; Ghanekar M. P. (2009).** *Pseudomonads*: major antagonistic endophytic bacteria to suppress bacterial wilt pathogen, *Ralstonia solanacearum* in the eggplant (*Solanum melongena* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25:47–55
- 86-**Migula, W. (1894).** Über ein neues System der Bakterien. *Arb Bakteriol Inst Karlsruhe* 1, 235– 238 (in German).
- 87-**Peix, A., Berge, O., Rivas , Abril, A.and Velazquez E, (2005).** *Pseudomonas argentinensis* sp. nov., a novel yellow pigment-producing bacterial species, isolated from rhizospheric soil in Cordoba (Argentina). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:1107–1112.
- 88-**Le Minor L. and Véron M.(1989).** Bactériologie médicale. 2ème édition. Flammarion. Paris.

Annexe

**Annexe 1 : composition des milieux de cultures****Milieu de dénombrement et de conservation :****Gélose nutritive (GN)**

-Extrait de viande.....	1g
-Extrait de levure.....	3g
-Peptone.....	5g
-NaCl.....	5g
-Glucose.....	10g
-Agar.....	15g
-Eau distillée.....	1000ml
PH.....	=7.4

**Bouillon nutritif (BN)**

-Tryptone.....	10g
-Extrait de viande.....	5g
-Peptone.....	5g
-Chlorure de sodium.....	5g
PH.....	=7.2

**L'eau physiologique**

-Chlorure de sodium.....	9g
-Eau distillée.....	1000ml

**Les milieux King A et King B.****Milieu de King A (g/l)      Pour 1 litre de milieu :**

-Peptone .....	20,0g
-Glycérol .....	10,0g
-Sulfate de potassium.....	10,0g
-Chlorure de magnésium ..	;.....1,4g
-Agar .....	12,0g
PH .....	= 7,2

**Milieu de King B (g/l)**

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone.....	20,0 g
- Glycérol.....	10,0 ml
- Phosphate di potassique .....	1,5 g
- Sulfate de magnésium, 7 H <sub>2</sub> O .....	1,5g
- Agar bactériologique.....	15,0g
PH du milieu prêt- à- l'emploi à 25°C .....	7,2 ± 0,2

**Minéral Salt medium (MSM)**

Pour 1 litre de milieu:

-Nacl .....	10g
-MgSo <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> o .....	0.42g
-Kcl .....	0.29g
-KH <sub>2</sub> po <sub>4</sub> .....	0.83g
-Na <sub>2</sub> Hpo <sub>4</sub> .....	1.25g
-Na No <sub>3</sub> .....	0.42g
-Eau distillée .....	1000ml
PH.....	=7.2

**Milieu citrate de SIMMONS**

-sulfate de magnésium.....	0.2g
-milieu urée indole.....	01g
-milieu mannitol mobilité.....	01g

**Milieu de bouillon clark et lubs**

Pour 1 litre de milieu:

- Peptone.....	5g
- Glucose.....	5g
- Phosphate bipotassique.....	5g
- L'eau distillée.....	1l

**Milieu gélose à l'amidon**

- Peptones.....	5g/l
-----------------	------

- Amidon(1%).....10g/l
- Agar.....10g/l
- L'eau distillée.....1l

**Milieu viande de foie**

- Viande de foie.....30g /l
- Glucose.....2,0g/l
- Agar.....6, 0g/l
- L'eau distillée.....1l
- PH.....=7,4

**Annexe 2 : Les tableaux.**

**Les tableaux de Cinétique de croissance des souches bactériennes durant la biodégradation du pétrole**

**Souche C1**

jour	2 <sup>eme</sup> j	4 <sup>eme</sup> j	6 <sup>eme</sup> j	8 <sup>eme</sup> j	10 <sup>eme</sup> j
T	0,269	0,496	0,534	0,566	0,883
100%	53,2	31,9	29,2	28,7	13,1

**Souche C2**

jour	2 <sup>eme</sup> j	4 <sup>eme</sup> j	6 <sup>eme</sup> j	8 <sup>eme</sup> j	10 <sup>eme</sup> j
T	0,210	0,265	0,507	0,562	0,959
100%	61,7	54,4	31,1	27,4	10,7

**Souche C3**

jour	2 <sup>eme</sup> j	4 <sup>eme</sup> j	6 <sup>eme</sup> j	8 <sup>eme</sup> j	10 <sup>eme</sup> j
T	0,335	0,483	0,975	1,069	1,644
100%	46,2	32,9	10,6	8,5	2,3

**Souche C4**

jour	2 <sup>eme</sup> j	4 <sup>eme</sup> j	6 <sup>eme</sup> j	8 <sup>eme</sup> j	10 <sup>eme</sup> j
T	0,216	0,548	0,577	0,918	1,087
100%	60,8	28,3	26,5	12,1	8,2

**Souche C5**

jour	2 <sup>eme</sup> j	4 <sup>eme</sup> j	6 <sup>eme</sup> j	8 <sup>eme</sup> j	10 <sup>eme</sup> j
T	0,332	0,791	0,941	0,976	1,533
100%	46,5	16,2	11,4	10,6	2,9

**Souche C6**

jour	2 <sup>eme</sup> j	4 <sup>eme</sup> j	6 <sup>eme</sup> j	8 <sup>eme</sup> j	10 <sup>eme</sup> j
T	0,259	0,425	0,447	0,488	0,952
100%	55,0	37,6	35,7	32,5	11,2

**Souche C7**

jour	2 <sup>eme</sup> j	4 <sup>eme</sup> j	6 <sup>eme</sup> j	8 <sup>eme</sup> j	10 <sup>eme</sup> j
T	0,335	0,461	0,965	1,305	1,548
100%	46,2	34,6	10,8	5,0	2,8

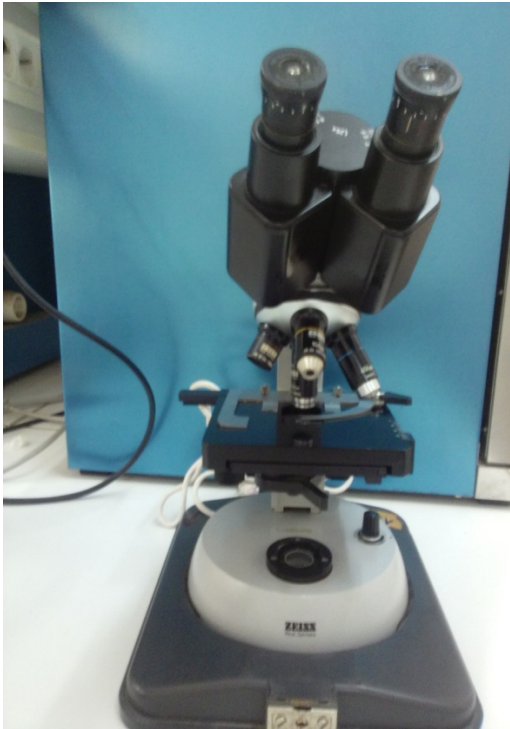
**Souche C8**

jour	2 <sup>eme</sup> j	4 <sup>eme</sup> j	6 <sup>eme</sup> j	8 <sup>eme</sup> j	10 <sup>eme</sup> j
T	0,224	0,339	0,524	0,826	1,169
100%	59,8	45,8	29,9	14,9	8,5

**Souche C9**

jour	2 <sup>eme</sup> j	4 <sup>eme</sup> j	6 <sup>eme</sup> j	8 <sup>eme</sup> j	10 <sup>eme</sup> j
T	0,268	0,602	0,708	0,811	0,860
100%	57,8	25,0	19,6	15,4	13,8

Annexe 3 : Les appareils



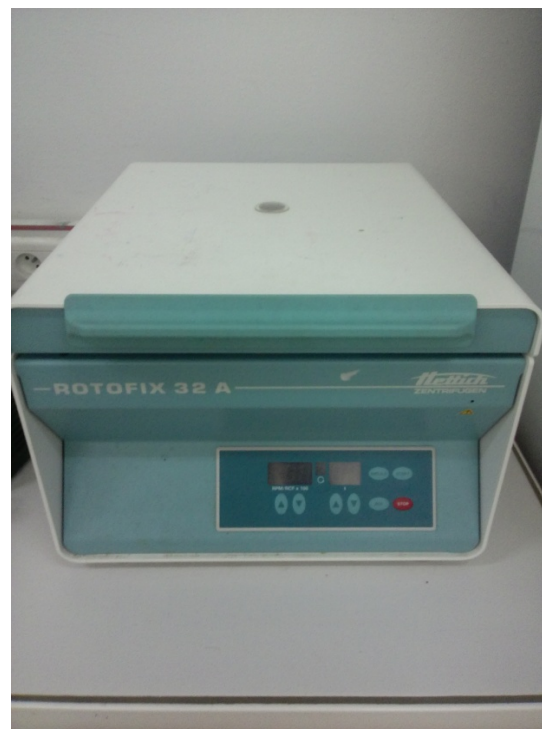
Microscope



spectrophotomètre



Cuve d'agitation



Centrifugeuse



Ph mètre