

Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de La Recherche Scientifique



Université de Ghardaïa

Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre  
Département de Biologie

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de**

**MASTER**

**Domaine :** Sciences de la nature et de la vie

**Filière :** Ecologie et environnement

**Spécialité :** Ecologie

**Par: BHAZ Amina**

**Thème**

**Capacité de biodégradation du pétrole brut par des  
bactéries autochtones isolées de sols contaminés**

**Soutenu publiquement le : .../.../2018**

**Devant le jury:**

<b>Mme. HAMID OUDJANA Aicha</b>	Maître de Conférences B	Univ. Ghardaïa	<b>Président</b>
<b>M. BELGHIT Saïd</b>	Maître de Conférences B	Univ. Ghardaïa	<b>Encadreur</b>
<b>M. BEN HAMMOUDA Hicham</b>	Technicien Supérieur	Univ. Ghardaïa	<b>Co-Encadreur</b>
<b>M. DIF Guendouz</b>	Maître Assistant A	Univ. Ghardaïa	<b>Examineur</b>

**Année universitaire 2017/2018**



## **Dédicace**

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Mes très chers parents*

*A celle qui m'a arrosé de tendresse et d'espoir, à la mère  
Qui ma bénie par ces prières .....Ma mère Houria.*

*A mon support dans ma vie, qui m'a appris a supporté et ma  
Dirigé vers la gloire .....Mon père Ramedan.*

*A mes adorables sœurs: Samah, Linda, Hayat, Masouda. Houda, Aicha*

*Et mes frères : Mohmmmed, Abdelmalek,*

*A Tous mes camarades surtout la promotion 2017/2018 Option Master II.*

*A toute ma famille.*

*A tous mes amis.*

*Ainsi qu'à tous ceux qui me sont chers.  
Tous qui m'ont aidé de proche ou de loin.*

## **Amina**



## Remerciement

Je tiens tout d'abord à remercier le bon Dieu de m'avoir aidé à réaliser ce travail en bon terme.

Je vous remercié mes très chers parents **maman** et **papa** sources de tendresse et de courage d'étude, d'être toujours à mes côtés de me soutenir, aimer, protéger et pour tous ce que vous avez fait pour moi.

Je remercie chaleureusement Dr. BELGHIT Saïd maitre de conférences à l'université de Ghardaïa d'avoir proposé ce thème et accepté de m'encadrer et pour son aide, ses orientations, ses conseils et ses corrections de ce mémoire.

Je tiens à remercier vivement les membres du Jury qui ont accepté d'évaluer mon travail:  
Mme HAMID OUDJANA A et M. DIF Guendouz

Je remercié l'ensemble des ingénieurs et techniciens supérieurs au niveau des laboratoires à l'université de Ghardaïa pour leur aide et leur disponibilité tout le temps.

Mention spéciale à M. Benhammouda Hicham de m'avoir co-encadré au sein du laboratoire, son aide, sa disponibilité et ses conseils scientifiques.

Enfin, un grand merci, à toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

**Merci**

# SOMMAIRE

Page

**DEDICACE**

**REMERCIEMENTS**

**SOMMAIRE**

**LISTE DES TABLEAUX**

**LISTE DES FIGURES**

**LISTE DES ABREVIATIONS**

**RESUME**

**ملخص**

**ABSTRACT**

**INTRODUCTION**

1

## **CHAPITRE 1 : Synthèse bibliographique**

1- Généralité sur le pétrole	4
1. 1.- Définition du pétrole	4
1. 2.- Caractères physiques et chimiques du pétrole	4
1.2.1- Caractère physique	4
1.2.1.1- La densité	4
1.2.1.2- La viscosité	5
1.2.1.3- Le point d'écoulement	5
1.2.1.4- Le point éclair	5
1.2.2- Caractère chimique	5
1.2.2.1- Hydrocarbures saturés	6
a- Alcanes linéaires	6
b- Alcanes ramifiés	6
c- Cyclo alcanes	6
1.2.2.2- Hydrocarbures aromatiques	6
1.2.2.3- Composés polaires	6
1.2.2.4- Asphaltènes	7
2.- Origine du pétrole	7
3.- Les type du pétrole	7
3.1.- Le pétrole non conventionnel	8
3.2.- Le pétrole conventionnel	8
3.2.1.- Fluide de forage pétrole	8
4.- Pollution de sol par le pétrole	8
4.1.-Définition de sol	8
4.2.-Composition de sol	9
5.- Extraction de pétrole	9
6.- Impacte des forages sur l'environnement	9
7.- Traitement du sol pollué par le pétrole	10
7.1.- Traitement physique (thermique)	10
7.2.- Traitement chimique	
7.2.1.- Oxydation chimique	11
7.3.- Traitement biologique	11
7.3.1.- Bioremédiation	11
7.3.1.1.- Méthodes de bioremédiation	11
7.3.1.1.1.- Bio augmentation	12
7.3.1.1.2.- Bio stimulation	12
7.3.1.1.3.- Bactéries dégradant le pétrole	12

7.3.2.- Les bio surfactants	13
7.3.2.1.- Définition de bio surfactant	13
7.3.2.2.- Type des bio surfactant	14
7.3.2.2.1.- Les surfactants anioniques	14
7.3.2.2.2.- Les surfactants non ioniques	14
7.3.2.2.3.-Les surfactants cationiques	14
7.3.2.3.- Classification	14
7.3.2.3.- Les glycolipides	14
7.3.2.3.2.- Lipopeptides et lipoprotéines	15
7.3.2.3.3.- Les phospholipides	15
7.3.2.3.4.- Les lipopolysaccharides ou polymériques	15
7.3.2.3.4.1.- Les acides gras et lipides neutres	15
7.3.2.4.- Application environnemental des bio surfactant	15
8.- Facteurs influençant la biodégradation de pétrole	15
8.1.- Facteur microbiens	15
8.2.- Nutriments	16
8.3.- Facteurs physico-chimiques	16
8.3.1.- L'aération	16
8.3.1.1.- Aérobies	16
8.3.1.2.- Anaérobie	16
8.3.2.- Humidité du sol	16
8.3.3.- Le pH	16
8.3.4.- Température	17
8.3.5.- Salinité	17
<b>CHAPITRE 2 : Matériel et méthodes</b>	
1.- Présentation de site d'étude	19
2.- Choix de station d'étude	20
3.- Prélèvement	20
4.- Séchage de sol	20
5.- Préparation de la solution mère	21
6.- Préparation des dilutions	21
7.- Culture des bactéries	21
8.- Dénombrement des bactéries	22
9.- Purification	22
10.- Conservation des souches purifiées	22
11.- Isolement des souches susceptibles à dégrader le pétrole	
12.- L'indice d'émulsion	23
13.- Identification des souches isolées	23
13.1.- Etude morphologique	23
13.1.1- Etude macromorphologique	23
13.1.2- Etude micro morphologique	24
13.1.2.1.- Coloration de GRAM	24
13.1.2.1.1.-Réalisation de la coloration	24
13.1.2.2.- Mannitol-Mobilité	24
13.2.- Etude biochimique	25
13.2.1.- Teste de catalase	25
13.2.2.- Teste d'oxydase	25
13.2.3.- Etude de type respiratoire	25
13.2.4.- Utilisation des galeries API	26

14. Suivi de la cinétique de croissance des souches sélectionnées	26
14.1.- Préculture	26
14.2.- Culture	26
15.-Tolérance des souches au pétrole	26
15.1.- Préculture	27
15.2.- Culture	27
<b>CHAPITRE 3 : Résultats et discussion</b>	
1.- Dénombrement de la microflore totale	29
1.1.- Résultats	29
1.2.- Discussion	29
2.- Origine des isolats bactériens sélectionnés	29
3.- Isolement des isolats susceptibles à dégrader le pétrole	30
4.- L'indice d'émulsion	31
4.1.- Résultats	31
4.2.- Discussion	33
5.-Caractérisation des isolats purifiés	33
5.1.- Aspect macroscopique	33
5.2.- Etude microscopique	34
5.2.1.-Résultats	34
5.2.2- Discussion	35
6.-Utilisation des schémas d'identification des principaux groupes bactérien	35
6.1.- Résultat et discussion	37
7.- Identification des souches sélectionnés	37
7.2.-Utilisation d'ABIS en ligne	39
7.2.1.- Résultats	39
7.2.2.- Discussion	39
8.-Suivi de la cinétique de croissance des souches sélectionnées	39
8.1.- Résultats	40
8.2.-Discussion	41
9.- Etude du pH	41
9.1.-Résultats	41
9.2.-Discussion	42
10.- Tolérance des souches au pétrole	42
10.1.- Résultats	42
10.2.- Discussion	43
<b>CONCLUSION</b>	45
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	47
<b>ANNEXE</b>	

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

USA :United States of America

pH : potentiel d'hydrogène

GN : gélose nutritive

MSM : mineral salt medium

VF : Viande foie

API : Analytical profile index

BCPL : LACTOSE BROTH WITH BROMOCRESOL PURPLE

ABIS : Abis advanced Bacterial identification software

UV : Ultra-violet

DO : Densité optique

UFC : Unité formant colonne

HAP: Hydrocarbure aromatique polycyclique

## LISTE DES TABLEAUX

	Page
<b>Tableau 01:</b> Les différents genres bactériens dégradant les hydrocarbures	13
<b>Tableau 02 :</b> Dénombrement de la microflore totale	29
<b>Tableaux 03 :</b> Origine des isolats sélectionnés	30
<b>Tableau 04 :</b> Calcul de l'indice d'émulsion sur le pétrole	31
<b>Tableau 05 :</b> Aspect macroscopique des colonies isolées	33
<b>Tableau 06 :</b> Observations microscopiques des isolats	34
<b>Tableau 07 :</b> Identification biochimique des isolats sélectionnés	38
<b>Tableau 08 :</b> Identification des souches à l'aide d'ABIS online –Bacterial identification	39



## LISTE DES FIGURES

	Page
<b>Figure 01</b> : Représentation schématique du devenir d'une pollution pétrolière à la surface du sol	09
<b>Figure 02</b> : Des molécules amphiphiles des surfactants	13
<b>Figure 03</b> : Limites administratives de wilaya de Ghardaïa	19
<b>Figure 04</b> : Résultat de l'indice d'émulsion des isolats isole a la zone de Noumrat	32
<b>Figure 05</b> : Résultat de l'indice d'émulsion des isolats isole a la zone de Metlili	32
<b>Figure 06</b> : Orientation préliminaire d'identification des souches M7, M4	36
<b>Figure 07</b> : Orientation préliminaire d'identification des souches M3, N12	36
<b>Figure 08</b> : Orientation préliminaire d'identification des souches N10, M13, N8, M10	37
<b>Figure 09</b> : Cinétique de croissance de la souche N6, M7 dans le milieu MSM avec 2 % de pétrole	40
<b>Figure 10</b> : variation du pH en fonction de temps pour la souche M7 durant la période de cinétique de croissance	41
<b>Figure 11</b> : variation de pH en fonction de temps pour la souche N6 durant la période de cinétique de croissance	42
<b>Figure 12</b> : Tolérance des souches N6, M7 au pétrole brut a différents concentration (5%, 10%, 15% et 20%)	42

## LISTE DES PHOTOS

	Page
<b>Photo 01</b> : Bourbier situé à Metlili « Gaada »_Ghardaïa	20
<b>Photo 02</b> : Bourbier situé à Noumerat _ Ghardaïa	20
<b>Photo 03</b> : Sol d'après le séchage	21
<b>Photo 04</b> : Agitation des tubes par vortex	21
<b>Photo 05</b> : compteur de colonies	22
<b>Photo 06</b> : Réactif pour la coloration de GRAM	24
<b>Photo 07</b> : La galerie API 20E avant incubation	26
<b>Photo 08</b> : Isolement des isolats susceptibles à dégrader le pétrole	31
<b>Photo 09</b> : Test d'émulsion du pétrole par les isolats sélectionnés après 24h	32
<b>Photo 10</b> : Aspect microscopique obtenu après la coloration de Gram (X100)	35

## RESUME

L'objectif de cette étude est d'évaluer la capacité de dégradation du pétrole par des bactéries autochtones isolées de sols contaminés à partir de deux bourbiers à base d'huile dans des zones de forage pétrolier dans la région de Ghardaïa.

Durant ce travail, après l'isolement d'un grand nombre de bactéries par la méthode de suspension dilution, vingt-six isolats ont été choisis en se basant sur des critères morphologiques à partir de deux échantillons de sol contaminés. Tous ces isolats ont été testés pour leur production des biosurfactants (indice d'émulsion E24), parmi eux dix ayant montré une capacité d'émulsionner le pétrole. Ces isolats ont été ensuite identifiés biochimiquement et morphologiquement. Les résultats montrent leur rapprochement aux genres suivants : *Stréptococcus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Proteus*. La suite d'identification des trois meilleures souches M5, M7 et N6 par des galeries API 20E montre que: la souche M5 se rapproche de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*, la souche M7 se rapproche de l'espèce *Proteus mirabilis* et la souche N6 se rapproche de l'espèce *Proteus myxofaciens*.

Pour la suite des travaux, nous avons sélectionné deux souches qui se sont avérées les meilleures : une de la zone de Metlili et l'autre de la zone de Noumérat, il s'agit de M7 (E24 100%) et N6 (E24 100%) respectivement. Leur cinétique de croissance montre que les deux souches possèdent un optimum de croissance au bout de 48 heures. L'étude de la tolérance au pétrole montre que les deux souches ont une croissance maximale jusqu'à 15% du pétrole.

**Mots clés :** Pétrole, biodégradation, isolats autochtones, bioremediation, bactérie, biosurfactant

## ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم قدرة تحليل البترول من طرف بكتيريا محلية معزولة من تربة ملوثة مأخوذة من المستنقعات النفطية في مناطق تنقيب مختلفة من منطقة غرداية.

خلال هذا العمل، و بعد عزل عدد كبير من البكتيريا، تم اختيار ستة وعشرين عزلة اعتماداً على معايير مورفولوجية إنطلاقاً من عينتين من التربة الملوثة. بين اختبار (E24) لجميع هذه العزلات لإبراز قدرتها على إنتاج مواد مستحلبة سطحية أن عشر منها لها القدرة على استحلاب النفط حيث تم تحديد تصنيفها الأولي كيميائياً ومورفولوجياً و تبين اقترابها من الأجناس التالية: *Streptococcus*، *Acinetobacter*، *Pseudomonas*، *Lactobacillus*، *Proteus*. باستعمال شرائط API 20<sup>E</sup> تم تحديد نوع أفضل ثلاث سلالات M5، M7 و N6 حيث تبين أن السلالة M5 تقترب من النوع *Pseudomonas aeruginosa*، السلالة M7 تقترب من النوع *Proteus mirabilis*، وأخيراً السلالة N6 على تقترب من النوع *Proteus myxofaciens*.

لمواصلة العمل، اخترنا أفضل سلالتين: الأولى معزولة من منطقة متليلى M7 و الثانية من منطقة النومرات N6 حيث أظهرت حركية النمو لهما بأن نموها الأمثل كان بعد 48 ساعة من التحضين. بعد دراسة تحمل النفط من طرف هاتين السلالتين تبين أن أقصى نموها يكون عند التركيز 15% من النفط.

**الكلمات المفتاحية:** بترول، تحليل بيولوجي، بكتيريا محلية، المعالجة الحيوية ، البكتيريا.

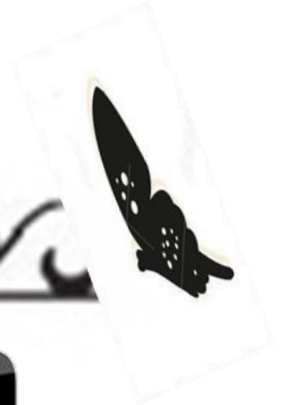
## ABSTRACT

The objective of this study is to evaluate the degradation capacity of oil by indigenous bacteria isolated from contaminated soils from two oil-drilling areas in the Ghardaia region.

During this work, after isolation of a large number of bacteria by the dilution suspension method, twenty-six isolates were selected based on morphological criteria from two contaminated soil samples. All these isolates were tested for their production of biosurfactants (E24 emulsion index), among them ten having shown an ability to emulsify oil. These isolates were subsequently identified biochemically and morphologically. The results show their association with the following genera: *Streptococcus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Proteus*. The identification of the best three strains M5, M7 and N6 by API 20E galleries shows that: the M5 strain is close to the *Pseudomonas aeruginosa* species, the M7 strain is close to the *Proteus mirabilis* species and the N6 strain is close to the species *Proteus myxofaciens*.

For the continuation of this work, we selected two strains which proved the best: one of the zone of Metlili and the other of the zone of Noumérat, it is about M7 (E24 100%) and N6 (E24 100 %) respectively. their growth kinetics shows that both strains have an optimum growth after 48 hours. The study of the tolerance to the oil shows that the two strains have a maximum growth up to 15% of the oil.

**Key words:** Oil, biodegradation, indigenous bacteria, bioremediation, bacteria, biosurfactant.



# Introduction



Avec un volume initial en place de 16 milliards de mètres cubes équivalent-pétrole découvert depuis 1948, date de la première découverte commerciale à Oued Guétérini, près de Sidi Aissa, en pleine zone des nappes, l'Algérie occupe le troisième rang parmi les pays producteurs de pétrole en Afrique, et le 12ème rang dans le monde (Attar et Hammat, 2009).

l'augmentation de l'activité du forage pétrolier dans le sud algérien et les bourbiers qui en résultent après l'utilisation des fluides de forage à base d'huile, provoquent des problèmes qui menacent la vie de l'homme, des animaux et des plantes (Belhabib *et al.*, 2013).

À partir de l'année 1990, l'Algérie recherche une stratégie pour éliminer les rejets pétroliers causés par les bourbiers des forages pétroliers. Pour cela, elle a créé des législations nationales pour la protection de son environnement et consent de grandes dépenses budgétaires pour trouver des solutions envers ces rejets. Mais jusqu'à maintenant, il reste une quantité liquide des rejets qui pénètre dans la nappe phréatique. Par contre, plusieurs pays, comme Qatar, Angola, ont trouvé des solutions définitives pour ces rejets à travers l'application du principe du forage sans bourbiers (0% décharges) (Boukhalifa et Tordjemani, 2017).

Les traitements mis en œuvre pour dépolluer les sols sont nombreux et depuis des années déjà, de nouvelles technologies sont en développement. Sur le terrain, les techniques de traitement thermiques et physico-chimiques, tandis que les procédés de traitement biologiques sont souvent considérés comme réservés à une catégorie restreinte de composés comme les hydrocarbures pétroliers légers ou adaptés à des conditions particulières (Abbia et Guitoun, 2014). Parmi les meilleures technologies de dépollution, La bioremédiation qui est l'utilisation de microorganismes pour détoxifier ou éliminer les polluants en raison de leurs diverses capacités métaboliques, c'est une méthode évolutive pour l'élimination et la dégradation de nombreux polluants environnementaux, y compris les produits de l'industrie pétrolière. La biodégradation par les populations naturelles de microorganismes représente l'un des principaux mécanismes par lesquels le pétrole et les autres polluants hydrocarbonés peuvent être éliminés de l'environnement (Das et Chandran, 2011; Kumar *et al.*, 2011). La bioremédiation reste la solution la plus efficace, la plus demandée car la mieux maîtrisée et la moins coûteuse. Il s'agit d'une technique douce dont le principe repose sur la minéralisation complétée des produits pétroliers qui ne génèrent aucun sous-produit toxique : contrairement aux procédés physicochimiques qui consistent souvent en un transfert de la pollution d'un milieu à un autre ou encore à son confinement (Akmoussi-Toumi, 2009).

Notre étude a pour objectifs d'isoler et de caractériser des bactéries hydrocarbonoclastes, et présentant un potentiel de production de bio surfactants à partir de sols pollués par des

Hydrocarbures au niveau de deux borbiers de rejet de fluide du forage dans les zones de Noumerate et Metlili à Ghardaïa.

Le présent manuscrit se subdivise en trois parties. La première représente une synthèse bibliographique portant sur des généralités sur le pétrole, la pollution des sols par le pétrole, et la dégradation microbienne du pétrole, la deuxième partie décrivant le matériel et les méthodes utilisés et la troisième partie est consacrée à la présentation et la discussion des résultats obtenus suivie d'une conclusion et perspective





**Synthèse**

**bibliographique**



## 1.- Généralités sur le pétrole

### 1. 1.- Définition du pétrole

Le pétrole brut est un liquide d'origine fossile qui est composé d'un mélange d'hydrocarbures présents dans certaine roche. Il peut être extrait et raffiné pour produire des combustibles comme l'essence, le kérosène, le diesel, etc (Miguel, 2006).

Le pétrole brut est un mélange liquide complexe d'hydrocarbures, c'est-à-dire de combinaisons chimiques de carbone (C) et d'hydrogène (H). Il est généralement extrait du sous-sol (bassins sédimentaires » où il occupe les vides de roches poreuses appelés « roches réservoirs ». Le pétrole brut contient de faibles quantités de soufre, ainsi que des traces d'azote, d'oxygène et de métaux (Haddad et Boudjada, 2015).

### 1. 2.- Caractères physiques et chimiques du pétrole

#### 1.2.1.- Caractères physiques

L'étude des propriétés physiques des hydrocarbures permet de distinguer les différents composés hydrocarbonés des pétroles bruts ou raffinés. Un produit raffiné est obtenu par distillation des pétroles bruts (Fattal, 2008).

Les caractères physiques sont :

##### 1.2.1.1.- La densité

Dans l'industrie pétrolière, on utilise la densité relative, comme étant le rapport du poids d'un certain volume d'échantillon à une température T au poids du même volume d'eau à une température standard. Le choix de l'état standard à 4°C permet l'identification des chiffres qui mesurent la densité et la masse volumique. La densité légale en France se mesure à 20°C et à pour symbole :

$$d_{4}^{20} = \frac{\text{poids d'un volume de produit à } 20^{\circ}}{\text{poids du meme volume d'eau à } 4^{\circ}}$$

Dans les pays anglo-saxon, la mesure de la densité se rapporte à celle de la spécifique gravité par hydromètre, ou celle par pycnomètre. Il faut souligner l'inversion du sens des mots spécifique gravité et densité qui signifient respectivement densité et masse volumique.

La spécifique gravité est définie pour deux températures standard identiques, soit 60°F

(environ 15°C) et a pour symbole : sp.gr ou sp.gr.60 /60 ou encore SG. Ainsi il ya une relation qui relie la SG60/60 à la densité  $d^{15}$  (Pierre, 1972).

### 1.2.1.2.- La viscosité

La viscosité est généralement définie comme étant la caractéristique de la résistance à l'écoulement d'un fluide ; elle intervient dans tous les phénomènes liés à l'écoulement des fluides :

- pertes de charge dans les tuyauteries
- écoulement dans les vannes, les soupapes et tous les types de restrictions
- pompage
- filtration – décantation

La viscosité est d'autant plus grande que la résistance à l'écoulement est élevée et, en raison des différentes méthodes de mesure utilisées pour la déterminer, on distingue deux types de viscosité : la viscosité dynamique et la viscosité cinématique. (Wakai, 2012).

### 1.2.1.3.- Le point d'écoulement

Le point d'écoulement des produits pétroliers (huiles, gasoil, fuel-oil) est la plus basse température à laquelle un produit contenu dans un tube à essai ne coule plus lorsque celui –ci est incliné. Ce point permet d'apprécier les limites de température à respecter dans la mise en œuvre des produits, en particulier, pour leur pompage en hiver, alors le point d'écoulement est une caractéristique particulièrement importante pour les produits pétroliers quand il s'agit de leur utilisation aux basses températures (Pierre, 1972).

### 1.2.1.4.- Le point éclair

Le point éclair est la plus basse température à laquelle les fractions d'hydrocarbures s'enflamment lorsqu'elles sont soumises à une étincelle. Certaines essences ont des points d'éclair à -40°C alors que le mazout, que l'on trouve communément dans une chaudière, à un point d'éclair aux alentours de 55°C (Fattal, 2008).

## 1.2.2.- Caractères chimiques

Le pétrole brut est parmi les mélanges les plus complexes des composés organiques qui se produisent sur la terre. Les progrès récents de la spectrométrie de masse à ultra-haute résolution ont permis d'identifier plus de 17 000 composants chimiques distincts et le terme de pétroleomique est inventé pour exprimer cette complexité récemment découverte (Hassanshahian et Cappello, 2013). La composition du pétrole brut varie selon les origines géographiques. Il est essentiellement constitué par des hydrocarbures paraffiniques, aromatiques et naphthéniques auxquels viennent s'ajouter des composés oxygénés, azotés et soufrés en proportions variables (Béghin, 2003).

Les hydrocarbures pétroliers sont classés comme suit :

### 1.2.2.1- 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 (n) varie entre 7 et 40 constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier) (Bertrand et Mille, 1989).

#### b) 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 isoprénoides (exemple: pristane, phytane) sont beaucoup moins nombreux. Ces composés se trouvent dans le pétrole brut dans des proportions sensiblement égales à celles des n-alcanes (Djerbaoui, 2011).

#### c) Cyclo alcanes

Les cyclo alcanes 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 (Soltani, 2004).

### 1.2.2.2- Hydrocarbures aromatiques

Plusieurs familles d'hydrocarbures aromatiques et poly aromatiques 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 (Bouderhem, 2011). En général, les hydrocarbures aromatiques sont moins abondants que les alcanes, et ne représentent que 10 à 30 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier (Soltani, 2004).

### 1.2.2.3- Composés polaires

Cette fraction correspond à des molécules hétérocycliques, telles que:

- Les composés oxygénés: phénols, acides carboxyliques, alcools, aldéhydes,...
- Composés soufrés: mercaptans, sulfures, disulfures,...
- Composés azotés: pyridines, quinoléines,...

Les dérivés soufrés sont dans la plupart des cas plus abondants que les composés oxygénés ou azotés (Soltani, 2004).

#### 1.2.2.4- Asphaltènes

Les asphaltènes sont constitués de molécules polycycliques à haut poids moléculaire, contenant des hétéroatomes tel que l'azote, le soufre et l'oxygène (Boukherissa, 2008).

### 2.- Origine du pétrole

Le pétrole est un mélange complexe d'hydrocarbures formés au cours de millions d'année ; par la décomposition anaérobique graduelle d'animaux ensevelis et de matière végétale (Sadek et Boutria, 2016). Les scientifiques pensaient jadis que le pétrole se formait essentiellement par réaction chimique entre des minéraux dans les roches profondes. En fait, il provient de restes d'innombrables êtres vivants marins accumulés au fond des océans au cours des temps géologiques. En mourant, ces micro-organismes (diatomées, foraminifères...) formant le plancton ont constitué, en se mêlant aux minéraux, d'épaisses couches de sédiments.

Pendant des millions d'années, par l'action de bactéries tout d'abord, puis sous l'effet de la pression et de la chaleur, ces restes organiques se sont transformés en pétrole. Celui-ci a ensuite migré à travers les roches pour s'accumuler dans des roches-réservoirs pour former des gisements (Maish, 2013).

Les hydrocarbures pétrole dans l'environnement peuvent avoir plusieurs origines :

- **Les hydrocarbures fossiles** : qui proviennent de la décomposition d'une grande quantité de matière organique coincée entre deux couches sédimentaires. Cela demande des caractéristiques géologiques passées spécifiques ce qui explique la faible quantité de ressources disponibles (Bekenniche, 2014).
- **Les hydrocarbures actuels** :  
Qui sont produits par des bactéries décomposant la matière organique. Cette production a lieu essentiellement dans les zones humides (tourbières, marais) et en quantité limitée. le changement climatique pourrait accroître cette production dans les zones actuellement gelée et relâcher de grandes quantités de méthane dans l'atmosphère terrestre ce qui accentuerait d'autant plus l'effet de serre (Djerbaoui, 2011).
- **Les rejets industriels et urbains** : qui sont les sources d'hydrocarbures pétroliers pyrolytiques (Soltani, 2004).

### 3.- Les type du pétrole

On distingue deux grands types : pétrole conventionnel et pétrole non conventionnel connus par ces densités (Sadek et Boutria, 2016).

### **3.1.- Le pétrole non conventionnel**

Le pétrole non conventionnel est un pétrole produit ou extrait en utilisant des techniques autres que la méthode traditionnelle de puits pétroliers, ou impliquant une et une technologie supplémentaires en raison de ses conditions d'exploitation plus difficiles. Les productions de type non-conventionnel comprennent : l'exploitation de sables bitumeux, de pétrole lourd, de schiste bitumineux, en offshore profond, en condition polaires. Si les deux derniers types de pétrole ne sont pas matériellement différents du pétrole conventionnel, en revanche les trois premiers, bien qu'ayant la même origine, ont eu une genèse différente (Agbon, 2013).

### **3.2.- Le pétrole conventionnel**

Les hydrocarbures de ce type formés au niveau de la roche-mère migrent vers une roche poreuse et perméable (appelée réservoir). Ils s'y accumulent et forment des gisements dont l'exploitation se fait par simple forage (Atlas, 1981).

#### **3.2.1.- Fluide de forage pétrole**

Le fluide de forage, appelé aussi boue de forage, est un système composé de différents constituants liquides (eau, huile) et/ou gazeux (air ou gaz naturel) contenant en suspension d'autres additifs minéraux et organiques (argiles, polymères, tensioactifs, déblais, ciments, ...) (Darley et Gray, 1988).

Le fluide est préparé dans des bacs à boues, il est injecté à l'intérieur des tiges jusqu'à l'outil d'où il remonte dans l'annulaire, chargé des déblais formés au front de taille (Khodja, 2008).

## **4.- Pollution de sol par le pétrole**

### **4.1.- Définition de sol**

Le sol est l'épiderme vivant de notre planète terre. A l'interface entre l'atmosphère, l'eau, les roches et le monde du vivant, il participe aux grands cycles d'énergie, d'eau et d'éléments (Girard *et al.*, 2011). Le sol est indispensable aux activités de l'homme ainsi qu'au fonctionnement des écosystèmes terrestres. Sa préservation constitue ainsi un enjeu majeur du développement durable. Il rend de nombreux services et se situe au carrefour de grands enjeux parfois concurrents : production d'aliments et de biomasse pour l'énergie et les matériaux, habitat pour de nombreux organismes vivants, support des infrastructures et des habitations humaines, recyclage des déchets par épandage, atténuation du changement climatique, voire participation à l'adaptation aux conséquences de ce changement, régulation des cycles de l'eau, filtration active des polluants vis-à-vis des eaux souterraines (Girard *et al.*, 2011).

## 4.2.-Composition de sol

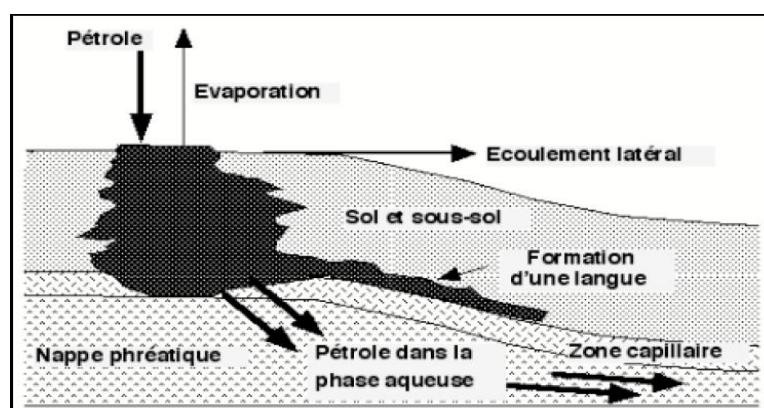
Le sol est un système hétérogène et complexe. Il est composé de 03 phases la première phase solide représentée par les particules du sol et une phase liquide représentée par l'eau du sol qui peut être enrichie en de nombreux composés et particules et la dernière phase une phase gazeuse constituée par l'air emprisonné dans le sol (Gabet, 2004).

## 5.- Extraction de pétrole

Les puits de forage utilisés pour la détection du pétrole servent également à son extraction. Au début de l'extraction, le pétrole jaillit naturellement ou est pompé artificiellement (extraction primaire). Lorsque la pression naturelle est épuisée ou insuffisante, des techniques artificielles peuvent être utilisées pour l'extraire plus rapidement : on injecte de l'eau ou du gaz pour déplacer le pétrole prisonnier de la roche poreuse (extraction secondaire). L'extraction tertiaire va encore plus loin et fait appel à des méthodes thermiques (injection de vapeur pour réchauffer le pétrole brut et réduire sa viscosité, ce qui le rend plus facile à pomper), des méthodes chimiques (recours à des détergents qui lavent littéralement l'huile de la roche), ou s'appuyant sur un mélange d'huiles plus légères dans les réservoirs profonds (ApplicaSciences, 2007).

## 6.- Impacte des forages sur l'environnement

Le devenir est déterminé par les propriétés physicochimiques intrinsèques de la substance, les quantités et les vitesses d'émission dans l'écosystème et par les propriétés physiques, chimiques, biologiques de l'environnement. Parmi les propriétés intrinsèques, généralement considérés comme critiques dans l'évaluation du risque potentiel d'une substance, on peut citer la structure moléculaire, la solubilité dans l'eau et les solvants, la pression de vapeur, la taille des particules et le spectre d'adsorption (ultraviolet et visible), ainsi que les capacités d'adsorption sur les solides et l'effet éventuel d'agents dispersants. Parmi les différentes altérations que peut subir un hydrocarbure, on cite les facteurs environnementaux qui sont (figure 01) (Benchouk, 2017).



**Figure 01** : Représentation schématique du devenir d'une pollution pétrolière à la surface du sol (Morgan et Watkinson, 1989).

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 (Gabet, 2004). Aux polluants transitant par les cours d'eau s'ajoutent ceux provenant des territoires proches de la mer. Ils peuvent avoir une origine diffuse (principalement agricole) ou ponctuelle (stations d'épuration industrielles ou urbaines) (Benchouk, 2017).

L'ère industrielle a engendré une pollution importante des sols et sous-sols par des mélanges complexes de substances organiques et inorganiques parmi lesquelles on retrouve les hydrocarbures, les solvants chlorés, les métaux, etc. ... Ces pollutions issues pour la plupart de déversements accidentels ou ponctuels résultant de comportements délibérés ou non, de fuites de réservoirs de stockage constituent un problème environnemental majeur notamment terme de risque de transfert d'hydrocarbures vers les nappes phréatiques, mais également un risque humain non négligeable (Gautier, 2007).

## **7.- Traitement du sol pollué par le pétrole**

Le phénomène de pollution par les hydrocarbures a une importance de plus en plus grande sur les plans environnemental, sanitaire et économique. Cette pollution peut avoir un impact soit direct ou indirect, sur la santé humaine et l'équilibre des écosystèmes aussi bien marins que continentaux. La qualité des sols peut également en être altérée (Bouderhem, 2011).

La dépollution peut être mise en œuvre à travers quatre grands types de méthodes, associant éventuellement la combinaison de plusieurs techniques (Naidu, 2003 ; Gan *et al.*, 2009).

### **7.1.- Traitement physique (thermique)**

Deux techniques *ex situ* sont utilisées, l'incinération et la désorption thermique. Elles sont employées pour la décontamination des sols pollués par les produits organiques. Ces technologies consistent à utiliser les hautes températures pour réduire les polluants en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O (Lecompte, 1995).

### **7.2.- Traitement chimique**

Les méthodes chimiques telles que l'oxydation ou la neutralisation ont pour but de détruire les polluants ou de les transformer en une forme moins nocive pour l'environnement, en provoquant des réactions chimiques entre le polluant et le réactif ajouté. Ils peuvent être applicables *in-situ* ou après excavation des sols (Ballerini et Vandecasteele, 1999).



La majorité des procédés de traitements chimiques exigent que les sols soient sous forme de boues où les contaminants soient mobilisés dans un milieu liquide (Gabet, 2004).

### 7.2.1.- Oxydation chimique

La technique d'oxydation chimique est largement répandue dans les pays industrialisés. Cette technique consiste en une dégradation des contaminants en contact avec des réactifs oxydants injectés dans la zone de sols contaminés (in-situ) ou mélangés dans un conteneur adapté (ex-situ) (Dueso *et al.*, 2009). L'oxydation chimique in-situ consiste à injecter sous pression un produit oxydant (ozone, peroxyde, etc.) à l'intérieur de la matrice des sols contaminés, que la zone soit saturée ou non. Les polluants peuvent être totalement dégradés (minéralisation) ou partiellement (sous-produits plus biodégradables). Ce traitement chimique permet de générer des réactions dans la zone contaminée de façon à modifier les produits toxiques en produits qui ne nuisent pas à l'environnement (Dufresne, 2013).

### 7.3.- Traitement biologique

Les techniques de traitement à identifier et à caractériser dans le cadre de cette étude sont les techniques biologiques, c'est-à-dire les techniques qui exploitent les propriétés d'un organisme vivant pour réaliser l'opération de dépollution (Ademe, 2006).

Pour la dégradation des hydrocarbures, différents micro-organismes sont utilisés tels que *Arthrobacter*, *Novocardiaou pseudomonas*. Si la flore locale est inadaptée à la dégradation des polluants ou est peu abondante, des souches bactériennes performantes allochtones peuvent être ajoutées au sol (Bekenniche, 2014).

Cette technique présente beaucoup d'avantages, à savoir le faible coût de traitement et la faible production de déchets et d'effluents, mais a l'inconvénient du risque de contamination de la chaîne alimentaire en plus de la longue durée du traitement (plusieurs mois, voire, dans certain cas, plusieurs années) (Khodja, 2008).

#### 7.3.1.- Bioremédiation

La bio remédiation est une technique de traitement biologique des sols pollués qui emploie des microorganismes en tant qu'agents de dégradation de la pollution. La bio remédiation est définie par l'utilisation d'organismes vivants pour détruire les polluants environnementaux. Elle a été appliquée au traitement de contaminations inhabituelles (Perr, 2001) par l'activité des bactéries l'action de leur condition de prolifération (Koller, 2004).

##### 7.3.1.1.- Méthodes de bioremédiation

Il existe deux principales méthodes de la bio remédiation: la bio augmentation et la bio stimulation (Benchouk, 2017).

#### **7.3.1.1.1.- Bio augmentation**

Cette technologie consiste à introduire des cultures de microorganismes au milieu contaminé dans l'objectif d'augmenter la biodégradation des hydrocarbures. La technique repose sur l'addition d'une souche bactérienne pure pré-adaptée; ajout d'un consortium pré-adapté; introduction de bactéries génétiquement modifiées; et l'addition de gènes pertinents de biodégradation conditionnés dans un vecteur à transférer par conjugaison dans des micro-organismes indigènes (El Fantroussi et Agathos, 2005). Généralement les microorganismes sont sélectionnés sur la base de leur aptitude métabolique à dégrader les hydrocarbures et également sur leurs caractéristiques essentielles qui permettent aux cellules d'être fonctionnellement actives et persistantes dans les conditions environnementales souhaitées. La meilleure approche pour la sélection des microorganismes compétents doit être basée sur la connaissance préalable des communautés microbiennes qui habitent sur le site à dépollué (Thompson *et al.*, 2005; Van der Gast *et al.*, 2004).

#### **7.3.1.1.2.- Bio stimulation**

La biodégradation des hydrocarbures dans le sol peut être limitée par de nombreux facteurs, y compris les nutriments, le pH, la température, l'humidité, l'oxygène, les propriétés du sol et la présence de contaminants (Atagana, 2008; Al Sulaimani, 2010; Bundy *et al.*, 2002). La bio stimulation implique la modification de l'environnement pour stimuler l'activité des populations microbiennes autochtones du sol par l'ajout des nutriments notamment l'azote, le phosphore, l'oxygène ou le carbone (par exemple sous forme de mélasse) au site contaminé, ils sont par ailleurs disponibles en quantités suffisamment faibles ce qui limite l'activité microbienne (Guerin, 1999; Roling *et al.*, 2002; Delille *et al.*, 2004; Kalantary *et al.*, 2014).

#### **7.3.1.1.3.- Bactéries dégradant le pétrole**

Dans le sol, les bactéries sont les micro-organismes les plus abondants et les plus actifs. En fonction des propriétés physico-chimique du sol ; tous les types physiologiques bactériens sont représentés dans la microflore tellurique : Autotrophes et hétérotrophes, thermophiles et psychrophiles, aérobies, anaérobies facultatifs et anaérobies très répandus, les actinomycètes jouent un rôle important dans la décomposition de la matière organique. Certaines espèces d'actinomycètes du genre *Streptomyces* produisent la géosmine, un composé volatil qui donne au sol son odeur terreuse caractéristique (Bousseboua, 2005). La biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes appelés « Hydrocarbonoclastes » a été mise en évidence dès 1946 par ZoBell. L'existence d'organismes susceptibles de métaboliser les hydrocarbures a été signalée dès le début du 20<sup>ème</sup> siècle par Sohgen (Gatellier, 1970). En revanche, la culture de bactéries étant plus rapide,

ajouté au fait que les bactéries assimilent mieux certaines molécules, l'usage de ces dernières est préféré. Dans cette optique, cette synthèse traitera donc des bactéries dégradant les hydrocarbures. Lorsque l'on nomme les bactéries capables de dégrader les hydrocarbures, presque tous les clades phylogénétiques sont représentés. Aussi, on retrouve aussi bien des bactéries Gram négatives que des bactéries Gram positives (Techer, 2011).

On peut y retrouver tous les types de bactéries, des autochtones, des hétérotrophes, des aérobies ; des anaérobies ; des mésophiles ; des psychrophiles et des thermophiles. De nombreux genres bactériens ont été recensés et décrits comme aptes à dégrader des hydrocarbures (Tarayre, 2012).

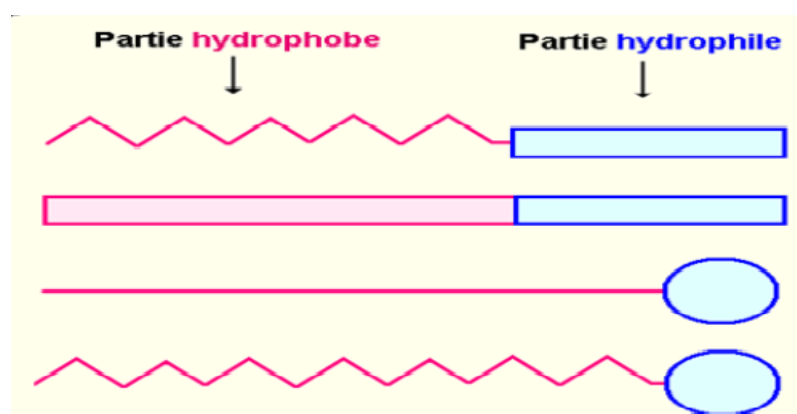
**Tableau 01:** Les différents genres bactériens dégradant les hydrocarbures (Tarayre, 2012).

<i>Aeromonas</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Achromobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Actinomyces</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Alcanivorax</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Beneckea</i>	<i>Brevibacterium</i>
<i>Burkholderia</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Cycloclasticus</i>	<i>Cytophaga</i>	<i>Erwinia</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Leucothrix</i>	<i>Micrococcus</i>
<i>Moraxella</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Myxobacterium</i>	<i>Peptococcus</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Sarcina</i>	<i>Serratia</i>	<i>Shewanella</i>
	<i>Spherotilus</i>		<i>Xanthomonas</i>	

### 7.3.2.- Les bio surfactants

#### 7.3.2.1.-Définition de bio surfactant

Les bio surfactants sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe non polaire (figure 02). Généralement, le groupement hydrophile est constitué d'acides aminés, peptides ou de polysaccharides (mono ou di) ; le groupement hydrophobe est constituée d'acides gras saturés ou non saturés (Desai et Banat, 1997).



**Figure 02 :** Représentations les plus utilisées pour illustrer les deux parties (hydrophile et hydrophobe) des molécules amphiphiles des surfactants (Larpent, 2000).

### **7.3.2.2.-Type des bio surfactant**

#### **7.3.2.2.1.- Les surfactants anioniques**

Sont dissocié dans l'eau à un anion amphiphile et un cation qui est en général un métal alcalin de (Na +, K +) ou un ammonium quaternaire. Ils sont les surfactants les plus couramment utilisés. Ils comprennent des alkyl benzène sulfonâtes (détergents), acides gras (savons), (acides gras) de savons, de lauryl sulfate (agent moussant), sulfosuccinate de di-alkyl (agent mouillant), lignosulfonates (dispersants) etc....Les surfactants anioniques représentent environ 50% de la production mondiale (Gherbal, 2014).

#### **7.3.2.2.2.- Les surfactants non ioniques**

Ils ne s'ionisent pas en solution aqueuse, en raison de leur groupe hydrophile est d'un type non dissociable, tel qu'un alcool, phénol, éther, ester, ou amide. Une grande proportion de ces surfactants non ioniques sont rendu hydrophile par la présence d'une chaîne de polyéthylène glycol, Obtenu par la polycondensation de l'oxyde d'éthylène. Ils sont appelés non ioniques polyéthoxylés (Gherbal, 2014).

#### **7.3.2.2.3.- Les surfactants cationiques**

Sont dissociées dans l'eau en un amphiphile cationique et un anion, le plus souvent de type halogène. Une très grande proportion de cette classe correspond à des composés azotés tels que les sels d'amines grasses et les ammoniums quaternaires, avec un ou plusieurs longue chaîne du type alkyle, souvent provenant d'acides gras naturels. Ces bio surfactants sont en général plus (Gherbal, 2014).

### **7.3.2.3.- Classification**

Les bio surfactants sont classés suivant la nature biochimique du surfactant produit par le micro-organisme. On distingue cinq grandes classes de bio surfactants : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les liposaccharides et les lipides neutres (Healy *et al.*, 1996).

#### **7.3.2.3.1.- Les glycolipides**

Les glycolipides sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acides hydroxy aliphatiques. Les glycolipides les plus étudiés sont les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides (Ron et Rosenberg, 2002).

### 7.3.2.3.2.- Lipopeptides et lipoprotéines

Les lipopeptides sont composés d'un lipide attaché à une chaîne polypeptide (Rosenberg et Ron, 1999). Parmi les bio surfactants bactériens de nature lipopeptidique, on distingue: La surfactine et La lichenysine et Les lipoamino-acides (Gherbal, 2014).

### 7.3.2.3.3.-Les phospholipides

Les phospholipides sont formés de groupements alcool et phosphate et de chaîne lipidique (Healy *et al.*, 1996). (Bognolo, 1999), indique que bien que sont présents dans tous les micro-organismes, il y a peu d'exemples de production extracellulaire.

### 7.3.2.3.4.- Les lipopolysaccharides ou polymériques

Sont constitués d'une ou plusieurs unités saccharides et d'acides gras (Healy *et al.*, 1996).

### 7.3.2.3.4.1- Les acides gras et lipides neutres

Sont les bio surfactants qui possèdent la masse molaire la plus élevée (Healy *et al.*, 1996). Du fait de leur forte production et de leurs propriétés tensioactives importantes, les bio surfactants les plus communs et les plus étudiés sont les glycolipides et les phospholipides (Desai et Banat, 1997).

### 7.3.2.4.- Application environnemental des bio surfactant

Application de bio surfactants dans dès La récupération du pétrole est l'une des méthodes avancées les plus prometteuses pour récupérer une part significative de la huile résiduelle. Le pétrole restant est souvent situé dans des régions du réservoir difficiles d'accès et l'huile est piégée dans les pores par la pression capillaire (Sen, 2008). Les agents de surface bio sources réduisent la tension interfaciales entre huile / eau et huile / roche. Cela réduit les forces capillaires empêchant le pétrole de traverser pores rocheux. Les agents bio surfactants peuvent également se lier étroitement à l'interface huile-eau et former une émulsion. Cela stabilise l'huile désorbée dans l'eau et permet l'élimination de l'huile avec l'eau d'injection (Suthar *et al.*, 2008).

## 8.- Facteurs influençant la biodégradation de pétrole

### 8.1.- Facteur microbiens

Ce facteur consiste à augmenter, dans le site contaminé, le niveau des populations microbiennes aptes à dégrader le xénobiotique, soit par renforcement des populations autochtones, soit par introduction de nouvelles populations (inoculation) (Pierre et Vincent, 2000).

## 8.2.- Nutriments

Les nutriments sont indispensables à l'activité et au développement des micro-organismes. Ce sont des corps simples qui peuvent être assimilés, sans transformation digestive par les organismes et favoriser la croissance des populations de bactéries. Les plus importants sont l'azote et le phosphore (Blifert et Perraud, 2004).

## 8.3.- Facteurs physico-chimiques

### 8.3.1.- L'aération

#### 8.3.1.1.- Aérobie

La biodégradation aérobie se fait au cours d'une respiration bactérienne utilisant l'oxygène comme accepteur terminal d'électrons. Ce métabolisme met en œuvre des mono- ou di-oxygénases qui attaquent les molécules par addition d'oxygène (Mounier, 2013).

La biodégradabilité d'une substance organique, est le degré de mobilité physique et chimique que subi cette matière organique provoquer par des microorganismes.

Celle-ci peut être affectée par la modification de l'un des facteurs suivants:

- Vitesse de dégradation des composés organiques
- Quantité d'oxygène consommée
- Produits résultant de la dégradation
- Activité microbienne (Zhanpeng et Hongwei, 2002).

#### 8.3.1.2.- Anaérobie

En absence d'oxygène, les bactéries métabolisent les HAP par voie anaérobie, mais beaucoup plus lentement qu'en aérobie (Martin, 2011).

L'activité métabolique des microorganismes produit des substances organiques simples non complètement oxydées telles que des acides organiques et d'autres composés comme le méthane et l'hydrogène gazeux (King, 1992).

### 8.3.2.- Humidité du sol

L'humidité est un paramètre important dans le processus de la biodégradation car l'eau est un élément indispensable au développement des bactéries. Les bactéries sont influencées par la concentration osmotique et la disponibilité en eau dans le sol, pour cela (Djerbaoui, 2011), (Gabet, 2004) a signalé que pour une meilleure activité de biodégradation, l'humidité doit être de 25 à 90%.

### 8.3.3.- Le pH

L'activité microbienne est largement influencée par le pH. Il doit être situé entre 5 et 9 avec un optimum aux alentours de 7 (Gabet, 2004). Si le pH est acide, il peut favoriser la solubilisation des métaux lourds qui sont très toxiques pour les bactéries (Bouderhem, 2011).

#### **8.3.4.- Température**

La température peut avoir un effet marqué sur la dégradation des hydrocarbures. En effet, la température influence l'état physique des hydrocarbures, ainsi que la composition et l'activité de la communauté microbienne qui se reflète sur le taux de dégradation des hydrocarbures (Atlas, 1981). La température optimale pour la biodégradation est située entre 20 et 30°C (Margesin et Schinner, 1997).

#### **8.3.5.- Salinité**

La salinité est un paramètre affecte la biodégradation, alors que la forte salinité diminue le nombre de micro-organismes dans le sol qui est ralenti les processus de l'humification et de la minéralisation des matières organiques. En effet, de tous les processus biologiques, la nitrification est la plus touchée, ainsi que le dégagement de CO<sub>2</sub>. Les fortes salinités constituent donc une barrière naturelle pour la biodégradation (Bertrand *et al.*, 1993).



**Matériel**

**&**

**méthodes**





## 1.- Présentation de site d'étude

La wilaya de Ghardaïa est située dans la partie sud du pays à 600 km au Sud de la capitale, Alger. Est assise sur une superficie de 86.560 km<sup>2</sup>, Elle a les coordonnées géographiques suivant : entre 4° et 7° de longitude Est et 35° et 36° de latitude Nord.

Elle est limitée:

Au Nord par la wilaya de Laghouat.

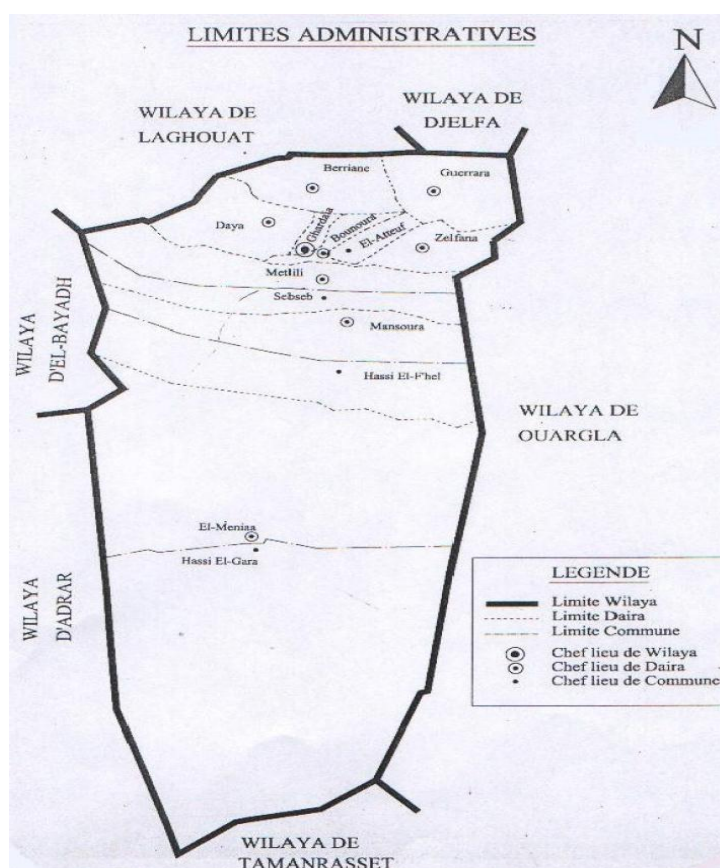
Au Nord Est par la wilaya de Djelfa.

A l'Est par la wilaya d'Ouargla.

Au Sud par la wilaya de Tamanrasset.

Au sud-ouest par la wilaya d'Adrar.

A l'Ouest par la wilaya d'El Bayadh



**Figure 03 :** Limites administratives de wilaya de Ghardaïa (Rezzag et Ben Yahkoum, 2005).

## 2.- Choix de station d'étude

Deux forages du pétrole ont été ciblés : La station de Metlili « Guaada » (photo 01) et celle de Noumerat (photo 02). Elles sont choisies comme lieu de prélèvement des échantillons du sol pour l'isolement des bactéries.

## 3.- Prélèvement

Un échantillon de sol est prélevé (environ 200 g) à une profondeur de 20 cm de chaque station d'étude qui est au voisinage des puits de pétrole (environ 20 cm) à une température de 12°C à la zone de Metlili et de 9°C à la zone de Noumerat. Les deux échantillons sont conservés dans des flacons stériles à température ambiante.



**Photo 01** : Bourbier situé à Metlili « Guaada »\_Ghardaïa



**Photo 02** : Bourbier situé à Noumerat \_ Ghardaïa

## 4.- Séchage de sol

Afin de dénombrer les microorganismes contenus dans un gram de sol sec nous avons pris une quantité de sable environ 100g. Après un tamisage de cette quantité de sol a été mise dans un verre de montre (photo 3), ensuit a été incubée pendant 2 jours sous une température de 50°C



**Photo 03 :** Sol après le séchage.

### 5.- Préparation de la solution mère

Pour préparer la solution mère on prend les deux échantillons de sol ; 1 g de sol est pesé puis introduit dans un tube à essai contenant 9 ml de l'eau distillée préalablement autoclavée. Le tube est ensuite agité pendant 2 minutes en vortex.

### 6.- Préparation des dilutions

Après la préparation de la solution mère, une série des dilutions variante de  $10^{-1}$  à  $10^{-7}$  a été préparée ; tout d'abord 1ml de la dilution  $10^{-1}$  a été prélevé et mis à l'aide d'une micropipette dans un tube contenant 9 ml d'eau stérile (dilution  $10^{-2}$ ) en suite 1ml de la dilution  $10^{-2}$  a été prélevé et mis dans un autre tube contenant 9 ml d'eau stérile (dilution  $10^{-3}$ ) et ainsi de suite jusqu'à la dilution  $10^{-7}$ . Pour chaque dilution il y a une agitation de tube par vortex (photo 04).



**Photo 04 :** Agitation des tubes par Vortex

### 7.- Culture des bactéries

Dans cette étape nous avons coulé le milieu GN dans des boîtes de Pétri (28 boîtes). Après solidification du milieu un volume de 100µl de chaque dilution a été pris et étalé à l'aide d'un

étaloire dans une boîte de Pétri. L'opération est répétée 2 fois. Les boîtes de pétri sont après mises dans l'étuve à 30 °C pendant 24

### 8.- Dénombrement des bactéries

Après 24h à 48h d'incubation à 30°C, les colonies développées sont dénombrées à l'aide d'un compteur de colonies (photo 05). Le calcul du nombre des microorganismes en tenant compte des facteurs de dilution est effectué sous la formule ci-dessous :

$$N = \frac{n}{d \times v}$$

N : nombre des microorganismes

n : nombre de colonie

d : dilution

v : volume 0.1ml



**Photo 05** : compteur des colonies

### 9.- Purification

Il est important de faire une bonne purification pour isoler un micro-organisme pur. Ceci est atteint par repiquages répétés sur gélose nutritive par la méthode d'ensemencement par strie. L'opération de purification est renouvelée à deux reprises en prenant chaque fois une colonie bien isolée sur gélose. Ceci conduit à l'obtention d'une culture pure vérifiée par observation macroscopique et microscopique.

### 10.- Conservation des souches purifiées

Une colonie est prélevée de la souche pure trouvée dans la boîte de pétri à l'aide de lance platine et ensemencée dans des tubes inclinés de gélose nutritive puis conservée à 4°C.

## 11.- Isolement des souches susceptibles à dégrader le pétrole

Pour isoler les souches susceptibles à dégrader le pétrole, on ensemence des tubes à essai contenant chacun 5 ml du milieu MSM préalablement autoclavé puis additionné à raison 2 % (0.1ml) du pétrole est filtré par micro filtre de 0.22um. On ajoute l'inoculum à l'aide d'une anse de platine à partir de la boîte de pétri contenant la souche bactérienne pure, on ferme les tubes puis on les incube à une température de 30°C, sous agitation de 140 rpm pendant 24 heures. Après incubation, on examine les tubes pour la présence ou l'absence de turbidité dans chaque culture. On note les observations sur l'apparence du milieu, claire ou trouble (Cappuccino et Welsh, 2017).

## 12.- L'indice d'émulsion

L'indice d'émulsion permet de vérifier la capacité des souches à émulsionner une phase hydrophobe (pétrole) dans une phase hydrophile (le milieu de culture). Les souches avec des indices d'émulsification supérieurs à 50% ont été définies comme des producteurs potentiels de biosurfactants. Le test consiste à mélanger 3 ml de culture bactérienne avec 2 ml du pétrole (60/40 v/v) précise dans des tubes stériles. Les tubes sont agités au vortex pendant deux minutes et laissés au repos pendant 24 heures à température ambiante. Après 24 heures on mesure la hauteur de l'émulsion et on calcule l'indice d'émulsification E24 selon équation suivante (Bodour *et al.*, 2004).

$$E24 = \frac{he}{ht} \times 100$$

he : hauteur d'émulsion.

ht : hauteur totale.

## 13.- Identification des souches isolées

Les souches isolées sont identifiées par des études morphologique et biochimique.

### 13.1.- Etude morphologique

#### 13.1.1- Etude macromorphologique

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une Première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification. D'après (Singleton, 1999), les éléments d'identifications macroscopiques sont:

- La forme des colonies : rondes, irrégulières,...etc.
- La taille des colonies par la mesure du diamètre.
- La Chromo genèse: couleur de la colonie.
- L'élévation: convexe, concave, plate.
- L'opacité: opaque, translucide ou transparente.

- La surface: lisse, rugueuse, sèche, dentelée,...etc.

### 13.1.2- Etude micro morphologique

Il servira à rechercher les micro-organismes, à étudier la morphologie, à voir des spores, des capsules, à noter l'existence et le type de la mobilité.

#### 13.1.2.1.- Coloration de GRAM

Coloration de GRAM 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 qui apparait dans la photo au-dessus (photo 06). 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).



**Photo 06** : Réactifs et colorants de la coloration de GRAM

#### 13.1.2.1.1.-Réalisation de la coloration :

1-Coloration primaire : Coloration par cristal violet. Laisser agir de 2 minutes. Rincer à l'eau distillée

2- Etaler le lugol et laisser agir 2 minutes; Rincer à l'eau distillé.

3- Décoloration à l'éthanol: verser goutte à goutte l'éthanol sur la lame inclinée obliquement, et surveiller la décoloration (30 secondes). Rincer sous un filet d'eau distillée.

4- Contre-coloration à la fuchsine. Laisser agir de 2 minutes. Laver doucement à l'eau distillée. Sécher la lame.

#### 13.1.2.2.- Mannitol-Mobilité

Il s'agit d'un milieu semi-solide contenant entre autres du mannitol, et du rouge de phénol comme indicateur de pH. Lorsque l'indicateur coloré passe du rouge au jaune, ce qui correspond à l'acidification du milieu, le mannitol est utilisé. Le caractère mobile est défini dans ce milieu par un

trouble envahissant toute la largeur de la gélose de part et d'autre de la piqûre centrale, alors qu'une bactérie immobile ne se développe que le long de la piqûre centrale (Denis *et al.*, 2011).

## 13.2.- Etude biochimique

### 13.2.1.- Teste de catalase

La catalase est une 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:



Sur une lame et à l'aide d'une pipette Pasteur, on dépose une colonie bactérienne à laquelle on ajoute de l'eau oxygénée (à 10 volumes). La présence d'une catalase est révélée par l'apparition immédiate de bulles de gaz qui correspond à l'oxygène dégagé (Tortora *et al.*, 2003).

### 13.2.2.- Teste d'oxydase

Ce test permet la détection de la phénylène-diamine-oxydase ou le cytochrome oxydase; enzyme entrant dans divers couples d'oxydoréduction. Agissant sur un substrat incolore, cet enzyme entraîne la formation d'une semi-quinone rouge. Cette dernière, très instable, s'oxyde rapidement pour donner un composé noirâtre. Pour réaliser ce test, un disque d'oxydase contenant de l'oxalate Ndimethylparanitrophénylène-diamine, qui aura été préalablement imbibé d'une goutte d'eau distillée stérile est déposé sur une lame et mis en contact avec une colonie bactérienne fraîchement cultivée. L'apparition d'une coloration violette immédiatement indique que le test est positif (Singleton, 1999).

### 13.2.3.- Etude de type respiratoire

Chaque souche pure est ensemencée sur la gélose semi solide Viande-foie (VF) et incubée à 30°C. Ce milieu présente un gradient de concentration en O<sub>2</sub>, plus abondant en surface. Le type respiratoire est exprimé par la localisation du niveau de la croissance bactérienne dans le tube:

- Colonies dans tout le tube: Bactéries aérobies-anaérobies facultatives.
- Colonies en haut du tube: Bactéries aérobies strictes.
- Colonies en haut du tube légèrement sous la surface: bactéries micro-aérophiles.
- Colonies en bas du tube: bactéries anaérobies strictes (Noumeur, 2008).

### 13.2.4.- Utilisation des galeries API

La galerie API 20E (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) composée de 20 micro-tubes contenant des milieux et substrats sous forme déshydratée est utilisée selon les recommandations décrite par le fabricant (photo 07). Les micro-tubes de la galerie API 20 E sont inoculés avec une suspension bactérienne, incubées à une température de 30 °C à un intervalle temps de 48 h. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Emanuel et Lorrence, 2009).



**Photo 07** : La galerie API 20E avant incubation.

## 14. Suivi de la cinétique de croissance des souches sélectionnées

### 14.1.- Préculture

Dans un tube à essai contenant 5 ml du milieu MSM et le pétrole brut (à 2% du volume de milieu) et en fait l'ensemencement d'une colonie est prélevée à partir d'un milieu gélosé. Le tube ensuite est incubé à 30°C pendant 24h sous agitation rotative (140rpm).

### 14.2.- Culture

La méthodologie utilisée pour évaluer la croissance bactérienne consiste à réaliser des cultures en milieu MSM liquide, et utiliser le pétrole comme seul source de carbone (à 2% du volume de milieu). Dans des Erlenmeyer de 250 ml contenant 45 ml de milieu MSM liquide ont été ensemencés par 5 ml de Préculture de chaque souche sélectionnée. Les erlenmeyers sont ensuite incubés à 30°C sous agitation de 140 rpm pendant cinq jours.

## 15.-Tolérance des souches au pétrole

On a testé la tolérance des souches M7 et N6 aux différentes concentrations du pétrole brut (5%, 10%, 15%, 20%)



### **15.1.- Préculture**

Dans un tube à essai contenant 5 ml du milieu MSM et le pétrole brut a différentes concentrations (5%, 10%, 15%, 20%), on fait l'ensemencement avec une colonie prélevée à partir d'un milieu gélosé. Le tube est ensuite incubé à 30°C pendant 24h sous agitation rotative (140rpm).

### **15.2.- Culture**

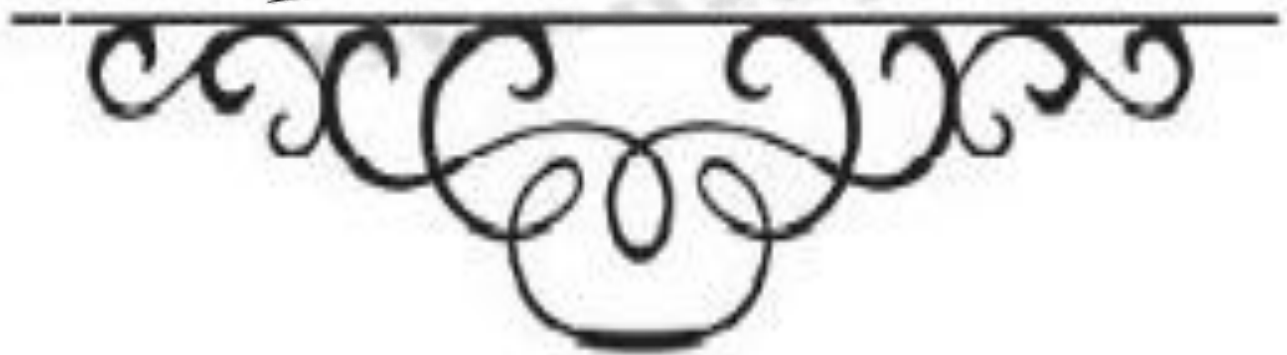
Des erlenmeyers de 250 ml contenant 45 ml de milieu MSM sont ajustés au pH 7 à l'aide du NaOH ou du HCl et additionnés respectivement à raison de 5%, 10%, 15%, 20% du Pétrole, ont été inoculés avec 5 ml de suspension des souches N6 et N7 et incubés à une température de 30°C, sous agitation de 140rpm, après 24 heures un prélèvement de 2ml est effectué dans un éppendorf. Pour éliminer le gazoil contenu dans le prélèvement, une centrifugation à 10000g pendant 60 minutes est nécessaire. La phase aqueuse dans l'éppendorf est éliminée et le culot est gardé puis dilué dans l'eau distillée. La mesure de l'absorbance est effectuée à 625 nm.



**Résultats**

**&**

**Discussion**



## 1.- Dénombrement de la microflore totale

### 1.1.- Résultats

Le résultat de dénombrement de la microflore totale sur gélose nutritive pour les différentes dilutions a permis d'avoir une idée sur la charge bactérienne du site pollué ainsi que de sa diversité. Les valeurs sont rapportées dans le tableau 2.

**Tableau N°2 :** Dénombrement de la microflore totale

Bourbier	Echantillons	Dilution	Nbre De Colonies	UFC/ml
NOUMERATE	N1	$10^{-5}$	100	$10^8$
Metlili	M1	$10^{-6}$	170	$10^9$

### 1.2.- Discussion

D'après les résultats obtenus nous avons trouvé une densité bactérienne forte au niveau de l'échantillon (N1) prélevé de la zone de Noumerate, et très forte densité au niveau de l'échantillon (M1) de la zone de Metlili. Selon (Dommergues et Mangenot, 1970), les densités bactériennes dans les sols soumis à des conditions écologiques dures (régions arides et régions polaires), sont faibles mais elles ne tombent rarement en dessous de  $10^4$ -  $10^5$  germes /g de sol sec dans les horizons superficiels.

La forte densité bactérienne dans nos échantillons peut être due à l'effet des hydrocarbures sur la zone polluée est positif et que les microorganismes sont capables de grandir rapidement, le taux d'humidité élevée favorise la prolifération. Le rejet des produits pétroliers dans les milieux terrestres entraîne une prolifération des microorganismes aptes à se développer sur les hydrocarbures et leurs produits de dégradation. Leur nombre est beaucoup plus important dans les zones polluées de façon chronique et s'accroît après un apport d'hydrocarbures dans les sites dépourvus de contamination (Heinrich et Hergt, 1993).

## 2.- Origine des isolats bactériens sélectionnés

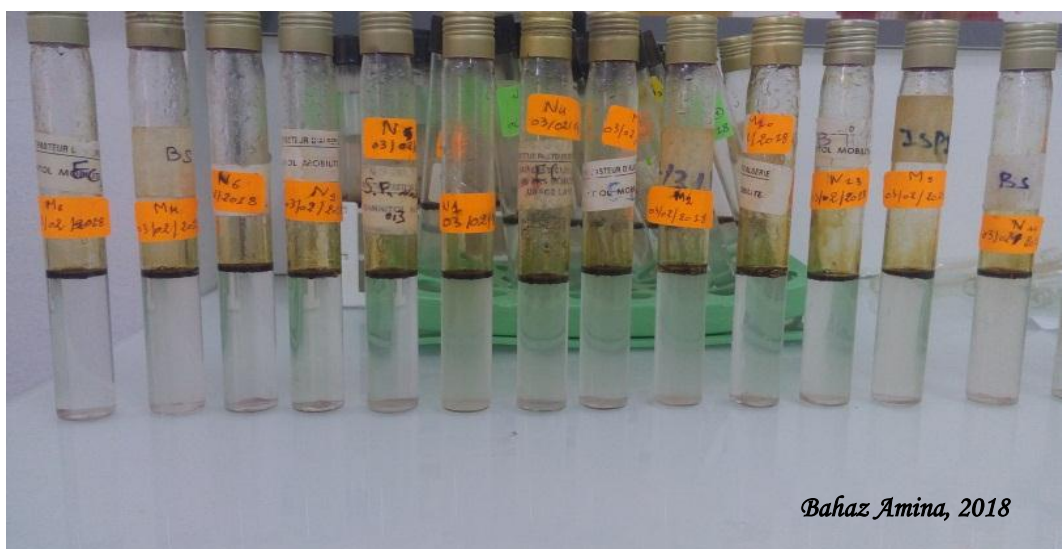
D'après les résultats de dénombrement obtenus, la variation des colonies sur le plan morphologique était très élevée cela nous a permis de sélectionner 13 isolats à partir de la zone de Noumerate et 13 isolats à partir de la zone de Metlili (tableau 03). Ces isolats sont différents sur le plan macroscopique. Ils ont été purifiés et ensemencés dans des Boite Petri contenant la gélose puis conservés à 4°C.

**Tableaux 03** : Origine des isolats sélectionnés

<b>Isolat</b>	<b>Dilution</b>	<b>Origine (bourbier)</b>
<b>N1</b>	$10^{-1}$	Noumerat
<b>N2</b>	$10^{-1}$	Noumerat
<b>N3</b>	$10^{-2}$	Noumerat
<b>N4</b>	$10^{-4}$	Noumerat
<b>N5</b>	$10^{-4}$	Noumerat
<b>N6</b>	$10^{-5}$	Noumerat
<b>N7</b>	$10^{-5}$	Noumerat
<b>N8</b>	$10^{-5}$	Noumerat
<b>N9</b>	$10^{-6}$	Noumerat
<b>N10</b>	$10^{-6}$	Noumerat
<b>N11</b>	$10^{-6}$	Noumerat
<b>N12</b>	$10^{-7}$	Noumerat
<b>N13</b>	$10^{-7}$	Noumerat
<b>M1</b>	$10^{-1}$	Metlili
<b>M2</b>	$10^{-2}$	Metlili
<b>M3</b>	$10^{-3}$	Metlili
<b>M4</b>	$10^{-3}$	Metlili
<b>M5</b>	$10^{-4}$	Metlili
<b>M6</b>	$10^{-4}$	Metlili
<b>M7</b>	$10^{-5}$	Metlili
<b>M8</b>	$10^{-6}$	Metlili
<b>M9</b>	$10^{-6}$	Metlili
<b>M10</b>	$10^{-6}$	Metlili
<b>M11</b>	$10^{-7}$	Metlili
<b>M12</b>	$10^{-7}$	Metlili
<b>M13</b>	$10^{-7}$	Metlili

### **3.- Isolement des isolats susceptibles à dégrader le pétrole**

Tous les 26 isolats ensemencés sur milieu MSM (2% pétrole (0.1ml)) liquide, ont montré une habilité à dégrader le pétrole et ont formé une turbidité de croissance (faible, moyenne ou forte). Les résultats obtenus sont représentés dans la photo 08.



**Photo 08 :** Isolement des isolats susceptibles à dégrader le pétrole

#### 4.- L'indice d'émulsion

L'indice d'émulsion permet de vérifier la capacité des isolats à émulsionner une phase hydrophobe (le pétrole brut) dans une phase hydrophile (le milieu de culture). Nous avons pris en considération seulement les isolats avec un pouvoir d'émulsion forte et très forte. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 04, les figures 04 et 05 et la photo 09.

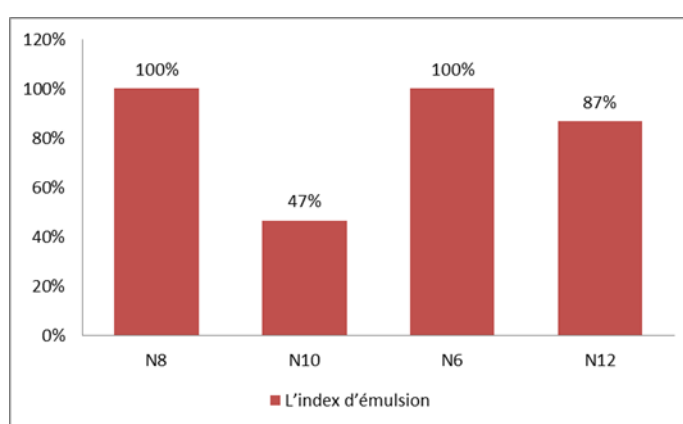
##### 4.1.- Résultats

**Tableau 04 :** Calcul de l'indice d'émulsion par les isolats sélectionnés

Souche	Longueur de la couche émulsifiée (mm)	Indice (E24)
N6	15	100%
N10	7	46.66%
N12	13	86.66%
N8	15	100%
M7	15	100%
M5	7.5	50%
M3	7	46.66%
M4	15	100%
M13	15	100%
M10	15	100%

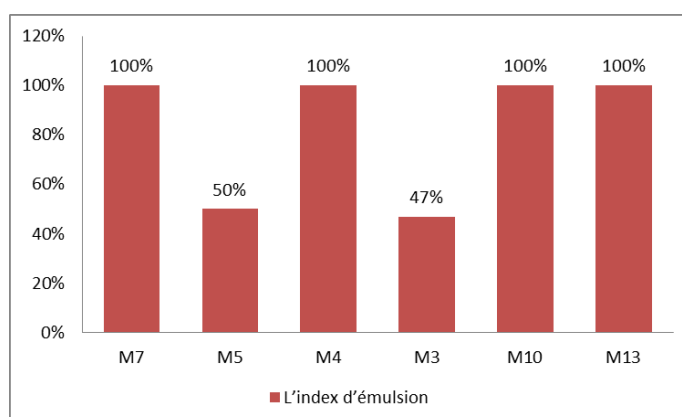


**Photo 09** : Test d'émulsion du pétrole par les isolats sélectionnés après 24h



**Figure 04** : Résultat de l'indice d'émulsion des isolats isolés de la zone de Noumerat

Les souches N8 et N6 présentent une forte capacité de produire des biosurfactants avec un indice d'émulsion très élevée 100%, et les souches N10 et N12 avec un indice d'émulsion 46.66% et 86.66% respectivement. Alors, les souches qui restent présentant une faible capacité de produire des biosurfactants.



**Figure 05** : Résultat de l'indice d'émulsion des isolats isolés de la zone de Metlili

Dans la zone de Metlili les souches M7, M4, M10 et M13 présentent un indice d'émulsion très élevée 100%, et les souches M5 et M3 avec un indice d'émulsion 50% et 46.66% respectivement.

#### 4.2.- Discussion

D'après les résultats obtenus, il se montre que les souches N6, N8, M7, M4, M10 et M13 produisent très forte quantité des biosurfactants avec un indice d'émulsification de 100 %. [Rodríguez-Rodríguez et al. \(2012\)](#) ont rapporté qu'un  $E_{24} > 50\%$  indique que le microorganisme produit potentiellement des biosurfactants. Néanmoins, il faut tenir compte les conditions optimales pour la productivité maximale des biosurfactants.

### 5.-Caractérisation des isolats purifiés

#### 5.1.- Aspect macroscopique

Parmi les vingt-six isolats nous avons dix qui ont montré une capacité d'émulsionner le pétrole. Nous les avons choisis pour faire une étude macroscopique. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 05.

#### Résultats

**Tableau 05 :** Aspect macroscopique des colonies isolées

Critère isolat	Diamètre (mm)	Couleur	Forme	Elévation	Contour	Opacité	Surface
N6	5 mm	marron clair	Lobé	Convexe	irrégulière	Translucide	Lisse
N10	10mm	marron clair	Lobé	Convexe	irrégulière	Translucide	Lisse
N12	<5 mm	marron clair	Ondulé	Convexe	irrégulière	Translucide	Lisse
N8	2 mm	doré	Ondulé	Convexe	irrégulière	transparente	Lisse
M7	>1 mm	verdâtre	Punctiforme	Convexe	irrégulière	transparente	Lisse
M5	3 mm	Jaune	Punctiforme	Convexe	irrégulière	Translucide	Lisse
M3	1 mm	doré	Punctiforme	Convexe	circulaire régulier	Translucide	Lisse
M4	2 mm	Jaune	Punctiforme	Convexe	circulaire régulière	Translucide	Lisse
M13	1 mm	marron clair	Lobé	Convexe	irrégulière	transparente	Lisse
M10	3 mm	Jaune	Circulaire à striation radiale	Convexe	régulière	transparente	Lisse

## 5.2.- Etude microscopique

L'observation microscopique a été réalisée suivant la coloration de GRAM. Les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau 06 et la photo 10.

### 5.2.1.-Résultats

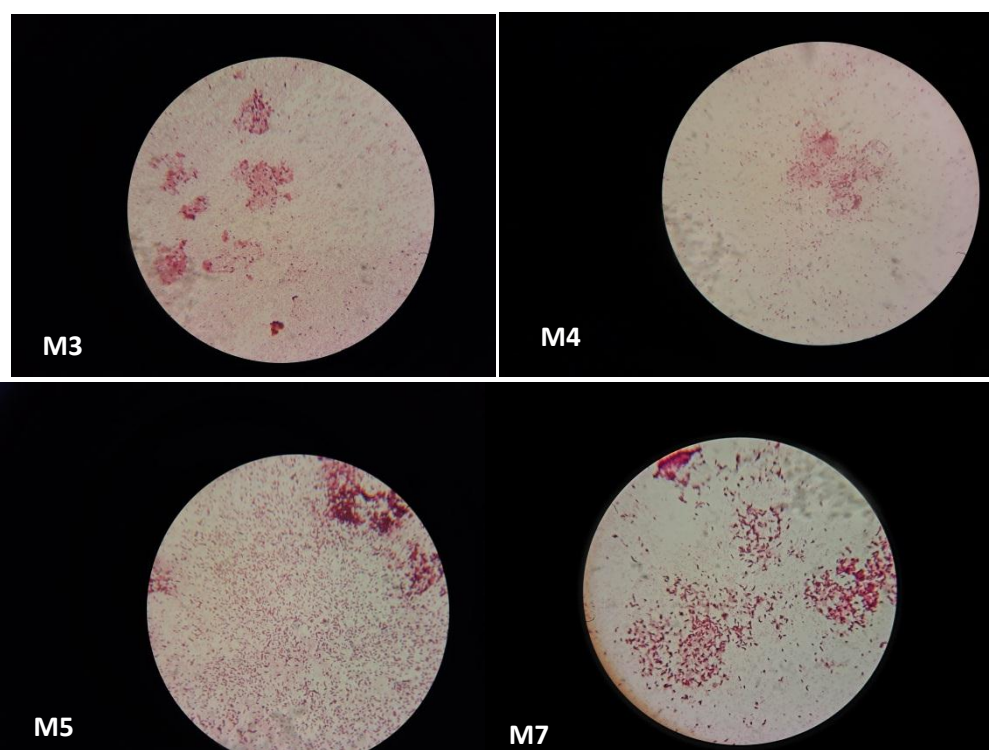
**Tableau 06** : Observations microscopiques des isolats

Critère	Coloration de GRAM		
	GRAM	Forme des cellules	Arrangement
Isolats			
N10	+	Coque	En chaine
N6	-	Bacile	Diploïde
N8	+	Coque	Diplocoques
N12	+	Bacile	Isolée/Diploïde
M7	-	Bacile	Grappe de raisin
M3	+	Bacile	En Chaine/isolée
M13	+	Coque	diplocoques
M4	-	Coccobacille	Diploïde
M10	+	Coque	diplocoques
M5	-	Bacile	Grappe de raisin

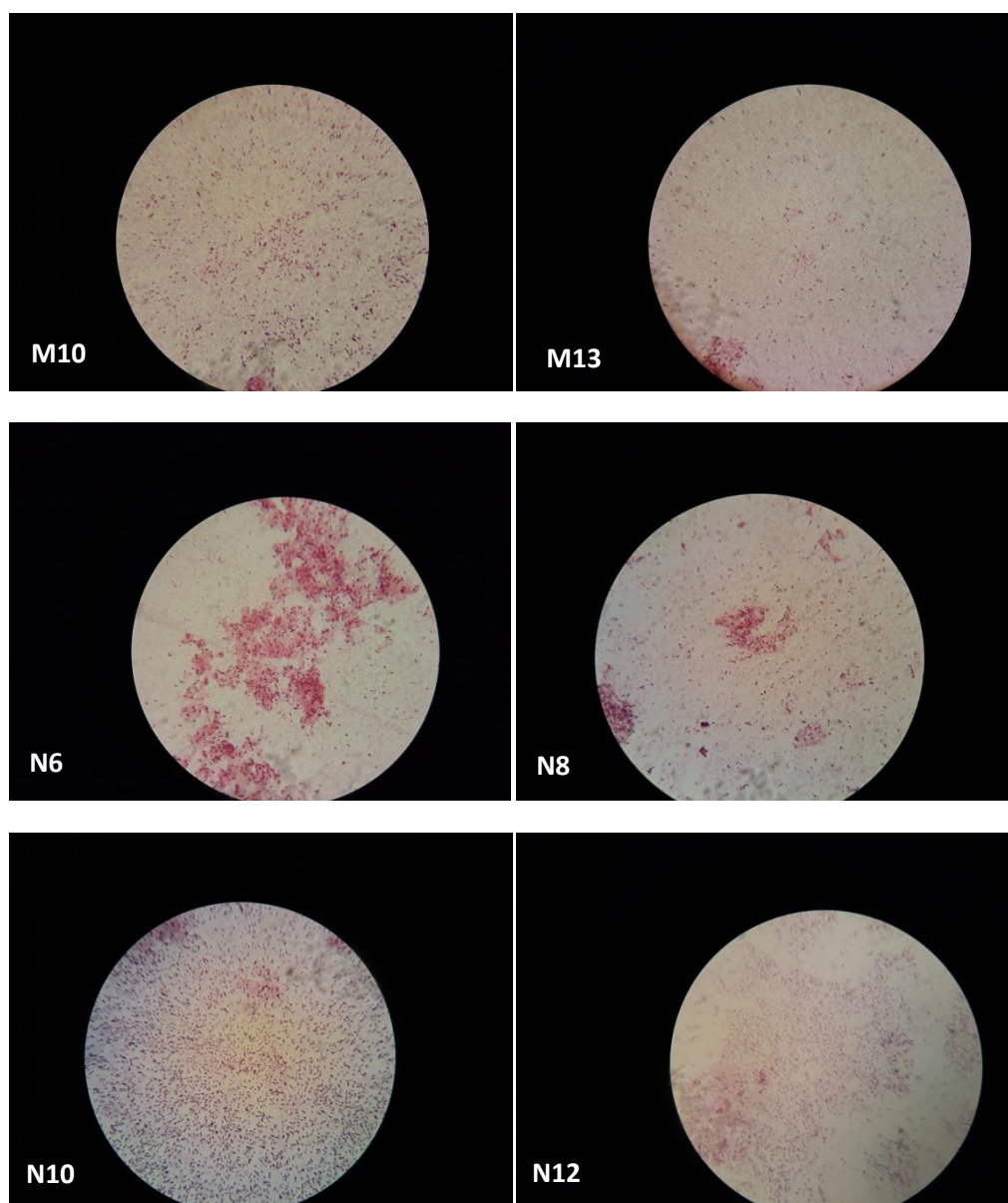
+ : Positive

- : Négative

Les résultats obtenus dans le tableau 6 et la photo 10 montrent que les cellules bactériennes sont généralement en forme bacile ou coque. Certaines sont avec une paroi à Gram positif et d'autres à Gram négatif. Elles sont assemblées en différents arrangements soient Grappe de raisin, en diploïde, diplocoques en chaine ou même isolées.







**Photo 10** : Aspect microscopique obtenu après la coloration de Gram (Gx100) (Bahaz Amina, 2018).

### 5.2.2- Discussion

Les résultats montrent que les isolats présentent une diversité micro-morphologique. Les bactéries du sol ont une grande variété de formes. Elles peuvent être mobiles ou immobiles, et posséder ou non des formes de résistance (spore, capsule) (Dommergues, 1970). Les résultats de coloration de Gram montrent que 6/10 isolats sélectionnés sont à Gram positif tandis que les restes sont à Gram négatif. Selon (Lahreche et Bouhamida, 2017), Les souches les plus fréquemment décrites dans la biodégradation des hydrocarbures appartenant aux genres à Gram positif.

### 6.-Utilisation des schémas d'identification des principaux groupes bactériens

Comme une identification préliminaire pour les isolats sélectionnés on a réalisé quelques tests d'orientation à savoir : la coloration de Gram, catalase, d'oxydase et le test d'aérobiose (VF). Les

schémas ci-dessous nous permettent de déterminer la famille ou le genre de nos souches sélectionnés à partir d'une identification orientée (Leyral et Joffin, 1998)

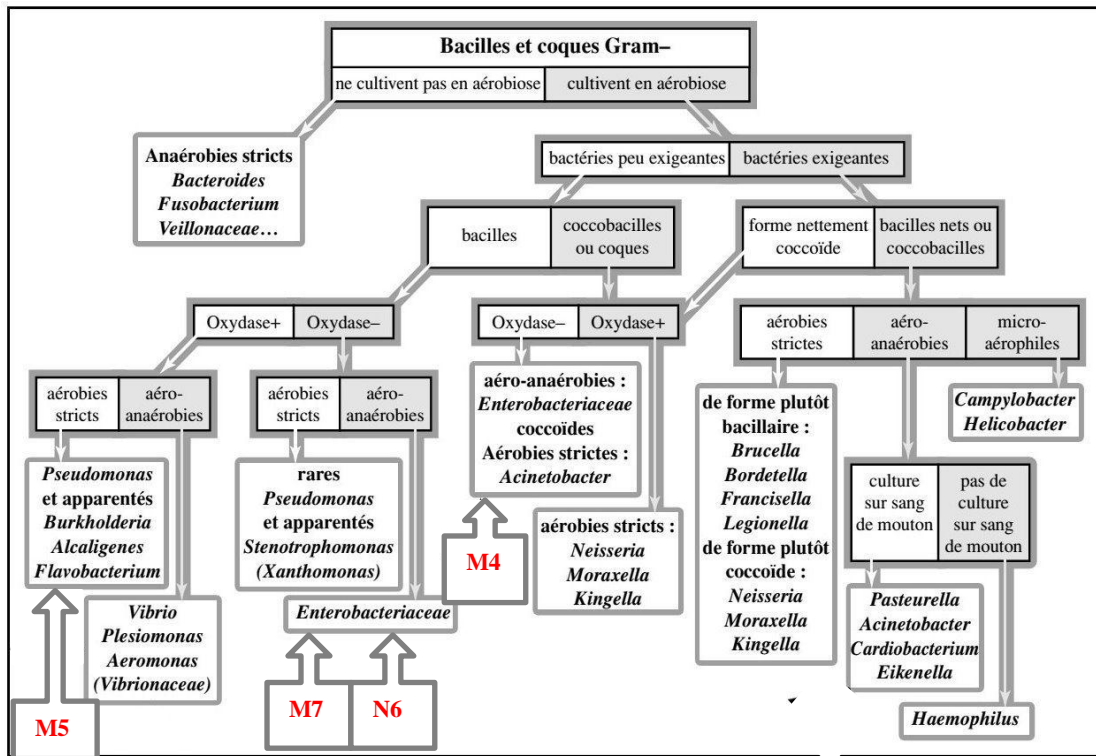


Figure 06 : Orientation préliminaire d'identification des souches M4, M5, M7 et N6

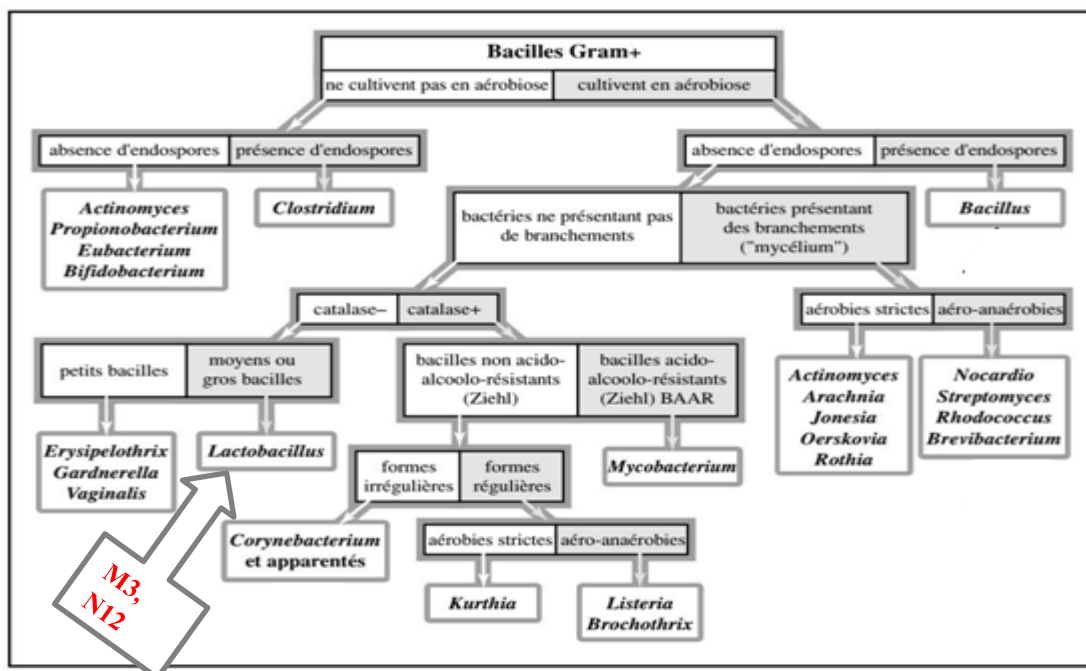


Figure 07 : Orientation préliminaire d'identification des souches M3, N12.

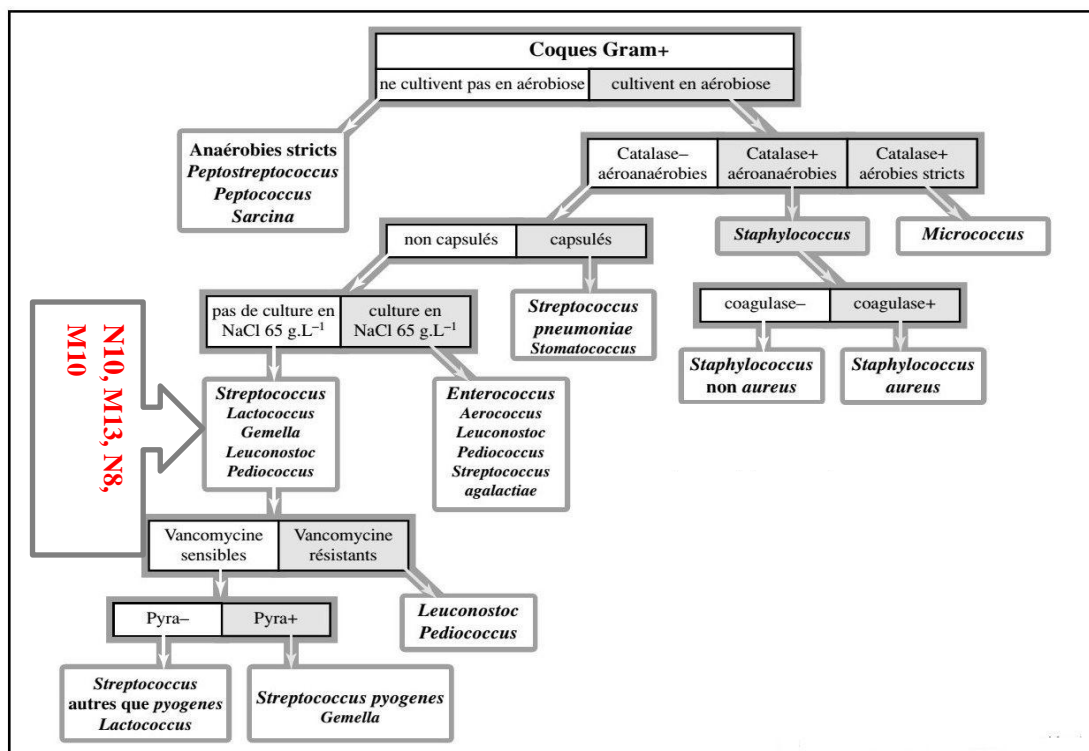


Figure 08 : Orientation préliminaire d’identification des souches N10, M13, N8, M10.

### 6.1.- Résultat et discussion

Le suivi des schémas d’identification nous a permis de rapprocher nos isolats aux genres suivants : les souches N10, N8, M13 et M10 au genre *Stréptococcus*, et la souche M4 au genre *Acinetobacter*, les deux souches N12 et M3 au genre *Lactobacillus*, la souche M5 au genre *Pseudomonas*, et les deux souches N6 et M7 à la famille des *Enterobacteriaceae*. D’après (Gaudu, 2014), les bactéries capables de dégrader les hydrocarbures font partie aux genres suivants: *Pseudomons*, *Acinetobacter*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Actinomyces*, *Rhodococcus*, *Brevibacterium*, *Peptococcus*, *Micrococcus*.

### 7.- Identification des souches sélectionnés

Le principe de l’identification API est le même que celui de la méthode enzyme/substrat. Chaque cupule contient un substrat différent avec lequel chaque enzyme bactérienne réagit. Après une incubation à 37°C pendant 24 h, la lecture est effectuée à l’aide d’un catalogue analytique. En se basant sur les résultats des tests d’orientation, nous avons continué l’identification des trois souches par l’utilisation des galeries API selon le genre obtenu. Ainsi, nous avons choisi une galerie API 20E qui disponible au niveau de notre laboratoire pour les souches N6, M7, M5. Les résultats obtenus suite à l’identification sont présentés dans le tableau 07.

## 7.1. Résultats

Tableau 07 : Identification biochimique des isolats sélectionnés

TEST	Réaction enzyme	N6	M5	M7
<b>Test VF</b>	Type respiratoire	AS	AS	AS
<b>Oxydase</b>	Cytochrome-oxydase	-	+	-
<b>Catalase</b>	Hydrolyse du peroxyde d'hydrogène	-	-	-
<b>BCPL</b>	Fermentation de lactose	-	-	+
<b>Mannitol mobilité</b>		+	+	+
<b>ONPG</b>	$\beta$ -galactosidase (orthonitrophényl- $\beta$ galactopyranosidase)	-	+	-
<b>ADH</b>	Arginine dihydrolase	+	+	-
<b>LDC</b>	Lysine décarboxylase	-	+	-
<b>ODC</b>	Ornithine décarboxylase	-	+	+
<b>CIT</b>	Utilisation du citrate	+	+	+
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Production d'H <sub>2</sub> S	-	-	-
<b>URE</b>	Test d'Urease	+	+	-
<b>TDA</b>	Tryptophane désaminase	+	+	+
<b>IND</b>	Test indole	-	-	-
<b>VP</b>	Production d'acétoïne (vogesproskauer)	+	+	+
<b>GEL</b>	Hydrolyse GELatine (Gélatinase)	+	+	+
<b>GLU</b>	Fermentatin de glucose	+	+	-
<b>MAN</b>	Fermentation de mannose	-	-	-
<b>INO</b>	Oxidation d'inositol	-	-	-
<b>SOR</b>	assimilation sorbitol	-	-	-
<b>RHA</b>	assimilation rhamnose	-	-	-
<b>SAC</b>	assimilation saccharose	-	-	-
<b>MEL</b>	assimilation melibiose	-	-	-
<b>AMY</b>	assimilation amygdaline	-	-	-
<b>ARA</b>	assimilation arabinose	-	-	-
<b>Mannitol</b>	Fermentation de Mannitol	-	+	-

Note : + : Test positif      - : Test négatif

## 2.-Utilisation d'ABIS en ligne

La sélection du taxon le plus proche a été faite à l'aide de programme « ABIS online- Bacterial identification software » (Costin Stoica et Sorescu Ionut, 2015). Les trois bactéries isolées ont été rapprochées aux espèces présentées dans le tableau 08 ci-dessous

### 7.2.1.- Résultats

**Tableau 08** : Identification des souches à l'aide d'ABIS online –Bacterial identification.

souche	Taxon le plus proche	% similarité
N6	<i>Cosenzea (Proteus) myxofaciens</i>	87.1% (P= 98.62%)
	<i>Proteus mirabilis</i>	82.4%
	<i>Proteus penneri</i>	78.5%
	<i>Photorhabdus temperata</i>	78.1%
M7	<i>Proteus mirabilis</i>	78.9%
	<i>Cosenzea (Proteus) myxofaciens</i>	72.3%
	<i>Erwinia amylovora</i>	71.7%
	<i>Xenorhabdus nematophila</i>	71.3%
M5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	93.6% (P=86.2%)
	<i>Pseudomonas fluorescens biovar 5</i>	91.4%
	<i>Pseudomonas fluorescens biovar 3</i>	87.3%
	<i>Pseudomonas gessardii</i>	83.7%

% similarité: Pourcentage de similarité.

% P : pourcentage de probabilité.

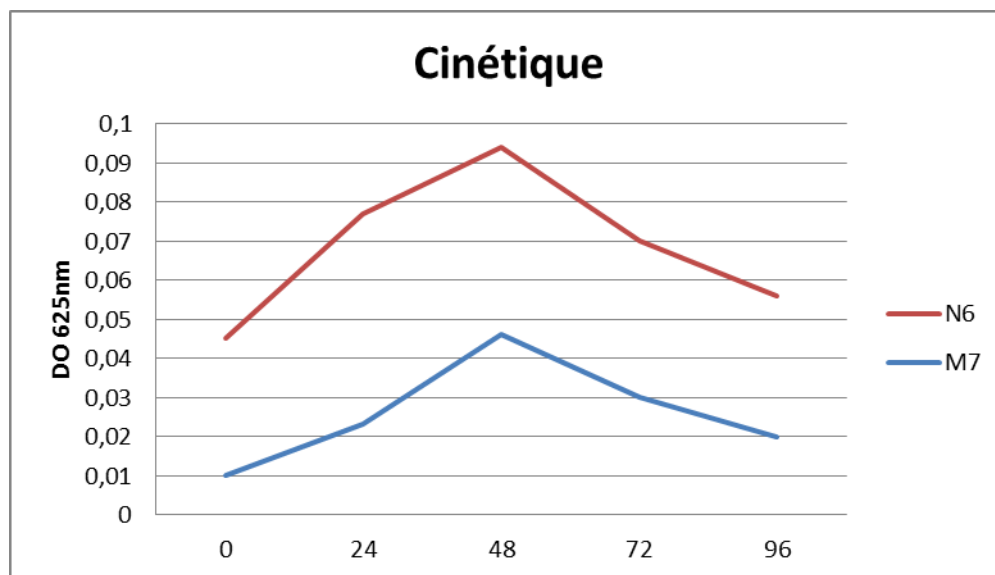
### 7.2.2.- Discussion

Les résultats obtenus montrent que la souche N6 est proche de l'espèce *Cosenzea (Proteus) myxofaciens*. Il est à noter que cette dernière ayant une capacité à dégrader le pétrole brut a été isolée et identifiée par (Ceyhan, 2012). La souche M5 se rapproche de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*. Cette espèce est connue par son utilisation comme un amplificateur pour la dégradation des hydrocarbures (Meliani, 2014). La souche M7 est proche de l'espèce *Proteus mirabilis*. Cette espèce aussi connue par sa capacité à biodégrader le pétrole (Chikere et Ekwuabu, 2014 ; Balogun et al., 2015)

## 8.-Suivi de la cinétique de croissance des souches sélectionnées

Dans l'objectif d'isoler des souches bactériennes ayant une haute capacité de biodégradation envers le pétrole brut, les deux souches N6 et M7 ont été choisis pour la suite des travaux. Ce choix est basé sur les résultats issus de test d'émulsification qui est un indicateur de production de

biosurfactant. Les souches retenues ont fait l'objet d'une suivie de cinétique de leurs croissance dans le milieu MSM additionné de 2 % (v/v) de pétrole brut en suivant la croissance microbienne en fonction du temps de culture, on mesurant l'absorbance du milieu de culture chaque 24 heures à 625 nm en utilisant un spectrophotomètre à UV visible, ce qui nous a permis de tracer les courbes représentées dans les figures suivantes.



**Figure 09** : Cinétique de croissance de la souche N6, M7 dans le milieu MSM avec 2 % de pétrole.

### 8.1.- Résultats

Le début de croissance des souches N6 et M7 est mesuré par une DO initiale de 0,035 et 0,01 respectivement. La phase de latence est absente pour les deux souches. Ceci peut être lié à l'âge des bactéries d'une part et d'autre part à leur adaptation aux sources de carbone dans le milieu. Sachant que les deux souches ont étéensemencées auparavant dans une préculture en utilisant le même milieu. De 0 à 48 heures, on observe une augmentation de la croissance exprimée par une phase exponentielle atteinte une maximale croissance, c'est la phase où la croissance bactérienne et la consommation du pétrole est maximale. On assiste à une diminution continue de la densité optique, c'est la phase de déclin ; elle est caractérisée par la mort cellulaire due à l'épuisement du substrat et à l'accumulation de substances toxiques dans le milieu de culture. Malgré des conditions optimales à l'activité des microorganismes, la concentration en polluant peut en effet être toxique si celle-ci est trop élevée (Tarayre, 2012).

## 8.2.-Discussion

Le suivi de cinétique de croissance de la souche N6 a révélé que cette souche est capable d'utiliser le pétrole comme une source de carbone, qui commence par une phase exponentielle atteinte le maximale au bout de 48 heures, (phase de latence est courte ou absente), puis une phase de déclin au-delà de 96 heures on assiste à une diminution continue de la densité optique, Ceci est probablement dû à une toxication par l'hydrocarbure. (Patience *et al.*, 2010).

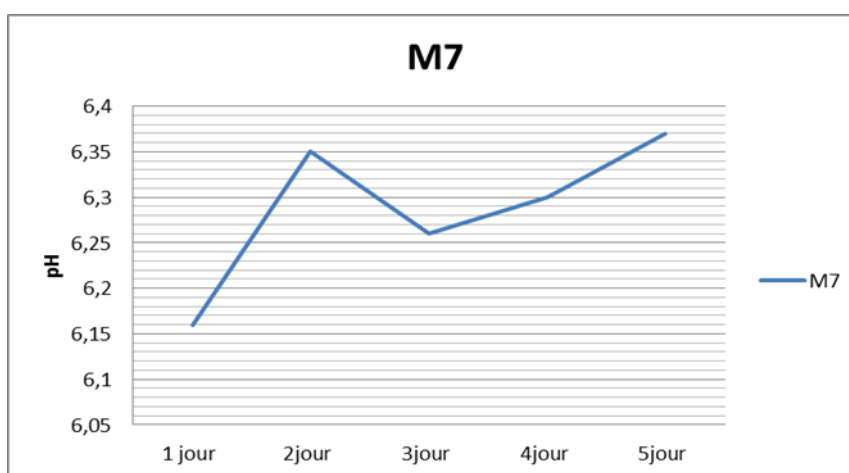
(Ceyhan, 2012) a observé une situation semblable en suivant la croissance de la souche *P.vulgaris* sp. Ou la phase exponentielle atteint au bout de 96 heures, suivie par un déclin, ceci peut être due à la complexité de pétrole brute para port au Pyrène.

Comme nous l'avons vu ci-dessus le suivi de cinétique de croissance pour la souche M7 montre que cette souche est capable d'utiliser le pétrole brut comme une source de carbone avec une phase de croissance atteinte le maximale au bout de 48 heures, puis une phase de déclin au-delà de 96 heures caractérisé par la mort cellulaire des bactérie, cela est probablement due à l'accumulation des dérivés toxiques de pétrole résultant de la dégradation de ce dernier par les bactéries.

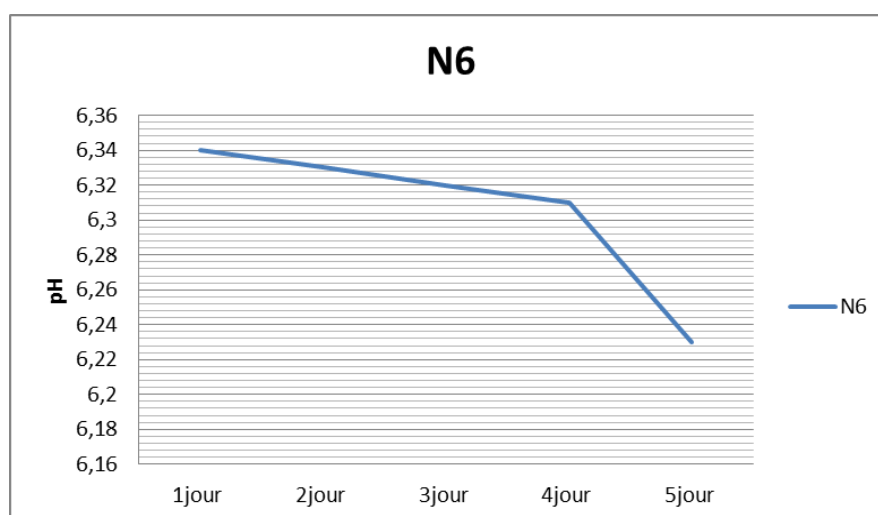
## 9.- Etude de pH

Le suivi du pH en fonction de temps durant la période du cinétique des souches N6 et M7 donne les résultats représentés dans les courbes suivants (figure 10 et 11).

### 9.1.-Résultats



**Figure 10 :** variation de pH en fonction de temps pour la souche M7 durant la période de cinétique de croissance.



**Figure 11** : variation de pH en fonction de temps pour la souche N6 durant la période de cinétique de croissance.

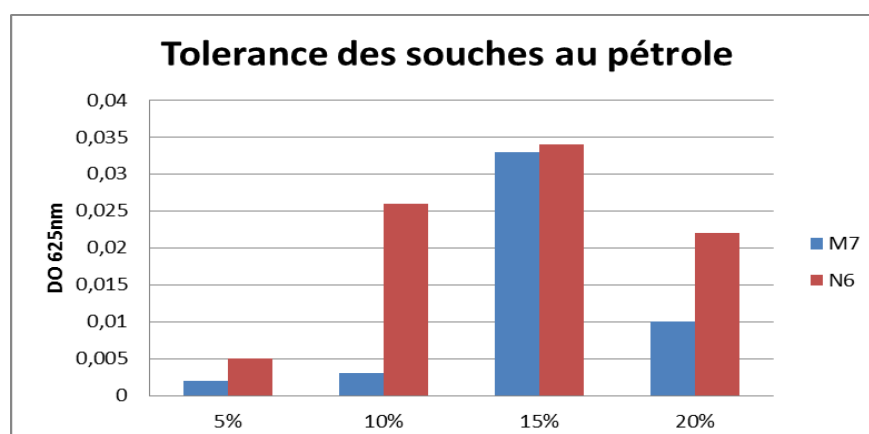
## 9.2.-Discussion

Pour le pH la variation des valeurs se situe autour de la neutralité entre pH 6.16 et 6.37 pour les deux souches étudiées. Ce résultat a été confirmé par (Margesin et Schinner, 2001), où ils expliquent qu'une diminution du pH tendant vers la neutralité est en raison de différentes réactions biochimiques entraînant l'assimilation des composés d'un hydrocarbure d'un côté avec synthèse des acides gras d'un autre côté"

## 10.- Tolérance des souches au pétrole

### 10.1.- Résultats

Des concentrations initiales en pétrole allant de 5 à 20% ont été utilisées pour étudier l'effet de concentration de pétrole sur la croissance des souches M7 et N6 dans un milieu liquide MSM. Les résultats sont représentés dans le graphe suivant (figure 12).



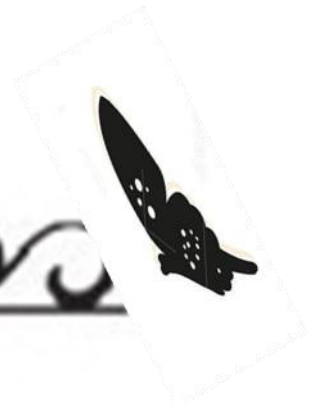
**Figure 12** : tolérance des souches N6, M7 au pétrole brut à différentes concentration (5%, 10%, 15% et 20%)



## 10.2.- Discussion

Des concentrations variantes de 5% à 20% (v/v) ont été testées pour la tolérance des souches N6 et M7 aux fortes concentrations du pétrole. Nous avons remarqué que les souches N6 et M7 supportent jusqu'à 15% de pétrole, où son optimum de croissance, après cette concentration la croissance des deux souches diminue.

[Isken et de Bont. \(1998\)](#) ont publié des travaux très intéressants recensant les nombreux mécanismes responsables de la tolérance des organismes aux solvants organiques. En exemple, puisque la membrane cellulaire est la principale cible des effets toxiques des solvants, les changements dans sa composition ont été déterminés comme les premiers à jouer un rôle crucial dans le phénomène de tolérance.



# Conclusion



Bien que les fluides de forage présentent un intérêt pratique et économique considérable, en particulier les fluides à base d'huile, mais ils présentent une sérieuse de pollution lors des rejets dans la nature sous formes associées aux déblais de forage.

Le but de notre étude est de rechercher des bactéries qui dégradent le pétrole brut, à partir de sols contaminés. A partir de deux bourbiers à base d'huile, situant à la wilaya de « Ghardaïa » nous avons isolé des isolats bactériens pour étudier leur capacité à l'utilisation du pétrole brut comme seule source de carbone.

La première partie de l'étude est consacrée à l'isolement et la sélection des bactéries hydrocarbonoclastes par culture sur milieu liquide MSM additionné du pétrole. Ensuite, le test de l'activité d'émulsification qui nous permet d'estimer la production de biosurfactants par les isolats sélectionnés. Les isolats sélectionnés ont été identifiés morphologiquement et biochimiquement. La deuxième partie de l'étude est consacrée à l'étude de la cinétique de croissance des meilleures souches sélectionnées et leur tolérance au pétrole.

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus se résume comme suit:

Nous avons isolé un grand nombre des bactéries à partir de deux échantillons de sol utilisés. On se basant sur des critères morphologiques nous avons sélectionnées 26 isolats. Tous ces isolats ayant une activité hydrocarbonoclastes. Ainsi, nous avons sélectionné par le test d'émulsification dix isolats ayant montré la plus grande capacité d'émulsification. En se basant sur leurs caractères macroscopiques, microscopiques et biochimiques, nous avons pu rapprocher les dix souches bactériennes aux genres suivants: *Stréptococcus*, *Acinetobacter*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Proteus*. A l'aide des galeries API20E l'identification des trois meilleures souches M5, M7 et N6 a montré leur rapprochement aux espèces *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* et *Proteus myxofaciens* respectivement. La cinétique de croissance des deux souches meilleures M7 et N6 a montré une croissance maximale au bout de 48h. La tolérance maximale pour les deux souches N6 et M7 est déterminée à la concentration de pétrole de 15%.



**Références**

**Bibliographique**



**ABBIA, S., & GUITOUN, L. (2014).** Les méthodes de traitement des sols pollués par les hydrocarbures pétroliers (Doctoral dissertation).

**ABBIA, S., & GUITOUN, L. (2016).** Etude des caractérisations de quelque souches bactériennes hydrocarbonoclastes sahariennes (Master-Univ-OUARGLA).

**ADEME. (2006).** Traitement biologique des sols pollués: recherche et innovation [Ebook] (p. 10). [http://www.ademe.fr/sites/default/files/assets/documents/43479\\_etude\\_adit\\_sols.pdf](http://www.ademe.fr/sites/default/files/assets/documents/43479_etude_adit_sols.pdf).

**AGBON, j., HOUNSOU, p., Kitihoun, s., & MENAZE, m. (2013).** <https://www.ladissertation.com/Sciences-et-Technologies/Technologies/Expose-Sur-Le-Petrole-92561.html>.

**AKMOUSSI-TOUMI, S. (2009).** Contribution à l'étude des boues de forage: isolement et évaluation de la capacité de quelques souches microbiennes à dégrader le gasoil (Doctoral dissertation).

**AI-SULAIMANI Y., AL-WAHAIBI S. N. et AI-BAHRY S.N. (2010).** Experimental investigation of biosurfactants produced by Bacillus species and their potential for MEOR in Omani oil field, In: Proceedings of the SPE EOR Conference at Oil and Gas West Asia 2010 (OGWA '10), pp. 378-386, Muscat, Oman.

**APPLICASCIENCES, (2007).** Pétrole de début à la fin. [www.apse.be](http://www.apse.be). Récupérée à partir de <http://www.apse.be/petrole-web.pdf>.

**ATAGANA H.I. (2008).** Compost bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil inoculated with organic manure. *African Journal of Biotechnology*. 7(10): 1516-1525.

**ATLAS R. M. (1981).** « Microbial degradation of petroleum hydrocarbons » Réf : 45 :180 – 209.

**ATTAR, M., & HAMMAT, M. (2009).** Le Potentiel en Hydrocarbures de L'Algérie. Rapport.

**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.

**BEGHIN, A. (2003).** Apport de mesures rhéologiques et de pelage à l'analyse de la rupture de liants bitumineux (Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI).

**BEKENNICHE, N. (2014).** Caractérisation des activités de biodégradation des hydrocarbures par différents genre microbiens isolés de site contaminés (Diplôme de Magister en Biologie, universitaire et de la recherche scientifique).

<https://www.ladissertation.com/Sciences-et->

**BALOGUN S. (2015).** Screening of hydrocarbonoclastic bacteria using redox indicator 2, 6-dichlorophenol indophenols. *Global Nest Journal*. (3). P 565-573

**BELHABIB A., BALLA F., TAMA A.S. (2013).** Les fluides de forage à base d'huile: impacts sur l'environnement et technique de traitement (Doctoral dissertation).

**BENCHOUK, A. (2017).** Biodegradation of diesel and isomerate by *Pseudomonas aeruginosa* and *Brevibacillus laterosporus* isolated from hydrocarbons contaminated soil. *Advances in Environmental Biology*, 10 (7) July 2016, Pages: 208-215 AENSI Journals.

**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. Masson publ., Paris: 343-385.

**BERTRAND J et al. (1993).** Hydrocarbon Biodegradation and hydrocarbonoclastic bacterial communities composition grown in seawater as a function of sodium chloride concentration. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 168, 125-138.

**BLIFERT et PERRAUD, (2004).** Chimie de l'environnement air, eau, sols, déchets. De Boeck université. P (369, 372-375).

**BOUKHALFA, Z., & TORDJEMANI, Y. (2017).** Etude des méthodes de traitement des boues de forage: considération environnementale (Doctoral dissertation).

**BOUKHERISSA .M. (2008).** Etude de la stabilité des asphaltènes dans le pétrole brut. Choix de dispersants et le mécanisme. Thèse de doctorat de l'Université Paul Verlaine – Metz.

**BOUSSABOUA H., (2005)-** Elément de microbiologie.

**BOUDERHEM, A. (2011).** Utilisation des souches bactériennes telluriques autochtones dans la biodétection et la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures (Doctoral dissertation).

**BOGNOLO G., (1999).** Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons, *Colloids and Surfaces A: Physico-Chemical and Engineering Aspects*, 152: 41-52.

- BODOUR A. A, GERRERO-BARAJAS C. et MAIER M., (2004).** Structure and characterization of Flavolipids, a novel class of Biosurfactants produced by Flavolipid sp. Strain MTN11. *App. and Env. Microbiol.*, 10 (6): 1114-20.
- BUNDY J.G., PATON G.I., et CAMPBELL C.D., (2002).** Microbial communities in different soils types do not converge after diesel contamination. *J. Appl. Microbiol.* 92 (2): 276-288.
- CAPPUCCINO J. G. ET CHAD T.W. (2017).** *Microbiology: A Laboratory Manual*, Global Edition. Pearson Education Limited.
- CEYHAN, N. (2012).** Biodegradation of pyrene by a newly isolated *Proteus vulgaris*. *Scientific Research and Essays*, 7(1), 66-77.
- CHIKERE, C. B. and EKWUABU, C. B. (2014).** Molecular characterization of autochthonous hydrocarbonutilizing bacteria in oil-polluted sites at Bodo Community, Ogoni land, Niger Delta, Nigeria *Nig J. Biotech.* (Vol. 27) 28 – 33
- COSTIN S., et SORESCU I. (2015).** ABIS online-bacterial identification software. [http://www.tgw1916.net/bacteria\\_logare.html](http://www.tgw1916.net/bacteria_logare.html), database version [March 25, 2017].
- DARLEY, H.C.H. et GRAY, G.R. (1988)** Composition and properties of drilling and completion fluids. 5th Ed., Gulf Professional Publishing, Houston, TX, 630p.
- DAS NILANJANA et CHANDRAN PREETHY. (2011).** Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*. 2011:1-13. doi:10.4061/2011/941810.
- DESAI, J. D., BANAT, I. M., (1997).** Microbial Production of Surfactants and their commercial potential, *microbiol. And mol. Biol. Reviews*, Vol. 61, No. 1, p. 47–64.
- DENIS, F., PLOY M.C., MARTIN, C., É. BINGEN. ET QUENTIN, R. (2011).** *Bactériologie médicale*. 2eme édition. Elsevier Masson. Paris, pages : 191.
- DELILLE, D., COULON, F., et PELLETIER, E. (2004).** Effects of temperature warming during a bioremediation study of natural and nutrient-amended hydrocarbon-contaminated sub-antarctic soils. *Cold Reg Sci Technol.* 40:61–70. doi:10.1016/j.coldregions.2004.05.005.
- DJERBAOUI AMINA NESRINE, (2011).** Utilisation de souches bactériennes autochtones dans la production de biosurfactant et la bioremediation des sols de Hassi Messaoud contaminent par les hydrocarbures.

**DOMMERGUES, YR, et MANGENOT, F. (1970).** Ecologie microbienne du sol. Edition Masson et Cie.

**DUESO, N, CADIÈRE, F (2009).** Traitabilité des sols pollués. Guide méthodologique pour la sélection des techniques et l'évaluation de leurs performances. France, Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie (ADEME) ,124 p.

**DUFRESNE, M. (2013).** Les technologies de traitement des sols contaminés: Lesquelles sont durables? (Doctoral dissertation, éditeur non identifié).

**EI FANTROUSSI, S., et AGATHOS, S.N. (2005).** Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr Opin Microbiol.* 8:268–275. doi:10.1016/j.mib.2005.04.011.

**EMANUEL G., et LORRENCE H.G. (2009).** Practical handbook of microbiology. CRC press. USA, pages : 853.

**FATTAL, P. (2008).** Pollutions des côtes par les hydrocarbures. Rennes: Presses universitaires de Rennes.

**GABET, S. (2004).** Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. Thèse Doctorat, Université de Limoges, France.

**GAN, S., LAU, E.V., et Ng, H.K. (2009).** Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials.* 172(2-3): 532-549. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.07.118.

**GATELLIER, (1970).** La microbiologie du pétrole. *Revue de l'institut français de pétrole*, vol 25 N°4, p. 198.

**GAUDU F. (2014).** Bioremediation des sols pollués aux hydrocarbures. Thèse Master 2, Université de Rennes 1, France.

**GAUTIER CELINE. (2007).** Biodégradation Des Hydrocarbures En Milieu Poreux Insaturé. Thèse de Doctorat de l'université de Pau Et Des Pays De L'ADOUR Institut Français Du Pétrole. Pages : 248.



- GHERBAL A, (2014).** Effets de la salinité sur la stabilité des biosurfactants produits par des souches bactériennes telluriques en présence de pétrole brut. (MASTER Académique. université Kasdi MERBAH-OUARGLA).
- GIRARD, M., WALTER, C., REMY, J-C., BERTHELIN, J., MOREL, J-L (2011).** Sols et environnement (2 ed, p. 9). Paris, France: Dunod.
- GUERIN T. F. (1999).** Bioremediation of phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in creosote contaminated soil using ex-situ landtreatment. *J. Hazard. Mater. B(65):305-315.*
- HADDAD. N, BOUDJADA. Y, (2015).** Isolement et caractérisation des bactéries hydrocarbonoclastes à partir de sols pollués dans la région de Hassi Messaoud, (Mémoire de Master, Université des Frères Mentouri Constantine).
- HASSANSHAHIAN M. et CAPPELLO S. (2013).** Crude oil biodegradation in the marine Environments. *Biodegradation - Engineering and Technology .*  
<http://dx.doi.org/10.5772/55554>.
- HEALY M.G., DEVINE C.M. et MURPHY R., (1996),** Microbial production of biosurfactants. *Resources, Conservation and Recycling, 18: 41-57.*
- HEINRICH D., et HERGT M. (1993).** *Atlas de l'écologie. Le livre de poche, encyclopédies d'aujourd'hui.* Edition Eyrolles.
- ISKEN S., DE BONT M. (1998).** Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles. (2).* P 229-238.
- KALANTARY R. R., ANOUSHIRAVAN M., A. ESRAFILI., S. NASSERI., F. R. ASHMAGH., S. JORFI., et M. JA'FARI. (2014).** Effectiveness of biostimulation through nutrient content on the bioremediation of phenanthrene contaminated soil. *Journal of Environmental Health Science & Engineering. 12(143): 1-9. DOI 10.1186/s40201-014-0143-1.*
- KHODJA, M. (2008).** Les fluides de forage: Etude des performances et considerations environnementales (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Toulouse).
- KING R . (1992).** *Practical Environmental Bioremediation, ISBN 0-87371-437-7.*
- KOLLER EMILIA, (2004).** *Traitement des pollutions industrielles : Eau, Air, Déchets, Sols, Boues.*

**KUMAR A. , BISHT B.S. , JOSHI V.D. and DHEWA T. (2011).** Review on bioremediation of polluted environment: a management tool. *International Journal Of Environmental Sciences*. 1(6): 1079-1093.

**LARPENT J.P., (2000).** Introduction à la nouvelle classification bactérienne. Les principaux groupes bactériens». Edition Techniques et Documentation. pp 28.

**LAHRECHE R., & BOUHAMIDA A (2017).** Capacité de biodégradation du gasoil par des bactéries autochtones isolées de sols contaminés. (Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de MASTER).

**LECOMPTE P., (1995).** Les sites pollués, traitement des sols et des eaux souterraines. Edition Lavoisier, TEC & DOC, P. 198.

**LECOMTE T. (1995).** Gestion écologique par le pâturage: l'expérience des réserves naturelles. Réserves Naturelles de France.

**LEYRAL G., et JOFFIN JN. (1998).** MICROBIOLOGIE TECHNIQUE 2 Documentation technique. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine.

**MAISH, K. (2013).** PÉTROLE ET GAZ NATUREL [Ebook] (p. 18). New York: Karen Whitehouse. Retrievé de [http://energy4me.org/wp-content/uploads/French\\_WEB.pdf](http://energy4me.org/wp-content/uploads/French_WEB.pdf).

**MARCHAL N. et BOURDON J. L., (1982).** Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed. Doin, Paris.

**MARGESIN R, SCHINNER F. (2001).** Extremophiles. Institute of Microbiology (NF), University of Innsbruck, Austria, p.73-83.

**MARGESIN R. ; SCHINNER F., (1997) :** Efficiency of indigenous and inoculated coldadapted microorganisms for biodegradation of Diesel oil in Alpine soils. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol.63. N°7. pp : 2660-2664.

**MARTIN. (2011).** Exploration de la biodiversité bactérienne dans un sol pollué par les hydrocarbures : analyse par marquage isotopique du potentiel métabolique et de la dynamique des communautés impliquées dans la dégradation. Thèse en Chimie Biologie. Université de GRENOBLE.

**MELIANI A, BENSOLTANE A (2014)** Enhancement of Hydrocarbons Degradation by Use of Pseudomonas Biosurfactants and Biofilms. *J Pet Environ Biotechnol* 5:168. doi:10.4172/2157-7463.1000168

**MIGUEL RONDON, (2006).** Influence de la formulation physico-chimique et des propriétés interfaciales sur la stabilité des émulsions asphaltènes-eau-huile. Application à la déshydratation du pétrole, (Doctoral dissertation), ACADEMIE de BORDEAUX.

**MOUNIER J. (2013).** Caractérisation fonctionnelle de gènes de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* lors du développement de biofilms sur composés organiques hydrophobes ; Thèse présentée à l'Université de Pau et des Pays de l'Adour - UPPA Ecole doctorale des sciences exactes et leurs applications.

**MONOD J, C. (1999).** Nature sauvage, nature sauvée : Ecologie et peuples autochtones. *Ethnies* 13 (24-25): 236.

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

**NAIDU R. (2003).** Treatment of contaminated soil: fundamentals, analysis, applications. *Geoderma.* 111(1-2): 151-153.

**NOUMEUR. S. R, (2008).** Biodégradation du 2,4-dichlorophénol par le microbiote tellurique de la région de Hamla (Batna). Diplôme de Magister en Microbiologie appliquée et Biotechnologies microbiennes, Université MENTOURI CONSTANTINE.

**PATIENCE. O., & OGBEIFUN, L. B. (2010).** Hydrocarbon biodegrading potentials of a *Proteus vulgaris* strain isolated from fish samples. *American Journal of Applied Sciences*, 7(7), 922-928.

**PERRY, G. (2001).** Microbiologie cours et questions de révision. PCEM. PCEP. 1 er Cycle /Licence. 2 ème Cycle / Master. Pp (849-853).

**PIERRE R, VINCENT J, (2000).** Introduction à la bioremédiation des sols, des eaux et de l'air. (Institut de Recherche pour le Développement IRD, Université de Provence AIX-Marseille 1 E.S.G.B.M.A - E.S.I.L. Luminy).

**PIERRE WUITHIER, (1972),** Raffinage et génie chimique Tome1, édition technip. Paris, Page.39—65

**REZZAG K, BEN YAHKOUM R, (2005).** INFLUENCE DES EAUX USEES SUR LA NAPPE PHREATIQUE (Cas de la vallée du M'Zab). Diplôme d'Ingénieur D'Etat en Génie des Procédés, Université de Ouargla.

**RODRIGUEZ-RODRIGUEZ C. E., ZUÑIGA-CHACON C. et BARBOZA-SOLANO C. (2012).** Evaluation of growth in diesel fuel and surfactants production ability by bacteria isolated from fuels in Costa Rica.

**RON E.Z. et E. ROSENBERG (2002).** Biosurfactants and oil remediation, *Current Opinion in Biotechnology*, 3: 249-252.

**ROSENBERG, E. and RON, E. Z., (1999).** High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52: 154-162.

**ROLING W. F. M., MILNER M. G., JONES D. M., LEE K., DANIEL F., SWANNELL R. J. P., ET HEAD I. M. (2002).** Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Appl Environ Microbiol.* 68 (11): 5537-5548.

**SADEK, M., BOUTRIA, S., & SOUICI, Z. (2016).** Analyse et contrôle du pétrole brut et caractérisation des boues du fond de bac (Doctoral dissertation, Université Abderrahmane Mira-Bejaia).

**SEN, R.( 2008).** Biotechnology in petroleum recovery: the microbial EOR. *Prog. Energ. Combust.* 34, 714–724.

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

**SOLTANI, M. (2004).** Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone (Doctoral dissertation, Chimie Analytique).

**SUTHAR, H.; HINGURAO, K.; DESAI, A.; NERURKAR, A. (2008).** Evaluation of bioemulsifier mediated microbial enhanced oil recovery using sand pack column. *J. Microbiol. Methods*, 75, 225–230.

**TARAYRE. (2012).** Bioremédiation de sols pollués aux hydrocarbures. Editions Universitaires Européennes. 116p.

**TECHER, D. (2011).**Réhabilitation de sols polluent par des HAP grâce aux bactéries associées à la rhizosphère de *Miscanthus x giganteus*. Université Paul Verlaine de Metz. 307p.

**THOMPSON I.P., VAN DER GAST C.J., CIRIC L., et SINGER A.C. (2005).** Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environ Microbiol.* 7(7): 909–915. Doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00804.x.

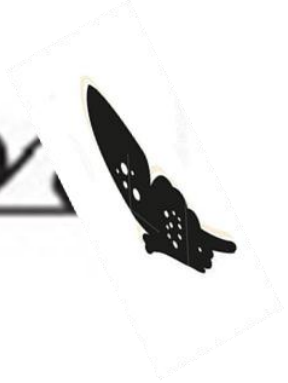
**TORTORA G .J. FUNKE B.R. et CASE C. L., (2003).**Introduction à la microbiologie. Ed. De Renouveau pédagogique Inc. pp : 157- 355.

**VAN DER GAST C.J., WHITELEY A.S., et THOMPSON I.P. (2004).** Temporal dynamics and degradation activity of an bacterial inoculum for treating waste metal-working fluid. *Environ Microbiol.* 65(3): 254–263. Doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00566.x

**WAKAI IBRAHIM YOUNOUSS, (2012).** Développement des corrélations pour le calcul des propriétés du pétrole et de ses fractions (Département de Génie des procédés, UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA).

**ZHANPENG J et HONGWEI Y. (2002).**Integrated assessment for aerobic biodegradability of organic substances Tsinghua University, Beijing, China.





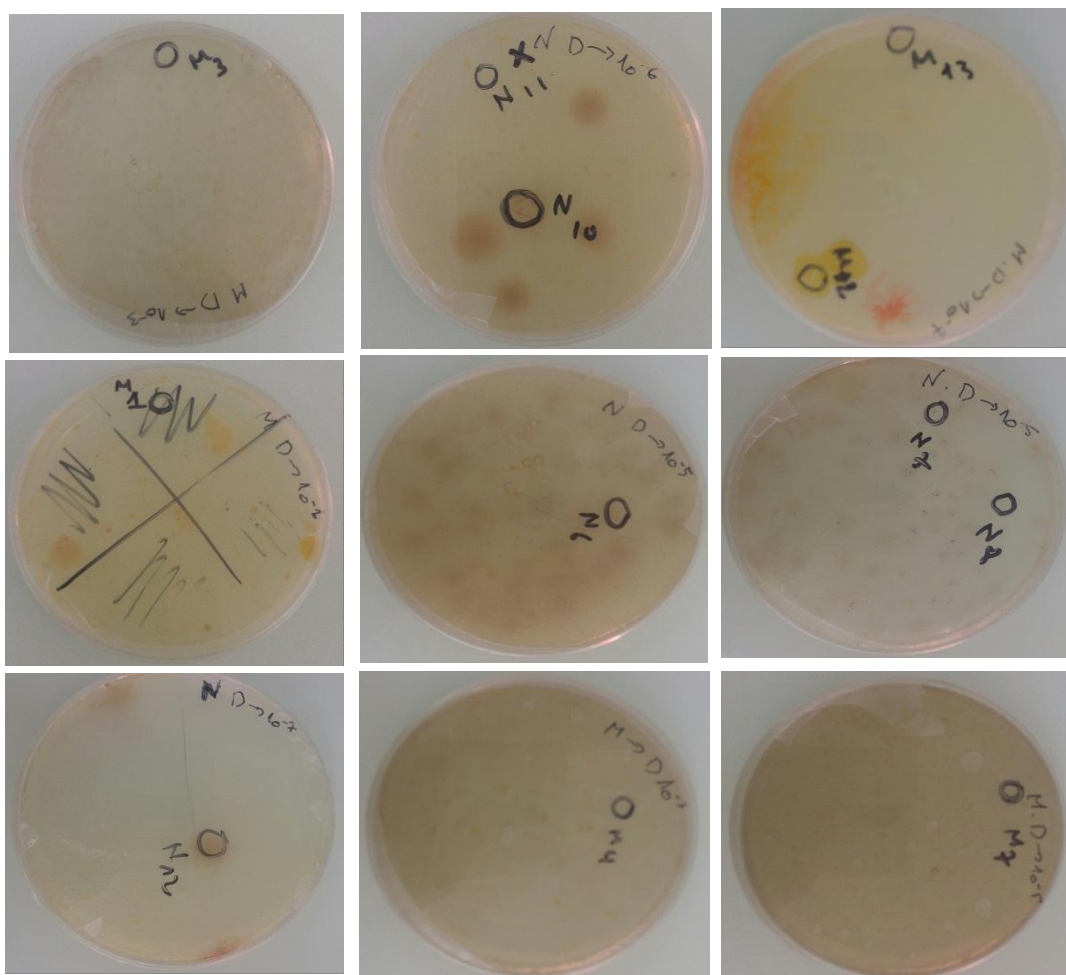
# **Annexes**



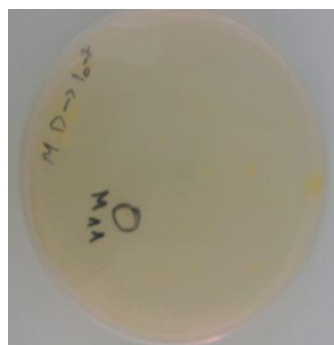
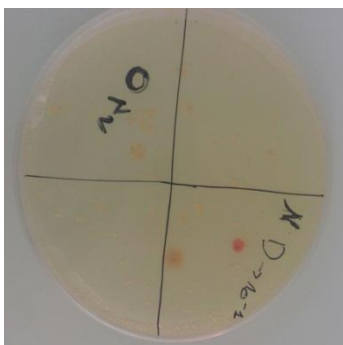
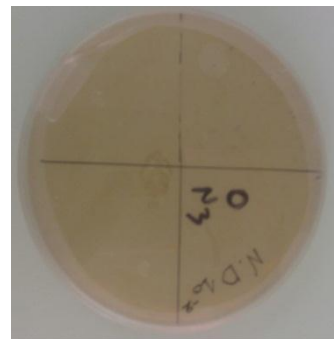
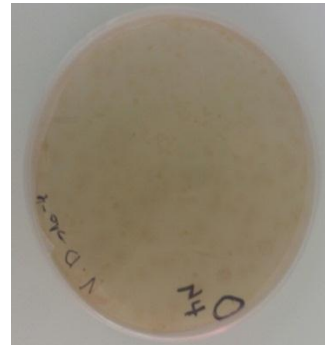
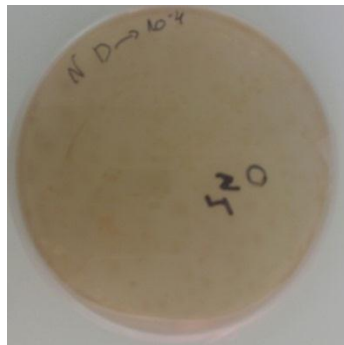
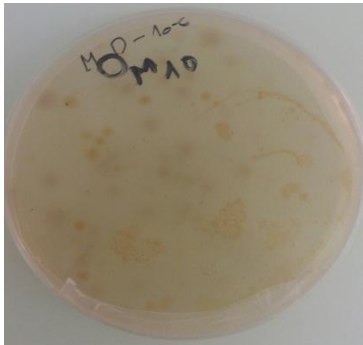
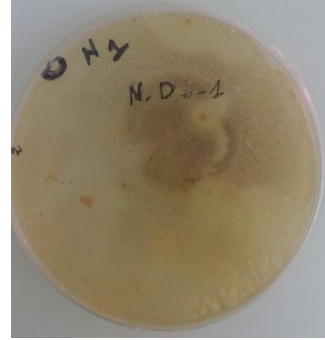
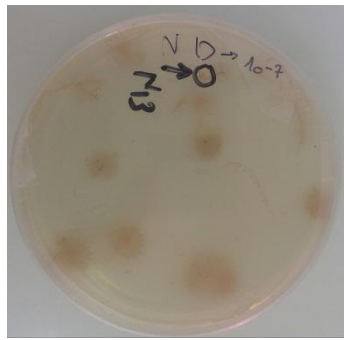
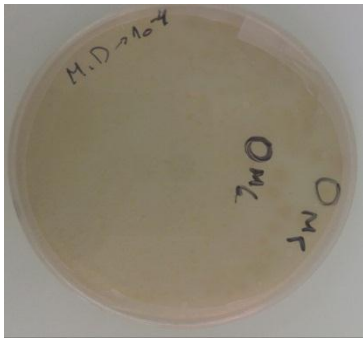
## 1- Milieu de culture MSM (ABBIA S., GUITOUN L, 2016)

MSM			
Ingrédients	Quantité	Ingrédients	Quantité
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	1, 2 gr	<b>Na Cl</b>	0, 1 gr
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	1, 8 gr	<b>MnSO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O</b>	0, 1 gr
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	4, 00 gr	<b>CuCl<sub>2</sub></b>	0, 025 gr
<b>MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O</b>	0, 20 gr	<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub></b>	0, 025 gr
<b>FeSO<sub>7</sub>H<sub>2</sub>O</b>	0, 01 gr	<b>CO(NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O</b>	0, 025 gr
<b>Zn Cl</b>	0,0 25 gr	<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	0, 1 gr
Eau distillée		1 litre	

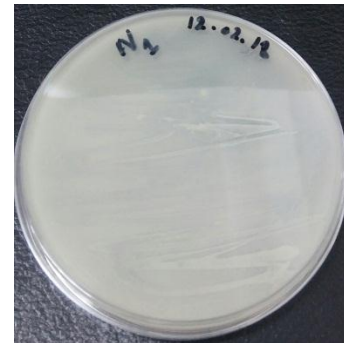
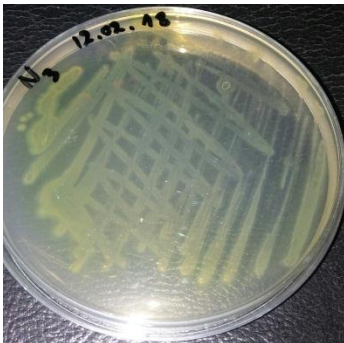
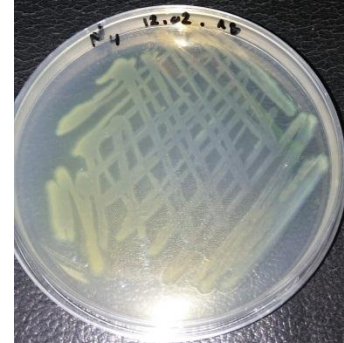
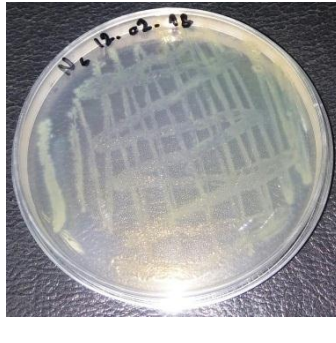
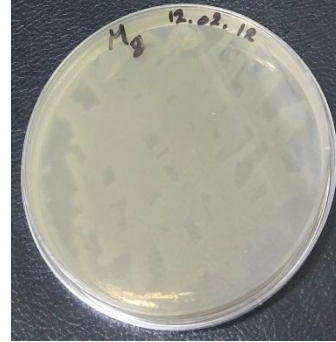
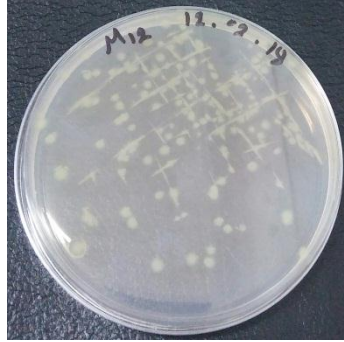
## 2- Résultats d'isolements des souches

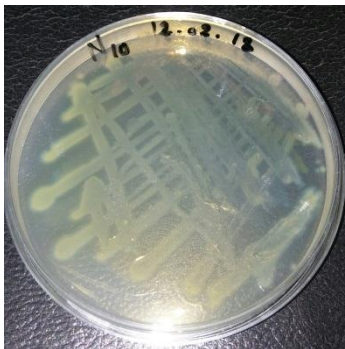
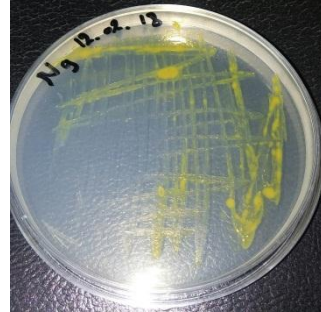
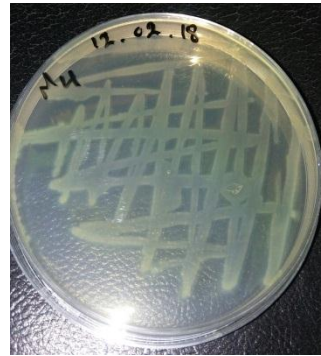
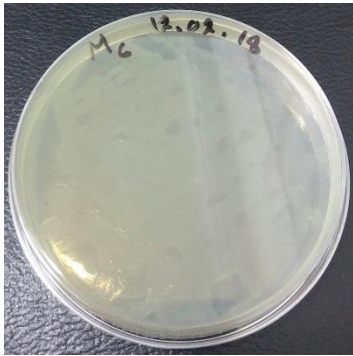






### 3- Résultats de purification des souches





5/29/2018

ABIS online – Results

AUTO MODE [ F ]  
 USER: amina  
 DATABASE VERSION: Pseudomonas 5.3.7-042018  
 STRAIN CODE: unknown

## RESULTS

1. *Pseudomonas aeruginosa* ~ similarity: 93.6%  
 Expected tests: ODC- Probability = 86.2% Integrity = 100%
2. *Pseudomonas fluorescens biovar 5* ~ similarity: 91.4%  
 Expected tests: ODC- Probability = 2.83% Integrity = 100%
3. *Pseudomonas fluorescens biovar 3* ~ similarity: 87.3%  
 Expected tests: ODC- Mannose+ Probability = 0.11% Integrity = 100%
4. *Pseudomonas gessardii* ~ similarity: 83.7%  
 Expected tests: ODC- Inositol+ Mannose+ Probability = 0.01% Integrity = 100%

INPUT tests: Motility+ Fluorescent pigment+ ADH+ H<sub>2</sub>S- Indole- LDC- ODC+ ONPG- Esculin hydrolysis- Gelatin hydrolysis+ Urease- Oxidase+ Arabinose- Citrate+ Glucose+ Inositol- Mannose- Mannitol+ Sorbitol- and Sucrose-  
 SUGGESTED discriminatory tests: Nonfluorescent pigment, 41°C, Nitrates, Adipate and 5-Ketogluconate

Legend: ■ 90-99% ■ 75-89% ■ 25-74% ■ 11-24% ■ 01-10

5/29/2018

ABIS online – Results

AUTO MODE [ F ]  
 USER: amina  
 DATABASE VERSION: Enterobacteriaceae 2.6.5-112017  
 STRAIN CODE: M7

## RESULTS

1. *Proteus mirabilis* ~ similarity: 78.9%  
 Expected tests: Catalase+ H<sub>2</sub>S+ Urease+ Glucose+ Probability = 9.07% Integrity = 100%
2. *Cosenzea (Proteus) myxofaciens* ~ similarity: 72.3%  
 Expected tests: Catalase+ ODC- Urease+ Glycerol+ Glucose+ Sucrose+ Xylose- Probability = 0% Integrity = 100%
3. *Erwinia Amylovora* ~ similarity: 71.7%  
 Expected tests: Catalase+ ODC- VP- Citrate- Urease+ Glucose+ Sucrose+ Probability = 0% Integrity = 100%
4. *Xenorhabdus nematophila* ~ similarity: 71.3%  
 Expected tests: ODC- VP- Glucose+ Mannose+ Xylose- Probability = 0% Integrity = 100%

INPUT tests: Motility+ Pigment- Catalase- Oxidase- ONPG- ADH- LDC- ODC+ VP+ Indole- H<sub>2</sub>S- Citrate+ Esculin hydrolysis- Gelatin hydrolysis+ Urease- Phenylalanine+ Arabinose- Glycerol- Glucose- Inositol- Lactose- Mannitol- Mannose- Melibiose- Raffinose- Rhamnose- Sorbitol- Sucrose- and Xylose+

Legend: ■ 90-99% ■ 75-89% ■ 25-74% ■ 11-24% ■ 01-10%

