

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche scientifique



جامعة امحمد بوقرة- بومرداس  
Université M'HAMED BOUGARA BOUMERDES  
Faculté Des Sciences  
Département de Biologie

## Mémoire de magister

Pour l'obtention du titre de Magister en Biologie  
Option Biochimie et Microbiologie appliquée

Présenté et soutenu publiquement par : M<sup>me</sup> AKMOUCI-TOUMI Sihem

Le : 15 /04 /2009

*Contribution à l'étude des boues de forage :  
Isolement et évaluation de la capacité de quelques souches microbiennes  
à dégrader le gasoil.*

Devant le jury:

Mme FAZOUANE F.	Maître de conférences (UMBB)	Présidente
Mme REFOUFI A.	Maître de conférences (UMBB)	Promotrice
Mr KHODJA M.	Docteur (CRD, SONATRACH)	Co-promoteur
Mme MECHAKRA A.	Maître de conférences (Univ. Const.)	Examinatrice
Mme KEBBOUCHE-GANA S.	Maître insistant classe B (UMBB)	Examinatrice
Mr KACI Y.	Maître de conférences (USTHB)	Examineur

*Boumerdès 2009*

## الملخص:

هذه الدراسة تهدف إلى تقييم تحلل البيولوجي لدى السلالات الجرثومية المعزولة من التربة الملوثة بسوائل الحفر (الديزل) هو أغلبية المنتج من التلوث). 6 من السلالات المعزولة، اثنتان تم اختيارها لتحسين القدرة على النمو في وجود وقود الديزل، حيث واحدة منهما تنتمي إلى جنس *Pseudomonas* (فصيلة البكتيريا) والأخرى إلى جنس *Rhodotorula* (فصيلة الخمائر). لتحقيق من قدرة هذه السلالات لتحليل الديزل، تم دراسة تطور معايير معينة مثل: التركيز الجرثومي، درجة الحموضة، التوتر السطحي، E24 ومعدل التحلل البيولوجي. تشير النتائج إلى أن هذه السلالات جيدة النمو في درجة الحموضة المعتدلة ولديهم القدرة عن خفض حدة التوتر مع السطح لدى المحلول المعدني إلى 36 ملي نيوتن/م، تم ربط هذه النتيجة إلى إنتاج الجزيئات الحيوية محددة من Biosurfactants والتي تم تحقيق وجودهم عن طريق مؤشر E24 ب 33% (*Pseudomonas*) و 37.5% (*Rhodotorula*). تجارب التحلل البيولوجي تبين أن *Pseudomonas* تحلل مجمعات n-C10، n-C12، 67,68، 40,05% و جزئياً n-C11، n-C13، n-C14، 38,53، 37,89، 30,97% في حين أن النسب لتحلل البيولوجي لـ *Rhodotorula* هي: 58,77% لـ n-C10، 37,9% لـ n-C19، 41,62% لـ n-C21 و 34,39% لـ n-C23.

كلمة المفتاح: التحلل البيولوجي و الديزل ، Biosurfactant ، *Pseudomonas* ، *Rhodotorula*

## Résumé

Cette étude a permis d'évaluer la dégradation du gasoil par des souches microbienne isolées de sols contaminés par les rejets des effluents de forage (le gasoil étant le produit majoritaire de pollution). Parmi les 6 souches isolées, deux d'entre elles ont été sélectionnées, pour leur meilleure capacité à se développer en présence de gasoil. Une identification préliminaire a révélé que l'une pouvait appartenir au genre *Pseudomonas* (bactérie) et l'autre au genre *Rhodotorula* (levure). Afin de vérifier la capacité de ces souches à dégrader le gasoil, l'étude de l'évolution de certains paramètres comme la concentration microbienne, le pH, la tension superficielle, E<sub>24</sub> et le taux de biodégradation des n-alcanes a été réalisée. Les résultats obtenus révèlent que ces souches ont une bonne croissance à des pH proches de la neutralité et ont la capacité de réduire la tension superficielle du milieu de culture à 36 mN/m. Ce résultat a été corrélé à une production de biomolécules particulières, les biosurfactants, dont la présence a bien été vérifiée et qui provoquent l'abaissement de la tension superficielle avec un index d'émulsification de 33,33 % pour *Pseudomonas* et de 37,5 % pour *Rhodotorula*. Les essais de biodégradation dans un milieu minéral ont montré que *Pseudomonas* dégrade considérablement les composés n-C10, n-C12 (67.68, 40.05) et partiellement n-C11, n-C13 et n-C14 (38.53, 37.89, 30.97 %), alors que pour *Rhodotorula* les pourcentages de dégradation sont de 58.77% pour n-C10, 37.9% pour n-C19, 41.62% pour n-C21 et 34.39% pour le n-C23.

**Mots clés :** Biodégradation, gasoil, biosurfactants, *Pseudomonas*, *Rhodotorula*.

## **Abstract**

This study used to assess the degradation of diesel by microbiologically strains isolated from soil contaminated by rejection of the effluents of drilling fluid (diesel is majority source of pollution). Of the 6 strains isolated, two of them were selected for their improved ability to grow in the presence of diesel. A preliminary identification revealed that one could belong to the genus *Pseudomonas* (bacteria) and the other genus *Rhodotorula* (yeast).

To verify the ability of these strains to degrade diesel, the study of the parameters evolution such as microbial concentration, pH, surface tension, E24 and the rate of biodegradation of n-alkanes has been achieved. The results indicate that these strains have good growth pH near neutral and have the potential to reduce the surface tension of culture medium to 36 mN/m. Result correlated to production of specific biomolecules, the biosurfactant, whose presence has been verified and that cause the lowering of the surface tension with an index of emulsification of 33.33% for *Pseudomonas* and 37.5% for *Rhodotorula*. The degradation tests in a mineral medium found that *Pseudomonas* degrades considerably compounds **n-C10**, **n-C12** (67.68, 40.05) and partially **n-C11**, **n-C13** and **n-C14** (38.53, 37.89, 30.97%) , While the percentages of *Rhodotorula* degradation are 58.77% for **n-C10**, 37.9% for **n-C19**, 41.62% for **n-C21** and 34.39% for the **n-C23**.

**Keywords:** Biodegradation, diesel, biosurfactant, *Pseudomonas*, *Rhodotorula*.

# REMERCIEMENTS

*Je tiens tout d'abord à remercier le bon Dieu de m'avoir aidé à réaliser cet ouvrage.*

*Ce travail de recherche a été réalisé au sein du Laboratoire de Centre de Recherche et de Développement de Sonatrach (CRD). Je tiens à remercier Monsieur **KHODJA M.**, chercheur au C.R.D., de m'avoir accueilli et pour l'intérêt qu'il a manifesté envers ce travail.*

*Je remercie Madame **REFOUFI A.**, Maître de conférence de l'U.M.B.B., de m'avoir fait confiance, et pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail en acceptant de diriger cette étude.*

*Je remercie l'ensemble du jury, Madame **FAZOUANE F.**, Maître de conférence à l'U.M.B.B., Madame **MECHAKRA A.**, maître de conférence à l'université de Constantine, madame **KEBBOUCHE-GANA S.**, chargé de cours à l'U.M.B.B. et monsieur **KACI Y.**, maître de conférence à l'U.S.T.H.B., qui ont bien voulu examiner ce travail.*

*Je remercie tous les enseignants de mon cursus universitaire qui ont Contribué à ma formation.*

*Mes vifs remerciements vont, également, à toutes les techniciennes du département de biologie sans exception pour leur aide et surtout pour leurs gentillesse.*

*Enfin, il me serait difficile d'omettre de remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail. Qu'ils trouvent dans ses quelques lignes l'expression de mes sincères remerciements.*

# Dédicace

*Je dédie ce mémoire :*

*A mes très chers parents avec toute ma reconnaissance.*

*A ma chère maman qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau. Ni sacrifices, ni privations ne l'ont empêché d'accomplir son devoir de mère soucieuse de l'avenir de ses enfants.*

*A mon cher papa qui a su se montrer patient, compréhensif et encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.*

*A Abdelkrim qui était toujours à mes côtés et qui n'a jamais cessé de me soutenir et de m'encourager. Jamais de simples mots ne me permettront de t'exprimer mes remerciements mon très cher mari.*

*A mon adorable bébé Ryadh qui comble notre bonheur.*

*A ma sœur : Nawel et belle sœurs : Badia et Nadia.*

*A mes chers frères : Djamel, Mustapha, Abdeslem et mon beau frère Aziz.*

*A mes petits nouveaux : Saïf Allah, Zindine ayoub, Lynda, amina, akli  
A la mémoire de mes grands parents.*

*A ma belle famille grands et petits, sans oublier : Salim, Imene et Lynda.*

*A Souad ma très chère amie, peut-être est-ce ta patience qui ne fait jamais défaut, ou encore ta bienveillance qui font de ta présence un tel cadeau ?*

*A toute ma famille.*

*A tout mes amis.*

*Ainsi qu'à tous ceux qui me sont chers.*

# Sommaire

Introduction générale.....	1
Chapitre I et II : Synthèse bibliographique	
I. Généralités sur les fluides de forage	3
1. Définition .....	3
2. Rôle de fluide de forage.....	3
3. Propriétés des fluides de forage .....	4
4. Classification des fluides de forage.....	4
5. Le devenir des rejets de fluides de forage.....	7
6. Méthodes de traitement de la pollution par les hydrocarbures aromatiques polycycliques.....	7
II. La biodégradation des hydrocarbures	
1. Mécanisme d'accès aux hydrocarbures.....	20
2. Les voies métaboliques de la biodégradation.....	24
Chapitre III : Matériels et Méthodes	
1. Matériels .....	41
1.1 Matériel biologique.....	41
1.2 Echantillonnage.....	41
1.3. Matériels non biologique.....	43
2. Méthodes.....	43
2.1 Etude de l'évolution de la contamination des bourbiers.....	43
2.2 Etude physico-chimique d'un borbier pollué par les fluides de forage.....	45
2.3 Evaluation du taux de biodégradabilité du gasoil.....	50
2.4 Etude microbiologique.....	53
2.5 Biodégradation du gasoil .....	68
Chapitre IV : Résultats et discussions	
1. Etude de l'évolution de la contamination des bourbiers.....	73
2. Caractérisation physicochimique du borbier B.....	74
2.1 Caractérisation du polluant par CPG.....	74
2.2 Dosage des paramètres indicateurs de pollution.....	75

3.	Evaluation de la biodégradabilité du gasoil.....	78
4.	Etude microbiologique.....	80
4.1	Résultats de dénombrement de la microflore totale.....	80
4.2	Isolement de souches microbiennes susceptibles de dégrader le gasoil.....	81
5.	Suivi de la cinétique de croissance des souches isolées.....	89
6.	Etude physiologique .....	92
7.	Essai de biodégradation .....	94
7.1	Influence du gasoil sur la croissance microbienne.....	94
7.2	Tolérance des souches SA et LB au gasoil .....	98
7.3	Biodégradation du gasoil.....	100
	Conclusion et perspectives.....	109

Bibliographie

Annexes

## Liste des figures

**Figure 1** : Cycle du fluide sur le site de forage (Schlumberger, 1997).

**Figure 2** : Représentations schématiques d'un pompage et traitement avec injection de tensioactif (Côme et Ducreux, 2001).

**Figure 3**: Schéma général des voies métaboliques de dégradation des n-alcanes et des isoalcanes (Ballerini et Vandecasteele, 1999).

**Figure 4**: Voie métabolique de la dégradation du cyclohexane (Atlas et Bartha, 1993; Morgan et Watkinson, 1994).

**Figure 5** : Les différents produits issus de l'oxydation du toluène (Parales et *al.*, 2000).

**Figure 6** : La voie de l'oxydation du toluène (Zylstra et Gibson, 1989 ; Sakamoto et *al.*, 2001).

**Figure 7**: Production de l'acide naphthoïque par la dégradation anaérobie des HAP (Meckenstock et *al.*, 2004).

**Figure 8**: Le mécanisme de dégradation du trichloréthylène (TCE) par une bactérie méthanotrophe (la souche 46-1) (Little et *al.*, 1988).

**Figure 9** : Photos des bourbiers contaminés de Hassi Massoud.

**Figure 10** : Respiromètre pour la mesure de la biodégradabilité des composés organiques.

**Figure 11** : Réaction de l'hydrolyse de l'ONPG (Marchal et Bourdon, 1982).

**Figure 12**: T'est d'émulsion.

**Figure 13** : Teneurs en hydrocarbures totaux, du carbone organique total et de l'humidité des échantillons de bourbiers A, B et C.

**Figure 14**: Chromatogramme de la fraction du gasoil liquide utilisé comme témoin.

**Figure 15**: Chromatogramme représentant le résultat d'analyse de la fraction d'hydrocarbure détectée dans le bourbier B.

**Figure 16** : Résultats du dénombrement sur gélose nutritive des trois échantillons de bourbiers (A, B et C).

**Figure 17** : L'aspect macroscopique (a) et microscopique (b) (G x 100) de la souche SA.

**Figure 18** : L'aspect macroscopique (a) et microscopique (b) (G x 100) de la souche SC.

**Figure 19** : L'aspect macroscopique (a) et microscopique (b) (G x 100) de la souche SD.

**Figure 20** : L'aspect macroscopique (a) et microscopique (b) (G x 100) de la souche SE.

**Figure 21** : L'aspect macroscopique (a) et microscopique (b) (G x 100) de la souche SF.

**Figure 22** : L'aspect macroscopique (a) et microscopique (b) (G x 100) de la souche LB.

**Figure 23 :** Cinétique de croissance des souches bactériennes isolées sur milieu BH à 2% du gasoil.

**Figure 24 :** Cinétique de croissance de la levure LB isolée sur milieu BH à 2% du gasoil.

**Figure 25 :** Effet de la température sur la croissance des deux souches SA et LB sur milieu BH à différentes températures pendant 24 heures d'incubation.

**Figure 26 :** Effet du pH sur la croissance de deux souches SA et LB sur milieu BH additionné de 2% de gasoil à différentes valeurs de pH pendant 24 heures d'incubation.

**Figure 27 :** Croissance de la souche SA dans un milieu BH à 30°C. a) croissance mesurée par dénombrement, b) croissance mesurée par turbidimétrie. Au temps indiqué par la flèche, du gasoil (1% v/v) est ajouté à l'une des deux cultures.

**Figure 28 :** Croissance de la souche LB dans un milieu BH à 30°C. a) croissance mesurée par dénombrement, b) croissance mesurée par turbidimétrie. Au temps indiqué par la flèche, du gasoil (1% v/v) est ajouté à l'une des deux cultures.

**Figure 29:** Croissance de la souche SA dans un milieu contenant du gasoil (25% v/v) dès le début de la fermentation.

**Figure 30 :** Croissance de la souche LB dans un milieu contenant du gasoil (25% v/v) dès le début de la fermentation.

**Figure 31 :** Effet de la concentration du gasoil sur la croissance cellulaire des souches SA et LB sur milieu Minérale BH en présence de différentes concentrations du gasoil pendant 24h d'incubation.

**Figure 32:** Variation de la cinétique de la croissance (croissance sur milieu BH à 30°C pendant 21 jours d'incubation de la souche SA) et du pH en fonction de temps.

**Figure 33:** Variation de la cinétique de la croissance (croissance sur milieu BH à 30°C pendant 21 jours d'incubation de la souche LB) et du pH en fonction de temps.

**Figure 34:** Variation de la tension superficielle en fonction de temps (croissance des deux souches SA et LB sur milieu BH à 30°C pendant 21 jours d'incubation).

**Figure 35 :** Résultats de l'index d'émulsification pour les deux souches SA et LB.

**Figure 36:** Le pourcentage de biodégradation du gasoil après 21 jours d'incubation des deux souches SA et LB sur milieu BH à 30°C.

## Liste des tableaux

**Tableau I:** Synthèse des principaux traitements de dépollution (Ballerini, 1999 ; Colin, 2000).

**Tableau II :** Résultats d'analyses physico-chimiques du bourbier B.

**Tableau III:** Variation de la teneur en hydrocarbures avec la composition du sol.

**Tableau IV :** Valeurs de DCO, DBO et taux de biodégradabilité après 28 jours d'incubation du gasoil testés.

**Tableau V :** Résultats de l'étude macroscopique des colonies isolées sur milieu BH à partir de l'échantillon du bourbier B.

**Tableau VI :** Résultats de l'étude microscopique des souches isolées.

**Tableau VII:** Résultats des tests biochimiques des différentes souches isolées.

**Tableau VIII:** Résultats des tests d'assimilation des sucres pour la souche LB.

**Tableau IX :** Paramètres de cinétiques des souches isolées et testées.

## Liste des abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

COT : Carbone Organique Total

DBO : Demande Biochimique en Oxygène

DCO : Demande Chimique en Oxygène

DO : Densité Optique

E24 : Index d'émulsification

GN : Gélose Nutritive

HAP: Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

HT : Hydrocarbures Totaux

IR : Infra Rouge

ISO : Organisation Internationale de Normalisation

NF ISO : les internationales éditées par l'AFNOR

NR : Nitrate réductase

RM :Rouge de méthyle

TPH : *Total Petroleum Hydrocarbons*

UFC: Unités Formants Colonies

VP : Voges Proskauer

# *Introduction*

## Introduction

Depuis le siècle dernier et jusqu'à nos jours, l'importance de l'industrie pétrolière n'a cessé de croître et ceci grâce au rôle stratégique et politique que le pétrole joue sur la scène mondiale. En effet, rien que pour l'année 2000, la production mondiale a atteint 11 millions de tonnes par jours de produits pétroliers (Soltani, 2004). Ces derniers sont considérés non seulement comme la matière première pour l'industrie chimique mais également comme source d'énergie la plus demandée mais et la moins coûteuse.

Depuis quelques années, les effets dévastateurs de cette industrialisation et leur impact ont été évalués sur l'environnement. En effet, de nombreux dégâts réels ont été constatés lors d'accidents (fuite de pétrole ...etc.), de rejets ou déversement volontaire, pouvant entraîner des catastrophes écologiques irréversibles.

Les conséquences de ces pollutions écologiques, peuvent avoir un impact soit direct ou indirect, sur la santé humaine, sur l'équilibre des écosystèmes aussi bien marins que continentaux. La qualité des sols peut également en être altérée.

Par ailleurs, le problème majeur rencontré dans les sols pollués par les produits pétroliers est l'atteinte des nappes phréatiques affectant ainsi la qualité des eaux. Leur décontamination pouvant nécessiter soient l'intervention de procédés physicochimiques ou alors biologiques.

En dépit de l'utilisation multiple des procédés physicochimiques dans la restauration des sols pollués par les produits pétroliers, la bioremédiation reste la solution la plus efficace, la plus demandée car la mieux maîtrisée et la moins coûteuse. Il s'agit là d'une technique douce dont le principe repose sur la minéralisation complète 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.

La réussite de la biorémédiation dépend de trois facteurs essentiels :

- Les propriétés physicochimiques du sol;
- La capacité des microorganismes autochtones de dégrader les hydrocarbures;
- La nature et la quantité des hydrocarbures.

Dans le cadre de notre travail de magister, nous avons retenu de cibler certains problèmes engendrés par l'exploitation pétrolière.

Notre étude a été réalisée au laboratoire de l'environnement « évaluation et contrôle de la pollution industrielle » du Centre de Recherche et de Développement (C.R.D) SONATRACH de Boumerdès. Elle avait pour but, l'isolement et l'identification des populations microbiennes provenant de borbier contaminé par les fluides de forage et d'autre part, d'évaluer leur capacité à les dégrader.

Pour réaliser ce travail, nous avons utilisé différentes approches:

- La caractérisation physicochimique et microbiologique d'un borbier ;
- La sélection d'isolats dégradant le gasoil ;
- L'influence du gasoil sur la croissance microbienne;
- L'influence de certains paramètres (température, pH) sur la croissance des isolats.
- La tolérance de ces isolats vis-à-vis d'un hydrocarbure toxique (gasoil);
- La capacité de ces microorganismes à dégrader le gasoil.

Nous avons structuré notre mémoire en quatre chapitres différents. Le premier et le second chapitre représentent une synthèse bibliographique. Un troisième chapitre décrivant le matériel et les méthodes utilisés. Le quatrième et dernier chapitre consacré aux résultats et discussions sera suivi d'une conclusion et perspectives.

*Chapitre I et II*

*Synthèse bibliographique*

# I. Généralités sur les fluides de forage

## I. 1. Définition :

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 (Figure 1). À la sortie du puits, il subit différents traitements, tamisage, dilution, ajout de produits, de façon à éliminer les déblais transportés et à réajuster ses caractéristiques physico-chimiques à leurs valeurs initiales. Il est ensuite réutilisé (Landriot, 1968).

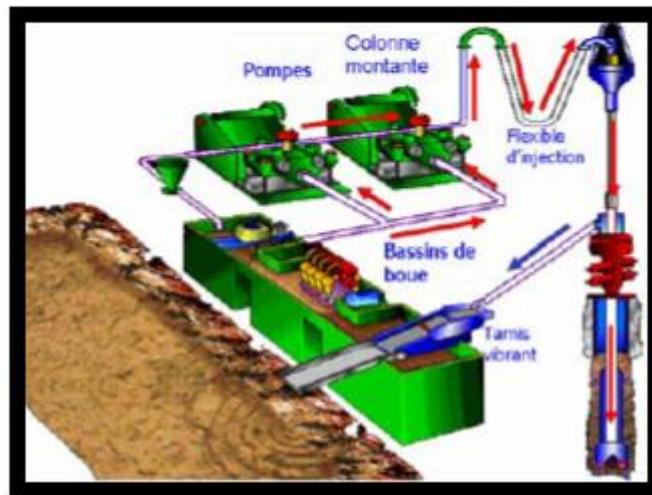


Figure 1 : Cycle du fluide sur le site de forage (Schlumberger, 1997)

## I. 2. Rôle des fluides de forage :

En général, les principaux rôles du fluide de forage sont (Chillingarian et Vorabutr, 1983; Darley et Gray, 1988) :

- Assurer la remontée des déblais du fond du puits jusqu'à la surface par la circulation d'un fluide visqueux dans l'espace annulaire.
- Maintenir les déblais en suspension lors d'un arrêt de circulation dans le but d'empêcher la sédimentation des déblais afin de redémarrer le forage sans coincement et ceci est possible grâce à la nature rhéologique du fluide.

- Refroidir et lubrifier l'outil pour éviter l'usure rapide des pièces métalliques en mouvement.
- Maintenir les parois du puits en raison de la pression hydrostatique exercée par le fluide en écoulement et permettre de contrôler la venue des fluides des formations rocheuses traversées. Du fait de cette différence de pression, le fluide va "filtrer" dans les formations perméables et déposer un film sur la paroi appelé "**cake de filtration**".
- Enfin, la boue ne doit être ni corrosive ni abrasive pour l'équipement, ni toxique ou dangereuse pour le personnel et elle ne doit pas présenter de risque d'incendie.

### **I. 3. Propriétés des fluides de forage :**

Ses principales caractéristiques sont :

1. La masse volumique ou densité : elle constitue un paramètre essentiel dans le maintien des parois du trou et les fluides en place dans les formations géologiques traversées. (Peysson, 2004)
2. La viscosité : c'est la caractéristique qui permet au fluide de suspendre et, par conséquent, transporter les déblais (Nguyen, 1993).
3. Le filtrat : c'est l'eau qui pénètre dans la formation géologique pour permettre le dépôt d'une couche de solides, appelée cake, qui enveloppe les parois du puits (Nguyen, 1993).

### **I. 4. Classification des fluides de forage :**

Traditionnellement, les fluides de forage sont classés en trois catégories selon le fluide de base utilisé dans leur préparation : l'air, l'eau ou l'huile (Ryan et Elimelech, 1996).

Ceci dit, nous sommes amenés à classer ces derniers en trois grandes familles :

- ❖ Fluides de forage à base d'eau.
- ❖ Fluides de forage à base d'huile.
- ❖ Fluides de forage gazeux.

#### **I. 4. 1 Les fluides de forage à base d'eau :**

Ces fluides sont souvent désignés par "Water-Based Muds" ou **WBM**. Ils sont dans la plupart des cas constitués par des suspensions de bentonites dans l'eau (30 à 60 g/L) dont les caractéristiques rhéologiques et de filtration sont souvent ajustées par des polymères.

Parmi les additifs on peut trouver :

a) *des viscosifiants*: argiles naturelles (souvent des bentonites), polymères synthétiques ou biopolymères;

b) *des réducteurs de filtrat* servant à consolider le cake de filtration pour limiter l'invasion par le fluide: amidons, carboxyméthylcelluloses ou CMC, celluloses polyanioniques (PAC), ou résines;

c) *des inhibiteurs de gonflement* et de dispersion des argiles: KCl, glycérol, silicates ou divers polymères comme le polyacrylamide partiellement hydrolysé (PHPA), les polyalkyleneglycols (PAG);

d) *des agents alourdissants* comme la barytine ("barite" ou sulfate de baryum  $BaSO_4$ ) et la calcite (carbonate de calcium  $CaCO_3$ ) qui sont les plus utilisés pour assurer à la boue une densité convenable. On note aussi l'utilisation de l'hématite ( $Fe_2O_3$ ) ou de la galène (PbS);

e) *des colmatants*, additifs plutôt exotiques comme des granuleux (coquilles de noix), des fibreux (fibres de bois, canne à sucre), et des lamellaires (coquilles d'huîtres, céréales) (Herzhaft, 2001; Peysson, 2004).

#### **I. 4. 2 Les fluides de forage à base d'huile :**

Les fluides à base d'huile sont des fluides dont la phase continue est une huile minérale (pétrole brut, fuel, gasoil, ...) et la phase dispersée est de l'eau.

Par définition, les fluides de forage à base d'huile contenant plus de 5% d'eau sont appelés boues de forage à émulsion inverse ; avec moins de 5% d'eau, on a les boues à l'huile (IDF, 1988). Ces fluides sont souvent désignés par "Oil-Based Muds" ou **OBM**.

La phase continue la plus utilisée jusqu'à ces dernières années était le gasoil, mais actuellement la législation relative à la protection de l'environnement impose l'utilisation d'huiles minérales ou "synthétiques", ne contenant plus de composés aromatiques. Des agents émulsifiants et mouillants sont alors utilisés pour favoriser la stabilité de l'émulsion.

Les propriétés rhéologiques de cette émulsion sont ajustées par l'addition d'agents viscosifiants, généralement des argiles organophiles. Les formulations peuvent contenir également des agents réducteurs de filtrat (composés asphalténiques et polymères) et d'autres additifs spéciaux. Il faut signaler qu'aujourd'hui la plupart des travaux de recherche portent sur l'amélioration des boues inverses synthétiques, vu leurs avantages économiques et environnementaux, comparativement aux fluides classiques à base de gasoil (Khodja, 2008).

### **I. 4. 3 Les fluides de forage gazeux :**

La phase continue de ces fluides c'est du gaz qui peut être de l'air, du gaz naturel, de la mousse, ou du brouillard. Notamment, mélangée avec des proportions d'eau provenant des formations, ou ajoutées intentionnellement.

Les fluides gazeux, communément utilisés sont :

- ❖ Forage à l'air.
- ❖ Forage à la mousse.
- ❖ Forage à la boue aérée.

#### ***- Forage à l'air***

L'air est le fluide de forage qui possède la plus basse densité et le prix de revient le moins élevée. Il apporte une solution à des problèmes compliqués parfois impossibles à résoudre avec les méthodes de forage à la boue conventionnelle. Il est recommandé dans le cas des pertes totales répétées de la boue lors de la circulation ainsi que dans le forage des couches productrices sous-faible pression (Houache et Sellami, 2001).

#### ***- Forage à la mousse***

Les mousses sont des dispersions d'un volume de gaz important dans un volume de liquide relativement faible. Elles sont utilisées comme fluides de forage lorsque les terrains traversés sont fracturés, ou lorsque le forage à l'air est impossible parce que la pression nécessaire ne peut être fournie sur le chantier. L'avantage du forage à la mousse se résume par sa faible pression hydrostatique au fond et par son excellent pouvoir de remontée des déblais à moins que la mousse ne refroidisse pas convenablement les terrains traversés ainsi que le train de sonde et ne contrôle pas la tenue des parois du puits (pas de cake).

Des problèmes de sécurité au sujet de l'utilisation de la mousse en réservoir sont à signaler, notamment des explosions dans le cas où le volume d'hydrocarbures gazeux est compris entre 3 et 10% par rapport à l'air. C'est le cas en 1992, du puits RB-13 en Algérie, une explosion s'est produite suite à une contamination de la boue par une venue d'huile ou de gaz (Abid, 1995).

#### ***- Forage à la boue aérée***

Le forage à la boue aérée est utilisé afin d'éviter les pertes de circulation et pour avoir un fluide de forage plus léger. Les avantages sont une bonne tenue des parois grâce à un cake

contrôlé, une tendance aux pertes de circulation fortement réduite et une vitesse d'avancement plus grande, une assez bonne capacité de refroidissement des terrains traversés et du train de sonde, à moins que la stabilité de la boue aérée ne soit liée à une circulation effective des fluides (Khodja, 2008).

### **I. 5. Le devenir des rejets de fluides de forage :**

A la sortie du puit, le fluide de forage remonte, chargé de déblais. Ces derniers séparés du fluide de forage par tamisage, sont rejetée dans une grande excavation, réalisé à cette effet, appelée : Bourbier. Il se trouve que ces rejets gardent en rétention des quantités importantes du fluide porteur par un phénomène appelé : enrobage ou encapsulation.

Lorsque c'est une OBM qui est utilisée, on mesure le pourcentage massique d'huile sur les déblais ou OOC% (Oil On Cutting). Le OOC% dépend de la nature de la roche, des caractéristiques du fluide, de la taille et de la forme des déblais. OOC% est dû à la présence de deux types d'interactions :

- Liquide – solide, par adsorption.
- Liquide – liquide, par interaction de type Van Der Walls.

Un bourbier à Hassi Messaoud, en fin de forage, peut contenir jusqu'à 600 m<sup>3</sup> de gasoil perdu par encapsulation. Ces quantités de gasoil se trouvent par la suite « lessivées » par l'action des eaux de rejets qui peuvent atteindre jusqu'à 12000 m<sup>3</sup> dans un seul bourbier à Hassi Messaoud. Les hydrocarbures non solubles dans l'eau se retrouvent en flottation sur la surface de l'étendue d'eau, alors que les hydrocarbures solubles dans l'eau se verront entraînés en profondeur par infiltration du fluide vecteur, en l'encurence l'eau de rejet (Lounis et Daoud, 2005).

### **I. 6. Méthodes de traitement de la pollution par les HAP (Hydrocarbures aromatiques polycycliques) :**

Les HAP sont connus pour représenter un risque certain pour la santé humaine et les écosystèmes, si leur concentration et leur mobilité sont trop importantes. Afin d'éviter la diffusion des HAP des sites contaminés vers les profondeurs des sols, des mesures doivent être prises en considération. Le choix d'une méthode particulière de dépollution va dépendre, au préalable, de certains paramètres comme le type de polluant et de la variabilité de son

comportement (volatilité, adsorbabilité, polarité...), de la diversité des conditions locales (nature du sol, de la nappe, accessibilité, disponibilité de surfaces utilisables à proximité, zone urbaine ou non), de voir s'il s'agit d'une pollution récente ou ancienne, de son étendue ou non. En plus, les exigences économiques et administratives sont à prendre en compte. Tout ceci nécessite donc, au préalable, un diagnostic.

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

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

La dépollution peut être mise en oeuvre en utilisant les techniques suivantes :

1. techniques physiques,
2. techniques chimiques qui font appel à un principe réactionnel (action d'un solvant, oxydation...) pour transformer le polluant en un composé moins toxique et inerte vis-à-vis de l'environnement,
3. techniques thermiques qui consistent à chauffer le matériel contaminé pour en extraire le polluant et le détruire,
4. techniques biologiques qui favorisent la biodégradabilité des produits.

## **I. 6. 1 Les techniques physiques**

Actuellement, elles constituent la majorité des techniques mises en oeuvre. On distingue deux types de méthodes : celles par piégeage et celles par évacuation.

### **I. 6. 1. 1 Les procédés physiques par piégeage**

Le **confinement** consiste à isoler la source de pollution à l'aide de matériaux argileux et/ou synthétiques. Ils sont utilisés en couverture, en parois verticales et horizontales, en injections dans le sol ou en enrobage des déchets (encapsulation). En règle générale, le site est recouvert de manière à éviter le lessivage et reste sous surveillance à l'aide de piézomètres.

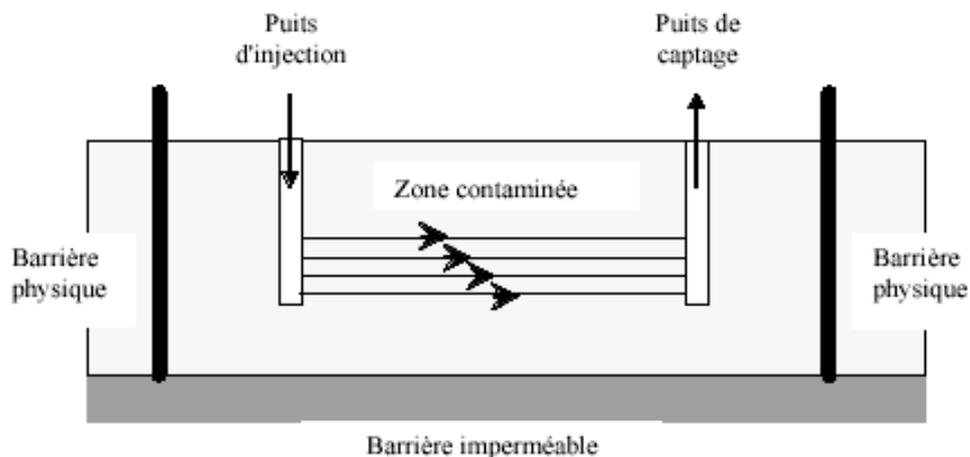
La **solidification-stabilisation** s'applique principalement sur des sols excavés. Les polluants sont piégés dans une matrice formant un matériau solide, peu perméable et non réactif. La stabilisation à la chaux ou par des argiles est employée pour des pollutions liées à la créosote ou des déversements de pétrole (naufrages de pétroliers). Cette technique est aujourd'hui délaissée au profit de techniques de traitement plus efficaces (Colin, 2000).

### I. 6. 1. 2 Les procédés par évacuation

L'**excavation** est la méthode la plus simple à mettre en oeuvre et qui permet de supprimer rapidement une source de pollution locale. Généralement, les terres excavées sont acheminées vers un centre de traitement spécialisé ou vers un centre d'enfouissement technique. Un schéma classique de traitement consiste à tamiser le sol à sec afin d'éliminer la fraction la plus grossière (diamètre > 4-5 mm). Ensuite, de l'eau est ajoutée et le mélange sol-eau est homogénéisé puis tamisé en plusieurs fractions.

Les sables sont séparés des limons et des argiles. Les polluants se concentrent dans les fractions les plus fines que l'on fait flocculer puis passer à l'épaississeur et ensuite dans un filtre presse pour être finalement traités. Le système fonctionne en circuit fermé. Pour améliorer la récupération des HAP, des tensioactifs sont ajoutés au fluide de lessivage, permettant ainsi la dispersion des polluants dans la phase liquide (Côme et Ducreux, 2001).

Le "**pompage et traitement**" permettent de confiner hydrauliquement la pollution (Figure 2) et de procéder à une décontamination en surface de l'eau pompée afin de pouvoir la réinjecter.



**Figure 2 : Représentations schématiques d'un pompage et traitement avec injection de tensioactif (Côme et Ducreux, 2001).**

Cette technique nécessite souvent l'ajout d'un tensioactif pour favoriser la désorption des HAP (Côme et Ducreux, 2001). En effet, de nombreux auteurs (Thiem et *al.*, 1997 ; Lafrance et Lapointe, 1998 ; Bordas et Lafrance, 2001) ont démontré en laboratoire (colonnes de sol) l'inefficacité de cette méthode sans l'ajout de tensioactifs. Cette technique reste la plus classique et est parfaitement maîtrisée (Colin, 2000). Les principaux intérêts de cette méthode sont une mise en oeuvre assez rapide et une durée de traitement variant de 3 à 18 mois, dans des conditions optimales. Cependant, le risque de dissémination de la pollution peut être important si l'ouvrage est mal implanté ; ce qui attirera la pollution vers une zone non contaminée.

Il est possible d'améliorer le "pompage et traitement" en utilisant des conditions techniques différentes. En effet, une étude réalisée par Dadkhah et Akgerman (2002), a montré qu'il est possible d'utiliser une extraction par injection de vapeur (230 à 270 °C), en la combinant à une oxydation chimique (O<sub>2</sub> ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Les rendements obtenus dépassent largement ceux obtenus avec la technique habituelle, et de plus, les HAP sont transformés en composés moins toxiques.

### **I. 6. 1. 3 Technique du pompage-écrémage**

Une autre méthode, est celle du **pompage-écrémage** qui est basée sur le pompage sélectif d'un produit flottant. Cette technique s'applique donc pour des produits organiques en phase flottante au toit de la nappe, comme les hydrocarbures. Cette méthode est en général couplée à un rabattement de nappe (méthode passive à l'aide d'une tranchée ou fossé de drainage, ou méthode active à l'aide de pompes) qui facilite l'écoulement du toxique vers le point de captage.

L'intérêt principal de cette méthode repose sur l'élimination rapide d'une grande quantité de polluant et, si le rabattement n'est pas trop fort, elle n'induit pas de pollution en profondeur supplémentaire. Cette technique ne s'emploie pas seule et est toujours couplée à des méthodes permettant de traiter le polluant restant, qui représente en moyenne 50% de la quantité initiale contenue dans le sol (Colin, 2000). Cet auteur indique que les coûts globaux, hors pompage de rabattement, se situent entre 23 000 et 76000 € pour une opération moyenne typique, par exemple une station service.

D'autres techniques, comme l'extraction sous vide et la ventilation ("venting") existent mais sont peu applicables aux HAP, qui sont peu volatils.

## **I. 6. 2 Les procédés thermiques**

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 (Lecomte, 1995).

L'incinération est la seule technique qui détruit réellement les polluants. Cependant cette technique est extrêmement coûteuse (380 €. $t^{-1}$ ) et les fumées toxiques qui se dégagent lors de la combustion nécessitent d'importants traitements engendrant ainsi des surcoûts (Dadkhah et Akgerman, 2002).

L'incinération se réalise en deux étapes. La première à 400°C, dite de volatilisation et une seconde dite de destruction se produisant à une température supérieure à 1 000°C. La méthode la plus largement utilisée est celle du désorbeur ou four rotatif (Lecomte, 1995 ; Colin, 2000). Selon cette méthode, le sol débarrassé des fractions grossières, est porté à une température suffisamment élevée pour permettre la désorption de l'humidité et des contaminants. Il est constamment agité pendant l'opération et les gaz émis sont traités à la sortie. Ce procédé est bien adapté aux sols contaminés par des hydrocarbures.

La **vitriification** consiste à transformer par élévation de température, un sol contaminé en un matériau fondu inerte. C'est donc une méthode thermique *in situ* se rapprochant de la stabilisation. Cette méthode est utilisée sur des sites difficiles à traiter par d'autres méthodes. La fusion du sol est obtenue en enfonçant dans le sol des électrodes jusqu'à une profondeur nécessaire pour le traitement, et en provoquant, par un courant électrique, une intense augmentation de température, de l'ordre de 2000 °C. A cette température, la matrice du sol entre en fusion et est transformée par pyrolyse en un verre silicaté, où tous les composés présents sont fondus ou vaporisés.

Cette méthode évite l'excavation et le déplacement de composés hétérogènes. Elle minimise le risque d'exposition aux contaminants, tout en étant durable. De plus, sa vitesse d'exécution est

rapide : 3 à 5 tonnes par heure. Le produit obtenu a un taux de lessivage très bas (Colin, 2000). Cependant, il existe quelques inconvénients à cette méthode, comme la position des électrodes qui limite la profondeur et la surface à traiter. De plus, il peut se produire un dégagement de gaz toxiques, devant alors être traités.

Elle nécessite également un potentiel énergétique important et coûteux : la consommation est évaluée à 750 kWh.t<sup>-1</sup>. Enfin, bien que permettant une bonne stabilité du matériau, cette méthode présente l'inconvénient d'empêcher la réapparition d'un tapis végétal (Lecomte, 1995 ; Colin, 2000).

### **I. 6. 3 Les traitements chimiques**

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

#### **I. 6. 3. 1 Les méthodes de mobilisation et d'extraction**

Les applications *in situ* se font par aspersion du sol par une solution chimiquement réactive (ex : tensioactif) qui va s'infiltrer dans le sol et mobiliser le polluant. La solution chargée du polluant est ramenée en surface par des drains ou des pompes dans des puits. Ensuite, elle est purifiée et recyclée pour une nouvelle aspersion. Le cycle peut ainsi fonctionner en continu, sur de très longues périodes, avec des apports de solutions neuves en cas de pertes.

La principale difficulté de cette technique est la surveillance du panache de pollution qui ne doit pas migrer hors de la zone de récupération. De plus, cette technologie est inopérante pour des sols à granulométrie fine (type argiles et limons fins), car elle altère l'état du sol et provoque des colmatages. De surcroît, ces sols peu perméables présentent une faible conductivité hydraulique qui limite la récupération des polluants mobilisés en phase aqueuse.

Ainsi, dans le cas d'utilisation de surfactant, les tensioactifs anioniques seront préférés aux tensioactifs cationiques qui sont reconnus pour se sorber au sol et provoquer les colmatages des ouvrages (West et Harwell, 1992). Le surfactant choisi doit être préférentiellement non

toxique envers les micro-organismes du sol et être biodégradable. Ainsi, l'utilisation de tensioactifs biologiques semble être conseillée. En effet, leur efficacité a été démontrée dans le cadre de plusieurs travaux (Mccray et Brusseau, 1998).

Dans le cas d'une application sur site, le sol est excavé et traité par la technique du "soil flushing" expliqué au paragraphe 1.2. Les avantages de cette méthode sont d'une part, sa facilité de mise en place et son coût peu élevé (dans la mesure où la solution de lessivage l'est), et d'autre part, son rendement intéressant. Les principaux inconvénients à prendre en compte concernent l'état du sol après traitement : les lessivages par des solutions toxiques et l'effet de colmatage plus ou moins prononcé peuvent altérer l'état des sols de façon irréversible. A cela s'ajoute un risque de migration non contrôlée de la pollution, soit latéralement ou vers des couches plus profondes de l'aquifère et ceux dans le cas d'un traitement *in situ*.

### **I. 6. 3. 2 Les réactions chimiques**

Elles permettent de transformer les polluants en des composés moins toxiques et de mobilité différente. Ce type de traitement est habituellement appliqué sur site. L'oxydation est la seule méthode applicable aux HAP car la réduction ne se fait que sur des produits halogénés.

En pratique, peu d'oxydants peuvent être utilisés car ils sont très sensibles au pH, et la forme sous laquelle ils sont disponibles n'est pas nécessairement compatible avec un traitement à grande échelle. Les plus utilisés pour traiter les HAP sont l'ozone (O<sub>3</sub>) et le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Dans tous les cas, les oxydants n'ont pas une action spécifique. Et une partie sera consommée par des réactions avec la MO des sols, altérant ainsi ces derniers. Ces réactions induisent un coût supplémentaire.

L'**ozone** sert à traiter les effluents liquides mais peut être utilisée *in situ*. En effet, Masten et Davies (1997) ont obtenu des rendements de plus de 95 % d'élimination du phénanthrène pour une durée d'ozonation de 2,3 heures et un flux d'ozone de 250 mg.h<sup>-1</sup>. En ce qui concerne le pyrène, 91 % ont été éliminés après 4 heures de traitement et un flux d'ozone de 600 mg.h<sup>-1</sup>. Des rendements plus faibles ont été obtenus avec l'anthracène (50 %). Ces auteurs indiquent que cette technique était applicable car la demande en ozone (taux de dégradation) du sable étudié était faible.

**L'eau oxygénée** est utilisée pour dégrader directement les composés organiques complexes et réfractaires à la biodégradation. Son action peut être catalysée par l'action des rayons ultraviolets ou du fer ferreux (Réactif de Fenton), qui va activer la décomposition du peroxyde d'hydrogène en radicaux OH. Ces derniers réagissent avec les composés organiques et provoquent leur décomposition en produits inoffensifs comme H<sub>2</sub>O et CO<sub>2</sub>.

L'utilisation commerciale de l'eau oxygénée permet de traiter les zones saturées (Ballerini et Vandecasteele, 1999), mais présente de nombreux inconvénients. En effet, ce processus, bien qu'efficace, n'est pas spécifique.

Kawahara *et al.*(1995) ont montré une augmentation importante (de 13 à 56 %) de l'extractabilité des HAP sur un site d'utilisation de composés de préservation du bois (créosote), et ceci après 1 heure de traitement d'un sol argileux par le réactif de Fenton. Bogan et Sullivan (2003) ont obtenu des résultats similaires, mais en ajoutant en plus de l'huile végétale (biodégradable) dans le sol. En effet, l'huile va permettre d'introduire une phase organique qui va faciliter la dissolution des HAP dans cette phase.

#### **I. 6. 4. Les méthodes biologiques**

Les procédés biologiques permettent de dégrader les polluants par l'action de microorganismes (bactéries, champignons...). Ils peuvent être utilisés seuls ou en complément d'une autre technique. La décontamination par voie biologique consiste donc à stimuler un phénomène naturel pour en augmenter le rendement afin de détruire le polluant organique qui sera utilisé comme source de carbone (Colin, 2000).

La décontamination se fait *in situ* en introduisant dans le sol les éléments nécessaires au développement de la biomasse ou bien *ex situ* en traitant le sol excavé. Pour la dégradation des hydrocarbures, différents micro-organismes sont utilisés tels que *Arthrobacter*, *Novocardia* ou *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 (Colin, 2000).

##### **I. 6. 4. 1 Biodégradation par traitement *in situ***

Cette technique fait appel au pompage et injection de l'oxygène sous forme gazeuse (O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>) ou liquide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) avec injection de nutriments nécessaires à l'activité microbienne. La source

d'oxygène est le principal inconvénient de ce système, car l'injection d'eau saturée en air n'est pas suffisante. L'apport d'oxygène s'effectue de plus en plus en phase liquide surtout à partir de peroxyde d'hydrogène. Cependant, cette source d'oxygène présente trois inconvénients majeurs : son coût, le caractère corrosif de  $H_2O_2$ , qui attaque les puits d'injection (Colin, 2000) et le pouvoir désinfectant de  $H_2O_2$  si celui-ci est utilisé à de fortes concentrations.

Du fait de la lenteur du processus de dégradation des HAP, notamment attribuable à leur forte adsorption au sol, il peut être nécessaire d'augmenter la biodisponibilité des HAP par ajouts de tensioactifs. En effet, Kosaric (2001) a observé une réduction significative de la concentration en HAP après 22 jours de bioremédiation et ajout de bio tensioactif.

#### **I. 6. 4. 2 Traitement en réacteur**

Le principe de ce traitement consiste à réaliser et faciliter la biodégradation dans un contenant installé sur le site, en ajoutant au sol les nutriments nécessaires aux micro-organismes.

Le sol excavé va subir diverses opérations de broyage, de tamisage et d'homogénéisation. Il sera ensuite mélangé à de l'eau, généralement en proportions de 30 % en poids / volume et introduit dans le réacteur par pompage. Différents modes de fonctionnement sont possibles, soit en continu ou en discontinu.

La plupart des dispositifs sont constitués de plusieurs réacteurs en chaîne, ce qui permet de transférer la boue d'un réacteur à l'autre. Les quantités de nutriments, calculées en fonction de la quantité initiale de polluant, sont ajoutées régulièrement afin de maintenir un rapport optimum entre les taux de carbone, d'azote et de phosphore. Des micro-organismes peuvent également être ajoutés pour maintenir la concentration en biomasse. Dans chaque réacteur, un brassage assure un contact et un transfert de masse maximum entre le polluant et les bactéries. Une aération complète le dispositif. Les gaz produits sont traités à l'aide de filtres à charbon actif. Après séparation du solide et de l'eau, la terre recueillie est stockée puis remise sur site et l'eau contenant les micro-organismes est recyclée.

Cette technique s'adresse à des sols pollués par des substances peu biodégradables, types d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), et pour des sols généralement difficiles à traiter comme les sols argileux. L'ADEME indique que la technique est efficace pour des polluants présents à des concentrations comprises entre 2,5 et 250  $g.kg^{-1}$ . Pour des HAP à

trois noyaux aromatiques, le taux d'élimination est de 98-99 % ; il diminue à 85-95 % pour ceux à quatre noyaux et à 55-85 % pour ceux à plus de quatre noyaux.

Les coûts sont généralement plus élevés comparés à ceux des autres traitements biologiques. Mais toutefois, ils restent moins chers que l'incinération et se situent entre 85 et 230 €. $t^{-1}$ .

Les principaux atouts de cette technique sont d'un côté, sa facilité à contrôler et maintenir les conditions optima de traitement et de l'autre, les durées de mises en oeuvre sont plus courtes et n'excèdent généralement pas 6 à 9 mois. Enfin, la structure du sol n'est pas trop altérée et sa réutilisation est envisageable pour des reconstructions paysagères.

Donc le principal inconvénient de cette méthode étant le coût par rapport aux autres techniques biologiques accompagné d'une efficacité moindre pour des HAP de masse élevée. Dans ce cas, l'ajout de tensioactif va rendre ces polluants plus accessibles aux micro-organismes et va donc, améliorer les rendements. Un autre inconvénient à l'utilisation de cette technique peut être la toxicité des sous-produits formés au cours du processus de bioremédiation (Dubourguier, 2000).

En France, ce procédé a déjà été utilisé couplé à une oxydation chimique (réactif de Fenton). Les travaux menés par Herviou *et al.* (2000) ont été réalisés sur deux types de sols pollués par des HAP lourds. Les auteurs ont obtenu des rendements de biodégradation de 29 et 41 % suivant le type de sol, avec le coût de l'opération évaluée à 107 €. $t^{-1}$ . Ces deux paramètres font qu'actuellement cette technique n'est pas économiquement viable.

#### **I. 6. 4. 3 Biotertre et Landfarming**

Le **biotertre** et le **landfarming** regroupent toutes les applications mettant en oeuvre des lots de terres contaminées de différentes hauteurs, y compris ceux auxquels ont été additionnés des matières végétales (composts) (Lecomte, 1995).

Pour se faire, le sol est étalé après excavation sur une grande surface imperméable, sur une épaisseur de quelques dizaines de centimètres. Ensuite la terre est retournée avec d'éventuels ajouts favorisant la biodégradation. Les coûts sont de l'ordre de 45 à 80 €. $t^{-1}$  et la durée du traitement variant de 12 à 24 mois pour les HAP, avec un taux moyen d'élimination de 80 % (le rendement varie selon la molécule) (Lecomte, 1995).

Lorsque le taux d'élimination n'est pas suffisamment élevé, la biostimulation peut être effectuée par ajout de nutriments spécifiques, ou bio augmenté par ajout de bactéries adaptées à la pollution. Straube *et al.* (2003) ont constaté une réelle amélioration des taux de dégradation des HAP après avoir ajouté de l'azote (augmentation de 10 % du taux de biodégradation). De même, Juhasz et Naidu (2000) suggèrent que la bio augmentation est une solution pour favoriser la dégradation des HAP lourds (benzo[a]pyrène) ou le traitement des sols fortement contaminés.

Pour des sols pollués contenant des contaminants volatils en quantités non négligeables, ou dans des pays où la législation interdit le traitement de dépollution à l'air libre (Québec par exemple), l'utilisation de la "**biopile**" est nécessaire. Les réacteurs à l'air libre sont alors remplacés par des réacteurs où les flux de gaz et de liquide sont parfaitement contrôlés. On réalise une pile de plusieurs mètres de hauteur que l'on place sur une couche drainante. Un système d'aspersion et un système de rigole sont mis en place. Pour les gaz, le procédé utilise le plus souvent un système de ventilation/extraction qui permet d'aspirer les composés émis ou d'injecter de l'air frais. Une couverture étanche (géo membrane) vient recouvrir l'ensemble. Cette technique est utilisée pour traiter les HAP. Lecomte (1995) indique qu'après 9 mois de traitement, 80 % en masse des HAP ont été dégradés.

#### **I. 6. 4. 4 La phytoremédiation**

Certaines plantes permettent de transformer (phytoremédiation) ou de stabiliser (phytostabilisation) les polluants dans les sols. En effet les racines de celles-ci sont étroitement associées à une microflore bactérienne et fongique qui va aider ou faciliter la dégradation des COH (Liste et Alexander, 2000). Longtemps, la phytoremédiation était restée essentiellement appliquée aux métaux lourds, mais de récentes études ont montré que cette technique est utilisable pour les HAP (Ballerini, 1999). Cependant, les mécanismes mis en jeu sont encore mal connus (Binet *et al.*, 2000).

La phytoremédiation peut être réalisée à l'aide de diverses espèces végétales comme l'avoine, le lupin, le colza (Liste et Alexander, 2000), le ray-grass (Binet *et al.*, 2000). Dans la plupart des cas, la phytoremédiation a été étudiée sur des sols riches en argile. Ballerini (1999) indique que le système fibreux racinaire de l'herbe facilite à la fois l'accessibilité des contaminants et le métabolisme microbien.

Les rendements d'élimination varient avec le nombre de cycles des HAP. Binet *et al.* (2000) ont observé une augmentation de la dissipation ou de la biotransformation de plusieurs HAP, incluant ceux de cinq et six noyaux aromatiques. Cependant, ces auteurs indiquent que les meilleurs taux d'élimination sont obtenus pour les HAP de trois cycles, comme le phénanthrène ou l'anthracène. Par ailleurs, Liste et Alexander (2000) ont obtenu en 8 semaines, 74 % d'élimination du pyrène sur un sol avec des plantes. Alors que les rendements chutent à moins de 40 % pour un sol sans plantes.

Les différentes techniques de traitement de la pollution par les hydrocarbures aromatiques polycycliques sus citées sont résumées dans le tableau I.

**Tableau I: Synthèse des principaux traitements de dépollution**  
(Ballerini, 1999 ; Colin, 2000)

Technique	Principe du traitement	Estimation du coût (€·t <sup>-1</sup> )	Avantages et Inconvénients	Durée de traitement	Rendements
Pompage-écrémage	Pompage des produits flottants sur la nappe	20 à 80	Élimination rapide de la pollution	Durée brève	50 %
Pompage et traitement	Entraînement des polluants avec l'eau	20 à 160	Risque de dissémination de la pollution	3 à 18 mois	Varie avec la solution lavante
Confinement	Excavation et mise en décharge	600 à 1000	Isole la pollution, Dégradation du sol		
Stabilisation	Injection de produits liants pour fixer la pollution	20 à 200	Technique désuète Dégradation du sol		
Incinération	Incinération en four tournant à haute température	270 à 1100	Technique efficace mais coûteuse et toxicité des fumées émises		Jusqu'à 99 %
Vitrification	Fusion du sol	180 à 400	Pas de réapparition de tapis végétal	Rapide : 3 à 5 t.h <sup>-1</sup>	
Traitement chimique	Ajout d'oxydants pour les transformer en espèces moins nocives	10 à 100	Procédé non spécifique		50 à 95 % suivant le HAP
Bioslurry	Biodégradation	85 à 230	Facile à mettre en oeuvre et à contrôler	2 à 3 semaines	Jusqu'à 95 % suivant le HAP
Biorette et Landfarming		45 à 80	Facile à mettre en oeuvre et à contrôler, mais peu rapide	12 à 24 mois	Jusqu'à 80 % suivant le HAP

## **II. La biodégradation des hydrocarbures**

Le devenir des produits pétroliers rejetés dans l'environnement est principalement gouverné par le processus de biodégradation. L'existence de ce phénomène dépend non seulement de la biodégradabilité intrinsèque du polluant mais aussi de la présence de microflore dégradatrices compétentes dans les sols et les eaux souterraines (Solano-Serena et *al.*, 2001).

Les interactions physiques, métaboliques avec la communauté microbienne contribuent à la nature dynamique de ce système qui utilise différentes méthodes pour accéder aux hydrocarbures. Une compréhension de ces interactions est nécessaire aux développements des techniques de traitement pour la biodégradation des hydrocarbures (Van Hamme et Ward, 2001).

### **II. 1 Mécanisme d'accès aux hydrocarbures**

Depuis longtemps, la faible dégradation de plusieurs contaminants a été attribuée à leur récalcitrance (résistance à l'attaque enzymatique). Mais, depuis le début des années 90, il a été avancé que c'est plutôt leur très basse hydro-solubilité qui expliquerait leur catabolisme difficile et limité (Comeau, 1999).

Selon Scott et Finnerty (1976a, b), le mécanisme d'accès impliqué dans le transport des hydrocarbures à travers la paroi des microorganismes est mal élucidé bien que des gouttelettes d'hydrocarbures soient fréquemment observées dans la cellule (Morgan et Watkinson, 1994). Ainsi, du fait de la faible solubilité de la plupart des hydrocarbures, le mécanisme d'accès par les microorganismes peut d'après selon de nombreux auteurs se faire selon quatre modes que l'on peut décrire comme suit :

#### **a. Utilisation de la phase dissoute (le transfert par solubilisation dans la phase aqueuse) :**

Ce modèle est celui généralement accepté pour la plupart des substrats. Une fois le substrat dissout et assimilé, la bactérie ne peut utiliser que les molécules se solubilisant dans l'eau. Par exemple, il a été démontré que la solubilité et la vitesse de dissolution du naphthalène limitent la croissance d'une souche alcaligène NP-ALK. Au début de croissance, la faible densité cellulaire de la culture initiale permet une croissance exponentielle puisque la concentration de naphthalène dissous va suffire aux besoins métaboliques. Si la densité cellulaire augmente à un niveau où les exigences nutritionnelles surpassent la vitesse de dissolution, la

biodisponibilité deviendra alors limitante et la croissance linéaire. Cette dernière va dépendre alors de la vitesse de dissolution du naphthalène (Comeau, 1999).

### **b-Le transfert interfacial direct (TID) :**

Dans ce, cas le microorganisme ne produit pas de biosurfactant mais va adhérer du fait de sa forte hydrophobicité à l'interface phase hydrophobe/phase aqueuse (Ballerini et Vandecasteele, 1999).

Ainsi, d'après Finnerty et Singer (1985) beaucoup de microorganismes dégradant des hydrocarbures ont des surfaces hydrophobes et peuvent donc s'associer aux gouttelettes d'hydrocarbure ou même entrer dans la phase organique pendant la culture.

Des auteurs Singer et Finnerty (1984) ainsi que Rateldge (1978) ont largement démontré que les changements étendus dans la composition des lipides de la membrane cellulaire peuvent se produire pendant la croissance sur des alcanes ; et peuvent dans certains cas, représenter le moyen d'augmenter l'association cellulaire avec la phase d'hydrocarbure. Un système actif de transport employé par *Acinetobacter* HO1-N cultivé sur n-hexadécane a été décrit par les auteurs Kappeli et Finnerty (1979), où des gouttelettes d'hydrocarbure ont été encapsulées dans les microvésicules de la membrane finissant alors par pénétrer dans la cellule.

Par ailleurs, il a été également observé des structures intracellulaires, comme par exemple, la présence étendue de vésicules et de tubules intracellulaires chez *Nocardia sp* (Watkinson, 1980). Alors que d'autres auteurs (Cooney et *al.*, 1980; Sumcker et Cooney, 1981) ont rapporté l'accumulation des gouttelettes d'hydrocarbure dans les hyphes des *Cladosporium resinae* pendant leur croissance sur des n-alcanes. Néanmoins, les mécanismes impliqués dans la pénétration n'ont pas été élucidés. Par la suite, Lindley et Heydeman (1986,1988), en étudiant en détail la même espèce *Cladosporium resinae* ont constaté que la prise des n-alcanes est un processus se déroulant en deux étapes. En effet, dans un 1<sup>er</sup> temps, l'hydrocarbure est passivement adsorbé sur la surface de la cellule puis dans un 2<sup>ème</sup> temps, il sera transporté à l'intérieur de la cellule par un processus obéissant à la cinétique de Michaelis Menten (Morgan et Watkinson, 1994).

### **c- Le transfert interfacial assisté par les biosurfactants (TIA) :**

Des biosurfactants sont produits par la bactérie. Ils ne sont pas indispensables au transfert qui s'effectue comme dans le cas précédent mais ils vont l'accélérer de façon importante en augmentant l'aire interfaciale entre les phases hydrophobe et hydrophile (émulsification) (Ballerini et Vandecasteele, 1999).

La formation d'une émulsion est souvent observée lors de la croissance de microorganismes sur des hydrocarbures aliphatiques (huiles). Dans ce cas, la production de bioémulsifiant permet un accroissement du ratio surface/volume. Ce qui va augmenter la surface disponible pour l'attachement direct des microorganismes au substrat (Comeau, 1999). L'émulsane est le bioémulsifiant le plus connu, sécrété par la souche *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 (Foght et al., 1989 ; Hommel, 1994). Il existe aussi l'allasane sécrété par *Acinetobacter radioresistens* KA53. Barkay et al. (1999) ont démontré que le complexe allasane augmente considérablement la solubilité des hydrocarbures polyaromatiques dans la phase aqueuse (Toren et al., 2002). En plus des bactéries, un certain nombre de levures dégradant les n-alcane sont capables de produire des bioémulsifiants telle que *Candida lipolytica* (le liposan) , *Saccharomyces cerevisiae* etc...(Hommel, 1994).

Iwabuchi et al. (2000) ont observé qu'il existe une relation étroite entre la morphologie des colonies de *Rhodococcus rhodochrous* et la capacité à tolérer le pétrole. Ainsi, les souches issues des colonies de morphotype rugueux sont sensibles au n-hexadécane et à la fraction aromatique du pétrole brut comparées aux souches issues des colonies mucoidales lisses. Cette relation entre le type de morphotype et la sensibilité est particulièrement due à la production d'un polysaccharide extracellulaire le « S-2 EPS » qui rend les cellules lisses plus résistantes. Iwabuchi et al. (2000) ont constaté que l'utilisation de ce polysaccharide extracellulaire « S-2 EPS » stimule la dégradation de la fraction aromatique du pétrole brut « Arabian light », par les bactéries autochtones des eaux marines et ont donc proposé de l'utiliser dans la bioremédiation des environnements marins contaminés par le pétrole.

### **d- Le transfert micellaire (la pseudo solubilisation) :**

Certains microorganismes peuvent produire des biosurfactants qui solubiliseraient le substrat dans des micelles qui à leur tour seraient directement assimilés (Comeau, 1999). Un mutant Tn5 d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* dégradant des hydrocarbures et qui ne pourrait

se développer sur n-hexadécane a été isolé par Koch et *al.* (1991). Ils ont constaté que la mutation avait eu comme conséquence une perte de production de biosurfactant. Ce qui a entraîné la cessation complète de la prise des hydrocarbures. Goswami et Singh (1991) ont remarqué qu'un processus de pseudo solubilisation (formation de microémulsion) a été impliqué dans la prise du n-hexadécane. Ces auteurs ont étudié deux souches de *Pseudomonas* capables de croître sur cet hydrocarbure. Ils ont observé qu'une souche s'est développée beaucoup plus rapidement que l'autre, avec un taux de croissance très élevée. Ce résultat est dû à la production simultanément d'un émulsifiant «une lipoprotéine» et d'un facteur de pseudo solubilisation «une glycoprotéine» qui ont fonctionné en synergie.

Il existe plusieurs microorganismes capables de produire des biosurfactants, par exemple : *Ustilago maydis* PRL-6 1 7 , *Rhodococcus aurantiacus*, *Mycobacterium paraffinicum*, *Corynebacterium spp*, *Arthrobacter sp*, *Flavobacterium sp.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* etc... (Hommel, 1994 ; Bodour et *al.*, 2003).

Par ailleurs, les espèces les plus importants sont celles appartenant au genre *Pseudomonas* produisant les rhamnolipides et les espèces de *Torulopsis* produisant les sophorolipides. Les biosurfactants de ces différentes espèces sont extrêmement efficaces et créent les niveaux de tensions superficielles les plus bas et ceci pour des concentrations inférieures que celles requises pour les agents tensioactifs synthétiques.

Il convient de noter que les rhamnolipides sont activement synthétisés au cours de la phase stationnaire de *Pseudomonas aeruginosa*. Par conséquent, elles sont également produites pendant la première étape du processus de la bioremédiation et contribuent à la mobilisation et solubilisation des contaminants pendant les étapes de minéralisation (Chayabutra et Ju, 2000).

Dans le cas des champignons, le mécanisme d'accession aux hydrocarbures est très mal élucidé. Kirk et Gordon (1988) ont observé que quelques souches des champignons marins dégradant les alcanes ont produit des biosurfactants pour émulsionner leurs substrats et que les microgouttelettes résultantes ont été alors entourés et pénétrés par des hyphes. Cependant, le mode du transport d'hydrocarbures dans la cellule n'a pas été décrit (Morgan et *al.*, 1994).

## II. 2 Les voies métaboliques de la biodégradation

### II. 2. 1 Biodégradation des hydrocarbures saturés :

La biodégradation des hydrocarbures saturés est essentiellement un processus aérobie réalisé par des bactéries. Les capacités plus restreintes des microorganismes eucaryotes seront mentionnées pour les classes d'hydrocarbures concernées. La dégradation des n-alcanes a été étudiée en détail. Une spécialisation nette des microorganismes selon les longueurs de chaîne des alcanes est une première caractéristique importante.

Des bactéries méthylophiles strictes sont seules capables (hormis quelques levures) de dégrader le méthane. Elles sont très répandues dans la nature, ce qui reflète la large distribution du méthane dans l'environnement. Ces bactéries appartiennent à cinq genres de bactéries gram-négatifs (*Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylomonas*, *Methylocystis*, *Methylosinus*).

Les alcanes courts (C2-C4) sont connus pour être dégradés par des bactéries appartenant aux genres *Mycobacterium* et *Nocardia* mais aussi par certains champignons (*Graphium* sp.).

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

Les alcanes à chaîne longue (C10-C20) sont très bien utilisés par les microorganismes, plus rapidement que les alcanes moyens. Les bactéries remplissant ce rôle appartiennent en particulier aux groupes des *Corynebacterium*, *Mycobacterium* et *Nocardia* (CMN) ; notamment au genre *Rhodococcus*, c'est le cas de la souche *Rhodococcus* Q15 capable d'utiliser une large gamme des alcanes (C10 à C21) et à des températures allant de 0° à 30°, mais également il existe les espèces appartenant à des genres gram-négatifs (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*). Les n-alcanes à longue chaîne sont également d'excellents substrats pour plusieurs genres de levures comme *Candida*, *Pichia*, *Yarrowia*, *Torulopsis*.

De plus, les alcanes à très longue chaîne (>C20) sont également dégradés par les microorganismes, mais l'utilisation de ces substrats solides à température ambiante a été moins étudiée (Ballerini et Vandecasteele, 1999 ; Whyte et al., 1998).

Une étude publiée par Churchill et *al.* (1999) a révélé que la souche CH1 de l'espèce de *Mycobacterium* isolée dans les dépôts d'Alaska a plusieurs potentialités et est capable d'utiliser à l'état liquide les alcanes linéaires (dodécane et décahécane), les n-alcanes à chaînes branchées (pristane), ainsi qu'à l'état solide des n-alcanes à longues chaînes (octadécane, docosane, octacosane) comme source unique de carbone et d'énergie à la croissance. Ce résultat a été confirmé par une autre étude menée par Yu et *al.* (2000) dans laquelle deux souches de *Mycobacterium* ont été isolées à partir des sols arctiques de Toundra canadienne. Il s'agit de la souche DhA-55 capable de se développer sur le dodécane et le pristane, et la souche IpA-13 capable de se développer sur l'octane et le pristane.

#### **a. Métabolisme aérobie : Mécanismes d'attaque des oxygénases**

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



Le système enzymatique impliqué est bien connu chez la souche *Pseudomonas oleovorans*, modèle de référence pour la dégradation des alcanes. Ce système comprend trois composantes :

Une hydroxylase membranaire (gène *alkB*) qui catalyse l'oxydation de la molécule, ainsi qu'une rubridoxine-Fe<sup>2+</sup> couplée à une rubrédoxine réductase qui assurent le transport d'électrons.

Tous les gènes codant pour ces enzymes ont été entièrement séquencés. Contrairement à l'alcane hydroxylase de *Pseudomonas oleovorans* qui est une monooxygénase, une dioxygénase conduisant à un hydroperoxyde a été identifiée chez une espèce d'*Acinetobacter*. Par ailleurs, plusieurs séquences nucléotidiques similaires au gène *alkB* ont été obtenues récemment chez diverses espèces de microorganismes, y compris à Gram positif (Truffaut et *al.*, 2001). Ces travaux révèlent la diversité relativement importante de ces gènes, dont certains présentent peu de similarité avec le gène initialement connu chez *Pseudomonas oleovorans* (Truffaut et *al.*, 2001).

Les travaux menés par Margesin *et al.* (2003) concernant la caractérisation de la population microbienne dégradant les hydrocarbures dans les sols alpestres contaminés, indiquent la prédominance de sept génotypes différents responsables de la dégradation des hydrocarbures. Parmi eux, quatre sont impliqués dans la dégradation des n – alcanes (*Pseudomonas putida* Gpo1 alkB ; *Acinétobactérie spp.* AlkM; *Rhodococcus spp.* alkB1 et *Rhodococcus spp.* alkB2).

Le système d'hydroxylation des eucaryotes a été notamment étudié chez la levure *Candida tropicalis*. L'hydroxylase est un cytochrome P-450 qui reçoit les électrons du NADPH par l'intermédiaire d'une réductase flavoprotéique. Les hydroxylases du type cytochrome P-450 sont caractéristiques des organismes eucaryotes, mais elles ont également été observées chez quelques systèmes bactériens tels que l'octane hydroxylase de *Cornybacterium 7 E 1 C* (Ballerini et Vandecasteele, 1999).

- **Voie de dégradation**

Une synthèse des voies métaboliques impliquées dans la dégradation des alcanes linéaires et branchés est donnée dans la figure 3. La séquence de base, après l'hydroxylation terminale de l'alcane, consiste en une suite de déshydrogénation, impliquant souvent des enzymes NAD (P) dépendantes, en aldéhyde et acide. Le dérivé acyl-coenzyme A (acyl CoA) est ensuite métabolisé par le système classique de  $\beta$ -oxydation soit directement ou, dans certains cas, après avoir subi à nouveau la séquence d'oxydation terminale à l'autre bout de la chaîne (*w*-oxydation). L'oxydation subterminale peut également avoir lieu. L'hydroxylation initiale se fait alors sur l'avant-dernier carbone ou même plus loin dans la chaîne (Morgan *et al.*, 1994). L'ensemble de ces voies a été démontré lors de la dégradation des n-alcanes mais il est possible que l' *w*-oxydation et l'oxydation subterminale concerneraient plus les alcanes branchés.

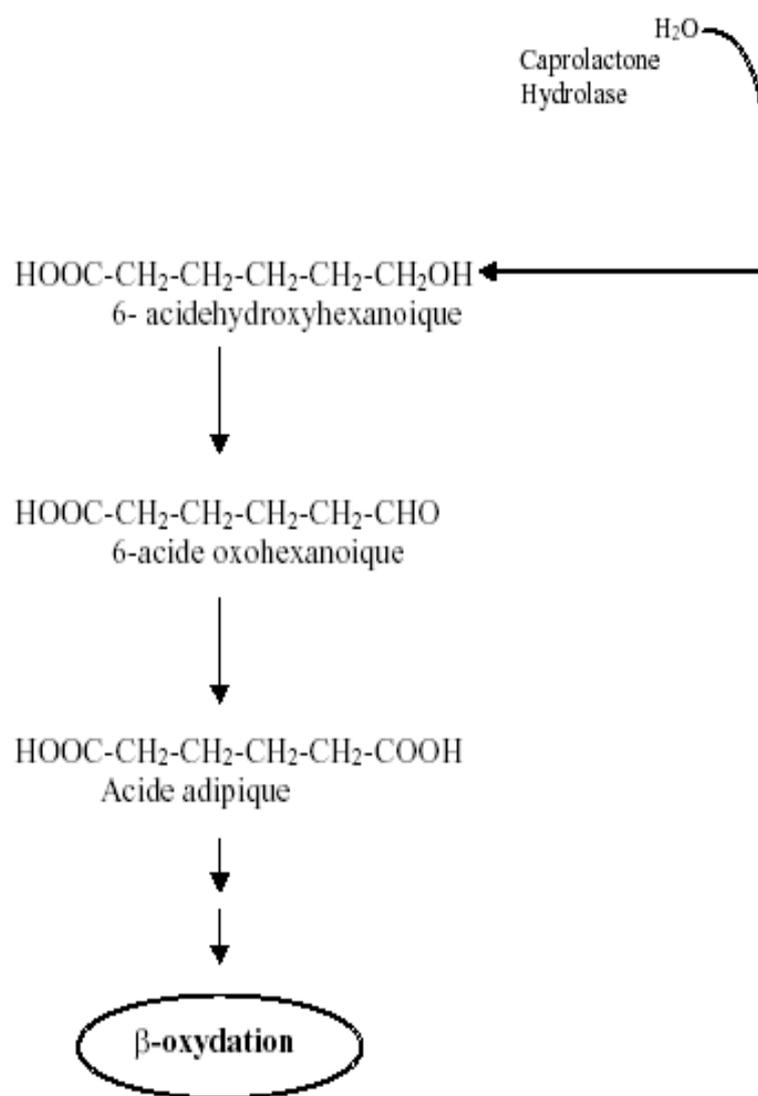
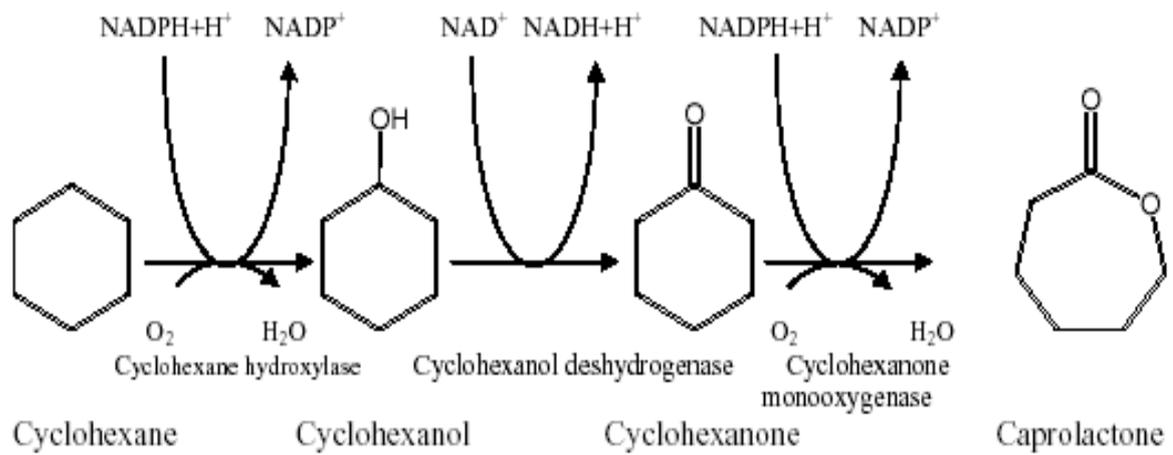


En ce qui concerne les alcènes, le cas des doubles liaisons terminales a été étudié. Ces alcènes sont biodégradables et leur métabolisme est proche de celui des alcanes. Plusieurs modes d'attaques ont été mises en évidence, mais l'oxydation du groupement méthyle terminal est considérée comme le mécanisme majeur (Ballerini et Vandecasteele, 1999).

Les cycloalcanes comme il a été vu, constituent une autre classe d'hydrocarbures. Les structures alicycliques sont fréquentes dans les composés naturels ( $\alpha$ -pinène, camphre) et la dégradation de ces composés a été bien étudiée (Trudgill, 1990). En ce qui concerne les hydrocarbures pétroliers, les voies de dégradation examinées dans le cas du cyclohexane et de ses dérivés conduisent aux conclusions résumées ci-après.

La dégradation du cyclohexane nécessite une première étape d'hydroxylation du noyau qui permet la dégradation selon le schéma de la figure 4. Plusieurs auteurs s'accordent pour avancer que l'on n'isole pas de souches pures utilisant le cyclohexane comme seule source de carbone et d'énergie mais de cultures mixtes. Certaines impliquant des relations de cométabolisme ou de mutualisme. Des souches cultivables sur cyclohexanol ou cyclohexanone sont en revanche facilement isolées. Le point remarquable dans la voie de la dégradation suivie est l'étape d'oxygénation du cycle pour former le  $\omega$ -caprolactone. La monooxygénase impliquée, une simple flavoprotéine à FAD a été caractérisée chez *Acintobacter* et *Pseudomonas*.

D'autres voies de dégradation des composés alicycliques ont été démontrées, dépendantes de la nature des substituants du cycle. Un cas important est celui des alkylcyclanes. Les alkylcycloalcanes à nombre impair de carbones dans la chaîne latérale sont facilement dégradés et ceci après l'hydroxylation terminale initiale de la chaîne, par la  $\beta$ -oxydation qui englobe la dégradation du cycle. Dans le cas des chaînes à nombre pair de carbone, la  $\beta$ -oxydation est bloquée au niveau du cycle. Seule des bactéries spécialisées, plus rares, peuvent à ce niveau libérer la cyclohexanone qui pourra alors être dégradé comme préalablement mentionné (Ballerini et Vandecasteele, 1999).



**Figure 4: Voie métabolique de la dégradation du cyclohexane (Atlas et Bartha, 1993; Morgan et Watkinson, 1994).**

## **b. Métabolisme anaérobie**

Les capacités de microorganismes à dégrader des hydrocarbures dans des conditions strictement anaérobies sont très limitées. Elles sont pratiquement absentes pour des composés aliphatiques, mais cela n'empêche pas qu'il existe des exceptions extrêmement rares (Chayabutra et Ju, 2000). C'est le cas d'une étude réalisée par Holiger et Zehnder (1996) où une description crédible de la dégradation et de la minéralisation de l'hexadécane et du dodécane par une bactérie sulfato-réductrice a été faite et dont le bilan global correspond à l'équation suivante :



Ce phénomène lent apparaît actuellement comme assez inhabituel (Ballerini et Vandecasteele, 1999).

## **II. 2. 2. Dégradation des hydrocarbures aromatiques :**

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

### **a. Biodégradation aérobie des hydrocarbures monoaromatiques :**

La dégradation des hydrocarbures monoaromatiques est essentiellement le faite de bactéries gram-négatives, comme les espèces de *Pseudomonas* (*P.putida* 01G3, *P.putida* PaW1, *P.pseudoalcaligenes* KF707, *P.putida* F1, *P.mendocina* KR1, *Burkholderia cepacia* G4, *Ralstonia pickettii* PKO1), mais également gram positives du groupe des *Corynebacterium*, *Mycobacterium* et *Nocardia* (CMN) (Hanson *et al.*, 1999 ; Ballerini et Vandecasteele, 1999 ; Parales *et al.*, 2000 ; Chablain *et al.*, 2001 ; Suenaga *et al.*, 2001).

Quelques cas de dégradation fongique ont été rapportés. C'est le cas de l'espèce deutromycète *Cladophialophora sp* (=ATCC MYA-2335) isolée à partir du sol contaminé par le BTEX et qui possède la capacité de croître sur un mélange complexe des hydrocarbures de

BTEX comme source unique de carbone et d'énergie ; et où le processus du catabolisme est semblable dans beaucoup d'aspects à celui des bactéries (Prenafeta-Boldu et *al.*, 2002).

- **Voies de dégradation :**

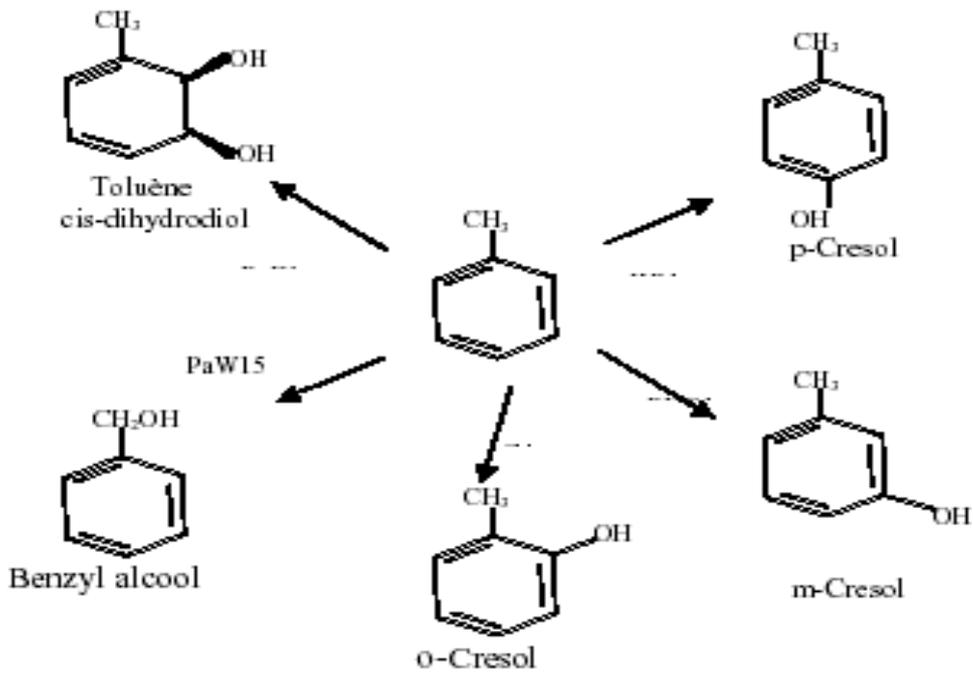
Le mode d'attaque dépend des groupements alkyles substituant mais pour un même composé va dépendre également de la souche bactérienne. Cinq voies distinctes ont été décrites pour la dégradation aérobie du toluène. Toutes les voies démarrent avec l'oxydation du toluène, mais cinq produits différents d'oxydation sont formés (Figure 5). Le mode d'attaque très utilisé par une dioxygénase sur le noyau aromatique est la voie de dihydrodiol, avec la molécule du toluène (figure 6).

Le toluène est d'abord oxydé en toluène cisdihydrodiol par addition de l'O<sub>2</sub> au noyau aromatique. Cette première réaction est effectuée par un système enzymatique désigné par le toluène dioxygénase. Ce dernier a été déterminé chez *Pseudomonas putida* F1 il présente des analogies avec le système bactérien d'hydroxylation des alcanes déjà décrits. Il comprend trois composantes: une réductase TOL (todA), une ferridoxine TOL (todB), et les deux sous unités de la terminal dioxygénase « ISP TOL » (todC1C2).

Le toluène dioxygénase a pour fonction de transférer des électrons du NADH au ISP TOL. Une règle générale, est que les voies suivies aboutissent toujours à la formation des composés du cycle citrique et que la présence des deux groupements hydroxyles sur le cycle aromatique est nécessaire pour l'ouverture de ce cycle. Leur disposition doit être en ortho (cas du catéchol) ou en para (cas de l'acide gentisique) (Zylstra et Gibson, 1989; Ballerini et Vandecasteele, 1999; Parales et *al.*, 2000).

Les voies de dégradations des BTEX sont les mieux connues (voies Xyl, Tod, Tom/Ttb2m, Tbu, Tmo). Par ailleurs, leurs gènes (toluène dioxygénase « tod », toluène monooxygénase « xyl », xylène monooxygénase « tol », ring hydroxylating toluène monooxygénase « tbu, tmo » ont tous été identifiés et bien caractérisés ; notamment ceux de la voie Xyl, impliqués dans la dégradation du toluène et des meta- et para xylènes. Les gènes xyl sont souvent portés par des plasmides dits « plasmides TOL » chez des souches des genres *Pseudomonas* ou *Alcaligenes*.

Dans le cas du plasmide TOL présent chez la souche *Pseudomonas putida* mt-2, les gènes ont été analysés et séquencés (Truffaut et *al.*, 2001; Baldwin et *al.*, 2003).



PaW15 (*Pseudomonas putida* PaW1)

Figure 5 : Les différents produits issus de l'oxydation du toluène (Parales et al., 2000).

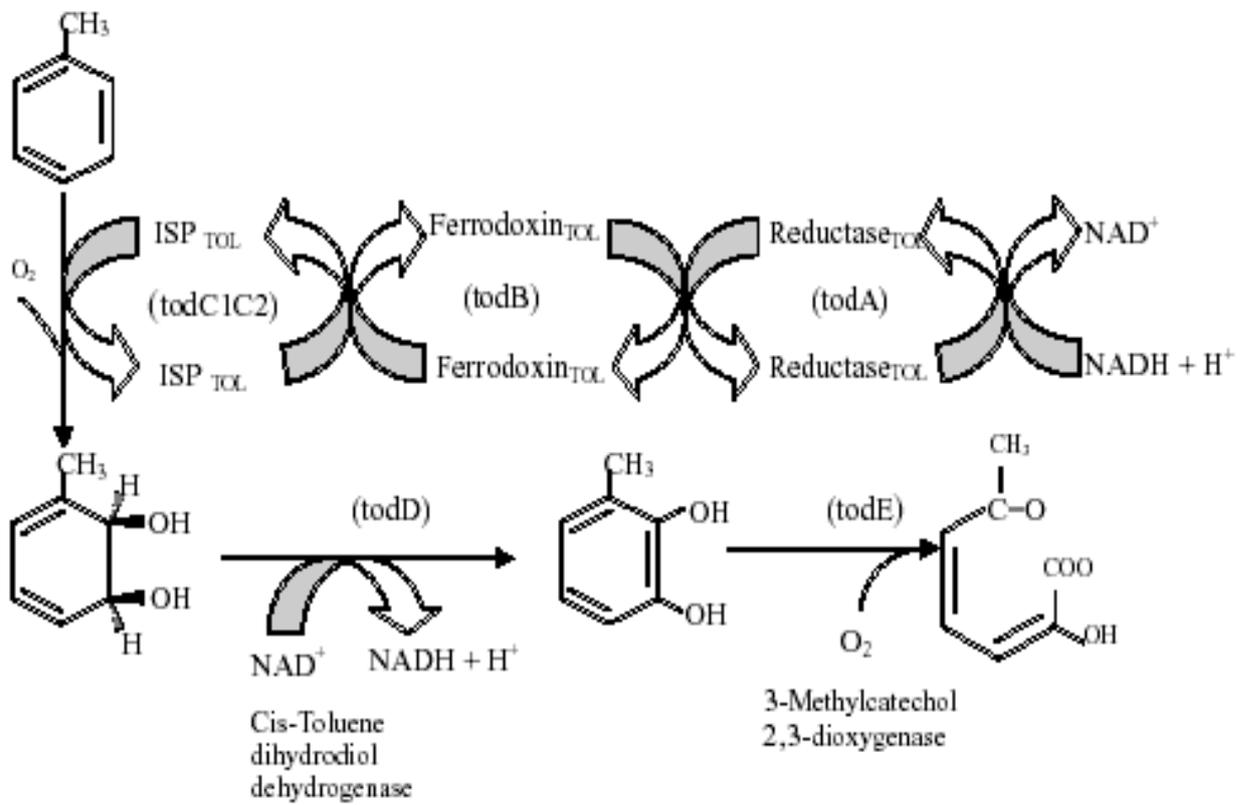


Figure 6 : La voie de l'oxydation du toluène (Zylstra et Gibson, 1989; Sakamoto et al., 2001).

### **b. Dégradation anaérobie des hydrocarbures monoaromatiques :**

La dégradation anaérobie des hydrocarbures aromatiques a été plus récemment mise en évidence. C'est surtout dans les conditions dénitrifiantes que la dégradation des BTEX a été observée. Dans l'ordre, il y a le toluène, le p-et m-xylène, l'éthylbenzène et l'*o*-xylène. Le bilan correspond à une minéralisation de l'hydrocarbure selon la réaction :



La dénitrification apparaît comme le système le plus efficace mais d'autres accepteurs d'électrons fonctionnant à des potentiels plus bas peuvent également dégrader certains hydrocarbures monoaromatiques. C'est le cas des bactéries sulfato-reductrices, des bactéries utilisant  $\text{Fe}^{3+}$ . Et enfin des consortiums dans les conditions méthanogène peuvent minéraliser le toluène (avec production de  $\text{CO}_2$  et de  $\text{CH}_4$ ).

Concernant le benzène, des résultats positifs et d'autres négatifs, ont été rapportés avec divers accepteurs d'électrons. Il apparaît que le benzène est dégradé dans certains milieux possédant les microflores adéquates mettant en œuvre la réduction des sulfates ou de  $\text{Fe}_2^+$  ou la méthanogenèse.

Les voies métaboliques de dégradation anaérobie sont encore mal connues, mais elles sont supposées analogues à celles des composés comme le benzoate (Ballerini et Vandecasteele, 1999).

### **c. Dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques :**

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des contaminants environnementaux omniprésents. Ils constituent une classe des produits chimiques organiques dangereux, dont certains de leurs effets toxiques sont reconnus comme fortement cancérogènes, génotoxiques, immunotoxique, mutagénique ou tératogénique. Ils représentent une menace pour la santé publique ( Heitkamp et *al.*, 1987 ; Boldrin et *al.*, 1993 ; Langworthy et *al.*, 1998 ; Kastner et *al.*, 1998; Bastiaens et *al.*, 2000 ; Kanaly et Harayama, 2000 ; Wang et *al.*, 2000 ; Rehmann et *al.*,2001 ; Cheung et Kinkle, 2001 ; Alexander et *al.*, 2002 ; Kanaly et *al.*, 2002 ; Eriksson et *al.*, 2003).

Quelques HAP sont classés comme polluants prioritaires par la plupart des agences de protection de l'environnement et en particulier, celle des Etats-Unis et ceci en raison de leur persistance dans l'environnement (Kanaly et *al.*, 2000 ; Kanaly et Harayama, 2000 ; Wang et *al.*, 2000 ; Kanaly et *al.*, 2002 ; Eriksson et *al.*, 2003). Bien que les HAP puissent subir l'oxydation chimique, la photodécomposition et la volatilisation, la dégradation microbienne reste le processus principal affectant la persistance des HAP dans l'environnement (Potin et *al.*, 2004b).

La dégradation des HAP par les différents microorganismes a fait l'objet de nombreux travaux scientifiques. Plusieurs espèces d'algues, de bactéries et de champignons sont connues pour dégrader des HAP. Généralement, ces microorganismes sont isolés à partir de sols et de dépôts contaminés, mais leur rôle au sein de la communauté microbienne n'est pas bien élucidé (Stapleton et *al.*, 1998; Langworthy et *al.*, 1998). Toute fois, une étude a montré qu'il y existait une synergie entre les mycètes et les bactéries dans le processus de la minéralisation des hydrocarbures aromatiques dans des environnements très hostiles, tel un sol acide (Stapleton et *al.*, 1998).

#### ♣ *Dégradation par les bactéries :*

Il a été observé que la dégradation des HAP dans le sol est dominée par des souches bactériennes appartenant à un nombre très limité de groupes taxonomiques, tels que *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* et *Mycobactérie* ; y compris d'autres genres comme *Acidovorax*, *Bordetella*, *Bacillus* et *Variovorax* (Kastner et *al.*, 1998; Bastiaens et *al.*, 2000 ; Annweiler et *al.*, 2000 ; Kazunga et *al.*, 2000 ; Kanaly et *al.*, 2000 ; Samanta et *al.*, 2002 ; Eriksson et *al.*, 2003 ; Johnsen et *al.*, 2005 ; Yu et *al.*, 2005).

Parmi ces groupes taxonomiques, des isolats appartenant aux *Sphingomonadaceae* représentent la proportion la plus élevée. Récemment, ces isolats ont été classés dans différents genres : *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium* et *Sphingopyxis*. Les membres de ces genres apparaissent être spécialisés dans la dégradation des produits chimiques aromatiques, et dont certains sont même considérés comme des oligotrophes strictes (Johnsen et *al.*, 2005).

En revanche, la majorité des travaux ont porté sur l'étude des espèces de mycobactéries. La raison principale est leur capacités à dégrader les HAP ; soit par cométabolisme, ou alors par

minéralisation. Dans ce cadre, la plupart des voies biochimiques des mycobactéries et de leurs métabolites ont été identifiés (Boldrin et al., 1993 ; Schneider et al., 1996 ; Kanaly et Harayama, 2000 ; Cheung et Kinkle, 2001 ; Khan et al., 2001 ; Moody et al., 2001 ; Rehmann et al., 2001 ; Vila et al., 2001 ; Bogan et Sullivan, 2003).

D'autres espèces telles que *Cycloclasticus spirillensus*, *Lutibacterium anuloederans* et *Cycloclasticus spp* originaires des milieux marins ont montré leur capacité à dégrader les HAP (Geiselbrecht et al., 1998 ; Chung et King, 2001).

Les voies de dégradation des HAP ont été caractérisées sur la base des structures des produits intermédiaires de dégradation identifiés. Le schéma général est comparable à celui des hydrocarbures monoaromatiques. Après la double hydroxylation du premier noyau, une étape d'oxygénation supplémentaire est nécessaire pour chaque ouverture du cycle (Ballerini et Vandecasteele, 1999). Les gènes impliqués dans le métabolisme et la régulation des HAP ont été décrits chez l'espèce de *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium* et *Nocardia* (Menn et al., 1993 ; Sanseverino et al., 1993 ; Wang et al., 2000 ; Moody et al., 2001 ; Ferrero et al., 2002).

#### ♣ **Dégradation par les champignons :**

Contrairement aux bactéries, et en général, les champignons n'utilisent pas les HAP comme leur source unique de carbone et d'énergie, mais ils transforment ces composés en métabolites détoxifiés par cométabolisme (Boonchan et al., 2000). Chez les champignons, parmi les voies d'attaque des HAP, il faut distinguer entre celles existant chez les champignons lignolytiques de celles existant chez les autres champignons. Cette différence a fait l'objet de nombreux travaux, mais deux cas sont à considérer (Bouchez, 1995 ; Ballerini et Vandecasteele, 1999) :

#### **1<sup>er</sup> cas des champignons non lignolytiques :**

Les champignons non lignolytiques tels que *Cunninghamella elegans*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium janthinellum*, *Syncephalastrum sp* et *Saccharomyces cerevisiae* peuvent transformer une variété de HAP ; y compris le pyrène, le chrysène, et le benzo[a]pyrène en métabolites polaires. En effet, une étude a montré la capacité de la souche *Aspergillus niger* à transformer le pyrène et le phénanthrène en 1-méthoxypyrène et 1-méthoxyphénanthrène.

L'attaque initiale des HAP est catalysée par le biais d'une monooxygénase. Un atome d'une molécule d'oxygène est incorporé dans un cycle aromatique des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) impliqués formant alors un arène oxyde pouvant évoluer en phénol ou en trans-dihydrodiol. L'autre atome de la molécule d'oxygène est réduit en eau. L'attaque initiale des HAP pouvant se faire en différentes positions, et à partir d'un même HAP, de très nombreux isomères peuvent ainsi être formés. La monooxygénase responsable de cette dégradation est le cytochrome P-450 (enzyme membranaire inductible) (Bouchez, 1995 ; Sack et *al.*, 1997 ; Boonchan et *al.*, 2000 ; Garon et *al.*, 2002 ; Potin et *al.*, 2004a ; Potin et *al.*, 2004b).

## **2<sup>ème</sup> cas des champignons lignolytiques :**

Le mécanisme d'attaque des HAP est dans ce cas complètement différent des précédents. Lorsqu'ils sont cultivés en conditions limitantes en carbone, en azote ou en soufre, les champignons lignolytiques produisent des enzymes extracellulaires. Parmi elles, il y a des lignines peroxydases [LiP] qui permettent l'attaque de la structure aromatique de la lignine et également le manganèse peroxydases [MnP].

Ces enzymes sont présumées être impliquées dans le processus de dégradation des HAP. En fait, il s'agit de cométabolisme, puisque les composés libérés ne peuvent pas servir de substrats de croissance aux champignons qui les produisent. Les champignons de la pourriture blanche tels que *Phanaerochete chrysosporium*, *Trametes versicolor* et *Pleurotus ostreatus* ont été les mieux étudiés. Ils peuvent non seulement dégrader certains HAP mais aussi détoxifier les sols et les dépôts pollués par les HAP.

Les lignines peroxydases sont peu spécifiques. Elles agissent sous forme oxydée en soustrayant un électron à la structure aromatique attaquée. Les HAP tels que l'antracène et le pyrène, sont oxydés mais l'attaque reste très limitée. Des structures quinoniques (pyrène 1,6-dione dans le cas du pyrène) et des composés aromatiques hydroxylés sont obtenues. Dans la plupart des cas, le métabolisme de ces produits ne va pas plus loin.

L'intérêt suscité par ce mécanisme réside dans le fait qu'il met en jeu une enzyme libre extracellulaire qui probablement -selon certaines hypothèses restant encore à confirmer- serait susceptible de favoriser un meilleur accès de la bactérie aux HAP polluants (Ballerini et

Vandecasteele, 1999 ; Kastner et *al.*, 1999 ; Boonchan et *al.*, 2000 ; Canet et *al.*, 2001 ; Garon et *al.*, 2002 ; Potin et *al.*, 2004a ; Potin et *al.*, 2004b).

#### ♣ **Voies de dégradation chez les algues et les cyanobactéries :**

Des travaux récents ont montré que les microorganismes photosynthétiques, en particulier les cyanobactéries, peuvent jouer un rôle direct ou indirect dans le métabolisme et la dégradation des hydrocarbures. En effet, les cyanobactéries comme *Anabaena cylindrica*, *Phormidium faveolarum* de *Oscillatoria* JCM et *Agmenellum quadruplicatum* pouvant dégrader différents composés aromatiques. Narro (1985) a démontré la capacité de *A. quadruplicatum* d'oxyder le phénanthrène en trans-9, 10-dihydroxy-9, 10-dihydrophénanthrène et 1-méthoxyphénanthrène grâce au système de monooxygénase. Une autre étude réalisée par Narro et *al.* (1992) a confirmé la formation de 1-méthoxyphénanthrène à partir du phénanthrène par *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 (Sack et *al.*, 1997 ; Abed et *al.*, 2002).

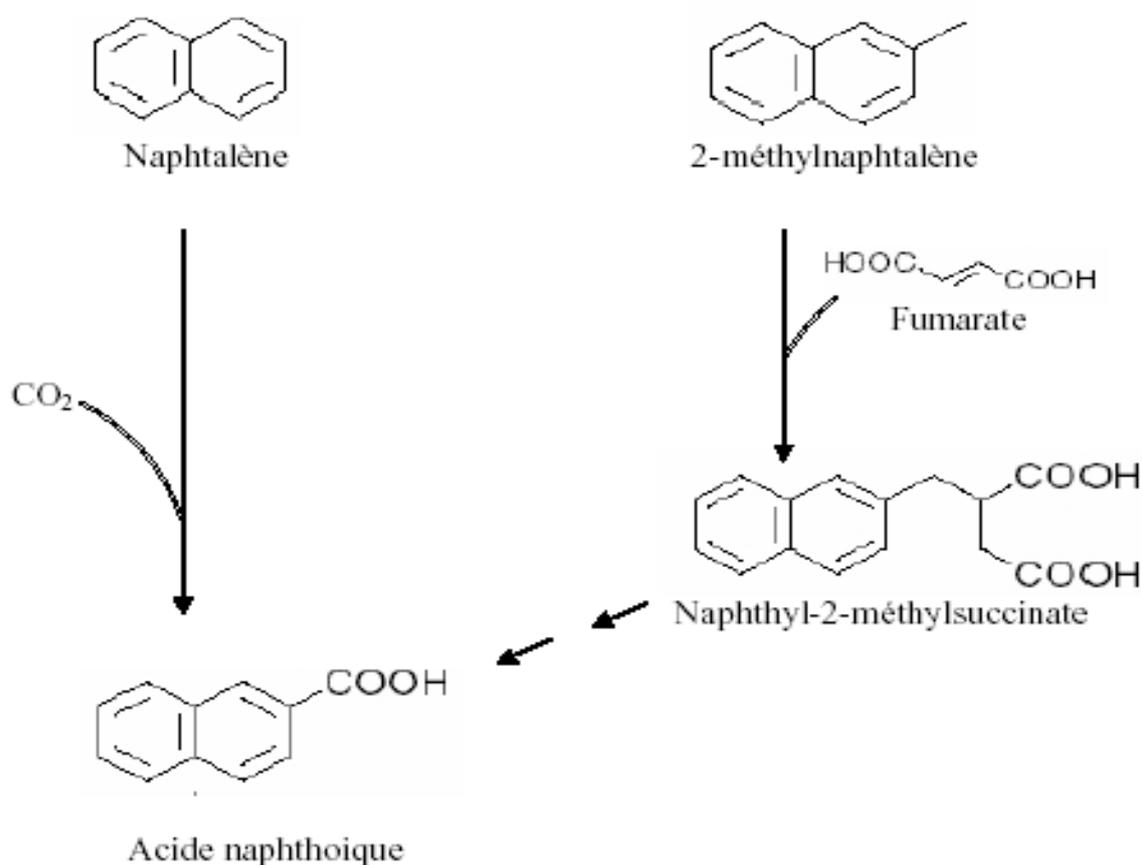
Dans des systèmes de nappe phréatique, les cyanobactéries sont présentes en association avec les bactéries dégradant le pétrole brut, en les immobilisant dans leur mucilage. En outre, elles fournissent également aux bactéries l'oxygène produit par leur photosynthèse et l'azote fixé requis pour leur activité dans le processus de dégradation. Ce rôle indirect des cyanobactéries est très important pour le succès du processus global de la biodégradation (Abed et *al.*, 2002).

#### **2.2.2. Dégradation anaérobie des hydrocarbures aromatiques polycycliques :**

La dégradation anaérobie des HAP a été démontrée à travers plusieurs études de microcosme avec comme accepteurs finals d'électrons le nitrate, le fer ferrique, le Sulfate (Meckenstock et *al.*, 2004). Les résultats obtenus par Chang et *al.* (2001) ont prouvé que des bactéries sulfato-réductrices, méthanogènes et les eubactéries sont impliquées dans la dégradation des HAP. Toute fois, les bactéries sulfato-réductrices occupent une place importante des consortiums adaptés aux HAP.

Les voies biochimiques de dégradation ont été étudiées sur des espèces dégradants le naphthalène, et ceci soit en cultures pure, ou soit en cultures enrichies. Ces voies convergent toutes vers un métabolite principal qui est l'acide 2-naphthoïque. Ce dernier est obtenu soit par l'addition d'une molécule de dioxyde de carbone au naphthalène, soit par l'addition du fumarate au groupe méthylique du méthyl-naphthalène (Figure 7).

La dégradation anaérobie des HAP a été également démontrée *in situ* dans des couches aquifères contaminées par identification des métabolites spécifiques (naphthyl -2-methylsuccinate, l'acide 2-naphthoïque). D'autres métabolites spécifiques, tels que les acides carboxyliques ont été détectés dans les eaux souterraines, indiquant ainsi la dégradation anaérobie des HAP et des composés hétérocycliques (Meckenstock et *al.*, 2004).



**Figure 7 : Production de l'acide naphthoïque par la dégradation anaérobie des HAP (Meckenstock et *al.*, 2004).**

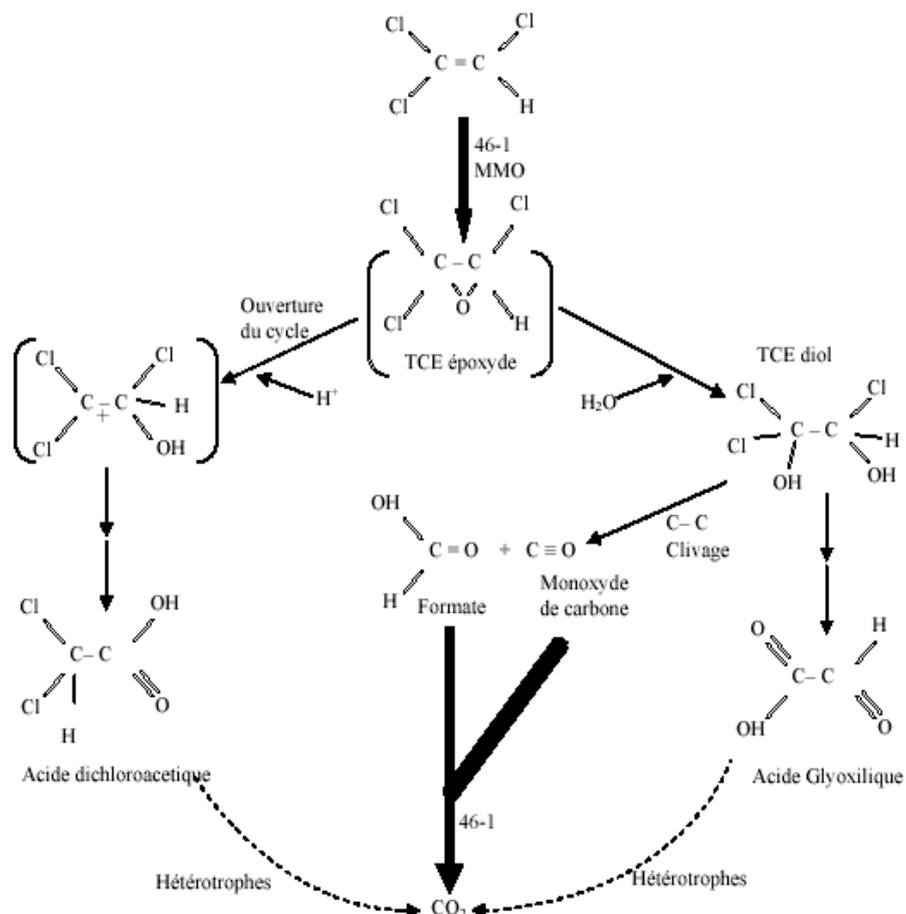
### II. 2. 3. Dégradation des hydrocarbures chlorés (solvants chlorés):

Les solvants chlorés sont des hydrocarbures aliphatiques de faible poids moléculaire, partiellement ou totalement substitués par du chlore. Le trichloréthylène (TCE) est reconnu comme étant le polluant environnemental le plus répandu dans le monde industrialisé (40% des sites sont contaminés). Il est donc considéré comme un polluant prioritaire par l'agence de protection de l'environnement (suspecté même d'être cancérogène).

En général, les solvants chlorés sont des composés qui persistent avec le temps dans l'environnement, pendant des décennies, et ceci malgré qu'ils puissent être métabolisés par les bactéries, soit en condition d'anaérobie (déshalogénéation réductrice) ou soit en conditions d'aérobie (oxydation cométabolique).

**a. Dégradation aérobie :**

Certains solvants chlorés peuvent être utilisés comme substrats carbonés par des microorganismes aérobies. C'est le cas par exemple du dichlorométhane, du chlorure de vinyle, du 1,2-dichloroéthane et du chloroéthane. Leur biodégradation passe par une réaction de substitution d'un atome de chlore par un groupement hydroxyle. Toujours en aérobie, plusieurs solvants chlorés seront dégradés par un processus de cométabolisme. C'est le cas du dichlorométhane, du chloroéthane, du chlorure de vinyle, du dichloroéthylène (DCE) et du trichloroéthylène (TCE). Le mécanisme de dégradation du trichloroéthylène (TCE), solvant chloré type, est illustré dans le cas de la méthane monooxygénase (MMO) par la figure 8.



**Figure 8 : Le mécanisme de dégradation du trichloroéthylène (TCE) par une bactérie méthanotrophe (la souche 46-1) (Little et al., 1988).**

Les enzymes responsables de l'attaque primaire sont des monooxygénases et des dioxygénases, telles la méthane monooxygénase (MMO), la toluène monooxygénase, l'ammonium monooxygénase, le propane monooxygénase (PMO), phénol hydroxylase et la toluène dioxygénase. Elles sont toutes induites en présence de substrats inducteurs cométaboliques. Ces derniers pouvant être soit du méthane (stimulation des microorganismes méthanotrophes), du propane, du propylène, du phénol, du toluène ou de l'ammoniaque (Parales et *al.*, 2000).

Généralement, ces enzymes sont d'autant plus efficaces que les solvants halogénés sont moins substitués. Les microorganismes aérobies capables d'effectuer ces types de réaction appartiennent aux genres *Pseudomonas* (*P.cepacia*, *P.mendocina* et *P.putida*), *Alcaligenes*, *Hypohomobim*, *Xanthobacter*, *Acinetobacter*, *Ancylobacter*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* (Fan et Scow, 1993 ; Doty et *al.*, 2000 ; Vogel et Ballerini, 2001 ; Maeda et *al.*, 2001).

#### **b. Dégradation anaérobie :**

Les composés totalement substitués tels que le tétrachloroéthylène et le tétrachlorure de carbone ne peuvent être dégradés qu'en anaérobiose par des bactéries méthanogènes, sulfato-réductrices, dénitrifiantes ou acétogènes. Le mécanisme de biodégradation consiste en une déchloration réductrice se traduisant par la perte des substituant chlorés qui seront remplacés par des atomes d'hydrogène. Pour la mise en œuvre d'un tel mécanisme, les bactéries ont besoin d'une source de carbone et d'électrons autre que le solvant chloré. Cela peut être, par exemple, le benzoate (Vogel et Ballerini, 2001).

Les déshalogénations successives du tétrachloroéthylène sont représentées par la suite de réactions suivantes :



Les vitesses de dégradation obtenues en déshalogénation réductrices sont plus faibles qu'en cooxydation (Ballerini et Vandecasteele, 1999).

# *Chapitre III*

## *Matériels et méthodes*

Cette étude a été réalisée au laboratoire de l'environnement « évaluation et contrôle de la pollution industrielle » du Centre de Recherche et Développement, (CRD) SONATRACH de Boumerdes. Elle a pour but la caractérisation physico-chimique et microbiologique d'un borbier de forage. En effet, après les opérations de l'extraction du pétrole, un volume important de boue de forage est déversé dans des zones prédestinées à ces rejets appelés borbier, ce qui engendre un problème de pollution pour ces régions.

### **III.1. Matériels :**

#### **III.1.1. Matériels biologique :**

Pour la réalisation de nos expériences, nous avons utilisé des échantillons de sols prélevés dans de borbiers pollués par des rejets de forage au niveau des puits du champ de Hassi Messaoud (voir figure 9).



**Borbier A**



**Borbier B**



**Borbier C**

**Figure 9 : Photos des borbiers contaminés de Hassi Massoud.**

### III.1.2. Échantillonnage :

Les sites que nous avons étudiés sont des bourbiers où ont été déversés les fluides de forage situés dans la région de Hassi Massoud.

- **Présentation du champ de Hassi-Messaoud:**

Le gisement de Hassi Messaoud, dont les caractéristiques sont indiquées ci-dessous, est l'un des plus grands champs pétroliers au monde. Sa superficie est de 2000 Km<sup>2</sup> et il se trouve à 142 m au dessus du niveau de la mer.

La découverte du champ remonte à 1956 et sa mise en production a démarré en 1958. Depuis cette date le champ ne cesse de produire.

- **Caractéristiques géoclimatiques du champ de Hassi-Messaoud:**

- **Position:** - 870 Km au Sud-Est d'Alger.

- 80 Km à L'est de Ouargla.

- **Climat:** Désertique

- **Température:** 0°C - 47°C.

- **Vents dominants:** Nord-Nord-Est.

- **Etapes de l'échantillonnage:**

La démarche proposée par ISO permet de définir un échantillonnage détaillé de façon précise.

Dans ce cas, le nombre de points d'échantillonnage est fonction de l'étendue de la zone, où plus la superficie est grande, plus le nombre d'échantillons à prélever doit être élevé. On aura alors :

- 85 échantillons pour 5 hectares.

- 25 échantillons pour 1 hectare.

- 10 échantillons pour 0.5 hectare.

Dans le cadre de cette étude, la surface ou superficie du bourbier retenu est de (50 m × 30m), donc superficie inférieure à 1500m<sup>2</sup>; ce qui entraîne qu'un prélèvement par bourbier suffisait.

Les prélèvements ont été réalisés sur trois bourbiers, codés A, B, C (Figure 9)

Les échantillons ont été prélevés sur :

- Le bourbier du site **A** datant de **9/2005**;
- Le bourbier du site **B** de **12/2006**, dont les prélèvements ont été fait aux abords les plus contaminés.
- Quant au bourbier **C** de **6/2005**, il s'agit d'un bourbier traité par la méthode physique (méthode de solidification).

Les prélèvements ont été effectués (le 13 Mars 2007 à 16 heures) à l'aide d'une spatule propre à une profondeur de 20 à 50 cm. Pour chaque échantillon, 1Kg de sol prélevé est mis dans un sachet en plastique propre. La température des échantillons *in situ* est égale à 22°C. Les échantillons ont été placés dans un frigorifiant jusqu'à l'arrivée au laboratoire où ils ont été ensuite conservés au réfrigérateur en attendant les analyses.

## **III.2. Méthodes**

### **III.2.1 Etude de l'évolution de la contamination des bourbiers :**

Dans le but de connaître l'évolution d'une contamination en fonction du temps et d'évaluer l'efficacité de la méthode de traitement physiques des bourbiers sur l'élimination des polluants, nous avons procédé aux analyses suivantes:

- Le dosage du carbone organique total par titrimétrie (COT).
- Le dosage des hydrocarbures totaux (HT) par la technique infrarouge pour les trois échantillons.
- La mesure du taux d'humidité à 105 °C sur les trois échantillons.

Le dosage du COT et des HT ont été réalisés, respectivement, par le laboratoire de géochimie minérale et le laboratoire des méthodes spectrale au niveau du Centre de Recherche et Développement.

#### **a. Dosage du carbone organique total [Norme NF ISO 10694]:**

##### **Principe:**

La matière organique présente dans un échantillon de sol est extraite à l'aide d'un solvant organique volatil le  $\text{CCl}_4$  selon le mode opératoire suivant :

##### **Mode opératoire:**

- Peser 400mg de sol;
- Attaquer l'échantillon avec de HCl à 2 mole;
- Attendre 6 à 8 heures;
- Attaquer le même échantillon à chaud sur une plaque chauffante à 70°C jusqu'à condensation;
- Neutraliser l'échantillon par NaOH à normalité 1,33 jusqu'à l'obtention d'un pH neutre;
- Ajouter 20ml d'eau distillée;
- Filtrer l'échantillon avec une pompe à vide pour avoir un résidu ;
- Doser l'échantillon avec un doseur de carbone.

**Lecture:**

La valeur de COT est exprimée en pourcentage (%) par le doseur de carbone.

**b. Dosage des hydrocarbures totaux par Spectrophotométrie infrarouge (AFNOR 90114) :****Principe:**

Lorsqu'un faisceau lumineux de longueur d'onde correspondant au spectre infra rouge traverse une solution contenant des hydrocarbures présents dans l'eau, une fraction de la lumière incidente est absorbée en fonction de la concentration des hydrocarbures.

**Mode opératoire:****Préparation de l'échantillon:**

L'échantillon doit être homogénéisé avant la pesée et le poids retenu est de l'ordre de 2g/l.

**Extraction:**

- fixer les cartouches aux adaptateurs.
- peser les échantillons dans les cartouches.
- placer une boule de coton hydrophile au dessus de l'échantillon et mettre en place les cartouches dans l'unité d'extraction.
- mettre sur position Boiling. Les cartouches sont immergées dans le solvant  $\text{CCl}_4$  à  $160^\circ\text{C}$ , le temps d'immersion dépend du type de l'échantillon (20-30 min).

**Récupération du solvant:**

- après rinçage de l'échantillon avec  $\text{CCl}_4$ , les extraits sont récupérés puis sont placés sur florisil et  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

Les volumes recueillis sont mesurés à l'aide d'éprouvettes graduées de 100 ml.

**Mesure de la concentration en hydrocarbures des extraits:**

- l'extrait est introduit dans une cuve en quartz de 1cm d'épaisseur, puis ensuite analysé par l'appareil IR.
- le logiciel CxHx traitant les analyses donne directement la concentration de l'hydrocarbure recherchée en mg/kg.

**c. Hygrométrie (humidité à  $105^\circ\text{C}$ ) (Norme NF ISO 1146) :**

Nous avons procédé à la détermination de la teneur pondérale en eau du sol par la méthode gravimétrique. Elle s'exprime en % c'est-à-dire en gramme d'eau pour 100 g de sol déshydraté à 105°C.

**Mode opératoire :**

- Prélever une prise d'essai du sol soit  $P_0$  et l'introduire dans le creuset;
- Faire sécher à l'étuve à 105°C pendant une heure;
- Refroidir au dessiccateur puis peser, soit  $P_1$  (poids constant).

**Lecture:**

Le taux d'humidité s'exprime en % selon la formule suivante :

$$H\% = \frac{P_1 - P_0}{P_0} \times 100$$

$P_0$  : poids de la prise d'essai du sol (g).

$P_1$  : poids de la prise d'essai de sol après séchage à 105°C (g).

**III. 2. 2. Etude physico-chimique d'un borbier pollué par les fluides de forage :**

**a. Caractérisation du polluant par chromatographie en phase gazeuse CPG:**

La caractérisation du polluant du borbier est réalisée par chromatographie en phase gazeuse. L'appareil utilisé est un chromatographe de type 6890 séries II, composé d'un injecteur, un détecteur FID, un four et une colonne ; colonne capillaire de silice fondue de 25m de longueur et de 0.32mm de diamètre.

La température de l'injection et celle du détecteur sont de 280°C.

Le polluant est d'abord extrait à l'aide d'un solvant (dichlorométhane) et un volume de 1  $\mu$  l de l'extrait sera utilisé pour l'injection.

**Principe de la (CPG):**

Une quantité de quelques microlitres de mélange à analyser est injecté à l'aide d'une seringue dans la chambre d'injection où elle va se vaporiser rapidement sous l'effet de la haute température du four. Il est ensuite emporté par le gaz vecteur qui est l'hélium, à travers la colonne d'analyse.

Une fois l'injection faite, les différents constituants du mélange passent dans la colonne, où ils seront plus ou moins retenus par l'adsorbant (phase stationnaire).

Les composants les moins retenus traversent rapidement la colonne alors que ceux plus fortement retenus y séjournent plus longtemps.

**Détecteur FID:**

Le mélange gazeux sortant de la colonne (gaz + substance) est brûlé en présence d'hydrogène. Cette combustion produit des ions libres qui vont induire une variation de la tension entre les électrodes (positive et négative) du détecteur. Cette variation est proportionnelle à la quantité de la substance.

Les résultats vont s'afficher sous la forme d'un chromatogramme.

#### **b. Dosage des paramètres indicateurs de pollution organique :**

- **Mesure de pH par électrométrie: (Norme NF ISO 10390).**

##### **Principe:**

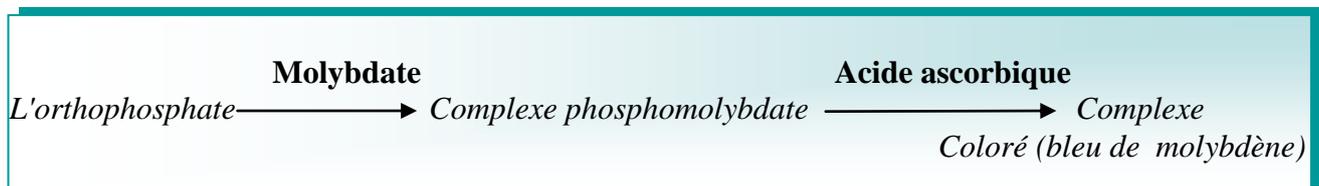
La différence de potentiel existant entre une électrode en verre et une électrode de référence (calomel KCl saturé) plongeant dans une même solution est une fonction linéaire du pH de cette solution.

La détermination consiste en la mesure d'une différence de potentiel. Elle s'effectue à l'aide d'un dispositif potentiométrique.

- **Dosage du phosphore [méthode HACH]**

##### **Principe:**

Le phosphore en solutions se trouve sous forme de phosphates. La seule forme de phosphate pouvant être détectée est l'orthophosphate. Toutes les autres formes doivent subir un prétraitement afin d'être transformé en orthophosphate avant de les analyser. Le dosage de ce dernier nécessite une mise en œuvre d'une réaction colorée spécifique de l'élément recherché selon le schéma suivant :



Le dosage s'effectue à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 890nm.

L'intensité de la coloration sera proportionnelle à la concentration en phosphore.

##### **Mode opératoire:**

### - Extraction du phosphore :

Une lixiviation doit être effectuée pour doser cet élément selon la norme [Norme NFX 31 160].

Les 5g d'échantillon de sol sont placés dans un bêcher contenant 100ml de l'hydrogénocarbonate de sodium à 0.5M. Après une agitation de 30 min suivie d'une filtration, le dosage est réalisé selon la méthode suivante :

### - Dosage par la méthode HACH :

- Mettre l'appareil (DR2000) en marche;
- Remplir un flacon colorimétrique avec 25ml de l'échantillon (lixiviat);
- Ajouter le contenu d'une gélule de réactif phosphoVer 3 au flacon puis agiter pour bien mélanger;
- Pour faire un blanc emplir un autre flacon avec 25ml d'échantillon (le blanc);
- Placer le blanc, puis l'échantillon dans le puit de mesure du DR2000.

### Lecture:

Le résultat s'affiche en mg/l.

### • Dosage des nitrates [méthode HACH]

#### Principe:

Le dosage des nitrates nécessite une mise en oeuvre préliminaire d'une réaction colorée spécifique de l'élément recherché selon la réaction suivante:



Ce dosage par spectrophotomètre est effectué à une longueur d'onde de 400nm pour les faibles concentrations et de 500nm pour les fortes concentrations.

L'intensité de la coloration sera proportionnelle à la concentration en nitrates.

#### Mode opératoire:

##### Extraction :

Selon la norme [Normes NFX 31 160], l'extraction est réalisée selon le protocole suivant:

- Introduire 10 g d'échantillon de sol dans un bêcher contenant 100ml d'eau distillée.
- Agiter pendant 1heure et filtrer le filtrat qui représente le lixiviat du sol.

##### Dosage [méthode HACH 8152]

- mettre en marche le DR2000;
- remplir deux cellules en verre chacune de 25ml d'échantillon (lixiviât);
- verser le contenu d'une gélule de Nitra Ver 5 dans un flacon, qui constituera l'échantillon préparé ; un second servira de blanc;
- placer le blanc dans le puits de mesure et fermer le capot;
- l'affichage indique : 0.0mg/l N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>H;
- effectuer la lecture de l'échantillon préparé, en procédant de la même façon que pour le blanc.

**Lecture:**

L'affichage indique le résultat en mg/l d'azote.

- **Dosage des nitrites [méthode HACH]**

**Principe:**

Le dosage nécessite une mise en œuvre préliminaire d'une réaction colorée spécifique de l'élément recherché. Dans ce cas la réaction dépend de la teneur en nitrites.

- pour les faibles concentrations la réaction est la suivante:



- pour les fortes concentrations, la réaction est:



L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en nitrites.

**Mode opératoire:**

**Extraction :**

10g d'échantillon du sol sont introduits dans un bêcher contenant 100ml d'eau distillée. Le mélange est agité pendant 1 heure puis filtré à l'aide d'un filtre plissé [Norme NFX 31 160].

**Dosage [méthode HACH]**

- prendre deux cellules en verre et remplir chacune d'elles de 25ml du lixiviat de sol: ajouter le contenu d'une gélule de Nitri Ver 2 dans une cellule. Cette cellule constituera l'échantillon préparé;
- placer l'échantillon exempté du réactif dans le puit de mesure. L'affichage indique :  $0\text{mg/l NO}_2^- \text{H}$  ;
- agiter l'échantillon préparé, puis le placer dans le puit de mesure.

**Lecture:**

La teneur en nitrites s'affiche en mg/l.

**III. 2. 3. Evaluation du taux de biodégradabilité du gasoil**

L'objectif de cette approche est d'estimer le taux de biodégradation du gasoil par les microorganismes lorsque celui-ci est rejeté dans la nature.

Pour se faire, nous avons utilisé le test respirométrique dont le principe est le suivant :

**Principe du test de biodégradabilité:**

C'est un test normalisé (**Norme ISO 9 408, 1991**) qui consiste à évaluer ou estimer la biodégradation ultime des composés organiques par voie biologique en aérobiose, dans un milieu d'essai aqueux enrichi en azote et en phosphore (la composition du milieu est donnée en annexe 2). Le composé à tester constitue la seule source de carbone et d'énergie dans le milieu et sa concentration est de 100mg/l.

**Description du dispositif expérimental:**

Un volume donné du milieu d'essai est introduit dans un flacon de 500ml avec une concentration du composé à expérimenter de 100mg/l. On y ajoute un volume d'inoculum représentant  $1/100^{\text{ème}}$  du volume totale du milieu.

Chaque flacon de mesure est relié à un système manométrique. La quantité d'oxygène absorbée par les microorganismes pour dégrader le composé à tester, est remplacée par l'air au-dessus de l'échantillon dans le flacon, et le  $\text{CO}_2$  produit est capté par un absorbant (la soude caustique KOH) (**Figure 10**).



**Figure 10 : Respiromètre pour la mesure de la biodégradabilité des composés organiques.**

En plus du flacon destiné à l'essai que l'on réalise en double, il est nécessaire de rajouter:

- 2 flacons à blanc (exemptes du composé à tester).
- 1 flacon de référence (le composé à expérimenter est l'acétate de sodium  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ).

La DCO des solutions blanc (milieu d'essais +  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) et celles des composés à tester sont mesurés. La méthode de mesure de la DCO est basée sur le principe de la méthode HACH le suivant :

Le test de la DCO consiste en la mesure de l'oxygène équivalent à la quantité des matières organiques oxydables par le dichromate de potassium ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ), dans une solution d'acide sulfurique à 50%. Un composé à base d'argent est ajouté comme catalyseur et un autre mercurique est ajouté pour réduire les interférences dues à l'oxydation des ions chlorures par le dichromate, d'après la réaction:



Pour la gamme de DCO de 0 à 1500 mg/l (DO de 620nm) utilisée pour le test de biodégradabilité, la méthode consiste en la mesure de la quantité de chrome trivalent produite et la coloration obtenue est verte.

#### **Réactifs:**

- Tubes DCO (0 à 1500mg/l)
- Eau déminéralisée.

**Appareillage:**

- Pipette jaugée à 2ml;
- Réacteur à 150°C (DCO 120/240V);
- Spectrophotomètre HACH type DR/2000.

**Mode opératoire suivi:**

- Homogénéiser la solution à analyser, pendant 2 minutes.
- Allumer le réacteur à DCO et préchauffer à 150°C.
- Retirer le bouchon d'un tube pour DCO.
- Tenir le tube incliné à 45°. prélever 2 ml de la solution à analyser et les introduire dans le tube.
- Fermer hermétiquement le tube et le retourner plusieurs fois pour mélanger le contenu.
- Préparer un blanc en répétant les mêmes étapes 3,4 et 5 en remplaçant l'échantillon par de l'eau déminéralisée.
- Chauffer les tubes pendant 2 heures.
- Eteindre le réacteur et attendre 20 minutes le refroidissement des tubes à 120°C ou au dessous.
- Retourner les tubes plusieurs fois pendant qu'ils sont encore chauds.
- Après refroidissement des tubes, en passe à la lecture des valeurs DCO par le DR/2000.

Le pH des solutions préparées doit être ajusté à 7.4 en utilisant des solutions de HCl 0,5 M ou NaOH 0,5 M après l'inoculation.

Les flacons sont aérés sous agitation (pendant 2 heures) dans le DBO mètre ouvert pour permettre une bonne répartition de l'oxygène dans le milieu.

Les bouteilles sont rebouchées et incubées pendant 28 jours.

A la fin du test les pH sont remesurés.

**Préparation de l'inoculum :**

Pour l'inoculum une boue activée de la station d'épuration de Boumerdès a été utilisée. Le prélèvement s'effectue juste après l'aération de la boue.

L'échantillon de boue ainsi prélevé subit une aération pendant quelques heures avant son utilisation pour éliminer toutes traces de substrats externes. Aussi, plus le temps de l'aération est lent plus le test est fiable.

L'inoculum obtenu doit être utilisé le jour du prélèvement à raison de 1/100 du milieu d'essais.

### **Programme de lecture utilisée pour la gamme 0-1500 mg/l :**

- Entrer le numéro de programme mémorisé pour la DCO en pressant sur 435, l'affichage indique : régler à 62 nm.
- Après réglage à la longueur d'onde correspondante, le tube d'essai à blanc est placé dans l'adaptateur.
- Après la lecture du blanc (DCO = 0 mg/l), les tubes suivants sont lus et les résultats sont donnés en mg/l de DCO.

### **Calcul du taux de biodégradation:**

Le taux de dégradation est calculé selon la formule suivante (Selon ISO 9 408):

$$\mathbf{B\ (\%) = DBO / DCO}$$

B: pourcentage de biodégradabilité.

DCO : est la demande chimique en oxygène du produit à tester préparé à 100 mg/l avec de l'eau distillée.

## **III. 2. 4. Analyses microbiologiques :**

### **a. Dénombrement de la microflore totale :**

Afin de dénombrer la microflore existant dans les différents échantillons contaminés par les déversements des hydrocarbures et les fluides de forage, nous avons procédé à une culture sur gélose nutritive. Pour se faire, une série de dilution variant de  $10^{-1}$  à  $10^{-9}$  a été préparée selon les étapes suivantes (Marchal et Bourdon, 1982):

- **Préparation de la solution mère:**

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

- **Préparation des dilutions:**

Dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérilisée, est ajouté 1 ml de la solution mère. Le mélange bien agité représente la dilution à  $10^{-1}$ . 1 ml de cette dilution mélangé à 9 ml d'eau physiologique, correspondra à la dilution  $10^{-2}$ . On continue ainsi jusqu'à l'obtention de la dilution  $10^{-9}$ .

- **Ensemencement par étalement sur gélose nutritive:**

Le milieu gélosé préalablement fondu est réparti dans des boîtes Pétri à une hauteur d'environ 3 à 4 mm qu'on laisse ensuite refroidir. 0.1 ml de chaque dilution est prélevé à

l'aide d'une pipette Pasteur puis déposé sur la gélose. Une goutte de la solution est étalée sur toute la surface du milieu.

Après 24h à 48h d'incubation à 30°C, les colonies développées sont dénombrées à l'aide d'un compteur de colonies.

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

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

N : nombre des microorganismes en UFC/ ml.

n: nombre des colonies dénombrées.

v: Volume prélevé ( 0.1ml).

d: Dilution.

#### **b. Isolement et purification des microorganismes (Jacques, 2005) :**

- **Isolement:**

Cette étape nous permet de mettre en évidence la microflore existante dans un borbier contaminé par les fluides de forage.

À partir d'un échantillon de sol, 1 g est prélevé puis mélangé à 9 ml de milieu minéral (BH) (voir composition en annexe 2). Le milieu est additionné du gazoil à raison de 2 % qui est considéré ici comme seul source de carbone.

Le mélange est ensuite incubé à 30°C sous agitation à raison de 150 tours/min.

Après l'étape de pré enrichissement, nous procédons selon les étapes suivantes :

1. Préparation des dilutions.
2. Ensemencement sur boîte de Petri.

Après obtention des dilutions variant de  $10^{-1}$  à  $10^{-9}$ , nous procédons à l'ensemencement sur un milieu GN (gélose nutritif). L'incubation se fait à 30°C pour une durée de 24 heures.

- **Purification**

Après 24 h d'incubation, nous passons à l'étape purification des cultures. Celle-ci nous permet d'obtenir des cultures pures à partir des différentes souches obtenues.

La sélection est basée sur l'aspect macroscopique des colonies : la couleur, la forme, le diamètre, l'opacité.... Un échantillon de chaque type de colonie est prélevé ensuite purifié par repiquage successif selon la méthode de stries (Austin, 1988).

### **c. Conservation des souches isolées**

Les souches isolées sont conservées dans des tubes à essai contenant un milieu GN incliné dont la composition est donnée en annexe 2. Les souches sont ensemencées sur la pente des tubes par la méthode des stries, puis incubées à 30°C pendant 24 heures. Les tubes dans lesquels il y a eu une croissance seront bouchés et conservés à 4°C pour une durée de 4 à 6 semaines. Afin de pouvoir toujours disposer de souches viables, la réactivation doit se faire tous les mois (Marchal et Bourdon, 1982).

### **d. Identification des souches purifiées:**

L'identification des souches isolées est réalisée en se basant sur les études morphologique, physiologique et biochimique.

#### **▪ Etude morphologique :**

##### **Aspect macroscopique:**

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification. D'après les auteurs Thoma et *al.* (1970), les éléments d'identifications macroscopiques sont:

- La forme des colonies : rondes, irrégulières,...etc.
- La taille des colonies par la mesure du diamètre : pinctiformes ou non pinctiformes.
- La chromogénèse: couleur de la colonie.
- L'élévation: convexe, concave, plate.
- L'opacité: opaque, translucide ou transparente.
- La surface: lisse, rugueuse, sèche, dentelée,...etc.

##### **Aspect microscopique:**

###### **a) Etat frais:**

Ce test permet de déterminer la forme, l'arrangement et la mobilité des bactéries .Il consiste en l'observation d'une goutte de suspension bactérienne, préparée avec de l'eau physiologique et placée entre lame et lamelle. L'observation se fait au microscope photonique.

###### **b) Coloration de Gram :**

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

Cette coloration permet de classer les bactéries selon leur capacité à fixer le cristal violet. Celles qui possèdent une enveloppe externe sont décolorées lors du lavage à l'éthanol

(Gram<sup>-</sup>), alors que celles qui n'en possèdent pas vont retenir le colorant (Gram<sup>+</sup>) (Perry, 2004). 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).

**Mode opératoire :**

- Préparer et fixer un frottis bactérien à la chaleur du bec Bunsen.
- Recouvrir au violet de Gentiane pendant 1min. Eliminer l'excès par l'eau courante;
- Ajouter du Lugol : deux bains de 45 secondes, jeter l'excès par l'eau courante;
- Traiter à l'alcool 95° pendant 30 secondes, puis rinçage à l'eau;
- Recolorer à la Fuschine pendant 1 à 2 minutes, rinçage à l'eau puis séchage;

L'observation se fait en ajoutant de l'huile à immersion. Les bactéries Gram positif se colorent en violet alors que les Gram négatif se colorent en rose.

**c) Recherche de spores:**

La coloration au bleu de méthylène permet l'observation de la morphologie cellulaire et la présence ou l'absence de la spore.

**Mode opératoire :**

Sur un frottis bactérien correctement fixé à la chaleur, on fait couler la solution de bleu de méthylène jusqu'à ce que toute la lame soit couverte. Après un temps de réaction d'une minute, on rince abondamment à l'eau. Ensuite le frottis bactérien est séché, puis observé au microscope au grossissement x 100.

• **Analyse biochimique:**

Cette approche nous oriente sur le métabolisme suivit par ces microorganismes et les enzymes qu'ils possèdent. Ces tests ont été réalisés en utilisant les « galeries » traditionnelles pour les souches microbiennes.

Les épreuves biochimiques permettent en général de distinguer les espèces, même étroitement apparentées entre elles (Tortora et *al.*, 2003).

• **Étude du type respiratoire:**

**Principe:**

Le type respiratoire est mis en évidence par l'ensemencement d'un milieu gélosé (viande fois) dans des tubes fins et profonds dans lesquels l'oxygène n'est présent qu'en surface et sur une zone étroite de 1cm (Marchal et *al.*, 1982).

**Technique:**

- Régénération des milieux dans un bain-Marie à une température comprise entre 70 et 80°C (dans le but d'abaisser le potentiel redox des milieux);
- Refroidissement à 45°C;
- Inoculation en utilisant une pipette Pasteur scellée et stérilisée: introduire jusqu'au fond du tube puis remonter et redescendre successivement plusieurs fois en décrivant des tours de spires très serrés. Sortir verticalement à 0.5cm de la surface.
- Le milieu est solidifié par refroidissement à l'eau courante du robinet.
- Incubation à 30°C pendant 24 heures.

**Lecture:**

Croissance en surface: bactéries aérobies strictes.

Croissance en profondeur: bactéries anaérobies strictes.

Croissance le long du tube: bactéries aéro-anaérobies facultatives.

Croissance dans la partie supérieure proche de la surface: bactéries microaérophiles.

- **Études des enzymes respiratoires:**

- **Recherche de la catalase:**

**Principe:**

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 (Marchal et Bourdon, 1982) :

**Technique:**

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).

**Lecture:**

Catalase+ : effervescence.

Catalase - : pas d'effervescence.

- **Recherche de l'oxydase:**

**Principe :**

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 (Marchal et Bourdon, 1982).

**Technique:**

Sur une lame un disque oxydase est déposé contenant de l'oxalate N-diméthyl paranitrophénylène-diamine, qui aura été préalablement imbibé d'une goutte d'eau distillée stérile et mis en contact avec une colonie bactérienne fraîchement cultivée.

**Lecture:**

Apparition d'une coloration violette immédiatement : la souche est dite oxydase positive.

**- Recherche de la nitrate réductase:****Principe:**

L'étude de la réduction des nitrates se fait par la mise en évidence des nitrites formés. Ces derniers en milieu acétique ou sulfurique, donnent une coloration rose.

L'enzyme nitrate réductase B catalyse la réaction des nitrates en nitrites (réduction assimilatrice). Les nitrates peuvent aller également jusqu'au stade azote ( $N_2$ ). Dans ce cas, on doit compléter par l'épreuve de Zoo Bell, épreuve qui consiste à ajouter de la poudre de zinc au milieu:

- si le zinc réduit les nitrates encore présents en nitrites, la coloration rose apparaît et la réaction est négative (bactéries sans nitrate réductase).
- si au contraire, la teinte du milieu reste inchangée, le stade nitrite a été dépassé donc les bactéries possédant une nitrate réductase très active (Marchal et Bourdon, 1982).

**Technique:**

A une culture en bouillon nitraté de 24 à 48h d'incubation à 30°C, on ajoute cinq gouttes de réactif de Griess. Après agitation, la lecture est immédiate.

**Lecture:**

- coloration rose ou rouge: nitrates réduits en nitrites (nitrate réductase positive  $NR^+$ ).
- milieu restant incolore: ajouter un peu de poudre de zinc (réducteurs des nitrates) ; agitation, inclinaison du tube de culture en position presque à l'horizontale et attendre cinq minutes avant la lecture:
  - si le milieu devient alors rose ou rouge, il reste des nitrates, donc ces derniers n'ont pas été réduits par la bactérie: nitrate réductase négative  $NR^-$ .
  - si le milieu reste incolore, il ne reste plus de nitrates, les bactéries les ont réduit au-delà du stade nitrites: nitrate réductase positive  $NR^+$ .

- **Métabolisme des glucides:**

- **Étude de la voie d'attaque des glucides:**

Le milieu utilisé est le milieu MEVAG de couleur rouge, contenant comme source de carbone le glucose. Ce milieu permet de distinguer les bactéries à métabolisme oxydatif ou fermentatif ou les deux à la fois.

**Technique:**

- Ensemencer par piqûre centrale deux tubes de milieux MEVAG, l'un sera recouvert d'une couche d'environ 1-1.5cm d'épaisseur de vaseline stérile,
- Deux tubes non ensemencés, l'un additionné de vaseline stérile l'autre sans vaseline qui seront utilisés comme témoins,
- Incuber les tubes ensemencés et les témoins à l'étuve à 30°C pendant 24 à 48 heures.

**Lecture:**

Bactéries fermentatives: virage au jaune du tube avec vaseline.

Bactéries oxydatives : virage au jaune du tube sans vaseline.

Bactéries oxydatives fermentatives: virage au jaune des tubes avec et sans vaseline.

- **Étude des différentes voies fermentatives intermédiaires**

**Principe**

Cette étude permet d'effectuer une différenciation entre la fermentation des acides mixtes (réaction rouge de méthyle : RM) et butylène glycolique (réaction Voges Proskauer, VP). Ces deux réactions ont un intérêt différent, mais elles peuvent être effectuées sur le même milieu et le plus souvent, se vérifiant mutuellement, une souche à RM<sup>+</sup> est habituellement VP<sup>-</sup> et vice versa.

**a- Réaction au rouge de méthyle :** elle consiste à mettre en évidence l'acidification finale d'un milieu glucosé par la fermentation du glucose, cette acidification provoque le virage du rouge de méthyle (rouge à un pH ≤ 5; jaune pH ≥ 5.8).

**b- Réaction de l'acétoïne (réaction de Voges- Proskauer) :** certaines bactéries sont capables de produire de l'acétyl-méthyl carbinol, soit à partir de deux molécules d'acide pyruvique, soit, le plus souvent au cours de la fermentation de 2-3 butyléneglycolique. En présence d'une base forte l'acétoïne donne une coloration rouge au milieu oxygéné (oxydation en diacétyle). Le diacétyle formé réagit avec le groupement guanidine de α- naphthol pour donner un composé rouge.

### Technique :

Une colonie de la souche à étudier est ensemencée sur le milieu Clark et Lubs puis incubé à 30°C pendant 24 à 48 heures.

Après l'incubation, diviser le milieu dans deux tubes stériles, verser quelques gouttes de VP I et quelques gouttes de VP II dans l'un des tubes, et dans l'autre, ajouter quelques gouttes de réactif RM (rouge de méthyle).

**Lecture:** Test VP: Coloration rouge : VP<sup>+</sup>.

Coloration jaunâtre: VP<sup>-</sup>.

Test RM: Coloration rouge : RM<sup>+</sup>.

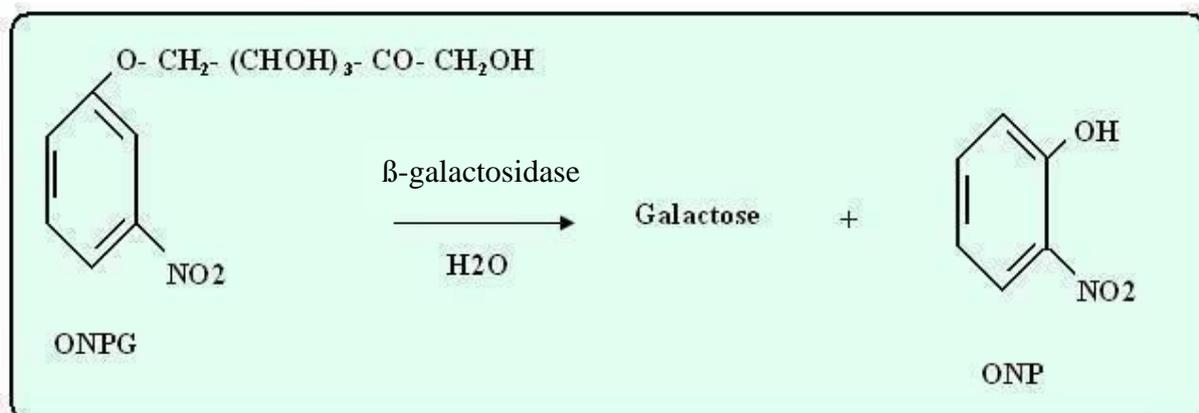
Coloration jaunâtre : RM<sup>-</sup>.

### - Recherche de la β-galactosidase :

#### Principe:

Pour dégrader activement le lactose, les microorganismes doivent posséder deux enzymes ; la perméase et la β-galactosidase.

L'épreuve ONPG permet de mettre en évidence la β-galactosidase qui dégrade l'ONPG soit l'orthonitrophényl- β-D- galactopyranoside qui possède une structure analogue au lactose. Le lactose est formé de deux molécules de glucose et de galactose, tandis que l'ONPG est composé d'une molécule d'orthonitrophényl liée à un galactose. L'hydrolyse de l'ONPG (composé incolore) libère l'orthonitrophényl qui est responsable de la coloration jaunâtre de milieu, Ce processus se fait selon la réaction illustrée dans la figure 11.



**Figure 11 : Réaction d'hydrolyse de l'ONPG (Marchal et Bourdon, 1982).**

**Technique:**

- Préparer une suspension dense d'une culture bactérienne à étudier dans un tube à essai stérile contenant 0.5ml d'eau physiologique, puis y ajouter un disque ONPG.
- incuber au bain Marie à 37°C pendant 24 heures.

**Lecture:**

La lecture se fait à des intervalles de temps différents : après 15mn, 30mn, 1 heure, 6 heures et 24 heures.

Le test ONPG est positif lorsque la suspension bactérienne se colore en jaune citron.

**- Utilisation des sucres TSI (gélose au glucose, lactose, saccharose):****Principe:**

Cette méthode permet de mettre en évidence d'une part, la fermentation du glucose (avec ou sans dégagement de gaz), du lactose, du saccharose et d'autre part, la production d'hydrogène de sulfate ( $H_2S$ ). C'est un milieu incliné dont le glucose présent dans le culot, est attaqué par voie fermentative entraînant une acidification du milieu avec production ou non de gaz. Sur la pente, le lactose et le saccharose seront alors oxydés et fermentés. La production du  $H_2S$  se manifeste par un noircissement du culot (Marchal et Bourdon, 1982).

**Technique:**

Une colonie est ensemencée en réalisant une piqûre centrale dans le culot et des stries serrées sur la pente. Remettre le bouchon du tube sans le revisser.

Incubation à 30°C pendant 24 heures.

**Lecture:**

Lactose-saccharose positif : pente virant au jaune;

Glucose positif: culot jaune;

$H_2S$  positive: noircissement du milieu dans la zone joignant la pente et le culot.

Production de gaz : présence de bulles de gaz dans le culot.

**- Utilisation du citrate comme source de carbone:****Principe:**

Le milieu utilisé est le citrate de Simmons, qui ne contient que le citrate comme seule source de carbone. Seules les bactéries possédant une enzyme citrate perméase seront donc capables de se développer sur ce milieu. L'utilisation de citrate provoque l'alcalinisation du milieu (Marchal et Bourdon, 1982).

**Technique:**

La pente du milieu estensemencée d'une suspension bactérienne, par stries longitudinales au moyen d'une anse. Les tubes sont légèrement fermés.

L'incubation se fait à 30°C pendant 3 à 5 jours. L'observation a lieu chaque jour.

**Lecture:**

La croissance de la bactérie sur le milieu indique que cette dernière possède du citrate perméase. Cependant s'il n'y a pas de développement, la bactérie ne possède pas cette enzyme.

**- Test Mannitol mobilité :****Principe:**

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

**Technique:**

Ensemencer le milieu Mannitol par piqûre centrale à l'aide d'une pipette Pasteur, chargée de culture à étudier.

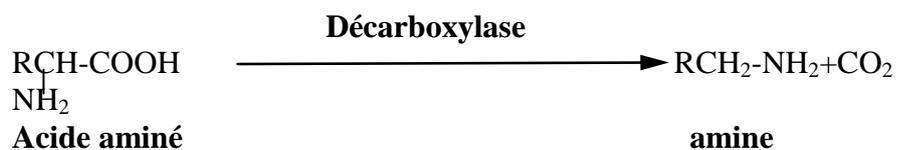
Incuber à 30°C, pendant 24 heures à 48 heures.

**Lecture:**

- La fermentation du Mannitol entraîne le virage du milieu au jaune.
- les souches mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement tandis que les souches immobiles croissent uniquement le long de la piqûre.

**• Étude du métabolisme protéique:****- La recherche des décarboxylases: ODC, LDC, ADH:****Principe:**

Les décarboxylases ou carboxylases, scindent les acides aminés entraînant la formation de l'amine correspondant avec la libération de CO<sub>2</sub> suivant la réaction :



Il s'agit d'enzyme induites dont la synthèse est favorisée par un pH acide (pH =3.5-5.5) et des conditions d'anaérobiose (Marchal et al. ,1982).

Les décarboxylases sont:



### Technique:

Le test est réalisé avec le milieu Moeller réparti dans 4 tubes à hémolyse différents:

- 1- le premier tube constitue le témoin. Il contient essentiellement du glucose en petite quantité et du pourpre de bromocrésol comme indicateur de pH.
- 2- les trois autres tubes contiennent en plus du milieu témoins, un des trois acides aminés suivants : Arginine, Lysine ou Ornithine.
- 3- après ensemencement, 1ml de vaseline stérile est ajouté dans chaque tube et le tout sera incubé à 30°C pendant 24 à 48h.

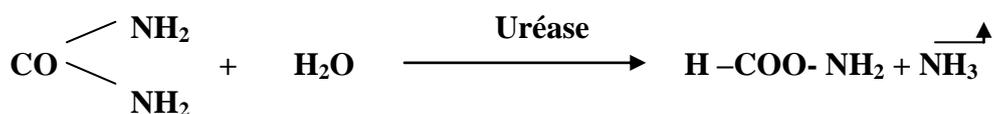
### La lecture:

- la réaction est positive lorsque le témoin vire au jaune (acidification du milieu due à l'utilisation du glucose). Les tubes contenant l'acide aminé restent violet (phénomène due à l'alcalinisation).
- la réaction est négative lorsque les tubes contenant l'acide aminé et le témoin virent au jaune (acidification).

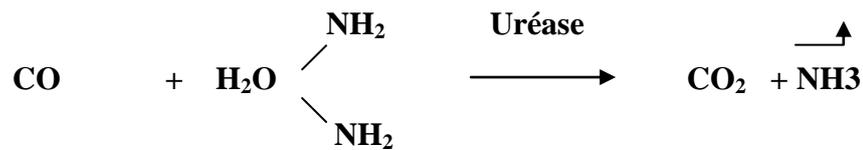
### - Recherche de l'uréase:

#### Principe:

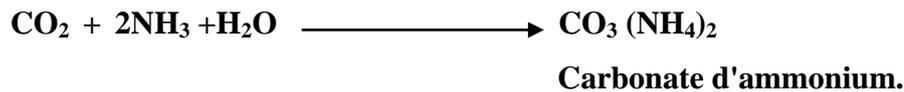
Toutes les bactéries hydrolysent l'urée grâce à la réaction suivante:



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



Le CO<sub>2</sub> et le NH<sub>3</sub> se combinent en donnant le carbonate d'ammonium:



Le carbonate d'ammonium alcalinise le milieu (Marchal et Bourdon, 1982).

### **Technique:**

La recherche de l'uréase se fait selon le procédé :

Dans les tubes d'urée –Indole, et à l'aide d'une anse stérile, on ensemence des colonies de la souche test âgée de 24h, on incube à 30°C pendant 24 heures.

### **Lecture:**

La lecture s'effectue comme suit :

- L'uréase est positive s'il y a virage de couleur du jaune vers le rouge violacé ou vers le rose rouge.
- L'uréase est dite négative s'il n'y a pas de changement de couleur.

### **• Production d'indole:**

### **Principe:**

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

### **Technique:**

Après 24 heures d'incubation, ajouter quelques gouttes du réactif de Kovacs au milieu urée indole inoculé par la souche à étudier.

### **Lecture:**

Après agitation:

- Anneau rouge vermillon en surface : indole positif.
- Anneau brunâtre (couleur du réactif): indole négatif.

- **Recherche du tryptophane désaminase (TDA) :**

**Principe:**

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

**Technique :**

Inoculer le milieu urée-indole (0.5ml) d'une suspension bactérienne dense.

Incuber à 30°C pendant 24 heures.

**Lecture:**

Après l'ajouter de quelques gouttes du réactif TDA, si :

- Une coloration brun foncé: TDA positive.
- Une coloration brun clair (du réactif): TDA négative.

- **Croissance sur milieu King (King A et King B):**

**Principe:**

Les milieux King A et King B permettent la différenciation entre les espèces de *Pseudomonas* par la mise en évidence de leurs pigments spécifiques.

La production des pigments est favorisée par la composition du milieu (Marchal et Bourdon, 1982).

**Technique:**

Inoculer un tube de milieu King A et un tube de milieu King B en réalisant des stries médianes à la surface de la pente ; replacer les capsules des tubes sans les revisser. Incuber à 30°C pendant 4 jours.

**Lecture:**

King A : ce milieu favorise la production de pyocyanine, pigment permettant l'identification de *Pseudomonas aeruginosa*. Les cultures typiques sont colorées en bleu-vert.

King B: ce milieu favorise la synthèse de la pyoverdine, pigment vert fluorescent produit par *Pseudomonas aeruginosa* et d'autres *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*). La pyoverdine se manifeste par une coloration vert fluorescent du milieu de culture.

- **Analyses biochimiques des levures**

**Principe du test :**

La galerie AUXACOLOR 2 est un système d'identification dont le principe repose sur l'assimilation des sucres. La croissance des levures est visualisée par le virage d'un indicateur de pH. La galerie comporte également 3 tests enzymatiques.

**Mode opératoire :**

**1. Inoculation de la microplaque**

- Préparer l'inoculum à partir d'une culture de 24 à 48h réalisée sur milieu de Sabouraud (+/- antibiotiques). Dans les conditions stériles, ensemercer le milieu de suspension (R2) avec des colonies de souche pure.
- Homogénéiser la suspension à l'aide d'un vortex.
- Prélever et distribuer, à l'aide d'une pipette, 100 µl de l'inoculum dans chacune des cupules de la microplaque (R1).
- Recouvrir la microplaque (R1) avec l'adhésif. Incuber 24 à 48h (72h si nécessaire) à 30°C.

**2. Lecture des résultats**

Pour la majorité des levures, l'identification peut être obtenue en 24h, mais il est parfois nécessaire de lire les résultats après 48 ou 72h.

**3. Interprétation des résultats**

Un profil numérique à 5 chiffres est obtenu en regroupant par 3 les valeurs des 15 tests suivants :

<i>Glucose</i>	<i>Maltose</i>	<i>Saccharose</i>
<i>Galactose</i>	<i>Lactose</i>	<i>Raffinose</i>
<i>Inositol</i>	<i>Cellobiose</i>	<i>Trehalose</i>
<i>Adonitol</i>	<i>Melezitose</i>	<i>Xylose</i>
<i>Arabinose</i>	<i>Hexosaminidase</i>	<i>Phenoloxidase</i>

On attribue à chaque réaction négative la valeur zéro et à chaque réaction positive une valeur en rapport avec sa position dans le triplet.

1 pour la position 1      2 pour la position 2      4 pour la position 3



Dans le triplet

L'addition des trois valeurs donne un chiffre qui permet l'obtention d'un profil numérique à 5 chiffres.

- L'activité proline-arylamidase (cupule POX/PRO) sera notée + ou - selon la couleur observée.

Cupule jaune ou vert-jaune : test PRO positif.

Cupule incolore ou grise : test PRO négatif.

- Afin de compléter cette identification, il est nécessaire d'utiliser six autres caractères, également à regrouper par 3, selon la méthodologie décrite ci-dessus, donnant ainsi deux chiffres supplémentaires.

*Pigmentation*

*Arthrospores*

*Capsule*

*Mycelium/pseudo-mycelium*

*chlamydo-spores*

*croissance à 37°C*

L'identification finale repose sur l'association des tests biochimiques et des caractères complémentaires déterminés dans les conditions habituelles.

**Exemple :**

*Candida albicans*

71442  
↙

Test biochimiques

+  
↙

test proline

07  
↙

caractères complémentaires

### III. 2. 5. Biodégradation du gasoil :

#### a. Sélection d'isolats dégradant le gasoil :

##### - Le suivi de la cinétique de croissance des souches pures isolées:

A partir des souches isolées sur un milieu minéral contenant le gasoil, la sélection portera sur la meilleure croissance de ces souches et selon les paramètres de croissances, à savoir, le temps de génération (**G**) et le taux de croissance (**μ**).

- Le temps de génération **G** correspond au temps nécessaire à une souche pour passer du nombre initial  $n_0 = x_0$  à  $t = 0$  au nombre  $n = 2x_0$  au temps  $t_n$  (Prevot, 1961).
- Le taux de croissance est le nombre de division **N** par unité de temps (heures).

Où :

$$\mu = N / t$$

$$G = t / N$$

$$N = (\log UFC_0 - \log UFC_1) / \log 2$$

Nous avons réalisé un suivi de la croissance des souches sur milieu contenant le gasoil en mesurant la concentration microbienne toutes les 12 heures et ce durant la période de fermentation. Les étapes de l'expérience sont décrites ci-dessous :

- **Préculture:**

Prélever une colonie à partir d'un milieu gélosé et la mettre dans un erlenmeyer de 100 ml contenant 20 ml du milieu BH autoclavé +2% du gasoil.

Incubation à 30°C pendant 24 heures sous agitation rotative (150 tours/min).

- **Culture:**

5 ml de chaque préculture est transvasés dans des erlens de 250 ml contenant chacune 50 ml du milieu BH + 2% de gasoil. L'agitation de 150 tours/min facilite l'accès des souches au substrat et à l'oxygène. Toutes les 12 heures, il y a prélèvement d'échantillons pour le suivi de la croissance.

- **Mesure de la concentration microbienne:**

L'échantillon est dilué à 1/10, puis 1 ml de chaque dilution est incorporé en milieu GN (gélose nutritive) solide.

La viabilité des souches a été déterminé par le dénombrement des colonies après 24 et 48 heures d'incubation à 30°C.

### **b. Etude de l'optimum de la température:**

Les souches isolées (âgé de 24 heures) sont inoculées dans des Erlenmeyer de 250 ml, remplis de 50ml de milieu BH stérile + 2% de gasoil. Le pH est ajusté à 7.

L'incubation est faite sous agitation rotative en raison de 150 tr/min et ceci à différentes températures (20°C, 25°C, 30°C, 35°C et 40°C) (Rodrigo, 2005).

Afin d'estimer l'optimum de température, la viabilité des cultures après 24 heures d'incubation est mesurée. Des dilutions sont préparées où 1 ml du milieu est dilué de 1/10 puis 0.1 ml de chaque dilution estensemencé sur GN à 30°C pendant 24 à 48 heures. Les colonies sont exprimées en UFC/ ml.

### **c. Etude de l'optimum de pH :**

Cette étude est réalisée avec l'utilisation du milieu BH liquide + 2% de gasoil. Les différentes valeurs de pH (5, 6, 7, 8, 9, et 10) sont ajustées par l'ajout de HCl 1M ou de NaOH 1M.

Dans des Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu stérile additionné de gasoil comme seule source de carbone, on inocule en utilisant des cultures de 24h, que l'on incube ensuite à 30°C avec une agitation de 150 tr/min.

L'optimum est estimé par la mesure des concentrations microbiennes selon la méthode décrite ci-dessus.

#### **d. Essai de biodégradation :**

##### **- Influence du gasoil sur la croissance microbienne**

###### ***\* Ajout de gasoil pendant la phase stationnaire***

La méthode utilisée pour déterminer l'influence du gasoil sur les souches **A** et **B** est basée sur celle de Aono *et al.* (1994). Dans des erlenmeyers de 500 ml, 100 ml de milieu de culture BH, 1% (v/v) de souche est ajouté.

Les fermentations ont été menées en mode batch, à une température de 30°C sous une agitation de 150 rpm, pendant 24 heures. Le gasoil (1 ml) est ensuite ajouté pour obtenir une concentration de 1% (v/v) (sauf dans les erlenmeyers servant de témoins), puis remis en incubation avec agitation pour une durée de 5 à 6 jours.

Régulièrement, toutes les 24 heures, il y a prélèvement d'échantillons pour le suivi de la croissance, par la mesure de la turbidité et la viabilité des bactéries. La turbidité est mesurée par spectrophotométrie à une densité optique (DO) de 600 nm.

La viabilité est déterminée par dénombrement des colonies après 24 heures d'incubation à 30°C sur milieu GN.

###### ***\* Ajout de gasoil au début de la fermentation***

Afin de mieux évaluer l'influence du gasoil sur la croissance des souches, une expérience très simple a été réalisée. Dans ce cas, le gasoil est ajouté au début de la fermentation. Toujours dans des erlenmeyers de 500 ml contenant 100 ml de milieu de culture BH, on additionne 1 ml de l'inoculum puis 25 ml de gasoil. Les paramètres de la fermentation sont les mêmes que les précédents.

##### **- Tolérance des souches au gasoil :**

La méthode de Fukumaki *et al.* (1994) est utilisée pour déterminer la tolérance au gasoil à partir d'un milieu BH. 2 ml d'inoculum sont nécessaires pour inoculer 100 ml de milieu BH (dans des erlenmeyers de 500 ml). Ensuite, 0 ml (témoin), 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% et 35% de gasoil (v/v) recouvraient les milieux. L'incubation est faite à 30°C pendant 2

jours avec une agitation à 150 rpm. À la fin de l'incubation, la méthode conventionnelle de dilution et d'ensemencement a été utilisée sur une gélose GN pour le dénombrement des souches viables, avec également mesure de la turbidité à 600 nm.

### **- Biodégradation du gasoil**

Pour évaluer la biodégradation du gasoil nous nous sommes basés sur la méthode de Jacques R.J.S. *et al.* (2005).

Les isolats sont incubés dans 100 ml du milieu BH contenant 25% de gasoil comme seule source de carbone à une agitation de 150 rpm et pour une durée de 21 jours.

Les prélèvements sont effectués tous les trois jours, avec le suivi régulier des paramètres suivants :

- Le taux de biodégradation qui est déterminé par CPG.
- Test d'index d'émulsion  $E_{24}$  .
- La tension superficielle.
- La concentration microbienne.

#### **• Test d'index d'émulsion $E_{24}$ :**

Ce test a été mis au point par Broderick et Cooney, et modifié par Francy *et al.* (1991) et Bodour *et al.* (2004). Il permet de vérifier la capacité des souches à émulsionner une phase hydrophobe (gasoil) dans une phase hydrophile (le milieu de culture).

Le test consiste à mélanger 3 ml du milieu de culture avec 3 ml de gasoil dans des tubes stériles. Les tubes sont agités au vortex pendant 3min. Puis après homogénéisation des deux phases, on procède au calcul de l'index d'émulsion, en les comparant au témoin qui est constitué du milieu de culture aseptique et de gasoil et soumis aux mêmes conditions (Figure 12).

Les tubes sont laissés au repos pendant 24h à température ambiante. Puis le calcul de  $E_{24}$  est refait une deuxième fois pour vérifier la stabilité de l'émulsion.

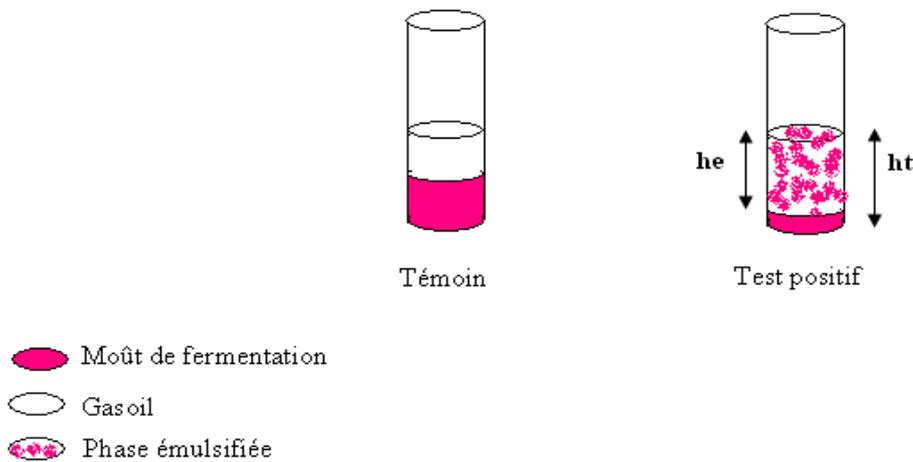
### Calcul de l'index de l'émulsion $E_{24}$ :

C'est le rapport de la hauteur de l'émulsion formée sur la hauteur totale du mélange, multiplié par 100.

$$E_{24} = ( h_e / h_t ) \times 100$$

**$h_e$**  : hauteur d'émulsion.

**$h_t$**  : hauteur totale du mélange.



**Figure 12 : Test d'émulsion.**

- **Etude de la tension superficielle**

La tension de surface est définie comme étant un état résultant des interactions s'exerçant entre les molécules à la surface d'un liquide au repos. Cette tension provient des forces intermoléculaires qui exercent une traction vers le bas sur les différentes molécules en surface. La méthode utilisée consiste à prélever un échantillon de culture tous les 3 jours et ce pour une durée de 21 jours pour le suivi de la tension superficielle. Ce procédé a été réalisé pour chaque souche bactérienne étudiée.

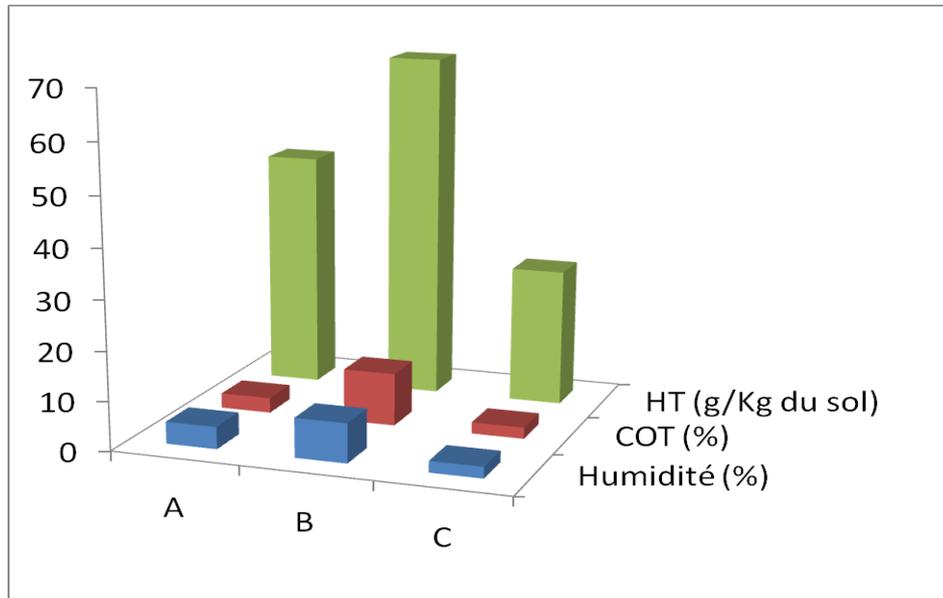
La mesure est effectuée à l'aide d'un tensiomètre (ABU-Ruwaida et *al.*, 1991).

# *Chapitre IV*

## *Résultats et discussions*

#### IV. 1. Etude de l'évolution de la contamination des bourbiers:

Dans le but d'évaluer le taux de contamination des bourbiers, nous avons dosé les composés d'hydrocarbures totaux (HT), du carbone organique total (COT) et mesuré le taux d'humidité. Les résultats obtenus sont représentés par la figure suivante:



**Figure 13: Teneurs en hydrocarbures totaux (HT), du carbone organique total (COT) et de l'humidité des échantillons de bourbiers A, B et C.**

D'après ces résultats (**Figure 13**), nous constatons que l'échantillon du bourbier **B** (12/2006) est le plus chargé en hydrocarbures totaux (69,829g/kg du sol) et en carbone organique totale (10,70%), comparé aux échantillons des bourbiers **A** (9/2005) et **C** (bourbier traité en : 6/2005). Cela peut être dû à plusieurs facteurs à savoir :

- Historique du bourbier.
- Nature du sol.
- Différence dans les dates de prélèvements.

Par ailleurs, le bourbier traité (bourbier **C**) reste toutefois pollué puisqu'il présente également des teneurs relativement élevées en hydrocarbure totaux (27,837 g/kg du sol) et en carbone organique (2,30%). Ce résultat démontre, sans aller à généraliser nos observations, que la méthode de traitement par solidification n'a pas totalement éliminé le polluant.

## IV.2 Caractérisation physicochimique du bourbier B:

L'échantillon du bourbier **B** a été choisi pour un diagnostic physico-chimique détaillé car il présente un taux de pollution très élevé comparé aux deux autres bourbiers analysés (A et C).

L'analyse physico-chimique permet de vérifier si le sol constitue un environnement favorable à la croissance des microorganismes (Samson, 1994).

### IV.2.1 Caractérisation du polluant par CPG:

Les résultats des analyses chromatographiques obtenus par CPG de l'échantillon du bourbier **B** et du gasoil brut sont représentés par les **figures 14** (témoin) et **15**.

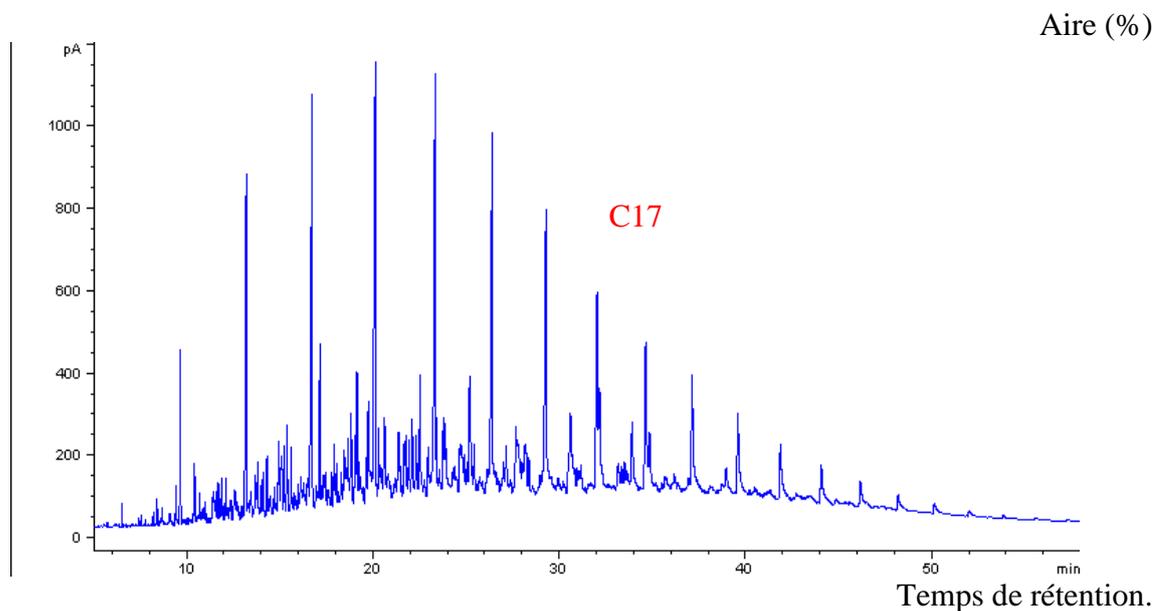


Figure 14: Chromatogramme de la fraction du gasoil liquide utilisé comme témoin.

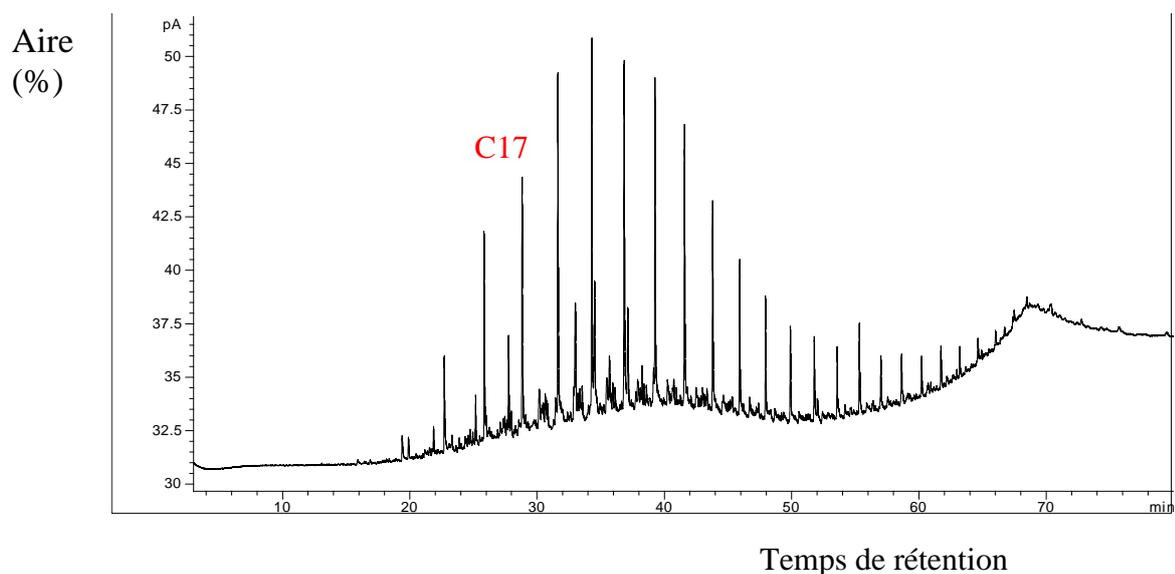


Figure 15: Chromatogramme représentant le résultat d'analyse de la fraction d'hydrocarbure détectée dans le bourbier B.

La comparaison des résultats avec le chromatogramme de l'échantillon de gasoil brut (**Figures 14 et 15**), montre une grande similitude (hydrocarbures de C10 à C24). On signale l'absence des fractions légères dans l'échantillon B, qui peut être expliquée par une éventuelle volatilisation. Ces résultats montrent que le contaminant majeur de ce bourbier est du gasoil. Cela était prévisible du fait qu'à l'exception de la première phase, la totalité du forage des puits du champ de HMD utilise des fluides à base d'huile (OBM).

Ces profils concordent parfaitement avec ceux trouvés par Geerdink *et al.* (1996), Haeseler *et al.* (2001), Jeannot *et al.* (2001) et Marchal *et al.* (2003). Selon Vogel et Ballerini (2001), les hydrocarbures d'un gasoil sont plus lourds et moins volatiles avec un nombre de carbones variant de 12 à 25.

#### **IV.2.2 Dosage des paramètres indicateurs de pollution:**

Les résultats de l'analyse physicochimique et paramètres indicateurs de pollution du bourbier **B** sont donnés dans le tableau II.

**Tableau II : Résultats d'analyses physico-chimiques du bourbier B.**

<b>Résultats</b>	<b>Paramètres</b>
0.79	Phosphore (mg/l)
0.4	Nitrate (mg/l)
2	Nitrite (mg/l)
8	Humidité (%)
8.10	pH
10.7	COT (%)
69.829	HT (g/kg du sol)

D'après ces résultats nous constatons que:

- La teneur en COT dans ce bourbier est très élevée. Il en est de même pour la teneur en hydrocarbures totaux dont la valeur obtenue (69.829g/kg du sol) est largement supérieure à la valeur fixée par la norme hollandaise (0.1g/kg du sol). Ce résultat confirme bien une pollution par les hydrocarbures. Cette pollution causée par les rejets de boues de forages constitue une source de carbone importante pour les microorganismes du sol. Ce taux de pollution trop élevé nécessite donc un procédé de traitement du bourbier.

- Le taux d'humidité du sol obtenu est de 8%. C'est une valeur relativement faible mais qui reste suffisante pour un borbier. Cette présence d'humidité peut être due à plusieurs facteurs : composition de fluide de forage, déversements des eaux lors des opérations d'exploitation. Toutefois, il est à noter qu'un faible taux d'humidité peut avoir un effet négatif sur l'activité microbienne, en permettant l'amélioration du contact microorganisme / polluant, et en favorisant le processus de dégradation enzymatique (Lecomte, 1995).
- Le borbier B présente un pH alcalin (8,10). Ce pH est influencé par celui des boues rejetées qui présentent des pH alcalins allant de 9 à 10 nécessaire afin d'éviter la corrosion du matériel de production.
- Quant aux paramètres chimiques, les résultats indiquent un déficit en éléments azote et phosphore (Tableau II). Selon Eckford et *al.* (2002), la pollution des sols par les hydrocarbures (diesel, carburant) a pour conséquence un déficit en azote par rapport au carbone (par exemple le rapport C/N est supérieur à 250/1) ; ce qui peut limiter la biodégradation des hydrocarbures. Pour tout traitement biologique, un enrichissement du sol avec ces éléments sera donc nécessaire.

Par ailleurs, il est connu que la flore microbienne a besoin d'éléments minéraux pour sa croissance, en particulier d'azote, dont les proportions optimales, généralement admises, sont de 10g d'azote et 1g de phosphore pour 100g de carbone (Ballerini, 1999). Ces éléments rentrent dans l'édification des constituants cellulaires lors de la multiplication des microorganismes (synthèse d'ADN, protéines...etc.). Prince et *al.* (2003) rapportent que dans les environnements aérobies les éléments limitants les plus susceptibles sont l'azote et le phosphore. Ainsi dans de telles conditions, il est probable que la biodégradation soit limitée.

### **IV.3 Evaluation de la biodégradabilité du gasoil**

Nous avons réalisé des tests de biodégradabilité afin d'estimer le taux de biodégradation de notre polluant.

Pour que les tests de biodégradabilité soient validés il faut que :

- Les pH des milieux testés doivent être compris entre 6 et 8.
- Le taux de biodégradabilité du milieu de référence doit dépasser 50% dans les premiers cinq jours du test.

- Le taux de biodégradabilité du milieu d'essai (blanc) soit compris entre 20 et 30 %.  
Les mesures des DCO, DBO et taux de biodégradabilité du composé testé ont donné les résultats regroupés dans le tableau IV.

**Tableau IV: Valeurs de DCO, DBO et taux de biodégradabilité après 28 jours d'incubation du gasoil testés.**

<b>Composé</b>	<b>DCO (mg/l)</b>	<b>DBO (mg/l)</b>	<b>B (%)</b>
<i>Gasoil</i>	<i>381</i>	<i>111</i>	<i>29.65</i>

**B%** : Taux de biodégradabilité.

**DCO** : Demande chimique en oxygène.

**DBO** : Demande biologique en oxygène.

La détermination de la biodégradabilité aérobie de notre échantillon de gasoil testé nous a permis de constater que le gasoil est très peu biodégradable (29.65 %) dans ces conditions d'expérimentation. A titre de comparaison, un pétrole brut arabis light est dégradé à plus de 65% alors que le fuel s'élève à 11% (Oudot, 1984 et 2000). Cela est dû probablement à la nature de gasoil, qui est composé de plusieurs types d'hydrocarbures constitués de différentes familles difficilement assimilables par les microorganismes.

Le carburant gasoil contient généralement de basses quantités d'alcènes. Il est composé de quatre classes :

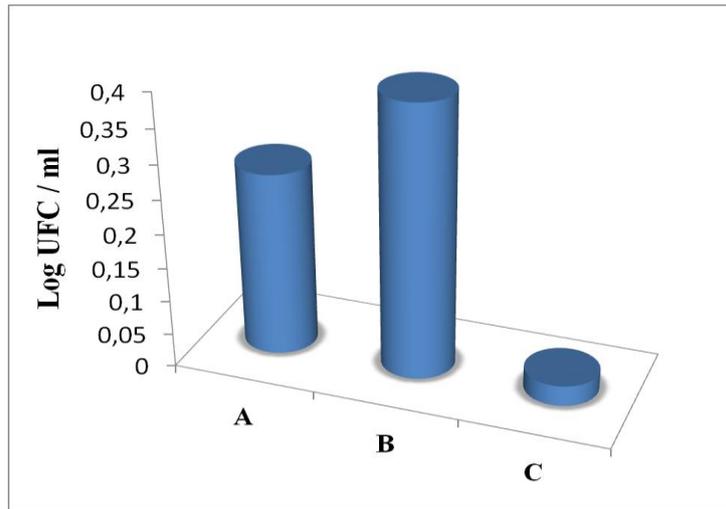
- n- alcanes ou n- paraffines (hydrocarbures saturés linéaires);
- isoalcanes ou iso paraffines (hydrocarbures saturés branchés, Pristène et phytène);
- cycloalcanes ou naphènes (alcanes cycliques saturés);
- composés aromatiques.

Cependant, il contient 2000 à 4000 hydrocarbures (Marchal et *al.*, 2003).

#### **IV.4 Etude microbiologique:**

##### **IV.4.1 Résultats de dénombrement de la microflore totale:**

Les résultats de dénombrement sur gélose nutritive obtenus pour les différents échantillons de borbiers **A** (9/2005), **B** (12/2006) et **C** (bourbier traité en : 6/2005), sont représentés par la Figure 16 :



**Figure 16: Résultats du dénombrement sur gélose nutritive des trois échantillons de bourbiers (A, B et C).**

D'après l'histogramme (**Figure 16**), il en ressort qu'il y a présence d'une microflore dans les trois bourbiers A, B et C, mais la comparaison des concentrations en microflore totale des trois bourbiers nous permet d'avancer que le bourbier B étant le plus récemment pollué (12/2006) présente une microflore assez importante avec une valeur de  $0.4 \cdot 10^9$  UFC/g de sol par rapport au bourbier A (9/2005). Alors que le bourbier C (traité par la méthode physique) a la valeur la plus faible ( $0.02 \cdot 10^9$  UFC/g de sol). Ces résultats révèlent qu'il y aurait une corrélation positive entre teneurs en hydrocarbures et présence d'une microflore. Ces observations concordent avec celles de l'auteur Atlas (1984), qui a noté qu'un apport d'hydrocarbures dans un sol est suivi d'une augmentation de la population microbienne.

Nos résultats montrent que le bourbier B présente une flore autochtone, sujet à une biodégradation vu que la norme exige au moins une teneur  $\geq 10^6$  germes/g de sol (Battele et NFESC, 1996). Ce résultat nous permet donc d'avancer que ce sol pourrait être traité par es procédés biologiques en utilisant ces propres microorganismes déjà existants.

Plusieurs auteurs ont débuté des traitements avec un nombre initial en microorganismes dépassant  $10^6$  germes /g de sol. C'est le cas de Margesin et Schinner (2001), Eriksson et *al.* (2001) et Stapleton et *al.* (1998) qui ont travaillé avec un nombre de germes initial, respectivement, de  $6.5 \cdot 10^7$  UFC/g de sol, de  $2.3 \cdot 10^7$  UFC/g de sol et de  $1.1 \cdot 10^6$  UFC/g de sol.

#### **IV.4.2 Isolement de souches microbiennes susceptibles de dégrader le gasoil:**

Pour isoler les souches microbiennes, nous avons utilisé le milieu BH additionné de gasoil, composant majoritairement présent dans les bourbiers. L'échantillon choisi est celui du bourbier **B** car celui-ci montre une charge importante en hydrocarbures totaux et en microflore totale. De ce fait, il représente le modèle adéquat et approprié à notre étude.

##### **a. Résultats de l'étude macroscopique:**

L'ensemencement sur milieu BH additionné de 2% de gasoil comme source de carbone, nous a permis d'isoler 6 colonies, distinctes par leur aspect, leur taille et leur couleur. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau V.

**Tableau V : Résultats de l'étude macroscopique des colonies isolées sur milieu BH à partir de l'échantillon du bourbier B.**

<b>Critère</b>	<b>Diamètre</b>	<b>Chromogénèse</b>	<b>Forme</b>	<b>Elévation</b>	<b>Contour</b>	<b>Opacité</b>	<b>Surface</b>	<b>Consistance</b>
<b>souche</b>								
<b>SA</b>	2mm	Beige	Ronde	Convexe	Régulière	Opaque	Lisse brillante	Crémeuse
<b>LB</b>	2mm	Rouge	Ronde	Convexe	Régulière	Translucide	Lisse brillante	Crémeuse
<b>SC</b>	>1mm	Crème	Régulière	Convexe	Régulière	Translucide	Lisse	Visqueuse
<b>SD</b>	>1mm	Beige	Régulière	Convexe	Régulière	Translucide	Lisse	Visqueuse
<b>SE</b>	>2mm	Jaune	Ronde	Convexe	Régulière	Opaque	Lisse brillante	Crémeuse
<b>SF</b>	3mm	blanche	Ronde	Convexe	Régulière	Translucide	Lisse brillante	Visqueuse

## b. Résultats de l'étude microscopique:

L'observation microscopique a été réalisée suivant deux étapes : Après coloration de Gram et Après une observation à l'état frais. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau VI.

**Tableau VI: Résultats de l'étude microscopique des souches isolées.**

Présence de spores.	Etat frais	Coloration de GRAM			Colonies
	mobilité	arrangement	forme des cellules	Gram	
-	+	isolées et en amas	colibacilles	-	<b>SA</b>
-	-	Isolées	Ovales allongés avec bourgeonnement	ND	<b>LB</b>
-	+	Isolées en paire et en chaînettes	Colibacilles	-	<b>SC</b>
-	+	Isolées et en amas	Colibacilles	-	<b>SD</b>
-	-	Isolées et en amas	Cocci	+	<b>SE</b>
+	+	Isolées en paire	Bacille	+	<b>SF</b>

**ND: non déterminé.**

### Remarque:

compte tenu que la souche LB ait poussé sur un milieu OGA additionné d'un antibiotique (tétracyclines), nous a permis de confirmer qu'il s'agissait d'une levure.

D'après nos observations (tableau VI), il ressort que les bactéries isolées présentent différentes formes : Bacilles, Colibacilles ou cocci et qu'elles sont, soient mobiles ou immobiles avec une paroi de type positive ou négative. En revanche, la spore n'a pas été révélée chez toutes les souches bactériennes sauf la souche SF.

## c. Résultats des tests biochimiques

Les résultats des tests biochimiques sont regroupés dans les tableaux VII et VIII.

**Tableau VII : Résultats des tests biochimiques des différentes souches isolées**

SF	SE	SD	SC	SA	Souches	
					Tests	
AAF	AS	AAF	AAF	AS	Type respiratoire (VF)	
+	+	+	+	+	Catalase	
-	-	-	-	-	Oxydase	
+	+	+	+	+	Nitrate réductase	
OF	O	OF	OF	O	Milieu Mevag	
+	-	+	+	+	Glu.	Milieu TSI
+	+	+	+	-	Lac. / Sac.	
-	-	-	-	-	H <sub>2</sub> S	
-	-	-	+	-	Gaz	
+	+	+	+	+	β-galactosidase (ONPG)	
+	-	+	+	+	Citrate perméase.	
-	-	-	+	-	Mannitol	Milieu Mannitol/ mobilité.
+	-	+	+	+	Mobilité	
-	-	-	+	-	Gaz	
+	+	-	+	-	VP	Milieu Clarck et Lubs
-	-	+	+	+	RM	
-	-	+	+	+	ADH	Milieu Moeller
+	-	-	-	-	LDC	
+	-	-	+	-	ODC	
-	+	-	-	-	Uréase	Milieu urée /Indole
+	+	+	-	-	TDA	
-	-	-	-	-	Indol	
-	-	-	-	+	King A	
-	-	-	-	+	King B	

AS: aérobie stricte.  
AF: aérobie facultatif.  
Lac: lactose.

+ : résultat positif.  
- : résultat négatif.  
Sac: saccharose.

O : Oxydatif.  
OF: Oxydatif et fermentatif  
Glu: glucose.

**Tableau VIII : Résultats des tests d'assimilation des sucres pour la souche LB**

Tests	glucose	maltose	saccharose	galactose	lactose	raffinose	inositol	cellobiose	trehalose	adonitol	melezitose	xylose	arabinose	hexosaminidase	POX / PRO	pigmentation	arthrospore	capsule	Mycélium/ Pseudo--mycélium	Croissance à 37 °C
Souche LB	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+

- : résultat négatif.

+ : résultat positif.

POX / PRO : activité proline-arylamidase.

#### **d. Identification des souches isolées :**

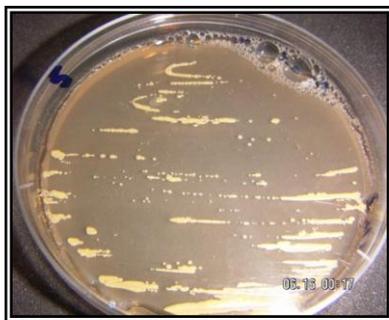
##### **a) Identification des souches bactérienne**

L'identification a pu être réalisée à l'échelle du genre ou de la famille. En effet, parmi les cinq bactéries isolées, nous avons pu affilier les souches comme appartenant aux familles suivantes (Bergey, 1984) :

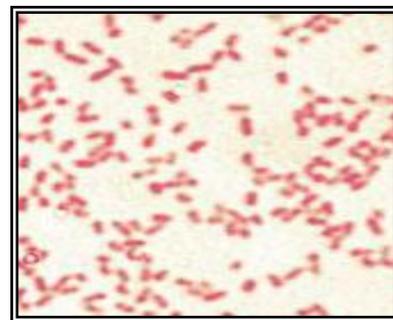
##### ***Les Pseudomonaceae :***

D'après sa morphologie macroscopique, la souche **SA** a été rattachée au genre *Pseudomonas*. Celle-ci forme de petites colonies circulaires, lisses et brillantes avec une pigmentation jaune (figure 17 a). La souche a une forme de bacillaire (Figure 17 b), avec les caractéristiques suivantes : Gram négatif, oxydase négative, catalase positive. Ces bactéries ont un caractère aérobic stricte, ADH et citrate positif (Bergey, 1984 ; Larpent, 1992 ; Prévôt, 1961 et Singleton, 1999). L'incapacité de cette souche à dégrader le mannitol avec l'ONPG positif nous permettrait de supposer qu'il s'agit de *Pseudomonas luteola*.

D'après la littérature, concernant la nomenclature de l'espèce *Chryseomonas luteola*, cette espèce aurait également comme synonyme le nom d'espèce *Pseudomonas luteola* (Anzai, 1997 ; Ghosh, 2000 ; Laurent et al., 2000).



(a)



(b)

**Figure 17 : L'aspect macroscopique (a) et microscopique (b) (G x 100) de la souche SA**

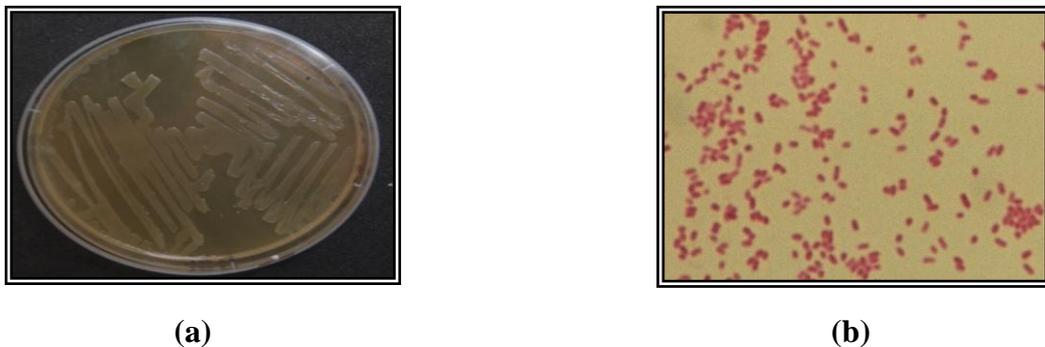
##### ***Les Enterobacteriaceae***

Les souches **SC** et **SD** sont apparentées à la famille des *Enterobacteriaceae* et présentent les caractéristiques suivantes : une forme bacillaire (figure 18 et 19), sont Gram négatif, aéro-anaérobic facultatives, catalase positive et à métabolisme fermentatif.

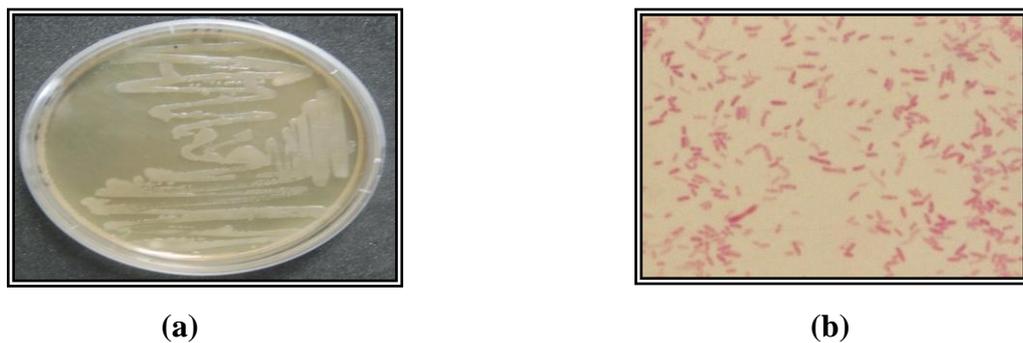
Les deux souches réduisent les nitrates en nitrites. L'étude des caractères biochimiques et la comparaison des tests biochimiques, nous ont permis de rattacher la souche **SC** au genre *Enterobacter*. Quant à la souche **SD**, elle pourrait appartenir au genre *Citrobacter*.

En se basant sur les tests biochimiques de cette souche, LDC et uréase négatives, citrate positif et fermentant le glucose avec production de gaz, nous avons supposé que la souche **SC** appartiendrait à l'espèce *Enterobacter cloacae*.

La souche bactérienne **SD** est mobile, capable d'utiliser le citrate de sodium comme unique source de carbone ; elle est ONPG positive, LDC négative, catalase positif, RM et VP négatifs. Compte tenu de ces résultats, l'espèce serait probablement *Citrobacter freundii*. (Bergey, 1984).



**Figure 18 : L'aspect macroscopique (a) et microscopique (b) (G x 100) de la souche SC.**



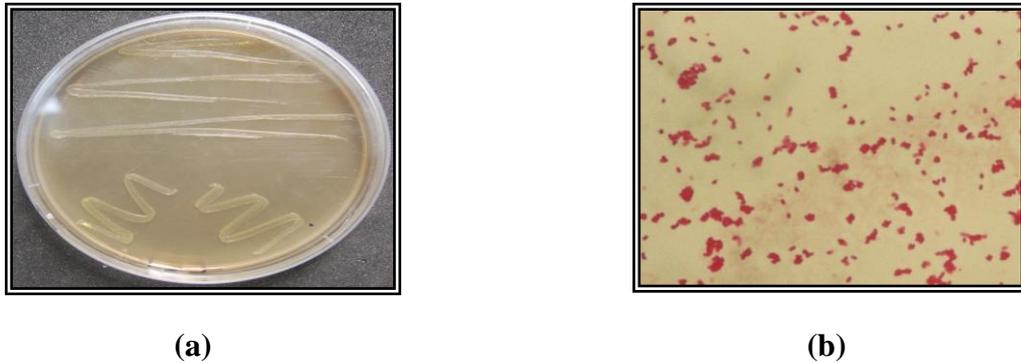
**Figure 19 : L'aspect macroscopique (a) et microscopique (b) (G x 100) de la souche SD.**

### ***Les Micrococcaceae***

La souche **E** a été affiliée au genre *Micrococcus* en raison de sa forme sphérique, de ses cellules qui se présentent soit en amas ou isolées (figure 20 b). Les colonies paraissent

jaunes, opaques et lisses (figure 20 a). Cette souche est aérobie stricte ne fermentant pas le glucose et à mobilité négative. Elle pourrait donc appartenir au genre *Micrococcus*.

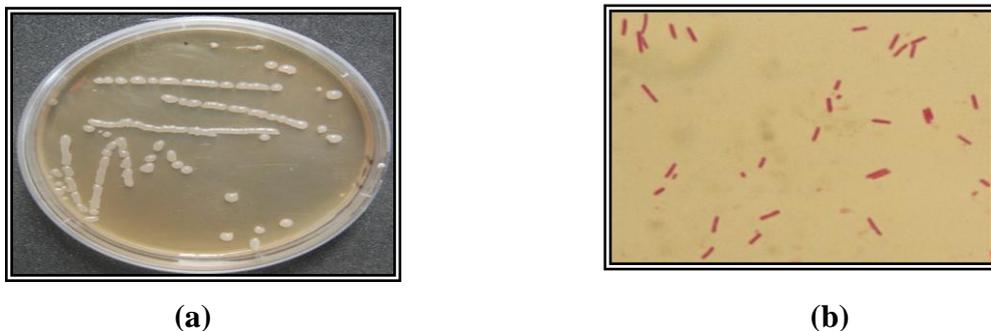
D'après les résultats des tests biochimiques et par comparaison avec ceux établis par Bergey, (1974) et Prévôt (1961), il est probable que cette souche correspondrait à l'espèce *Micrococcus varians*.



**Figure 20 : L'aspect macroscopique (a) et microscopique (b) (G x 100) de la souche SE.**

### *Les Bacillaceae*

La souche **SF** a été affiliée au genre *Bacillus* en raison de la morphologie de ses cellules en forme de bacilles (figure 21 b), gram positive, sporulées, aérobie strictes ou aéro-anaérobie facultatif et qui possèdent une catalase. En effet, ceux sont des caractères spécifiques du genre *Bacillus*.



**Figure 21 : L'aspect macroscopique (a) et microscopique (b) (G x 100) de la souche SF.**

### **b) Identification de la souche de levure :**

#### *Description morphologique :*

Sur milieu Sabouraud, les cellules appartenant aux colonies obtenues sont ovale assez allongée bourgeonnant de façon unilatérale (figure 22 b). Elle présente une paroi épaisse, pouvant même simuler une capsule. Sur le plan macroscopique, elle se présente comme une

colonie de consistance crémeuse à la surface lisse ou finement plissée (figure 22 a). Nous avons noté l'absence de pseudo mycélium. En culture, ceux sont des levures pigmentées par un pigment caroténoïde rose à rouge orangé.

Il s'agirait alors de l'une des formes de levure parfaite. Elle ne fermente pas les sucres, mais les assimile, c'est le cas du glucose, le saccharose, le raffinose. Elle est inositol et nitrate négatifs et possède une uréase. Elle appartient à la classe des *Blastomycètse*, ordre des *Cryptococcales* et famille des *Cryptococcaceae*. Cette souche serait affiliée au genre *Rhodotorula sp.* (Lodder, 1970 ; Kreger-VanRij, 1984 et Barnett et *al.*, 1990).



(a)



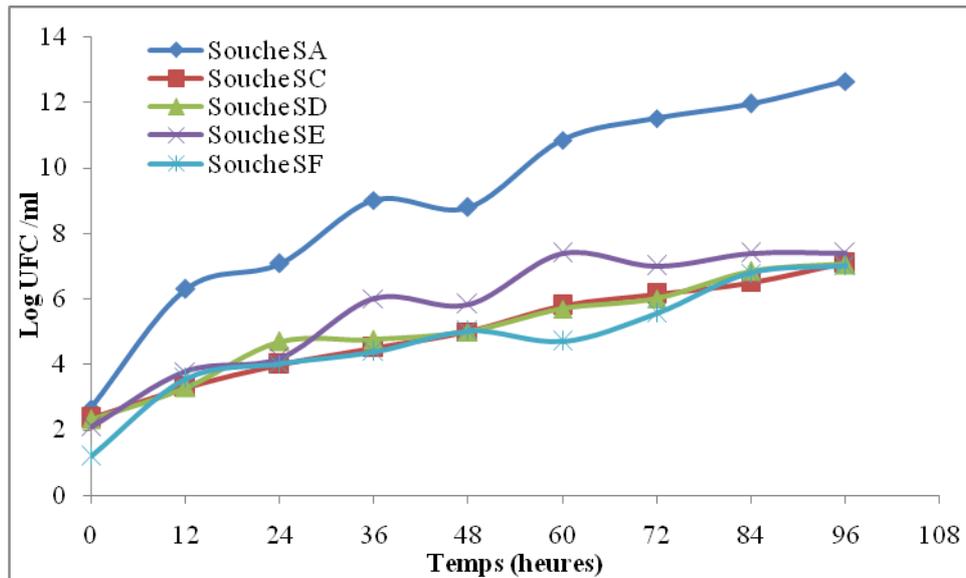
(b)

**Figure 22 : L'aspect macroscopique (a) et microscopique (b) (G x 100) de la souche LB.**

#### **IV.5 Suivi de la cinétique de croissance des souches isolées:**

La cinétique de croissance des souches isolées sur milieu BH additionné de 2% du gasoil comme seule source de carbone, a été suivi en mesurant la concentration microbienne en fonction du temps ; ce qui nous a permis de tracer les courbes représentées par la figure 23 pour les bactéries et la figure 24 pour la levure isolée. Les valeurs de Log UFC/ml en fonction du temps sont données dans le tableau 5.I (annexe 5).

Les courbes **Log UFC/ ml = f (t)** obtenues ont l'allure d'une courbe de croissance bactérienne classique (voir figures 23 et 24).



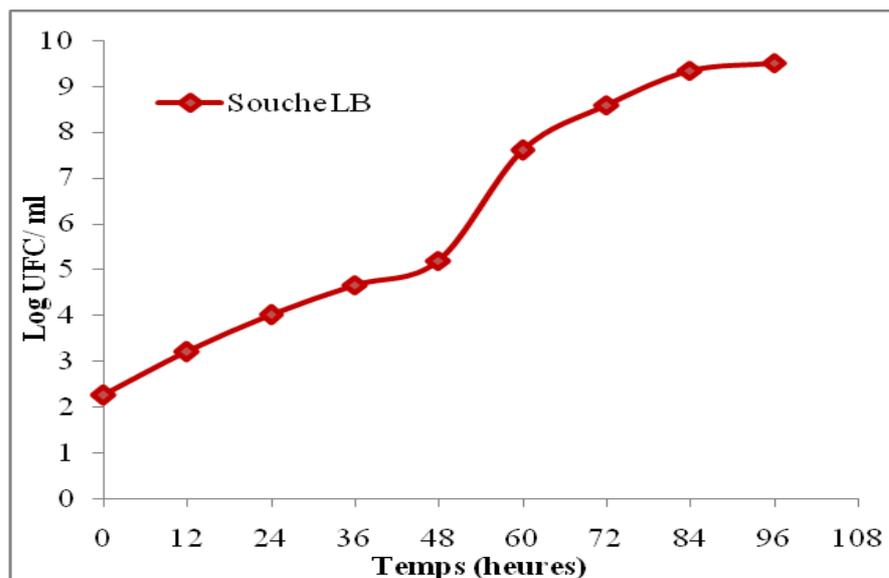
**Figure 23 : Cinétique de croissance des souches bactériennes isolées sur milieu BH à 2% du gasoil.**

Pour les 5 souches bactériennes étudiées, les phases de latence observées sont très courtes. Ce résultat démontre une adaptation plus ou moins rapide de ces souches à la source de carbone utilisé (le gasoil).

D'après ces courbes, nous pouvons observer, d'une part, que la concentration microbienne augmente dès la 1<sup>ère</sup> heure de fermentation jusqu'à atteindre des valeurs maximales (12 heures); et que cette augmentation correspond à la phase exponentielle, phase durant laquelle la dissolution du substrat (gasoil) suffit aux besoins métaboliques. D'autre part lorsque la concentration microbienne augmente au delà de 12 heures, le niveau des exigences nutritionnelles surpassent la vitesse de dissolution du substrat, la biodisponibilité deviendra alors limitante et c'est la croissance linéaire (12 - 24 heures).

Ceci nous laisse penser que les fractions dégradées durant cette phase sont complexe, cette phase pourrait être caractéristique de la dégradation des hydrocarbures complexes, permettant ainsi des nouvelles cinétiques de croissance successives qui se traduisent par des Diauxies alternées (au delà de 24 heures).

Pour le suivi de la croissance de la levure isolée, nous avons obtenu les résultats représentés par la figure 24:



**Figure 24 : Cinétique de croissance de la levure LB isolée sur milieu BH à 2% du gasoil.**

La cinétique de croissance de cette levure évolue en 48 heures, comportant une phase de latence qui est rapide, une phase exponentielle atteinte au bout de 36 heures et une phase stationnaire (48 heures). Au delà de 48 heures on assiste à une diauxie qui est expliquée par l'assimilation des composés complexe de gasoil dissous dans le milieu minéral.

Par ailleurs, nous savons que la vitesse de croissance a longtemps été considérée comme un critère essentiel pour le choix du microorganisme (Heijnen et Roels, 1981). Pour cela, nous avons procédé à une nouvelle sélection des souches, en se basant sur le calcul des paramètres cinétiques, après 96 heures d'incubation (Rodrigo et al. 2005). Les résultats sont représentés dans le tableau IX.

**Tableau IX : Paramètres des cinétiques de croissances des souches isolées et testées**

Souches	SA	LB	SC	SD	SE	SF
N	33.11	24.08	15.71	15.71	17.63	19.26
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	<b>0.34</b>	<b>0.25</b>	0.16	0.16	0.18	0.20
G (h)	2.89	3.98	6.10	6.10	5.44	4.98

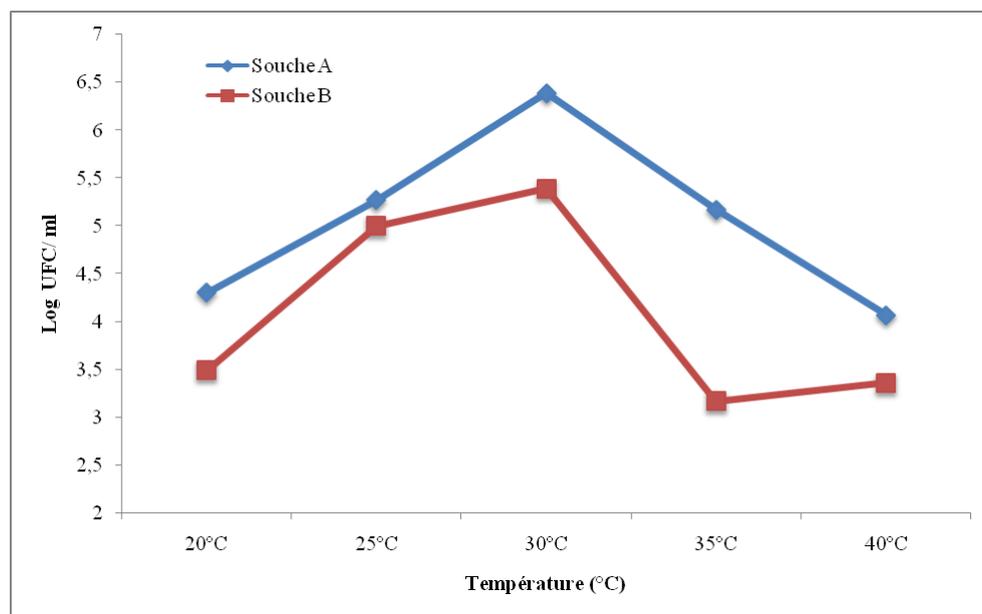
En comparant les résultats des différentes souches, les isolats SA et LB sont les seuls à atteindre un nombre de cellules variant de  $10^{10}$  à  $10^{12}$  UFC/ ml. Avec un taux de croissance élevé, les souches présentent respectivement, les valeurs de  $\mu$  de **0.344** et **0.250 h<sup>-1</sup>**

correspondant à un temps de génération de  $G = 2.898$  et  $3.986$  h. Selon Rodrigo (2005), les isolats de *Pseudomonas* cultivés sur un milieu minéral contenant de l'anthracène comme seule source de carbone ont atteint un taux de croissance allant de  $0.31$  à  $0.32 \text{ h}^{-1}$ .

## IV.6 Etude physiologique

### - Etude de l'optimum de la température et de pH :

Afin d'étudier l'influence de la température sur la croissance des souches testées SA et LB et de déterminer leur température optimale correspondante, différentes valeurs de températures allant de  $20^\circ\text{C}$  à  $40^\circ\text{C}$  avec un intervalle de  $5^\circ\text{C}$  ont été testées. Les résultats obtenus sont représentés par les courbes de la figure 25. Les valeurs des différentes concentrations microbiennes sont données en annexe 5 (tableau 5. II).



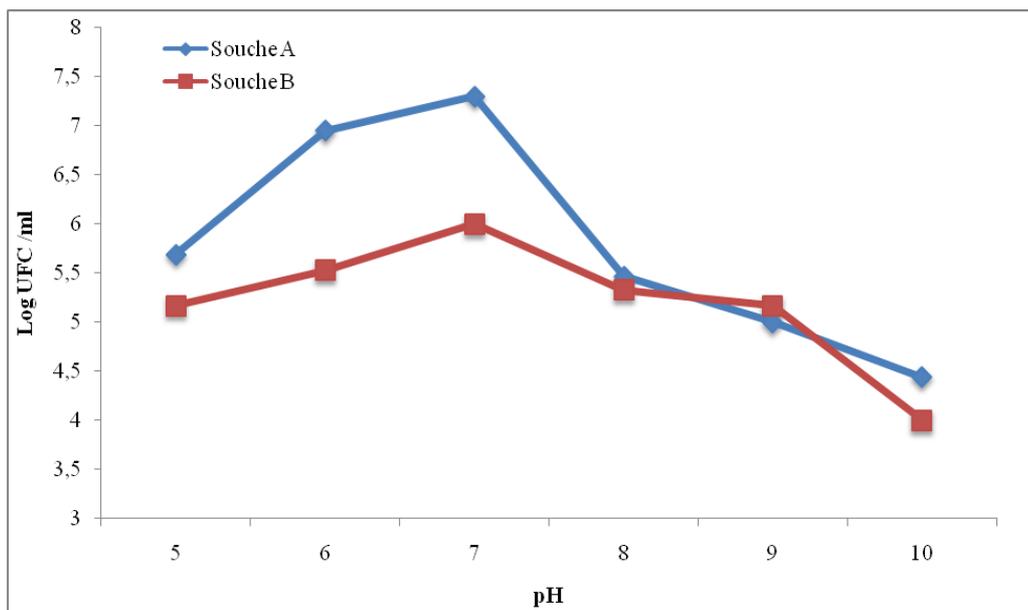
**Figure 25 : Effet de la température sur la croissance des deux souches SA et LB sur milieu BH à différentes température pendant 24 heures d'incubation.**

D'après ces courbes, nous pouvons observer que la souche microbienne LB possède une faible croissance à  $20^\circ\text{C}$ ,  $35^\circ\text{C}$  et  $40^\circ\text{C}$ . Par contre, à  $25^\circ\text{C}$  et  $30^\circ\text{C}$ , nous remarquons une croissance cellulaire importante, avec un seuil optimal obtenu à  $30^\circ\text{C}$ .

Pour la souche bactérienne SA, on note que la croissance cellulaire est fonction de la température. En effet, pour la température allant de  $20^\circ\text{C}$  à  $30^\circ\text{C}$ , nous remarquons que plus

celle-ci augmente, plus la croissance est élevée. Il apparaît que 30 °C représente ici la température optimale pour la souche SA car après ce seuil la croissance de la souche diminue. D'après ces observations, il en ressort que le paramètre température aurait une influence sur les deux souches.

L'effet de la variation du pH sur la croissance des souches SA et LB a été également étudié. Les résultats obtenus sont représentés par la figure 26. Les valeurs de la concentration microbienne sont données en annexe 5 (tableau 5. III).



**Figure 26 : Effet du pH sur la croissance de deux souches SA et LB sur milieu BH additionné de 2 % de gasoil, à différentes valeurs de pH pendant 24 heures d'incubation.**

Pour la souche bactérienne SA, une croissance relativement importante est observée dans un intervalle de pH variant entre 5 et 8, avec un optimum de croissance à pH 7. Cependant, pour la souche LB la croissance semble plus ou moins stable et constante pour un intervalle de pH compris entre 6 et 8, mais avec toutefois, une légère hausse de la croissance au pH 7. Ce dernier semble être le point optimal.

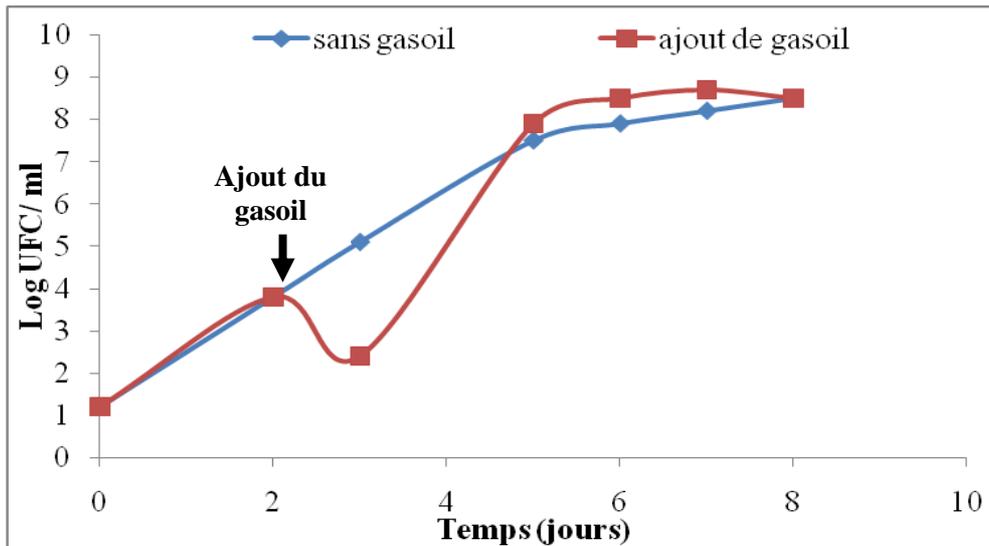
Selon Rodrigo (2005), *Pseudomonas citronellolis* présente une température optimale de croissance située entre 25 et 30°C avec un pH 7, alors que chez *Sphingomonas sp* d'après H.-P.Zhao et al. (2007), l'optimum de croissance est observé à une température de 30 °C et à pH 7. Le même résultat a été signalé par Bauer et Capone (1988).

## IV.7 Essai de biodégradation :

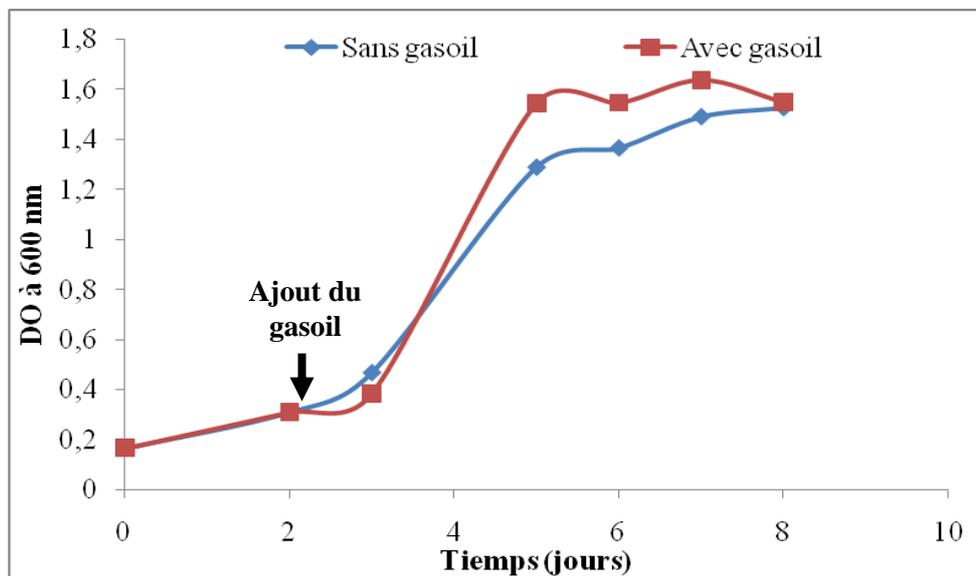
### IV.7.1 Influence du gasoil sur la croissance microbienne

#### a. Ajout de gasoil pendant la phase stationnaire

Le résultat obtenu de l'influence du gasoil sur la croissance des deux souches lorsque l'hydrocarbure est ajouté 48 heures après le début de la fermentation est donné en figures 27 et 28. Les valeurs de la DO mesuré à 600 nm sont données en annexe 5 (tableau 5.IV, 5.V)



a)

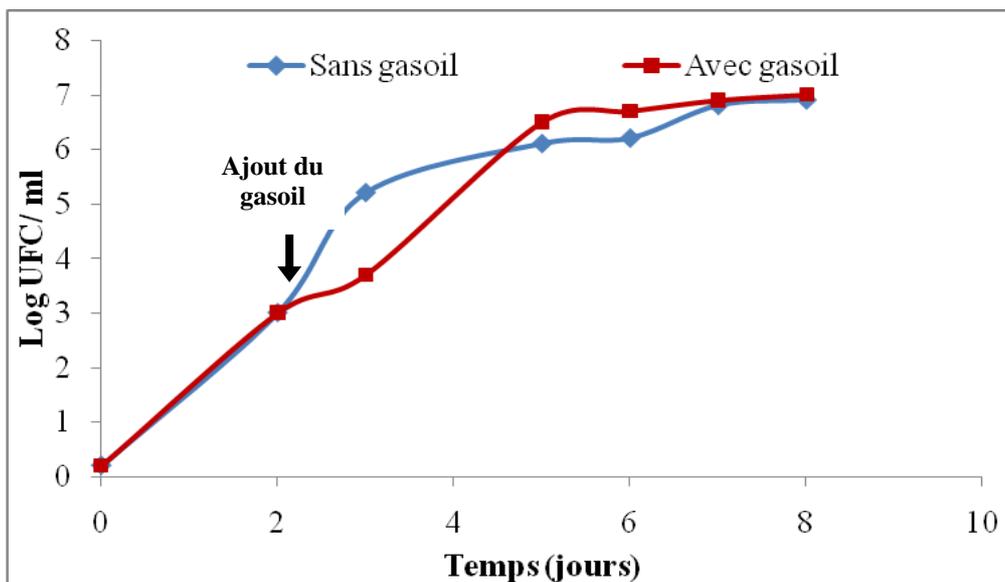


b)

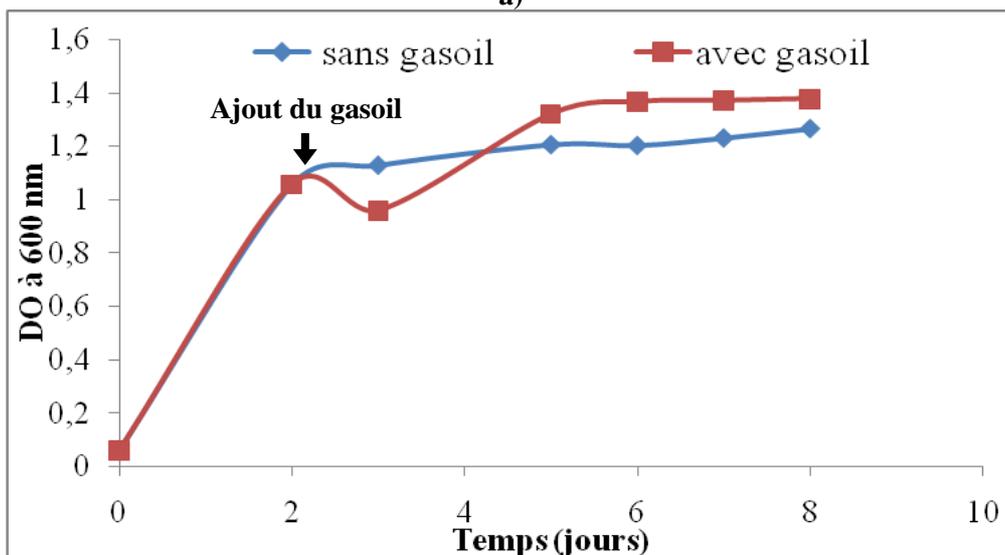
Figure 27 : Croissance de la souche SA dans un milieu BH à 30°C.

a) croissance mesurée par dénombrement, b) croissance mesurée par turbidimétrie. Au temps indiqué par la flèche, du gasoil (1% v/v) est ajouté à l'une des deux cultures.

Le contact direct du gasoil avec les deux souches, peut causer dans un premier temps une diminution pour les deux souches. En ce qui concerne la souche SA (Figure 27 a), pendant les 24 heures après l'ajout de l'hydrocarbure, la viabilité a diminué, passant de  $6.10^3$  ufc/ml à  $2.10^2$  ufc/ml. Par la suite, la concentration de bactéries viables a augmenté pour se maintenir à  $10^7$  ufc/ml, atteignant ainsi un état stationnaire. Comparé au témoin (sans gasoil), l'ajout d'hydrocarbure a causé après huit jours de fermentation, une perte totale de 2 logs. En ce qui concerne le résultat de la croissance obtenu par densité optique (Figure 27 b), il vient appuyer celui de la viabilité. On y retrouve un schéma semblable c'est à dire une diminution de la turbidité quand le gasoil est additionné au milieu.



a)



b)

Figure 28 : Croissance de la souche LB dans un milieu BH à 30°C.

a) croissance mesurée par dénombrement, b) croissance mesurée par turbidimétrie. Au temps indiqué par la flèche, du gasoil (1% v/v) est ajouté à l'une des deux cultures.

Quant à la souche LB (Figure 28 a), l'effet du gasoil est marqué par une diminution de croissance de 1.5 logs avec des valeurs qui diminuent passant de  $10^5$  ufc/ml à  $5.10^3$  ufc/ml. Ensuite, observons une reprise de croissance qui rejoint rapidement la concentration de cellules viables de celle du témoin, soit  $10^7$  ufc/ml atteignant ainsi sa phase stationnaire. D'après la figure 28 b, généralement, l'évolution de la DO suit celle de la viabilité, où l'on observe un arrêt de l'augmentation de la turbidité suivie d'une reprise pour atteindre une valeur de DO égale à 1,3.

D'après l'ensemble de ces observations, il apparaît que les cultures semblent contenir des cellules tolérantes à cet hydrocarbure. En effet, les levures viables reprennent à nouveau leur division 24 heures après l'ajout du gasoil (Figures 27 a et 28 a).

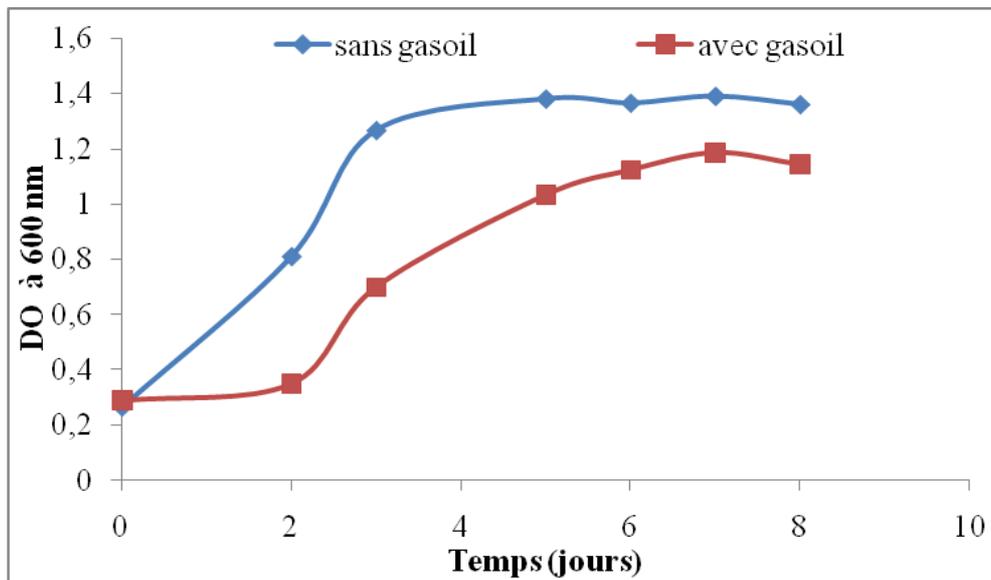
En conséquence, l'augmentation de la turbidité observée peut résulter de la croissance de cellules tolérantes au gasoil déjà présentes dans la population initiale. Aono *et al.* (1994) ont observé une situation semblable en suivant la croissance de la souche *Escherichia coli* K-12 JA 300 dans un milieu contenant de l'hexane. Cependant, avec l'ajout de p-xylène, les cellules ont été immédiatement tuées. Après l'addition du p-xylène, aucune cellule viable n'a été détectée au bout de cinq minutes. On peut donc supposer que cette tolérance dépend de l'état physiologique de chaque souche. En effet, les cellules d'une population donnée présentent des variations au niveau des constituants de leur surface cellulaire ; et cette dernière va dépendre, entre autres, de la composition du milieu de culture (Aono *et al.*, 1994; Ikura *et al.*, 1997). Ce type de population pourrait être enrichi par la présence de solvants organiques et sera maintenue si la pression de sélection se poursuit. Ainsi, des souches présentant une tolérance au gasoil pourrait déjà être présentes avant l'ajout du solvant, et qu'elles auraient été enrichies par la pression de sélection exercée par le gasoil dans le milieu. Quant à savoir si les souches qui présentaient une tolérance au xylène étaient à un stade de croissance différent de celles qui étaient plus sensibles, aucune des études consultées ne nous a permis d'y répondre.

Malgré cette lacune, l'hypothèse de la présence de levures et de bactéries déjà tolérantes au gasoil pourrait bien expliquer le fait que les souches SA et LB étaient en mesure de croître malgré la présence de gasoil qui était directement en contact avec leur membrane cellulaire.

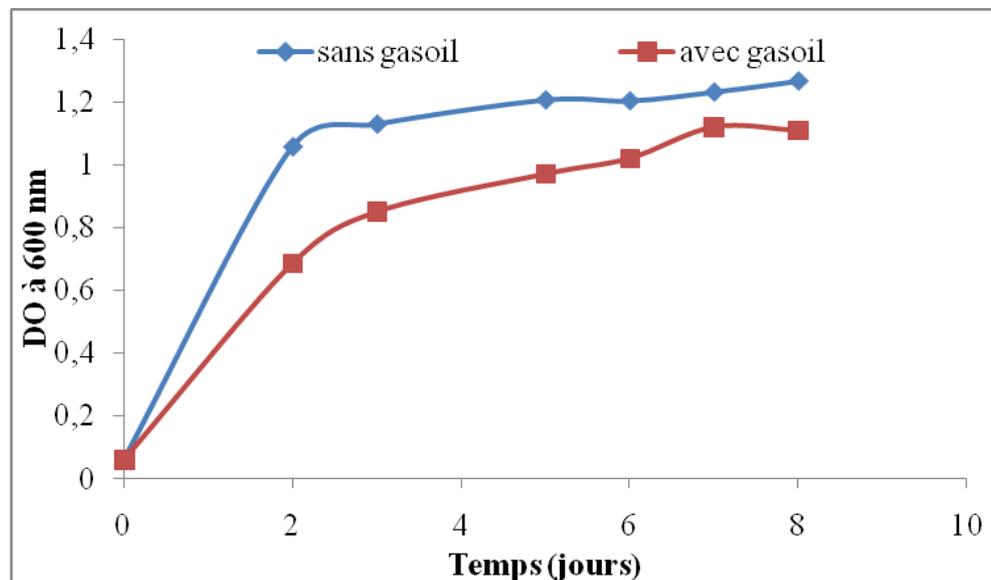
#### ***b. Ajout de gasoil au début de la fermentation***

Les résultats de la mesure de DO à 600 nm de croissance microbienne SA et LB sont donnés en annexe 5 (tableau 5.VI et 5.VII).

Les résultats de l'influence de gasoil au début de la fermentation sont donnés en figures 29 et 30.



**Figure 29 : Croissance de la souche SA dans un milieu contenant du gasoil (25% v/v) dès le début de la fermentation.**



**Figure 30 : Croissance de la souche LB dans un milieu contenant du gasoil (25% v/v) dès le début de la fermentation.**

D'après les résultats, la présence de gasoil dès le début de la fermentation va influencer la croissance des deux souches (Figures 29 et 30). Toutefois, il a été remarqué la mort de cellules dès qu'elles sont mises en contact avec le gasoil, causant ainsi un décalage avec le

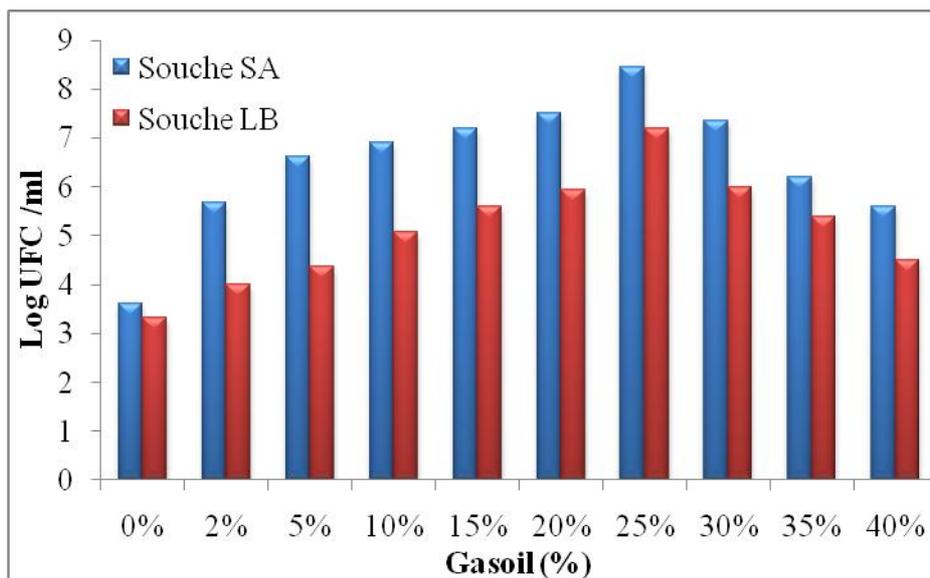
témoin et ceci tout au long de la fermentation. Par exemple, après deux jours, la densité optique pour la souche SA sur gasoil était de 0,3 alors que celle du témoin était de 0.8. Pour la souche LB sur gasoil, la DO était d'environ 0,6 et celle du témoin de 1,0. Autant pour la souche SA (Figure 29) que la souche LB (Figure 30), leur croissance sur les milieux avec gasoil suivent la même tendance que celle du témoin (sans gasoil), mais toujours avec une turbidité inférieure.

La présence de gasoil dès le début de la fermentation a été à l'origine d'un taux de mortalité pour les deux souches. Malgré cette mortalité, il y a eu augmentation de la biomasse. Ce résultat montre que les souches utilisées sont en mesure de croître en présence de gasoil lorsqu'elles sont dans un milieu avec une source de carbone facilement assimilable, cas du glucose. Plusieurs travaux ont montré que certaines souches de *Pseudomonas putida* peuvent croître en présence de plus de 50% (v/v) de toluène quand d'autres sources de carbone et d'énergie sont disponibles pour leur croissance (Inoue et Horikoshi, 1989; Shima *et al.*, 1991; Inoue *et al.*, 1991). De plus, il a été démontré que la présence d'une source de carbone rapidement métabolisable prévient la perte de viabilité de *Flavobacterium sp.* en présence de pentachlorophénol (Topp *et al.*, 1988).

D'un autre côté, Cruden *et al.* (1992) ont suivi la croissance de *P. putida* Idaho avec 20% (v/v) de p-xylène. Ils ont observé que la viabilité cellulaire diminuait quelques heures après que les bactéries soient entrées en phase stationnaire. Des résultats similaires ont été publiés sur la croissance de *Pseudomonas oleovorans* en présence de l'octane (De Smet *et al.*, 1983). Enfin, un déclin rapide de la viabilité de *P. putida* S-12 après que la croissance maximale soit atteinte a été remarqué par Weber *et al.* (1993). Contrairement à ces études, la phase stationnaire des souches SA et LB s'étendait sur plusieurs jours et aucune diminution significative de la viabilité n'a été observée (Figures 27 à 30). Ikura *et al.* (1997) ont observé une diminution de la viabilité de deux souches de *P. mendocina* en présence de 1% de styrène mais dans ce cas-ci, la diminution fut graduelle et elle s'étendait sur plusieurs jours. Ce résultat aurait probablement été obtenu dès que la source de carbone aurait été épuisée.

#### ***IV.7.2 Tolérance des souches SA et LB au gasoil***

La tolérance au gasoil des souches SA et LB dans un milieu liquide est représentée par la figure 31 et les valeurs de la concentration microbienne en fonction de pourcentage de gasoil sont données en annexe 5 (tableau 5.VIII).



**Figure 31 : Effet de la concentration du gasoil sur la croissance cellulaire des souches SA et LB sur milieu Minérale BH en présence de différentes concentrations de gasoil pendant 24h d'incubation**

Des concentrations de gasoil variant de 0 à 40% (v/v) ont été testées. D'abord pour la souche SA, la viabilité initiale était de  $10^2$  ufc/ml. Après 24 heures d'incubation, la viabilité du témoin (sans gasoil) était de  $10^5$  ufc/ml alors que l'on observe une augmentation importante de 6, 7 et 8.5 logs correspondant respectivement à des concentrations de gasoil de 5, 15 et 25% (v/v). Au-delà de 25% (v/v), on note une mortalité cellulaire. Quant à la souche LB, la viabilité initiale était de  $10^2$  ufc/ml et après 24 heures, le témoin avait une concentration de  $2 \times 10^3$  ufc/ml. Une mortalité comparable à celle de la souche SA, a été obtenue au-delà de la concentration de 25 % de gasoil.

Les auteurs Fukumaki *et al.* (1994) ont alors proposé que les souches qui ont la même concentration de cellules viables avec et sans solvant, soient considérées tolérantes à ce solvant. En se basant sur cette affirmation, nous constatons que les deux souches SA et LB sont tolérantes au gasoil (Figure 31). Ce qui conforte les résultats obtenus de l'étude de l'influence du gasoil sur la croissance des souches SA et LB (Figures 27 à 30) démontrant une tolérance au gasoil.

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,

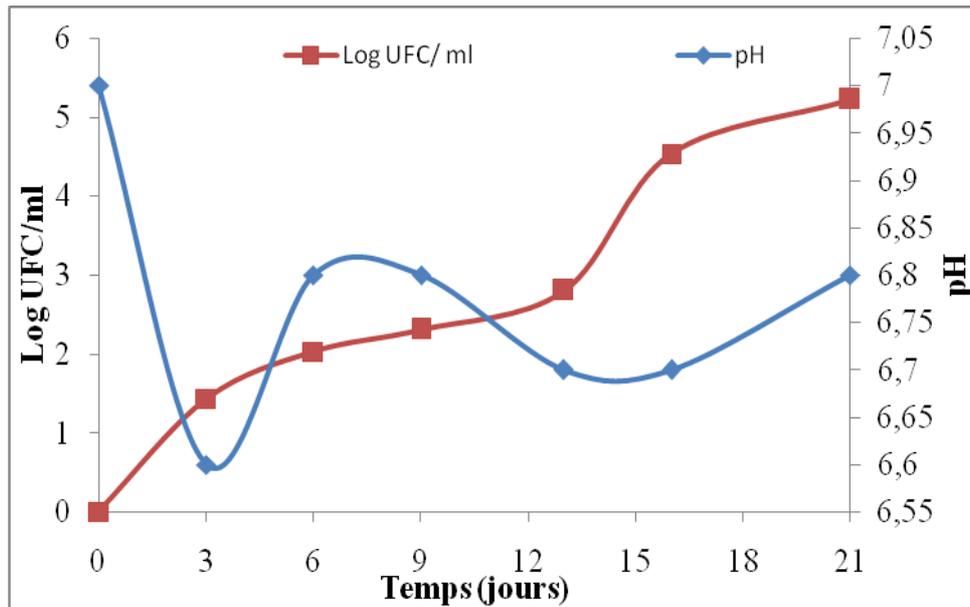
puisque la membrane cellulaire est la principale cible des effets toxiques des solvants, les changements dans sa composition ont été déterminés comme les premiers à jouer un rôle crucial dans le phénomène de tolérance. En effet, des changements ont été observés au niveau des lipides et des protéines permettant de rétablir la stabilité et la fluidité de la membrane cytoplasmique quand celle-ci est perturbée par le solvant. Isken et de Bont (1998) ont mentionné également que la dynamique de biosynthèse des composés membranaires peut jouer un rôle important dans la tolérance aux solvants. Pinkart et White (1997) ont démontré que la synthèse des phospholipides chez *Pseudomonas putida* est augmentée après un contact au xylène.

#### ***IV.7.3 Biodégradation du gasoil***

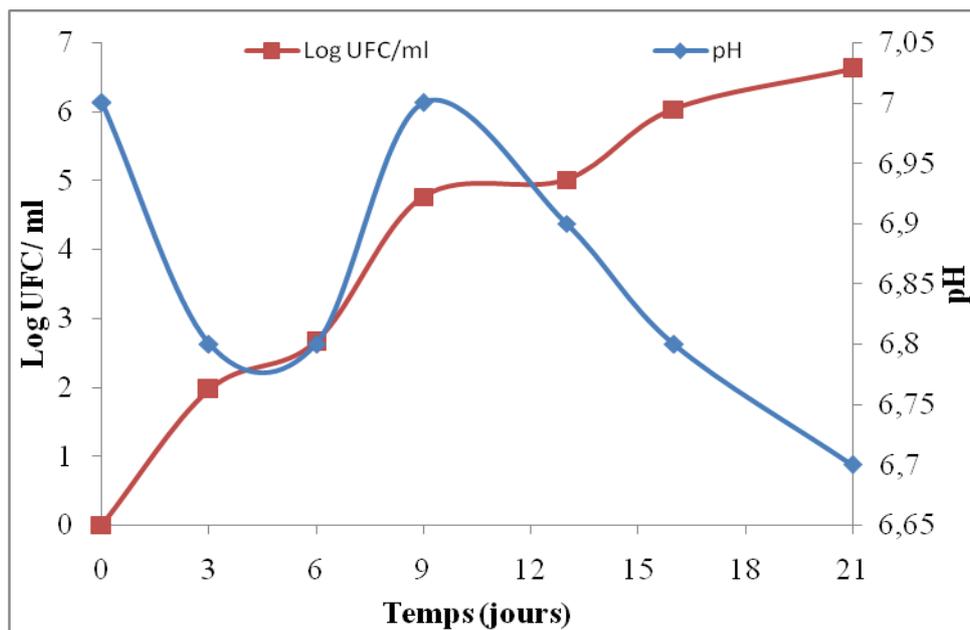
Afin de mieux comprendre les phénomènes qui accompagnent la biodégradation du gasoil et le comportement des microorganismes concernés, nous avons suivie l'évolution de certains paramètres comme la concentration microbienne, le pH, la tension superficielle, l'Index d'émulsification ( $E_{24}$ ) et enfin le taux de biodégradation.

##### **a. Evolution de la concentration microbienne :**

Les résultats de la variation de cinétique de croissance et du pH en fonction du temps pour les deux souches sont donnés en annexes 5 (tableau 5.IX et X) et sont représenté en figures 32 et 33.



**Figure 32: Variations de la cinétique de croissance (croissance sur milieu BH à 30°C pendant 21 jours d'incubation de la souche SA) et du pH en fonction de temps**



**Figure 33: Variations de la cinétique de croissance (croissance sur milieu BH à 30°C pendant 21 jours d'incubation de la souche LB) et du pH en fonction de temps**

D'après les figures 32 et 33, nous observons une augmentation de la concentration microbienne pour les deux souches SA et LB. La souche SA (Figure 32) montre une cinétique de croissance très lente pendant les 12 premiers jours, suivit d'une accélération importante qui se poursuit jusqu'à atteindre un taux maximal vers la fin du traitement (5.22 logs). L'auteur,

Espirito-Santo (2002) en utilisant le milieu BH additionné de 5% (v/v) de diesel comme seule source de carbone et d'énergie, inoculé avec  $10^7$  UFC/ml de bactéries, observa après 8 jours d'expérience une concentration bactérienne maximale de  $10^8$  UFC/ml avec une diminution notable (valeur obtenue de  $10^5$  UFC/ml) au bout du 20<sup>ème</sup> jour de traitement.

L'observation de la figure 33 montre, en revanche que la croissance de la souche LB débute assez rapidement comparée à celle de la souche SA, avec une concentration de  $9.3 \cdot 10^4$  UFC/ml qui évolue pour atteindre après 9 jours d'expérience une valeur de  $10^5$ . Toutefois la croissance reste stable pendant 3 jours, puis elle reprend pour atteindre jusqu'à la fin du traitement, une valeur significative variant de  $1.2 \cdot 10^5$  à  $4.16 \cdot 10^6$  UFC/ml.

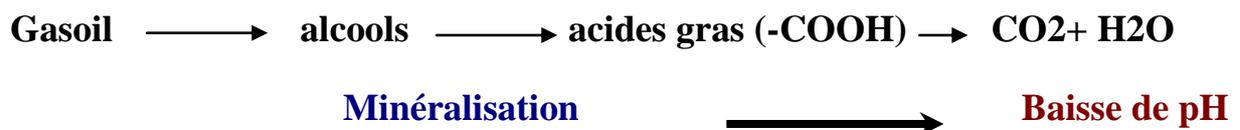
Cette cinétique de croissance que nous avons obtenue se divise en 2 phases séparées par une phase d'adaptation. Plusieurs auteurs ont suggéré certaines explications ; où Miranda et *al* (2007) supposent que pour la croissance de *Rhodotorula aurantiaca*, les constituants du gasoil sont consommés dans la 1<sup>ère</sup> phase et probablement pas dans la 2<sup>ème</sup> phase de croissance. D'après Calvo et *al.* (2004), cette croissance pourrait être expliquée par la présence de substances comme les biosurfactants qui faciliteraient l'assimilation des hydrocarbures (gasoil). Ces résultats confirment les travaux obtenus par Pepi et *al.* (2005) qui ont identifié un nouveau biosurfactant de nature glycolipidique, produit par la bactérie *Halomonas sp.* ANT-3b développée sur un milieu contenant le n-hexadécane comme seule source de carbone.

#### **b. Evolution du pH :**

L'évolution du pH en fonction du temps est représentée par les figures 32 et 33. Au temps initial de la biodégradation du gasoil, le pH était de 7. Pour les deux souches SA et LB la courbe de pH évolue en fonction du temps. Durant les 3 premiers jours de l'expérience, le pH de la souche SA (Figure 32) diminue à la valeur de 6.6, puis se stabilise à des valeurs proches de la neutralité (pH 6.8). En revanche, le pH de la souche LB reste stable pendant les 6 premiers jours (pH 6.8), stabilité qui sera suivie d'une légère diminution (pH de 6.7 au 21<sup>ème</sup> jour). Selon Ballerini (1999), le pH du milieu peut affecter l'activité microbienne. La plupart des bactéries sont capables de se développer dans un intervalle de pH allant de 5 à 9, avec un optimum se situant aux alentours de 7. En résumé, les valeurs de pH que nous avons relevé restent bien incluses dans cet intervalle donné.

Margesin et Schinner (2001) en réalisant une étude sur 22 premiers jours ont observé qu'il y avait une diminution significative du pH dans les sols fertilisés. Cette baisse de pH tendant vers la neutralité indiquerait la présence d'une activité microbienne accrue dans les sols traités par rapport au témoin. La raison étant certainement due aux différentes réactions biochimiques qui entraînent l'assimilation des composés du gasoil d'un côté, avec synthèse des acides gras porteurs de groupements « COOH » d'un autre côté, causant ainsi leur acidité. Ces groupements représentent des métabolites intermédiaires de la biodégradation des hydrocarbures avant la minéralisation complète par les microorganismes.

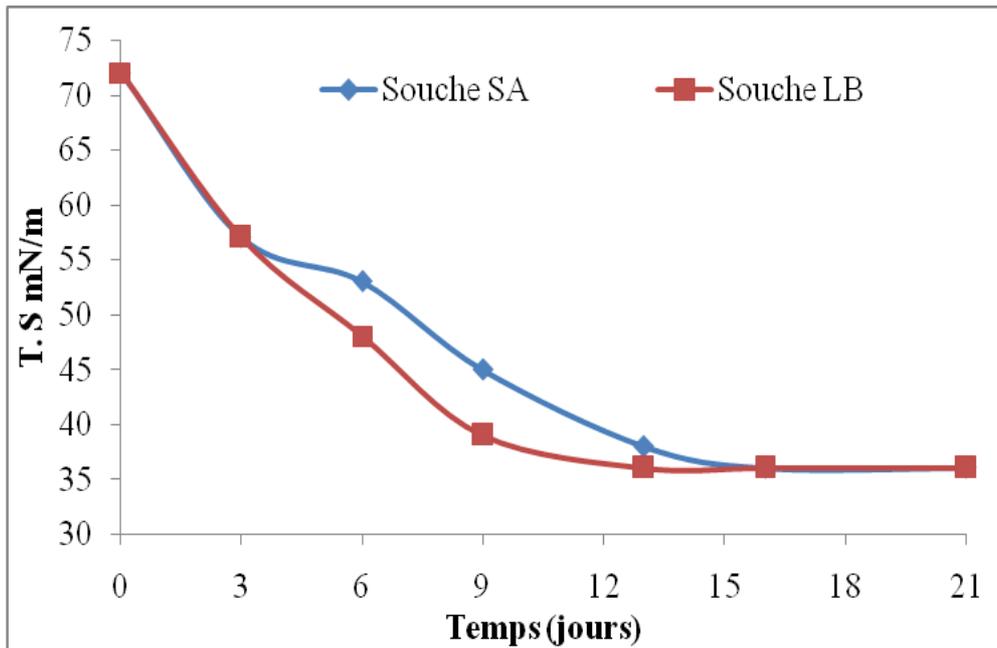
L'oxydation des n-alcanes en acides gras a été signalée par Whyte et *al* (1998), Abed et *al* (2002), van Beilen et *al* (2003), Leahy et Colwell (1990). En effet, il a été observé que durant la dégradation, par exemple, du xylène (Labrecque, 2003) et de l'antracène (Wong et *al.*, 2002), il y a production d'acides intermédiaires qui acidifient ainsi le milieu. Le schéma ci-dessous récapitule le phénomène d'acidification :



### c. Evolution de la tension superficielle:

Le résultat de la variation de la tension superficielle en fonction du temps pour les deux souches sont donnés en annexe 5 (tableau 5.XI).

La tension superficielle est la force nécessaire pour rompre la surface entre deux liquides immiscibles (Neindre, 1993). Les résultats obtenus sont représentés par les courbes illustrées dans la figure 34.



**Figure 34: Variation de la tension superficielle en fonction du temps (Croissance des deux souches SA et LB sur milieu BH à 30°C pendant 21 jours d'incubation).**

D'après l'allure des courbes de la variation de la tension superficielle au cours du temps pour les souches SA et LB, nous remarquons qu'aux premiers jours de fermentation la tension superficielle est relativement élevée (valeur  $\geq 55$ ) comparée à celle de l'eau qui est de 72 mN/m. Au bout du 6<sup>ème</sup> jour, nous observons que pour les souches SA et LB, les valeurs décroissent jusqu'à atteindre les 36 mN/m. Ce résultat nous permet de suggérer qu'il y a production de biomolécules spécifiques ayant des propriétés tensio-actives ; comme les biosurfactants connus pour entraîner l'abaissement de la tension superficielle (Tabatabaee et *al.*, 2005).

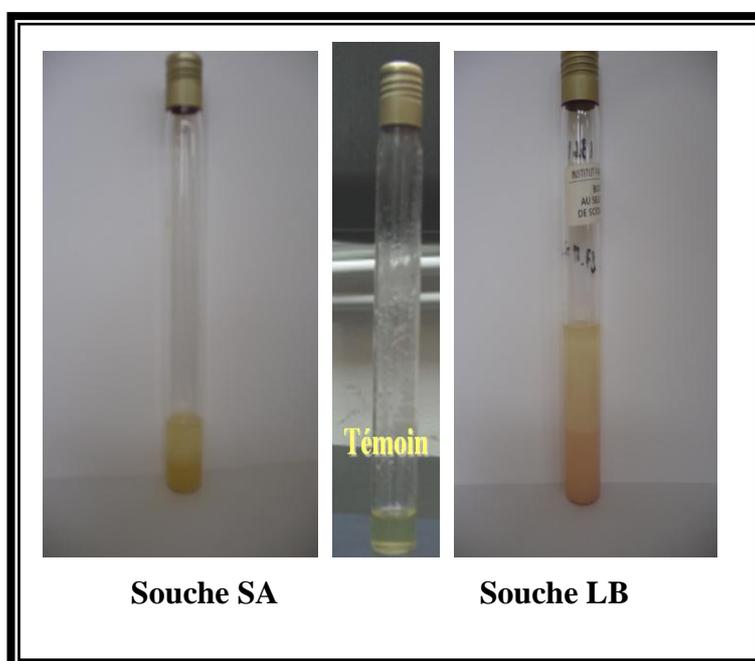
Les mêmes résultats ont été obtenus par Banat et *al.* (1991) qui ont pu isoler plusieurs bactéries ayant la capacité de réduire la tension superficielle du milieu de culture à des valeurs inférieures à 40 mN/m. Par ailleurs, la lichenysine A (lipopeptide) produite par *Bacillus licheniformis* BAS50 réduit la tension superficielle de l'eau de 72 mN/m jusqu'à 28 mN/m. En outre, le rhamnolipide (glycoprotéine) produit par *Pseudomonas aeruginosa* et la surfactine (lipoprotéine) produite par *Bacillus subtilis* ont la capacité de réduire la tension superficielle de l'eau de 72 mN/m à 30 mN/m. Une autre espèce, *P.citronellolis* réduit également la tension superficielle du milieu de culture jusqu'à 36 mN/m (Eder et *al.*, 2007).

#### **d. Index d'émulsification ( $E_{24}$ ) :**

Afin de confirmer et d'estimer la production des biosurfactants par les souches SA et LB, nous avons réalisé le test d'émulsification ( $E_{24}$ ) qui consiste à homogénéiser 3ml de mout de fermentation au 21<sup>ème</sup> jour, avec 3ml de gasoil.

D'après les résultats obtenus, il en ressort que les deux souches SA et LB produisent des biosurfactants avec un index d'émulsification, respectivement de 33,33 % et de 37,5 % (**Figure 35**). Ces observations montrent que les souches que nous avons isolées présentent un intérêt industriel certain et important grâce à leur production de ces composés à activité émulsifiante.

D'après la littérature, *Flavobacterium sp.* produit des flavolipides qui présentent un rôle dans la bioremédiation et la formation des biofilms (Bodour et *al.*, 2004). De même, des glycolipides élaborés par la bactérie psychrophile *Halomonas sp.* ont un intérêt biotechnologique environnemental certain, par la remédiation des sols pollués par les hydrocarbures à de basses températures (15°C) (Pepi et *al.*, 2005). *Halomonas ventosa* et *Halomonas anticariensis* peuvent également former des biofilms grâce à la production des exo-polysaccharides à activité émulsifiante (Mata et *al.*, 2006).



**Figure 35 : Résultats de l'index d'émulsification pour les deux souches SA et LB**

#### **e. Evolution du taux de biodégradation du gasoil :**

Le gasoil est un mélange complexe d'environ 2000 à 4000 hydrocarbures (Marchal et *al.*, 2003), qu'on ne peut pas séparer totalement par chromatographie. En fait, seuls les n-alcane et quelques hydrocarbures ramifiés peuvent être identifiés en tant que composés séparés.

Nous avons pu suivre une fraction du gasoil qui contient 21 hydrocarbures dont 16 sont identifiables et appartenant à la famille des n-alcane (C10 – C25).

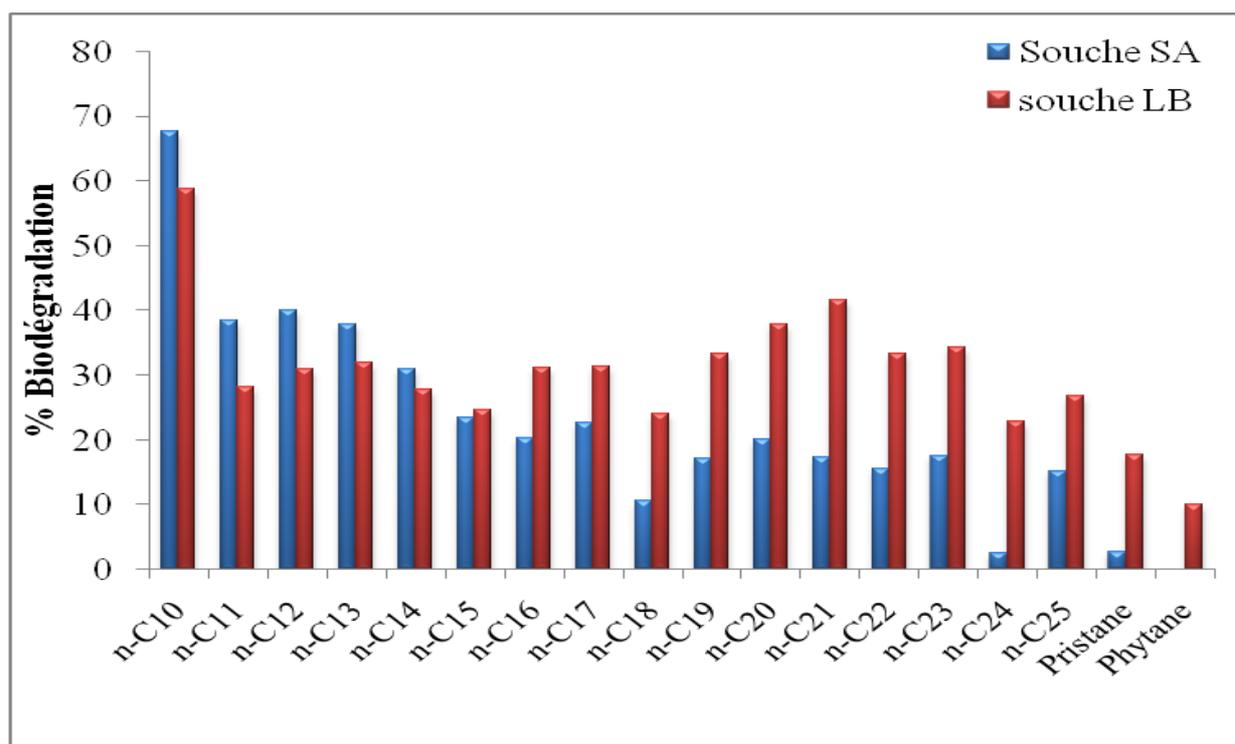
Concernant la dégradation du gasoil, le problème majeur est la complexité d'analyse qui est due au nombre élevé de ses composés. Le suivi de la concentration des hydrocarbures durant la période d'essai a été réalisé par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Le spectre du gasoil analysé est représenté en annexe 6. Il nous a permis d'identifier les alcane situés entre C10 – C25. Les pourcentages de biodégradation du gasoil sont donnés en annexe 5 (tableau 5.XII).

L'évolution du taux de biodégradation du gasoil par les souches SA et LB a été uniquement estimé à la fin de l'expérience (au bout du 21<sup>ème</sup> jours), car d'après les auteurs Eriksson et *al* (2001), le taux d'élimination le plus élevé des TPH est obtenu au 21<sup>ème</sup> jour de traitement. Alors que Namkoong et *al* (2002) ont observé une rapide élimination des TPH dans la première quinzaine de traitement.

En effet, les hydrocarbures les plus simples pourraient être dégradés pendant la première phase. Quant à nos résultats, ils sont donnés en % de dégradation en fonction des n-alcane présents dans le gasoil (figure 36).

D'après l'histogramme (Figure 36), la souche SA montre une activité de biodégradation des n-alcane de C<sub>10</sub>-C<sub>25</sub>, relativement importante avec un pourcentage de dégradation le plus élevé pour les n-C10 (≈68%) et presque de moitié pour les n-C11, n-C12, n-C13, n-C14 avec respectivement, des valeurs (%) de 38.53, 40.05, 37.89, 30.97. Alors que pour les n-alcane allant de C<sub>15</sub> à C<sub>25</sub>, ils sont très faiblement dégradés, avec un pourcentage de dégradation nulle (0) pour le phytane.



**Figure 36: Le pourcentage de biodégradation du gasoil après 21 jours d'incubation des deux souches SA et LB sur milieu BH à 30°C**

En revanche, la souche LB dégrade partiellement les n-alcanes, pristane et phytane avec un maximum de dégradation obtenu pour les n-C10, n-C19, n-C21, n-C23 avec des valeurs respectives de 58.77, 37.9, 41.62, et 34.39 (%).

Labrecque (2003) et Van Beilen et *al* (2003) ont évoqué la capacité des levures à dégrader les hydrocarbures. Miranda et *al* (2007) démontre que *Candida ernobii* dégrade complètement le tétradécane, 5 méthyl-octane, octadécane et le décane (60.8%) ; et partiellement le *nonane* (21.4%). Ceci, contrairement à *Rhodotorula aurantiaca* qui présente un pourcentage de dégradation très élevé pour le *decane* de 93%, de 38.4% pour le *nonane* et 22.9% pour le *dodecane*.

Richard et Vogel (1999) en cultivant des souches bactériennes et en utilisant le gasoil comme seul source de carbone et d'énergie, rapportent que le taux de biodégradation atteint après 50 jours d'incubation est de 90%, alors que Gouda et *al*. (2007) en utilisant *Gordonia sp.* en présence du kérosène obtiennent un taux de biodégradation de 95%. D'autres auteurs (Suparna et *al*. 2004) ont testés la biodégradation du diesel avec une population bactérienne isolée des sédiments marins, sous les conditions aérobies, ont constaté après 8 jours

d'incubation, un taux de disparition de fuel de 39% avec une perte de 80% des constituants aliphatiques.

*Dietzia sp.* Groupe E9-2 (BAH 11) dégrade les n-alcane, isoalcane, les isoprenoides, pristane et phytane (Chaillan et al., 2004). L'espèce de bactérie *D. maris* est capable de croître sur un milieu à C6, C17, C19 et C23 n-alcane (Rainey et al., 1995), alors que *D. psychrocaliphila* utilise les n-alcane C13, C15, C16, C20, C24 et pristane mais pas le C10 et le C32 (Yumoto et al., 2002).

Irene von der Weid et al. (2007) ont montré que l'espèce *Dietzia cinnamea* est capable de dégrader les n-alcane de C11-C36, pristane et phytane avec respectivement, un taux de biodégradation de 45.41 et 41.53%.

Les hydrocarbures complexes ne sont donc efficacement éliminés qu'après dégradation des hydrocarbures simples. Marchal et al. (2003) ont signalé que la dégradation du gasoil est un processus restant inachevé. Cependant, il est clair que la résistance partielle à la biodégradation est expliquée par la qualité intrinsèque du pétrole complexe.

Par ailleurs, plusieurs travaux traitent de la priorité de la biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes, citons: Whyte et al. (1998), signale que les alcane à courtes chaînes sont dégradés plus aisément que les alcane à chaînes longues et Mohn et Stewart (2000), indiquent que les hydrocarbures branchés sont récalcitrants par rapport aux hydrocarbures linéaires dans une culture microbienne mixte.

Selon Marchal et al. (2003), expliquent qu'en particulier, le taux de dégradation peut être proche de 100 % lorsque les alcane linéaires sont abondants. D'autre part Eriksson et al. (2001), Namkoong et al. (2002), considèrent que le déclin des HAP du gasoil dépend du déclin des n alcane.

Das et Mukherjee (2007) signale que les n-alcane sont préférentiellement dégradé par rapport au TPH présent dans le pétrole brut. Et finalement, d'après Borresen et al. (2003), les alcane ayant des chaînes plus longues que C18 représentent les fractions récalcitrantes du diesel. Il est probable qu'à la fin des essais ce sont les constituants récalcitrants du diesel (alcane branchés et les aromatiques) qui restent.

# *Conclusion*

## Conclusion et perspectives

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 source de pollution lors des rejets dans la nature sous formes associées aux déblais de forage.

Des études d'impact sur l'environnement ont révélé les effets perturbateurs de cette source de pollution sur les milieux récepteurs. Des informations sur leurs propriétés et surtout sur la biodégradation de ces hydrocarbures sont nécessaires pour le choix et l'application d'un traitement efficace ou pour le contrôle de l'atténuation naturelle (Gallego et *al.*, 2001 ; Salanitro, 2001).

L'objectif fixé de notre travail de magister est de contribuer à la biodégradation du gasoil à l'aide de microorganismes isolés à partir de sol de borbier susceptibles de le dégrader. Pour se faire trois borbiers différents par leur âge et emplacement ou localisation ont été retenus dans notre étude.

Afin de mener à bien nos travaux, nous avons réalisé une étude préliminaire concernant d'une part, la caractérisation physico-chimique et microbiologique du sol pollué et d'autre part, la sélection d'isolats dégradants le gasoil, en appréhendant l'influence et la tolérance du gasoil sur la croissance microbienne. Et enfin, nous avons mesuré la capacité de ces microorganismes à dégrader le gasoil. L'ensemble des résultats que nous avons obtenus se résume ainsi:

- La comparaison du résultat obtenu avec le chromatogramme de l'échantillon de gasoil brut montre que **le gasoil** est le polluant majoritaire du borbier.
- La biodégradabilité aérobie du gasoil et de l'ordre de **29.65%**. Ce résultat nous a permis de constater qu'il est constitué de différentes familles difficilement assimilables par les microorganismes.
- Dans l'objectif d'isoler les souches bactériennes susceptibles de dégrader le gasoil, le **bourbier B** a été choisi, vu l'importance de sa microflore et de sa charge organique.
- Les résultats d'isolement bactérien de borbier B, nous a permis d'isoler **5 souches bactériennes et une levure**.

- En se basant sur le calcul des paramètres de cinétique, la souche A (bactérie) et souche B (levure) présentent un taux de croissance élevé qui est respectivement de  $\mu = 0.344$  et  $0.250 \text{ h}^{-1}$ .
- En se basant sur leurs caractères microscopiques, macroscopiques, biochimiques et physiologiques, nous avons pu rapprocher la souche bactérienne A au genre *Pseudomonas luteola* (Anzai,1997 ; Ghosh,2000 ; Laurent,2000), et la souche levurienne B au genre *Rhodotorula sp.* (Lodder, 1970 ; Kreger-VanRij, 1984 et Barnett et al., 1990).
- L'étude de l'influence du pH et de la température a montré une influence notable sur la croissance, avec des optimum de **7** pour le **pH** et **30°C** pour la **T°**.
- Le travail a été complété par l'étude de deux types d'isolats choisis; une bactérie et une levure. L'élément majeur qui ressort de ces expériences est que les deux souches sont en mesure de croître en présence de gasoil, même si la concentration de celui-ci atteint **40% (v/v)**.
- Le suivi de l'évolution de la tension superficielle des deux souches montre qu'elles ont la capacité de réduire la tension superficielle du milieu de culture jusqu'à atteindre les **36mN/m**. Ce résultat nous permet de suggérer qu'il y a production de biomolécules spécifiques ayant des propriétés tension-actives.
- Il en ressort que les deux souches A et B produisent en effet des biosurfactants avec un index d'émulsification de **33,33 %** et de **37,5 %** pour la souche A et B respectivement.
- Par contre, même si les souches sont tolérantes au gasoil, la capacité de celles-ci à dégrader le gasoil avec les **n-C10, n-C11, n-C12, n-C13, n-C14** est de respectivement 67.68, 38.53, 40.05, 37.89, 30.97 % pour la souche A, alors que pour la souche B avec les **n-C10, n-C19, n-C21, n-C23**, les valeurs obtenues sont respectivement de 58.77, 37.9, 41.62, 34.39 %.

Les différents constituants du gasoil sont intrinsèquement biodégradables, mais à des degrés variables, ceci en raison de leur hydrophobicité et du fait qu'ils sont visqueux ou bien solides à la température ambiante. Il ne s'agit pas là d'un échec mais plutôt d'une preuve que la dégradation de composés organiques toxiques par des microorganismes est loin d'être évidente, sachant que la dégradation des hydrocarbures est dépendante de différents facteurs comme la température, les teneur en eau et en oxygène, le pH, la présence de nutriments inorganiques et la versatilité métabolique microbienne.

En perspective, il serait souhaitable de compléter cette étude par une approche plus approfondie, à savoir :

1. L'optimisation des paramètres de traitement (ajout de surfactant, enrichissement par nutriments comme azote, phosphore... ;
2. Une analyse qualitative de la dégradation du gasoil qui permettrait de mieux comprendre le mécanisme microbien impliqué dans notre étude.
3. Par ailleurs, une approche moléculaire par le séquençage de ARN 16S pour les bactéries et ARN 18S pour les levures, aiderait à déterminer de façon précise l'affiliation des espèces microbiennes isolées à partir de nos différents échantillons de boues.
4. Exploiter le potentiel de production de biopolymères à activité émulsifiante pour la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures.

*Références  
bibliographiques*

# Bibliographie

1. **Abed R. M. M., N. M. D. Safi, J. Köster, D. de Beer, Y. El-Nahhal, J. Rullkötter, & F. Garcia-Pichel**, 2002. Microbial Diversity of a Heavily Polluted Microbial Mat and Its Community Changes following Degradation of Petroleum Compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**(4) :1674 – 1683.
2. **ABU-Ruwaida A.S., M. Banat, A. Haditirto, S. Salem et A. Kadri**, 1991. Isolation of biosurfactant producing bacteria product characterization and evaluation. *Acta Biotech*, **11**(4): 315-24.
3. **AFNOR norme T 90- 114**, 1979. Essais des eaux : Dosage des hydrocarbures totaux (Méthodes par spectrophotométrie Infra- Rouge). *AFNOR*, pp. 483- 442.
4. **Alexander R. R., J. Tang, & M. Alexander**, 2002. Ecological Risk Assessment: Genotoxicity is Unrelated to Total Concentration of Priority Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils Undergoing Biological Treatment. *J. ENVIRON. QUAL.*, **31** : 150–154.
5. **Annweiler E., H. H. Richnow, G. Antranikian, S. Hebenbrock, C. Garms, S. Franke, W. Francke and W. Michaelis**, 2000. Naphthalene Degradation and Incorporation of Naphthalene – Derived Carbon into Biomass by the Thermophile *Bacillus Thermoleovorans*. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(2): 518 – 523.
6. **Anzai, Y., Y. Kudo and H. Oyaizu**, 1997. The phylogeny of the genera *Chryseomonas*, *Flavimonas*, and *Pseudomonas* supports synonymy of these three genera. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **25** : 249-251.
7. **Aono R., H. Kobayashi, K.N. Joblin et K. Horikoshi**, 1994. Effects of organic solvents on growth of *Escherichia coli* K-12. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**: 2009-2014.
8. **Atlas R. M. et R. Bartha**, 1993. Microbial ecology- Fundamentals and applications. 3ème éd. *Benjamin Cummings, Redwood City*.
9. **Baldwin B. R., C. H. Nakatsu and L. Nies**, 2003. Detection and Enumeration of Aromatic Oxygenase Genes by Multiplex and Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **69** (6):3350 – 3358.

10. **Ballerini D. et J. P. Vandecasteele**, 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.
11. **Ballerini D.**, 1999. Traitements biologiques des sols. *Technique de l'ingénieur*, traité Environnement, G2 620, pp. 1- 6.
12. **Banat I., N. Samarah, M. Murad, R. Horne, and S. Benerjee**, 1991. Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 80–84.
13. **Barkay T., S. Navon-Venezia, E. Z. Ron, and E. Rosenberg**, 1999. Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, pp. 2697–2702.
14. **Barnett J.A., R.W. Paine, D. Yarrow, 1990.** Yeasts: Characteristics and Identification. *University Press*, Cambridge.
15. **Bastiaens L., D. Springael, P. Wattiau, H. Harms, R. D. Wachter, H. Verachtert, and L. Diels**, 2000. Isolation of Adherent Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH)-Degrading Bacteria Using PAH- Sorbing Carriers. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(5) :1834 – 1843.
16. **Bauer J.E. et Capone D.G., 1988.** Effects of co-occurring aromatic hydrocarbons on degradation of individual polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediment slurries. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1649-1655.
17. **Bergey R.**, 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology. 9<sup>eme</sup> edition*, p. 964.
18. **Binet P., Portal J.M. et C. Leyval**, 2000. Dissipation of 3-6 ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass. *Soil Biology & Biochemistry*, **32** : 2011-2017.
19. **Bodour A., Drees K. P., & R. M. Maier**, 2003. Distribution of Biosurfactant – Producing Bacteria in Undisturbed and Contaminated Arid Southwestern Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, **69** (6) : 3280 – 3287.
20. **Bodour A.A, C. Gerrero-Barajas et M. Maier**, 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.
21. **Bogan B. W. et W. R. Sullivan**, 2003. Physicochemical soil parameters affecting sequestration and mycobacterial biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Chemosphere*, **52**, pp. 1717 – 1726.

22. **Boldrin B., Tiehm A., and C. Fritzsche**, 1993. Degradation of Phenanthrene, Fluorene, Fluoranthene, and Pyrene by a *Mycobacterium* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, **59** (6) :1927 – 1930.
23. **Boonchan S., Britz M. L., and G. A. Stanley**, 2000. Degradation and Mineralization of High- Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Defined Fungal-Bacterial Cocultures *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (3) : 1007 – 1019.
24. **Bordas F. et P. Lafrance**, 2001. Utilisation de biosurfactants (rhamnolipides) pour le traitement d'un sol sableux contaminé par le pyrène – Essais en colonne de sol. *Etude et gestion des sols*, **8** (3) : 181-188.
25. **Bouchez M.**, 1995. La biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques : métabolisme du substrats non conventionnels. Thèse de doctorat de l'école nationale supérieure des industries agro-alimentaires, p. 245.
26. **Calvo C., F.L. Toledo, C. Pozo, M.V. Martinez-Toledo et J. Gonzalez-Lopez**, 2004. Biotechnology of bioemulifiers produced by microorganisms. *J. of Food, Agriculture et Environment*. **2** :238-243.
27. **Canet R., J. G. Birnstingl, D. G. Malcolm, J. M. Lopez-Real and A. J. Beck**, 2001. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microflora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar contaminated soil. *Bioresource Technology*, **76**, pp. 113 – 117.
28. **Chablain P. A., A. L. Zgoda, C.O. Sarde and Truffaut N.**, 2001. Genetic and Molecular Organization of the Alkylbenzene Catabolism Operon in the Psychrotrophic Strain *Pseudomonas putida* 01G3. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(1) : 453 – 458.
29. **Chaerun, S.K., Tazaki, K.**, 2005. How kaolinite plays an essential role in remediating oil-polluted seawater. *Clay Miner.*, **40**, 481-491.
30. **Chang B. V., L. C. Shiung and S. Y. Yuan**, 2001. Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil. *Chemosphere*, **48** : 717 – 724.
31. **Chayabutra C. et L. K. JU**, 2000. Degradation of n- Hexadecane and Its Métabolites by *Pseudomonas aeruginosa* under microaerobic and Anaerobic Dentrifying conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (2) : 493 – 498.
32. **Cheung P. Y. et B. K. Kinkle**, 2001. *Mycobacterium* Diversity and Pyrene Mineralization in Petroleum-Contaminated Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, **67** (5) : 2222 – 2229.

33. **Chilingarian, G. V. et Vorabutr, P.**, 1983. *Drilling and Drilling Fluids*, Elsevier ScientifAmsterdam.
34. **Chung W. K. and G. M. King**, 2001. Isolation, Characterization, and Polyaromatic Hydrocarbon Degradation Potential of Aerobic Bacteria From Marine Macrofaunal Burrow Sediments and Description of *Lutibacterium anuloderans* gen. nov. sp. nov. and *Cycloclasticus Spirillensus* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, **67** (12) : 5585 – 5592.
35. **Churchill S. A., J. P. Harper and A. F. Churchill**, 1999. Isolation and Characterization of a *Mycobacterium* Species Capable of Degrading Three- and Four-Ring Aromatic and Aliphatic Hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, **65** (2) : 549–552.
36. **Colin F.**, 2000. Pollution localisée des sols et sous sols par les hydrocarbures et par les solvants chlorés”, à l’initiative du comité de l’environnement de l’académie des sciences. rapport N° 44, *édition TEC et DOC*, p. 417.
37. **Côme J.M. et J. Ducreux**, 2001. Dépollution par injection de tensioactifs d'un forage d'alimentation en eau potable contaminé par du fioul domestique. *L'Eau, l'Industrie, les Nuisances*, **240** : 41-47.
38. **Comeau Y.**, 1999. Biorestauration des sols contaminés. Cours professer à l’Ecole Polytechnique de Montréal, Etudes supérieurs en génie de l’environnement.
39. **Cooney J. J., C. Siporin and R. A. Smucker**, 1980. Physiological and cytological responses to hydrocarbons by the hydrocarbon- using fungus *Cladosporium resinae*, Bot. pp. 227- 232.
40. **Cruden, D.L., J.H. Wolfram, R.D. Rogers and D.T. Gibson**, 1992. Physiological properties of a *Pseudomonas* strain which grows with p-]xylene in a two phase (organic-aqueous) medium. *Appl Environ Microbiol*, **58** : 2723-2729.
41. **Dadkhah A.A. et A. Akgerman**, 2002. Hot water extraction with *in situ* oxidation: PAHs removal from soil. *Journal of Hazardous Material*, **93** : 307-320.
42. **Darley, H.C.H. et G.R. Gray**, 1988. Composition and properties of drilling and completion fluids. 5th Ed., *Gulf Professional Publishing*, Houston, TX, 630p.
43. **Das K. and A. k. Mukherjee**, 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil. *Bioresource Technology*, **98** : 1339- 1345.

44. **Davet P.**, 1996. Vie microbienne du sol et production végétale. Ed Elsevier, Amsterdam, p.383.
45. **De Smet M.J., J. Kingma, H. Wynberg et B. Witholt**, 1983. *Pseudomonas oleovorans* as a tool in bioconversions of hydrocarbons: growth, morphology and conversion characteristics in different two-phase systems. *Enzyme Microb.Technol.*, **5** : 352-360.
46. **Doty S. L., T. Q. Shang, A. M. Wilson, J. Tangen, A. D. Westergreen, L. Newman, A. S. E. Strand and M. P. Gordon**, 2000. Enhanced metabolism of halogenated hydrocarbons in transgenic plants containing mammalian cytochrome P450 2E1. *Applied Biological Science*, **97** (12) : 6287 – 6291.
47. **Dubourguier H.C.**, 2000. From the laboratory to industrial scale: Composting of polluted soils from former coal industry and gas plants: future research needs, NATO Advanced Research Workshop the Utilization of Bioremediation to Reduce Soil Contamination: Problems and Solutions. Liblice Castle, Czech republic, June 14-19.
48. **Eder C. Santos, Rodrigo J.S. Jacques, Fa'tima M. Bento, Maria do Carmo R. Peralba Pedro A. Selbach, Enilson L.S. Sa', Fla'vio A.O. Camargo**, 2007. Anthracene biodegradation and surface activity by an iron-stimulated *Pseudomonas* sp. *Bioresource Technology*, 1 -6.
49. **Eckford R., F. D. Cook, D. Saul, J. Aislabie, and J. Foght**, 2002. Free-Living Heterotrophic Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Fuel-Contaminated Antarctic Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, **68** (10): 5181–5185.
50. **Eriksson M., J. O. Ka and W. W. Mohn**, 2001. Effects of Low Temperature and Freez-Thaw Cycles on Hydrocarbon Biodegradation in Arctic Tundra Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **67** (11) : 5107 – 5112.
51. **Eriksson M., E. Sodersten, Z. Yu, G. Dalhammar, and W. W. Mohn**, 2003. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons at Low Temperature under Aerobic and Nitrate-Reducing Conditions in Enrichment Cultures from Northern Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, **69** (1) : 275 – 284.
52. **Espírito-Santo L. S.**, 2002. Biodegradabilidade de óleo Diesel por microrganismos nativos da areia da praia de Suape - PE e predição de um modelo relacionado ao derramamento do poluente. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

53. **Fan S. et K. M. Scow**, 1993. Biodegradation of Trichloroethylene and Toluene by Indigenous Microbial Populations in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **59** (6) : 1911-1918.
54. **Ferrero M., E. Llobet-Brossa, J. Lalucat, E. Garcia-Valdés, R. Rossello-Mora, and R. Bosch**, 2002. Coexistence of Two Distinct Copies of Naphthalene Degradation Genes in Pseudomonas Strains Isolated from the Western Mediterranean Region. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**(2) : 957 – 962.
55. **Finnerty W. R. et M. E. Singer**, 1985. Membranes of hydrocarbon- utilizing microorganisms. In: Organization of Prokaryotic Cell Membranes, B. K. Gosh (ed), Volume III, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1- 44.
56. **Foght J. M., D. L. Gutnick, and D. W. S. Westlake**, 1989. Effect of Emulsan on Biodegradation of Crude Oil by Pure and Mixed Bacterial Cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, **55** (1) : 36 – 12.
57. **Fukumaki T., A. Inoue, K. Moriya et K. Horikoshi**, 1994. Isolation of a marine yeast that degrades hydrocarbon in the presence of organic solvent. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**: 1784 -1788.
58. **Gallego JLR., J. Loreda, JF. Llamas, F. Va zquez, et J. Sanchez**, 2001. Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation*, **12**, 325-335.
59. **Garon D., S. Krivobok, D. Wouessidjewe, F. Seigle-Murandi**, 2002. Influence of surfactants on solubilization and fungal degradation of fluorene. *Chemosphere*, **47**(3) : 303- 309.
60. **Geerdink M. J., R. H. Kleijntjens, M. C. M. Van Loosdrecht et K. C. A. M. Luyben** 1996. Microbial decontamination of polluted soil in a slurry process. *Journal of environmental engineering*, pp. 975- 982.
61. **Geiselbrecht A. D., B. P. Hedlund, M. A. Tichis and J. T. Staley**, 1998. Isolation of Marine Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH)- Degrading Cycloclasticus strains from the Gulf of Mexico and Comparison of their PAH Degradation Ability with That of Puget Sound Cycloclasticus Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, **64** (12) : 4703 – 4710.
62. **Ghosh S. K.** 2000. A rare infection caused by *Chryseomonas luteola*. *J. Infect.* **41**, 109-110.
63. **Gouda M.K., S.H. Omar, A.Z. Chekroud and M.N.E. Hemdan**, 2007. Bioremediation of kerosene I: A case study in liquid media. *Chemosphere*, 1- 8.

64. **Goswami P. et H. D. Singh**, 1991. Different modes of hydrocarbon uptake by two *Pseudomonas* species. *Biotechnol. Bioeng*, **37**, p. 1- 11.
65. **Hanson J. R., J. L. Macalady, D. Harris and K. M. Scow**, 1999. Linking Toluene Degradation with Specific Microbial Population in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. **65**, N°12, pp. 5403 – 5408.
66. **Haeseler F., D. Blanchet et P. Le Thiez**, 2001. Réhabilitation des sites contaminés par hydrocarbures-de l'évaluation des risques à la dépollution : une approche intégrée. *Bull.Soc.Fr.Microbiol*, **16** (3) :197-203.
67. **Heijnen J.J. and J.A. Roels**, 1981.A macroscopic model describing yield and maintenance relationships in aerobic fermentation processes. *Biotechnol Bioeng* **23**: 739–763
68. **Heitkamp M. A., J. P. Freeman and C. E. Cerniglia**, 1987. Naphthalene Biodegradation in Environmental Microcosms: Estimates of Degradation Rates and Characterization of Metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*, **53** (1) :129 – 136.
69. **Herviou P., H. Bonin, S. Dufay et G. Rigaud**, 2000. HAP lourds : traitement par voie biologique ?. *L'Eau, L'Industrie, Les Nuisances*, **230** : 51-55.
70. **Herzhaft, B.**, 2001. Les fluides de forage : un exemple de fluides complexes industriels, 36ème colloque annuel du Groupe Français de Rhéologie (GFR 2001), Marne-la-Vallée France, 10-12 Octobre.
71. **Holiger C. et A. J. B. Zehnder**, 1996. Anaerobic biodegradation of hydrocarbons. *Current opinion in Biotechnology*, **7** : 326- 330.
72. **Hommel R. K.**, 1994. Formation and function of biosurfactant for dégradation of waterinsoluble substrats. In: *Biochemistry of microbial dégradation*, coordinateur C. Ratledge, Ed Kluwer Academic Publishers, pp. 63- 87.
73. **Houache S. et A. Sellami**, 2001. Étude de la biodégradabilité aérobie des boues de forage. Mémoire de fin d'étude. USTHB.
74. **IDF**, 1988. Product data manual.
75. **Ikura, Y., Y.Yoshida et T. Kudo**, 1997. Physiological properties of two *Pseudomonas mendocina* strains which assimilate styrene in a two-phase (solvent-aqueous) system under static culture conditions. *J. Ferment. Bioeng.*, **83** : 604-607.
76. **Inoue, A. et K. Horikoshi**, 1989. A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature*, **338** : 264 -266.

77. **Inoue, Yamamoto, M. et Horikoshi, K.** 1991. *Pseudomonas putida* which can grow in the presence of toluene. *Appl Environ Microbiol*, **57** : 1560-1562.
78. **Irene von der Weid, J. M. Marques, C. D. Cunha, R. K. Lippi, Silvia C.C. dos Santos, A. S. Rosado, U. Lins, L. Seldin,** 2007. Identification and biodegradation potential of a novel strain of *Dietzia cinnamea* isolated from a petroleum-contaminated tropical soil. *Systematic and Applied Microbiology*, **30** : 331–339.
79. **Isken S. et de J. A. M. Bont,** 1998. Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles*, **2** : 229-238.
80. **Iwabuchi N., M. Sunairi, H. Anzai, M. Nakajima and S. Harayama,** 2000. Relationships between colony morphotypes and oil tolerance in *Rhodococcus rhodochrous*. *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (11) : 5037 – 5077.
81. **Jeannot R., B. Lemièrre et S. Chiron,** avec la collaboration de F. Augustin, D. Darmendrail, 2001. Guide méthodologique pour l'analyse des sols pollués. document du BRGM 298, *éditions BRGM*, p. 101.
82. **Johnsen R., L. Y. Wick, H. Harms,** 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, **133** :71 – 84.
83. **Juhász A.L. et R. Naïdu,** 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **45**, 57-88.
84. **Kanaly R. A., et Harayama S.,** 2000. Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. MINIREVIEW, *Journal of Bacteriology*, **182** (8) : 2059-2067.
85. **Kanaly R. A., R. Bartha, K. Watanabe, and S. Harayama,** 2000. Rapid Mineralization of Benzo[a]pyrene by a Microbial Consortium Growing on Diesel Fuel. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(10):4205 – 4211.
86. **Kanaly R. A., S. Harayama, and K. Watanabe,** 2002. *Rhodanobacter* sp. Strain BPC1 in a Benzo [a] pyrene-Mineralizing Bacterial Consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, **68** (12) :5826–5833.
87. **Kappeli O. et W. R. Finnerty,** 1979. Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane- grown *Candida tropicalis*. *J. Bacteriol*, **140**, pp. 707- 712.
88. **Kastner M., M. Breuer-Jammali and B. Mahro,** 1998. Impact of Inoculation Protocols, Salinity, and pH on the Degradation of Polycyclic Aromatic Hydro carbons (PAHs) and Survival of PAH-Degrading Bacteria Introduced into Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **64** (1) : 359 - 362.

89. **Kastner M., S. Streibich, M. Beyrer, H. H. Richnow, and W. Fritsche**, 1999. Formation of Bound Residues during Microbial Degradation of [14 C] Anthracene in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. **65**, No. 5, pp. 1834–1842.
90. **Kazunga C. and M. D. Aitken**, 2000. Products from the Incomplete Metabolism of Pyrene by Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (5) : 1917-1922.
91. **Khan A., R. F. Wang, W. W. Cao, D. R. Doerge, D. Wennerstrom, and C. E. Cerniglia**, 2001. Molecular Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression of Genes Encoding a Polycyclic Aromatic Ring Dioxygenase from *Mycobacterium* sp. Strain PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, **67** (8) :3577-3585.
92. **Khodja M., 2008**. Les fluides de forage: Etude des performances et considerations environnementales. Thèse de doctorat, spécialité: Génie des Procédés et de l'Environnement. Institut National Polytechnique De Toulouse. 288p.
93. **Kirk P. W. et A. S. Gordon**, 1988. Hydrocarbon degradation by filamentous marine higher fungi. *Mycologia*, 80, p. 776- 782.
94. **Kock K., O. Kapelli, A. Fiechter and J. Keiser** 1991. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *J. Bacteriol*, **173** : 4212- 4219.
95. **Kosaric N.**, 2001. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. *Food Technol. Biotechnol.*, **39** (4) : 295-304.
96. **Kreger-Van Rij N.J.W.**, 1984. *The Yeast: A Taxonomic Study*, 3 ed. Elsevier Sci. Publication, Amsterdam.
97. **Labrecque M. H.**, 2003. Etude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène. *Maîtrise en microbiologie agricole*, Université de Laval.
98. **Lafrance P. et M. Lapointe**, 1998. Mobilization and co-transport of pyrene in the presence of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants in sandy soil columns. *Ground Water Monitoring and Remediation*, **18**, (4) :139-147.
99. **Landriot G.**,1968. *Fluide de forage, édition Technip*, France.
100. **Langworthy D. E., R. D. Stapleton, G. S. Sayler, and R. H. Findlay**, 1998. Genotypic and Phenotypic Responses of a Riverine Microbial Community to Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, **64** (9) :3422–3428.

101. **Laurent, P., L. Buchon, J. F. Guespin-Michel, and N. Orange.** 2000. Production of pectate lyases and cellulases by *Chryseomonas luteola* strain MFCL0 depends on the growth temperature and the nature of the culture medium: evidence for two critical temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1538-1543.
102. **Leahy, J. G., R. R. Colwell,** 1990. Microbial Degradation of hydrocarbons in the Environment. *Microbiol. Rev.*, **54** : 305-315.
103. **Lecompte P.,** 1995. Les sites pollués, traitement des sols et des eaux souterraines. *Édition Lavoisier, TEC & DOC*, p. 198.
104. **Lindely N. D. et M. T. Heydeman,** 1986. Mecanism of dodecane uptake by whole cells of *Cladosporium resinae*. *J. Gen. Microbiol*, **132** : 751- 756.
105. **Lindely N. D. et M. T. Heydeman,** 1988. The uptake of n-alkanes from alkane mixtures during growth of the hydrocarbon- utilizing fungus *Cladosporium resinae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **23** : 384- 388.
106. **Liste H. et M. Alexander,** 2000. Plant-promoted pyrene degradation in soil. *Chemosphere*, **40**, 7-10.
107. **Little C. D., A. V. Palumbo, S. E. Herbes, M. E. Lidstrom, R. L. Tyndall and P. J. Gilmer,** 1988. Trichloroethylene Biodegradation by a Methane-Oxidizing Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, **54** : 951-956.
108. **Liu J., Z. Xu, J. Masliyah,** 2004. Role of fine clays in bitumen extraction from oil sands. *AIChE Journal*, **50**, 1917-1927.
109. **Lodder J.,** 1970. *The Yeast: A Taxonomic Study*. North Holland Publishing Company, Oxford.
110. **Lounis S. et I. Daoud,** 2005. Analyse microbienne et physico-chimique des sols contaminés par les hydrocarbures à Hassi-Messaoud. Mémoire de fin d'étuded pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en ecologie option pathologie des écosystèmes, 63p.
111. **Maeda T., Y. Takahashi, H. Suenaga, A. Suyama, M. Goto, and K. Furukawa,** 2001. Functional Analyses of Bph-Tod Hybrid Dioxygenase, Which Exhibits High Degradation Activity Toward Trichloroethylene. *The journal of Biological Chemistry*, **276** (32) : 29833 – 29838.
112. **Marchal N. et J.L. Bourdon,** 1982. Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. *Ed. Doin*, Paris.
113. **Marchal R., S. Penet, F. Solano-Serena, J.P. Vandecasteele,** 2003. Gasoline and Diesel Oil. *Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP*, **58** (4) : 441-448.

114. **Margesin R. et F. Schinner**, 2001. Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. *Applied and Environmental Microbiology*, **67** (7) : 3127-3133.
115. **Margesin R., D. Labbé, F. Schinner, C. W. Greer and L.G. Whyte**, 2003. Characterization of Hydrocarbon-Degrading Microbial Populations in Contaminated and Pristine Alpine Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, **69** (6) : 3085-3092.
116. **Masten S.J. et S.H.R. Davies**, 1997. Efficacy of in-situ ozonation for the remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soils, *J. Contam. Hydrol.*, **28** : 327-335.
117. **Mata J.A., V. Béjar, I. Ilamas, S. Arias, P. Bressolier, R. Tallon, M.C. Urdaci et E. Quesada**, 2006. Exopolysaccharides produced by the recently described halophilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis*. *Research in Microbiology*, **157**: 827-835.
118. **Mccray J.E. et M.L. Brusseau**, 1998. Cyclodextrin-enhanced in situ flushing of multiple-component immiscible organic liquid contamination at the field scale: mass removal effectiveness. *Environ. Sci. Technol.*, **32**, (9), 1285-1293.
119. **Meckenstock R. U., M. Safinowski et C. Griebler** 2004. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Ecology*, **49**, pp. 27-36.
120. **Mesarch M. B., C. H. Nakatsu and L. Nies**, 2000. Development of Catechol 2,3-Dioxygenase-Specific Primers for Monitoring Bioremediation by Competitive Quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (2) : 678-683.
121. **Menn F. M., B.M. Applegate, and G. S. Sayler**, 1993. NAH Plasmid-Mediated Catabolism of Anthracene and Phenanthrene to Naphthoic Acids. *Applied and Environmental Microbiology*, **59** (6) : 1938-1942.
122. **Mohn W. W. et G. R. Stewart**, 2000. Limiting factors for hydrocarbon biodegradation at low temperature in Arctic soils. *Soil Biology & Biochemistry*, **32**, pp. 1161 – 1172.
123. **Moody J. D., J. P. Freeman, D. R. Doerge and C. E. Cerniglia**, 2001. Degradation of Phenanthrene and Anthracene by Cell Suspensions of Mycobacterium sp. Strain PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, **67** (4) :1467 - 1483.
124. **Morgan P., R. J. Watkinson & C. Ratledge**, 1994. Biodegradation of components of petroleum. In: *Biochemistry of microbial degradation* Ed Kluwer Academic Publishers, pp. 1-31.

125. **Murray H.**, 2000. Traditional and new applications for kaolin, smectite and palygorskite: a general overview. *Appl. Clay Sci.*, **17**, 207-221.
126. **Namkoong W., E. Y. Hwang, J. S. Park and J. Y. Choi**, 2002. Bioremediation of dieselcontaminated soil with composting. *Environmental Pollution*, Vol. **119**, No. 1, pp. 23- 31.
127. **Narro M. L.**, 1985. Oxidation of aromatic hydrocarbons by marine cyanobacteria. Ph.D. thesis. *University of Texas at Austin*, Austin.
128. **Neindre B.L.**, 1993. Tensions superficielles et interfaces. Techniques de l'ingénieur. Traités constantes physico-chimiques. **475** : 2-12.
129. **Nguyen J., P.**, 1993. Le forage, Technique d'exploitation pétrolière, *le Forage Technip*.
130. **Oudot J.**, 1984. Rate of microbial degradation of petroleum components as determined by computerized capillary gas-chromatography and computerized mass-spectrometry. *Mar. Environ. Res.* **13**, 277-302.
131. **Oudot J.**, 2000. Biodégradation du fuel de l'Erika. *Life Science*, **323**, 945-950.
132. **Parales R. E., J. L. Ditty and C. S. Harwood**, 2000. Toluene-Degrading Bacteria Are Chemotactic towards the Environmental Pollutants Benzene, Toluene, and Trichloroethylene. *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (9) : 4098 – 4104.
133. **Pepi M., A. Cesàro, G. Liut et F. Baldi**, 2005. An antarctic psychrotrophic bacterium *Halomona sp.* ANT-3b, growing on n-hexadecane, produces a new emulsifying glycolipid. *FEMS Microbio. Ecol.* **53** : 157-166.
134. **Peysson Y.**, 2004. Solid/Liquid Dispersions in Drilling and Production. *Oil and Gas Science and Technology – Rev. IFP.* **59**: 11-21.
135. **Pinkart H.C. et D. C. White**, 1997. Phospholipid biosynthesis and solvent tolerance in *Pseudomonas putida* strains. *J. Bacteriol.*, **179**, 4219-4226.
136. **Potin O., E. Veignie and C. Rafin**, 2004b. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil. *FEMS Microbiology Ecology*, **51**, pp. 71-78.
137. **Prenafeta-Bo1dú F. X., J. Vervoort, J. T. C. Grotenhuis and van J. W. Groenestijn**, 2002. Substrate Interactions during the Biodegradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene (BTEX) Hydrocarbons by the Fungus *Cladophialophora sp.* Strain Tl. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. **68**, No. 6, pp. 2660 - 2665.

138. **Rateldge C.**, 1978. Degradation of aliphatic hydrocarbons. In: Developments in Biodegradation of Hydrocarbons, R. J. Watkinson (ed), Applied Science, London, **1**, pp. 1- 46.
139. **Rainey F.A., S. Klatte, R.M. Kroppenstedt and E. Stackebrandt**, 1995. Dietzia, a new genus including Dietzia maris comb. nov., formerly Rhodococcus maris, Int. J. Syst. Bacteriol. **45** : 32–36.
140. **Rehmann K., N. Hertkorn, and A. A. Kettrup**, 2001. Fluoranthene metabolism in *Mycobacterium* sp. strain KR20: identity of pathway intermediates during degradation and growth. *Microbiology*, **147**, pp. 2783 – 2794.
141. **Richard, J.Y. and T.M. Vogel**, 1999. Characterization of Soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. *Internat. Biodeteriorat. and Biodegradat.*, **44**, 93-100.
142. **Rodrigo J.J.S., E. C. Santas, F.M. Bento, M. C. R. Peralba, P. A. Selbach, E. L. S. Sa and F. A. O. Camargo**, 2005. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. from a petrochemical sludge landfarming site. *International Biodeterioration et Biodegradation*. **56**, 143-150.
143. **Ryan J.N. et M. Elimelech**, 1996. Colloids Surf A. *Physico chem Eng. Asp.* **107**:1.
144. **Sack U., T. M. Heinze, J. Deck, C. E. Cerniglia, M. C. Cazau, and W. Fritsche**, 1997. Novel Metabolites in Phenanthrene and Pyrene Transformation by *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. **63**. No. 7, pp. 2906-2909.
145. **Salanitro JP.**, 2001. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in soil. *Adv. Agron.* **72**, 53-105.
146. **Sakamoto T., J. M. Joern, A. Arisawa, and F. H. Arnold**, 2001. Laboratory Evolution of Toluene Dioxygenase To Accept 4-Picoline as a S u b s t r a t e. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. **67**, No. 9, pp. 3882 – 3887.
147. **Samanta S. K., O. V. Singh, and R. K. Jain**, 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *TRENDS in Biotechnology*, Vol. **20**, No. 6, pp. 243 – 248.
148. **Sanseverino J., B. M. Applegate, J. M. Henry King, and G. S. Saylor**, 1993. Plasmid- Mediated Mineralization of Naphthalene, Phenanthrene, and Anthracene. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. **59**, No. 6, pp. 1931-1937.
149. **Schima H., T. Kudo et K. Horokochi**, 1991. Isolation of toluene-resistant mutants from *Pseudomonas putida* PpG1 (ATCC 17453). *Agric. Biol. Chem.*, **55** : 1197-1199.

150. **Schlumberger C.D.**, 1997. Oil Well Drilling "Mud circulation and treating equipment", Vol.4. Schlumberger/Sedco Forex. *Technomedia international. Inc.*
151. **Schneider J., R. Grosser, K. Jayasimhulu, W. Xue, and D. Warshawsky**, 1996. Degradation of Pyrene, Benz[a]anthracene, and Benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. Strain RJGII-135, Isolated from a Former Coal Gasification Site. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. **62** (1): 13 - 19.
152. **Scott C. C. L. et W. R. Finnerty**, 1976a. A comparative analysis of the ultrastructure of hydrocarbon- oxidizing microorganisms. *J. Gen. Microbiol*, **94** : 342- 350.
153. **Scott C. C. L. et W. R. Finnerty**, 1976b. Characterisation of intracytoplasmic hydrocarbon inclusions from the hydrocarbon- oxidizing *Acinetobacter* sp. HO1-N. *J. Bacteriol*, **127** : 481- 489.
154. **Singer M. E. et W. R. Finnerty**, 1984. Microbial metabolism of straight- chain and branched alkanes. In: *Petroleum Microbiology*, R. M. Atlas (ed), Macmillan, New York, pp. 1- 59.
155. **Solano-Serena F., Marchal R., et Vandecasteele J. P.**, 2001. Biodégradabilité de l'essence dans l'environnement : de l'évaluation globale au cas des hydrocarbures récalcitrants. *Oil & Gas Science and Technology- Rev. IFP*, **56** (5) :479-498.
156. **Soltani M.**, 2004. Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse de doctorat de l'université Paris 6, spécialité chimie analytique, p. 284.
157. **Sposito, G., Skipper, N.T., Sutton, R., Park, S-A., Soper, A.K., Greathouse, J.A.**, 1999. Surface geochemistry of the clay minerals. *Pro. Nat. Acad. Sci. U.S.A*, **96**, 3358-3364.
158. **Stotzky, G., Rem, L.T.**, 1966. Influence of clay minerals on microorganisms I. Montmorillonite and kaolinite on bacteria. *Can. J. Microbiol.*, **12**, 547-563.
159. **Stapleton R. D., D. C. Savage, G. S. Sayler, and G. Stacey**, 1998. Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons in an Extremely Acidic Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. **64** (11) :4180 - 4184.
160. **Straube W.L., C.C. Nestler, L.D. Hansen, D. Ringleberg, P.H. Pritchard et J. Jones-meehan**, 2003. Remediation of polycyclic hydrocarbons (PAHs) through Landfarming with Biostimulation and Bioaugmentation. *Acta Biotechnol.*, **23**, (2-3) : 179-196.

161. **Suenaga H., M. Mitsuoka, Y. Ura, T. Watanabe, and K. Furukawa**, 2001. Directed Evolution of Biphenyl Dioxygenase: Emergence of Enhanced Degradation Capacity for Benzene, Toluene, and Alkylbenzenes. *Journal of Bacteriology*, **183** (18) :5441 - 5444.
162. **Sumcker R. A. and J. J. Cooney**, 1981. Cytological responses of *Cladosporium resinae* when shifted from glucose to hydrocarbon medium. *Can. J. Microbiol*, **27** : 1209- 1218.
163. **Suparna M., J. Sheeja, M. Gita, V. Avinash**, 2004. Biodegradation of Diesel Oil by an Arabian Sea Sediment culture Isolated from Vicinity of an Oil Field, *Biores. Technol.*, **95** : 281-286.
164. **Tabatabaee A., M.M. Assadi, A.A. Noohi et V.A. Sajadian**, 2005. Isolation of biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoirs. *Iranian J. Env. Health Sci. Eng.* **2**: 6-12.
165. **Thiem A., M. Stieber, P. Werner et F.H. Frimmel**, 1997. Surfactant-enhanced mobilization and biodegradation of polycyclic-aromatic hydrocarbons in manufactured gas plant soil. *Environ. Sci. Technol.*, **31**, (9) : 2570-2576.
166. **Topp E., R.L. Crawford et R.S. Hanson**, 1988. Influence of readily metabolizable carbon on pentachlorophenol metabolism by a penta chlorophenol degrading *Flavobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54** : 2452-2459.
167. **Toren Orr E., Y. Paitan, E. Z. Ron and E. Rosenberg**, 2002. The Active Component of the Bioemulsifier Alasan from *Acinetobacter radioresistens* KA53 Is an OmpALike Protein. *Journal of Bacteriology*, **184** (1) : 165-170.
168. **Tortora G.J., B.R. Funke et C.L. Case**, 2003. Introduction à la microbiologie. *Ed. de Renouveau pédagogique Inc.* pp :157- 355.
169. **Trudgill P. V.**, 1990. Microbial metabolism of monoterpenes-recent developments. *Biodegradation*, **1**, p. 93-105.
170. **Truffaut N., D. Mater, S. Hallier-Soulier et P. Poupin**, 2001. Outils moléculaires d'évaluation des capacités dégradatives de microflore de l'environnement. *Bull.Soc.Fr.Microbio.*, **16** (3) : 190- 196.
171. **UP** (Union pétrolière), 2004. Pétrole: matière première et produits. [www.erdoel.ch/doc/980693996017032004.pdf](http://www.erdoel.ch/doc/980693996017032004.pdf)
172. **UP** (Union pétrolière), 2003. Pétrole: origine, production et traitement. [www.erdoel.ch/doc/229808986217032004.pdf](http://www.erdoel.ch/doc/229808986217032004.pdf)

173. **Vandecasteele J. P. et D. Ballerini**, 2001. Biodégradation des hydrocarbures et xenobiotiques et biorestauration des eaux et des sols pollués. *Bull.Soc.Fr.Microbio.*, **16** (3) : 183.
174. **Van Beilen J.B., Z. Li, W.A. Duetz, T.H.M. Smits and B. Witholt**, 2003. Diversity of Alkane Hydroxylase Systems in the Environment. *Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP*, **58** (4) :427-440.
175. **Van Hamme J. D. et O. P. Ward**, 2001. Physical and Metabolic Interactions of *Pseudomonas* sp. Strain JA5-B45 and *Rhodococcus* sp. Strain F9-D79 during Growth on Crude Oil and Effect of a Chemical Surfactant on Them. *Applied and Environmental Microbiology*, **67** (10) : 4874–4879.
176. **Van Loosdrecht M.C.M., J. Lyklema, W. Norde, J.B. Zehnder**, 1990. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol. Rev.*, **54**, 75-87.
177. **Vila J., Z. López, J. Sabaté, C. Minguillón, A. M. Solanas and M. Grifoll**, 2001. Identification of a Novel Metabolite in the Degradation of Pyrene by *Mycobacterium* sp. Strain AP1: Actions of the Isolate on Two- and Three-Ring Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(12) :5497-5505.
178. **Vogel T. et D. Ballerini**, 2001. Biorestauration des sols et des aquifères contaminés par des hydrocarbures et des composés halogénés. *Bull.Soc.Fr.Microbiol.*, **16**(3) : 204-209.
179. **Wang R. F., D. Wennerstrom, W. W. Cao, A. A. KHAN, and C. E. Cerniglia**, 2000. Cloning, Expression, and Characterization of the katG Gene, Encoding Catalase-Peroxidase, from the Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacterium *Mycobacterium* sp. Strain PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (10) : 4300–4304.
180. **Watkinson R. J.**, 1980. Interaction of microorganisms with hydrocarbons. In: Hydrocarbons in Biotechnologie, D. E. F. Harrison, I. J. Higgins and R. J. Watkinson (eds), Heyden, London, pp. 11- 24.
181. **Warr L. N., J. N. Pedro, M. Lett, A. H. Salmeron, M. Khodja**, 2008. How clays stimulate marine oil bioremediation (article en soumission).
182. **Weber F. J., L. P. Ooijkaas, R. M. Schemen, S. Hartmans et J.A.M. de Bont**, 1993. Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to high concentrations of styrene and other organic solvents. *Appl Environ Microbiol*, **59** :3502-3504.
183. **West C.C. et J.H. Harwell**, 1992. Surfactants and subsurface remediation, *Environ. Sci. Technol.*, **36**(12), 2324-2330.

184. **Whyte L. G., J. Hawari, E. Zhou, L. Bourbonnière, W. E. Inniss, C. W. Greer,** 1998. Biodegradation of Variable-Chain-Length Alkanes at Low Temperatures by a Psychrotrophic *Rhodococcus* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(7) : 2578–2584.
185. **Wong J. W. C., K. M. Lai, C.K. Wan, K.K. Ma, M. Fang,** 2002. Isolation and optimization of PAH-degradative bacteria from contaminated soil for PAHs bioremediation. *Water, Air and Soil Pollution*, **139** : 1-13.
186. **Yu S. H., L. Ke, Y.S. Wong et N.F.Y. Tam,** 2005. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Environment International*, **31** :149- 154.
187. **Yu Z., G. R. Stewart, and W. W. Mohn,** 2000. Apparent Contradiction: Psychrotolerant Bacteria from Hydrocarbon-Contaminated Arctic Tundra Soils That Degrade Diterpenoids Synthesized by Trees. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(12) : 5148–5154.
188. **Yumoto, A. Nakamura, H. Iwata, K. Kojima, K. Kusumoto, Y. Nodasaka, H. Matsuyama,** 2002. *Dietzia psychralcaliphila* sp. nov., a novel facultatively psychrophilic alkaliphile that grows on hydrocarbons, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 85–90.
189. **Zhao H.P., L. Wang, J.R Ren, Z. Li, M. Li and H.W. Gao,** 2007. Isolation and characterization of phenanthrene-degrading strains *Sphingomonas* sp. ZP1 and *Tistrella* sp. ZP5. *Journal Hazardous Materials*. 8p.
190. **Zylstra G. J. et D. T. Gibson,** 1989. Toluene Degradation by *Pseudomonas putida* F1 Nucleotide Sequence of The *TodC1C2BADE* Genes and their Expression In *Escherichia Coli* *The Journal of Biological Chemistry*, **264**(25) :14940-14946.

# *Annexes*

# Annexe 1

## Matériels utilisés

### ➤ Equipements

- 1 – Etuve (Incucell)
- 2 – Spectrophotomètre UV / visible (SHIMADZU)
- 3 - Autoclave (SANA CLAV)
- 4 – pH mètre (HANNA instruments)
- 5 – Agitateur –plaque chauffante (VELP scientifica)
- 6 – Vortex (VELP scientifica)
- 7 - Centrifugeuse à froid (SIGMA)
- 8 – Incubateur- agitateur (Nonotron HT)
- 9 – Tensiomètre (KRÜSS)
- 10 – Microscope photonique (NOVEX Holand)
- 11 – Loupe (NOVEX Holland)
- 12 –Balance (SCALTEC)
- 13 – Bec Bunsen (Fisher)
- 14 -- Réfrigérateur

### ➤ Verreries et matériels en plastiques

Erlenmeyer de 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml,  
Bêcher de 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml,  
Boîte de Pétri en plastique,  
Pipettes Pasteur,  
Anse de platine,  
Tubes à essai,  
Lames et lamelles,  
Seringues,  
Sacs en plastique,  
Parafilm,  
Micropipettes,  
Pinces (à bois et métallique),  
Cuvettes de spectrophotomètre.

## Annexe 2

### Composition des milieux de culture

Tableau 2.I : Composition chimique de milieu de culture utilisé

Composition chimique g/l	BH standard
$K_2HPO_4$	1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2
$NH_4NO_3$	1
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,02
$FeCl_3$	0.05
$KH_2PO_4$	1
Eau distillée	1000
pH	7,00

#### Remarque :

L'autoclavage de milieu se fait à 121°C pendant 15 min.

Pour la préparation des milieux solides, on ajoute 20g d'Agar-Agar au milieu liquide utilisé.

#### ➤ Recherche de l'activité catalasique :

##### Réactif :

Eau oxygénée .....30 volumes

##### Composition du réactif de Griess :

##### -Réactif 1 :

Acide parasulfanilique..... 0,8 g  
Acide acétique .....100ml

##### -Réactif 2 :

$\alpha$ -naphtylamine ..... 0,5 g  
(ou mieux diméthyl- $\alpha$  naphtylamine.....0,6g  
Acide acétique 5 N .....100ml

#### ➤ La composition du milieu de culture Citrate de simmons

Sulfate de magnésium..... 0,2g/l  
Phosphate mono-ammonique..... 1g/l  
Phosphate bipotassique..... 1/l  
Citrate de sodium..... 2g/l

Chlorure de sodium.....	5g/l
Bleu de bromothymol.....	0,08g/l
Agar.....	15g/l

➤ **Milieu Clark et Lubs**

Peptone tryptique ou polypeptone.....	5 à 7 g/l
Glucose.....	5 g/l
Phosphate bi potassique.....	5 g/l

➤ **La composition du milieu Urée indole**

Tryptophane.....	0,3g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,1g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,1g
Na Cl .....	0,5g
Urée.....	2g
Alcool a 95° .....	1 ml
Rouge de phénol à 1%.....	0,25ml
Eau distillée.....	100ml

➤ **La composition du milieu Mannitol :**

Peptone tryptique de viande.....	20 g/l
Agar.....	4g/l
Mannitol.....	2 g/l
K NO <sub>3</sub> .....	1g/l
Rouge de phénol.....	4ml

Réactifs et additifs

- Alcool,
- Disque d'oxydases,
- Eau distillée,
- Eau oxygénée 10 V,
- Fuchsine,
- Gasoil,
- Huile de vaseline,
- Huile à immersion,

- Poudre de Zinc,
- Réactifs de Kovacs,
- Solution de lugol,
- Violet de gentiane.

## Annexe 3

### Mesure de la densité optique (spectrophotométrie)

La détermination de la biomasse dans les cultures est opérée par la mesure de la turbidité de la suspension au moyen d'un spectrophotomètre UV- visible. La longueur d'onde est maintenue à 600 nm (elle est retenue dans les publications).

Pour la mesure de la densité optique, on se base sur la loi de Beer-Lambert

$$A = \lg(I_0 / I) = \epsilon.l.C$$

A : densité optique.

$I_0$  : intensité de la lumière incidente.

I : intensité de la lumière émergente.

$\epsilon$ : absorption molaire (absorption d'une solution  $c = 1$  mole/l dans une cuvette de dimension de  $l = 1$  cm) [l / mole. cm].

C : concentration molaire [mole/l].

l : épaisseur de la cuvette [cm].

La loi de Beer- Lambert est valable seulement pour les solutions suffisamment diluées. Dans ces conditions la courbe obtenue est une droite (la densité optique est proportionnelle au nombre de molécules absorbantes).

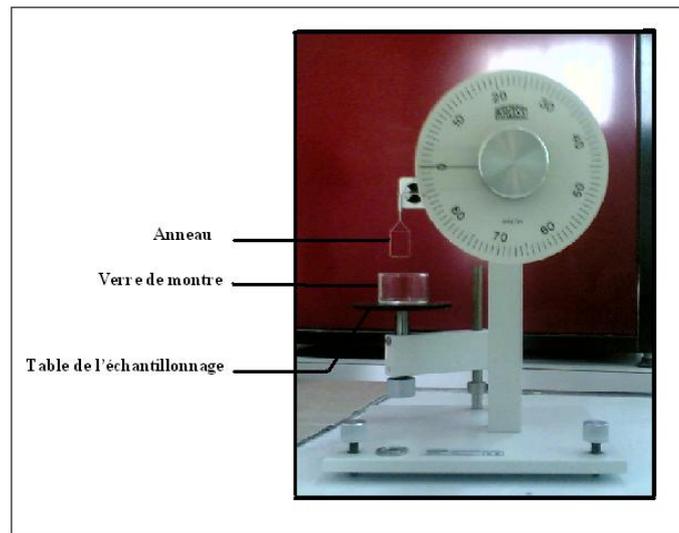
### Mesure de la tension superficielle

Le tensiomètre est représenté dans la figure 3.1

Pour effectuer des mesures de la tension superficielle, différentes étapes doivent être suivies :

- Etalonner l'appareil ;
- Introduire l'échantillon (10 ml du milieu de culture prélevé aseptiquement) dans un verre de montre ;

- Placer le verre de montre sur la table d'échantillonnage et faire monter la table jusqu'à ce que l'anneau immerge dans le milieu de culture (formation d'un film).
- Réaliser un réglage d'appareil jusqu'à ce que le film casse.
- La valeur sur le cadran au moment de la cassure du film correspond à la tension de surface du liquide.



**Figure 3.1 : Tensiomètre (KRÜSS).**

## **Annexe 5**

### **Résultats de la mesure de la concentration microbienne**

**Tableau 5.I : Résultats de la mesure de la concentration microbienne isolée sur milieu BH à 2% du gasoil.**

Temps (heures)	Log UFC/ml					
	Souche SA	Souche LB	Souche SC	Souche SD	Souche SE	Souche SF
0	2,66	2,26	2,36	2,32	2,09	1,2
12	6,3	3,21	3,3	3,3	3,79	3,56
24	7,08	4,01	4	4,69	4,2	4,02
36	9,01	4,67	4,5	4,75	6	4,38
48	8,79	5,2	5	5	5,83	5,01
60	10,84	7,6	5,79	5,69	7,39	4,69
72	11,5	8,59	6,14	6	7	5,56
84	11,95	9,34	6,5	6,84	7,39	6,78
96	12,63	9,51	7,09	7,05	7,4	7

**Tableau 5.II : Résultats de la mesure de la concentration microbienne des deux souches SA et LB sur milieu BH à différentes température pendant 24 heures d'incubation.**

Température	Log UFC/ml	
	Souche SA	Souche LB
<b>20°C</b>	4,3	3,49
<b>25°C</b>	5,27	5
<b>30°C</b>	6,39	5,39
<b>35°C</b>	5,17	3,17
<b>40°C</b>	4,07	3,36

**Tableau 5.III: Résultats de la mesure de la concentration microbienne des deux souches SA et LB sur milieu BH à différentes valeurs de pH pendant 24 heures d'incubation.**

pH	Log UFC/ml	
	Souche SA	Souche LB
<b>5</b>	5,69	5,17
<b>6</b>	6,95	5,53
<b>7</b>	7,3	6
<b>8</b>	5,47	5,33
<b>9</b>	5	5,17
<b>10</b>	4,44	4

### ***INFLUENCE DU GASOIL SUR LA CROISSANCE MICROBIENNE***

- *Ajout de gasoil pendant la phase stationnaire*

**Tableau 5.IV : Résultats de la croissance de la souche SA dans un milieu BH à 30°C. Croissance mesurée par turbidimétrie et par dénombrement.**

jours	sans gasoil	ajout de gasoil	sans gasoil	ajout de gasoil
	DO à 600 nm sans gasoil	DO à 600 nm avec gasoil	Log UFC/ml sans gasoil	Log UFC/ml avec gasoil
0	0,164	0,164	1,2	1,2
2	0,309	0,309	3,8	3,8
3	0,466	0,382	5,1	2,4
5	1,288	1,544	7,5	7,9
6	1,365	1,546	8,2	8,5
7	1,49	1,638	8,9	8,6
8	1,526	1,549	9	7

**Tableau 5.V : Résultats de la croissance de la souche LB dans un milieu BH à 30°C. Croissance mesurée turbidimétrie et par dénombrement.**

jours	sans gasoil	ajout de gasoil	sans gasoil	ajout de gasoil
	DO à 600 nm sans gasoil	DO à 600 nm avec gasoil	Log UFC/ml sans gasoil	Log UFC/ml avec gasoil
0	0,06	0,06	0,2	0,2
2	1,057	1,057	3	3
3	1,129	0,959	5,2	3,7
5	1,206	1,32	6,1	6,5
6	1,203	1,366	6,2	6,7
7	1,231	1,37	6,8	6,9
8	1,266	1,377	6,9	7

- *Ajout de gasoil au début de la fermentation*

**Tableau 5.VI : Résultats de la croissance de la souche SA dans un milieu contenant du gasoil (25% v/v) dès le début de la fermentation. La densité optique est mesurée sur une période de 7 jours.**

	sans gasoil	avec gasoil
Temps (jours)	DO à 600 nm sans gasoil	DO à 600 nm avec gasoil
0	0,264	0,29
2	0,809	0,35
3	1,266	0,699
5	1,38	1,032
6	1,365	1,122
7	1,39	1,185
8	1,36	1,142

**Tableau 5. VII: Résultats de la croissance de la souche LB dans un milieu contenant du gasoil (25% v/v) dès le début de la fermentation. La densité optique est mesurée sur une période de 7 jours**

	sans gasoil	avec gasoil
Temps (jours)	DO à 600 nm sans gasoil	DO à 600 nm avec gasoil
0	0,06	0,06
2	1,057	0,686
3	1,129	0,851
5	1,206	0,972
6	1,203	1,022
7	1,231	1,122
8	1,266	1,111

## ***TOLERANCE DES SOUCHES A ET B AU GASOIL***

**Tableau 5.VIII : Résultats de l'effet de la concentration du gasoil sur la croissance cellulaire des souches SA et LB sur milieu Minérale BH en présence de différentes concentrations Du gasoil pendant 24h d'incubation**

% gasoil	Log UFC/ml	
	Souche SA	Souche LB
0%	3,6	3,32
2%	5,69	4
5%	6,62	4,36
10%	6,9	5,07
15%	7,2	5,61
20%	7,5	5,93
25%	8,46	7,21
30%	7,35	6
35%	6,2	5,4
40%	5,6	4,5

## ***BIODEGRADATION DU GASOIL***

- Evolution de la concentration microbienne et du pH

**Tableau 5. IX; Résultats de la variation de la cinétique de croissance (croissance sur milieu BH à 30°C pendant 21 jours d'incubation de la souche SA) et du pH en fonction de temps.**

Temps (jours)	pH	Log UFC/ml
0	7	0,4
3	6,6	1,43
6	6,8	2,03
9	6,8	2,31
13	6,7	2,8
16	6,7	4,53
21	6,8	5,22

**Tableau 5.X ; Résultats de la variation de la cinétique de croissance (croissance sur milieu BH à 30°C pendant 21 jours d'incubation de la souche LB) et du pH en fonction de temps.**

Temps (jours)	pH	Log UFC/ml
0	7	0,5
3	6,8	1,97
6	6,8	2,66
9	7	4,76
13	6,9	5,01
16	6,8	6,03
21	6,7	6,62

- Evolution de la tension superficielle

**Tableau 5. XI: Résultats de la variation de la tension superficielle en fonction du temps (Croissance des deux souches SA et LB sur milieu BH à 30°C pendant 21 jours d'incubation).**

Temps (jours)	T.S mN/m souche SA	T.S mN/m souche LB
0	72	72
3	57	57
6	53	48
9	45	39
13	38	36
16	36	36
21	36	36

- Evolution du taux de biodégradation du gasoil

**Tableau 5. XII: Résultats du calcul de pourcentage de biodégradation du gasoil après 21 jours d'incubation des deux souches SA et LB sur milieu BH à 30°C.**

<i>n</i> -alcanes	% Biodégradation	
	Souche SA	Souche LB
<i>n</i> -C10	67,68	58,77
<i>n</i> -C11	38,53	28,23
<i>n</i> -C12	40,05	30,94
<i>n</i> -C13	37,89	31,96
<i>n</i> -C14	30,97	27,82
<i>n</i> -C15	23,42	24,73
<i>n</i> -C16	20,3	31,13
<i>n</i> -C17	22,62	31,29
<i>n</i> -C18	10,67	24,03
<i>n</i> -C19	17,23	33,31
<i>n</i> -C20	20,11	37,9
<i>n</i> -C21	17,34	41,62
<i>n</i> -C22	15,63	33,27
<i>n</i> -C23	17,54	34,39
<i>n</i> -C24	2,62	22,94
<i>n</i> -C25	15,12	26,88
Pristane	2,76	17,67
Phytane	0	10,05

## Annexe 6:

### Résultats expérimentaux de la chromatographie

#### a) Spectres chromatographiques

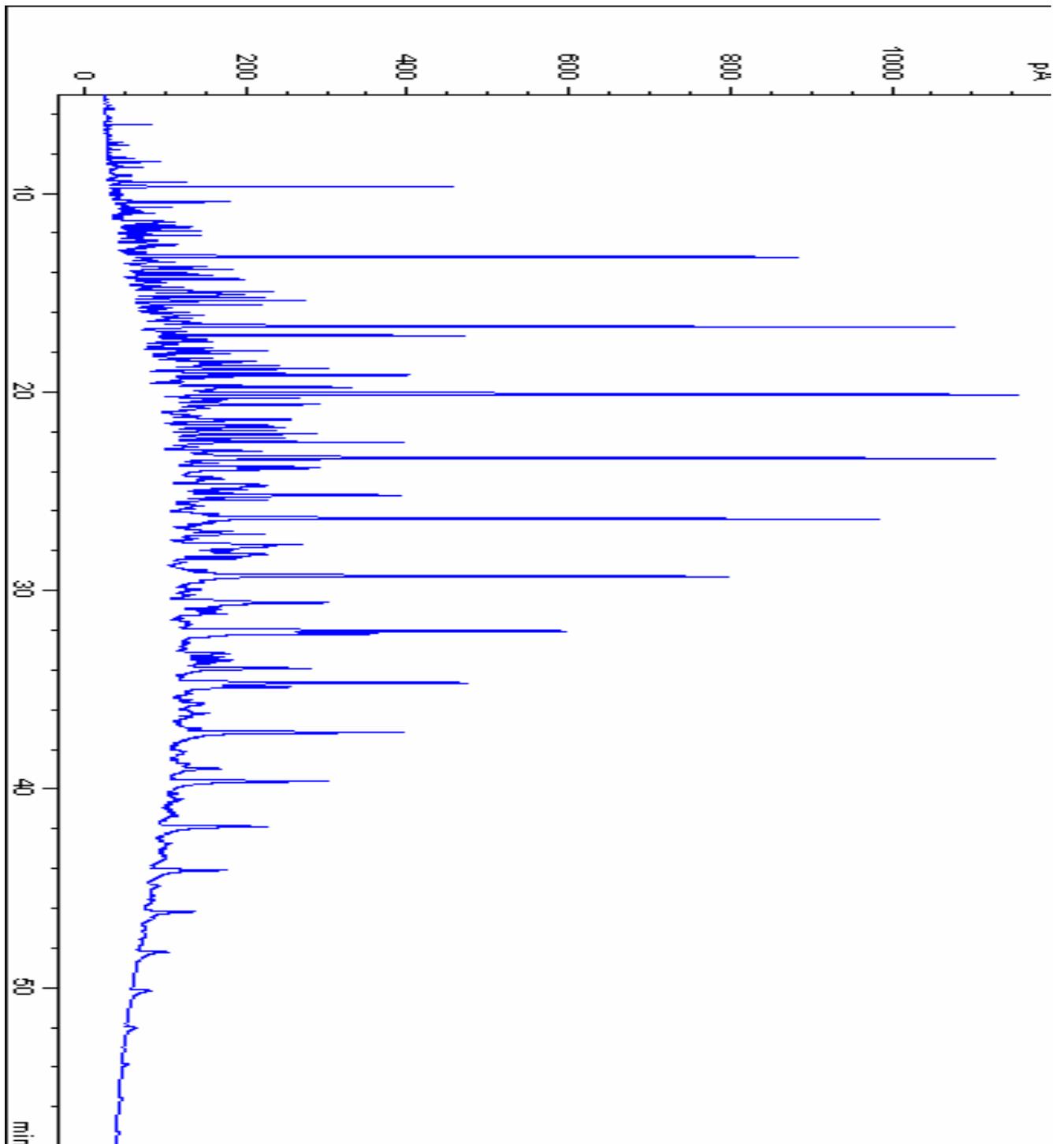


Figure 6.1 : Spectre chromatographique de l'échantillon de gasoil

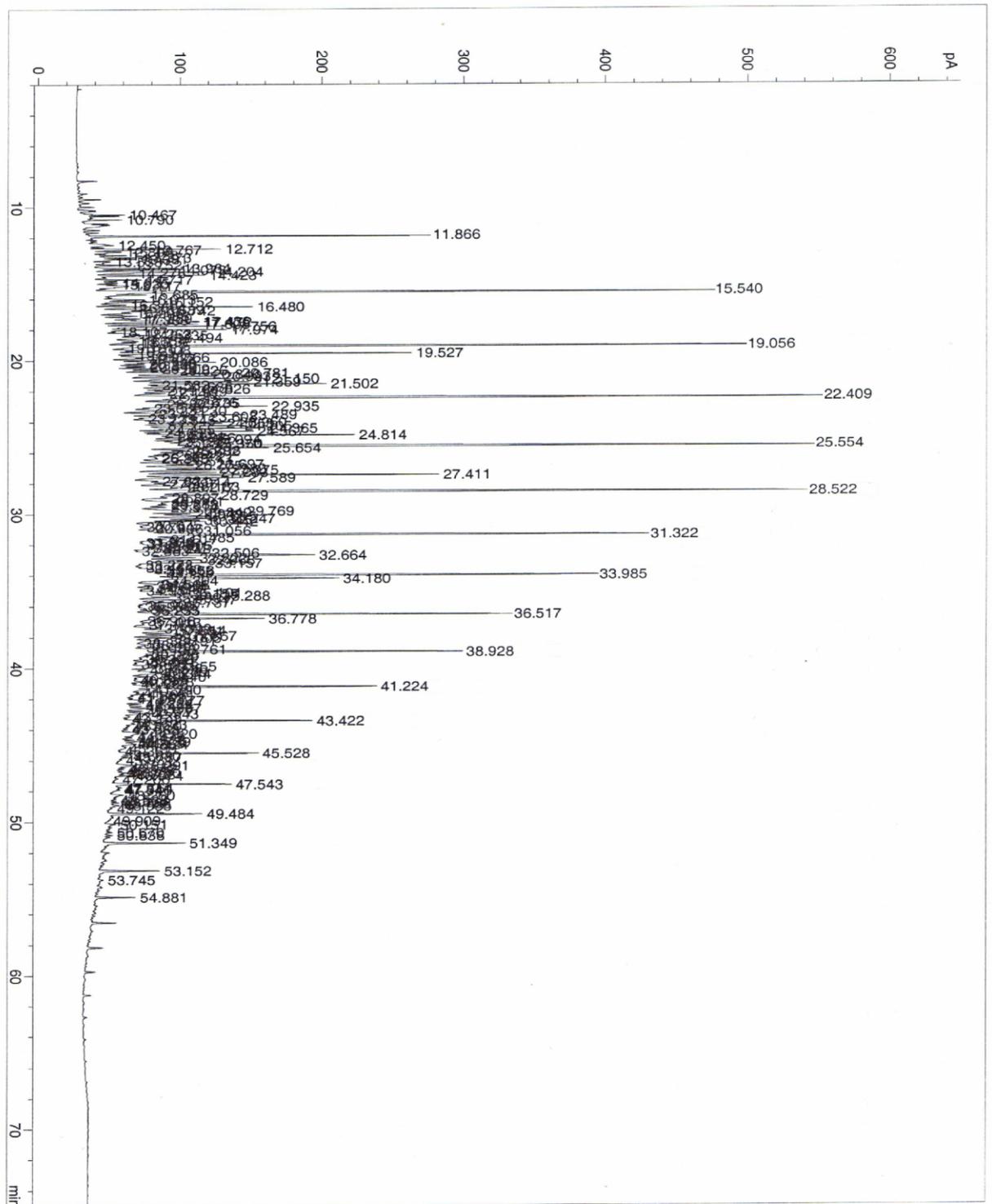


Figure 6.2 : Spectre chromatographique de la souche SA (jour 21)

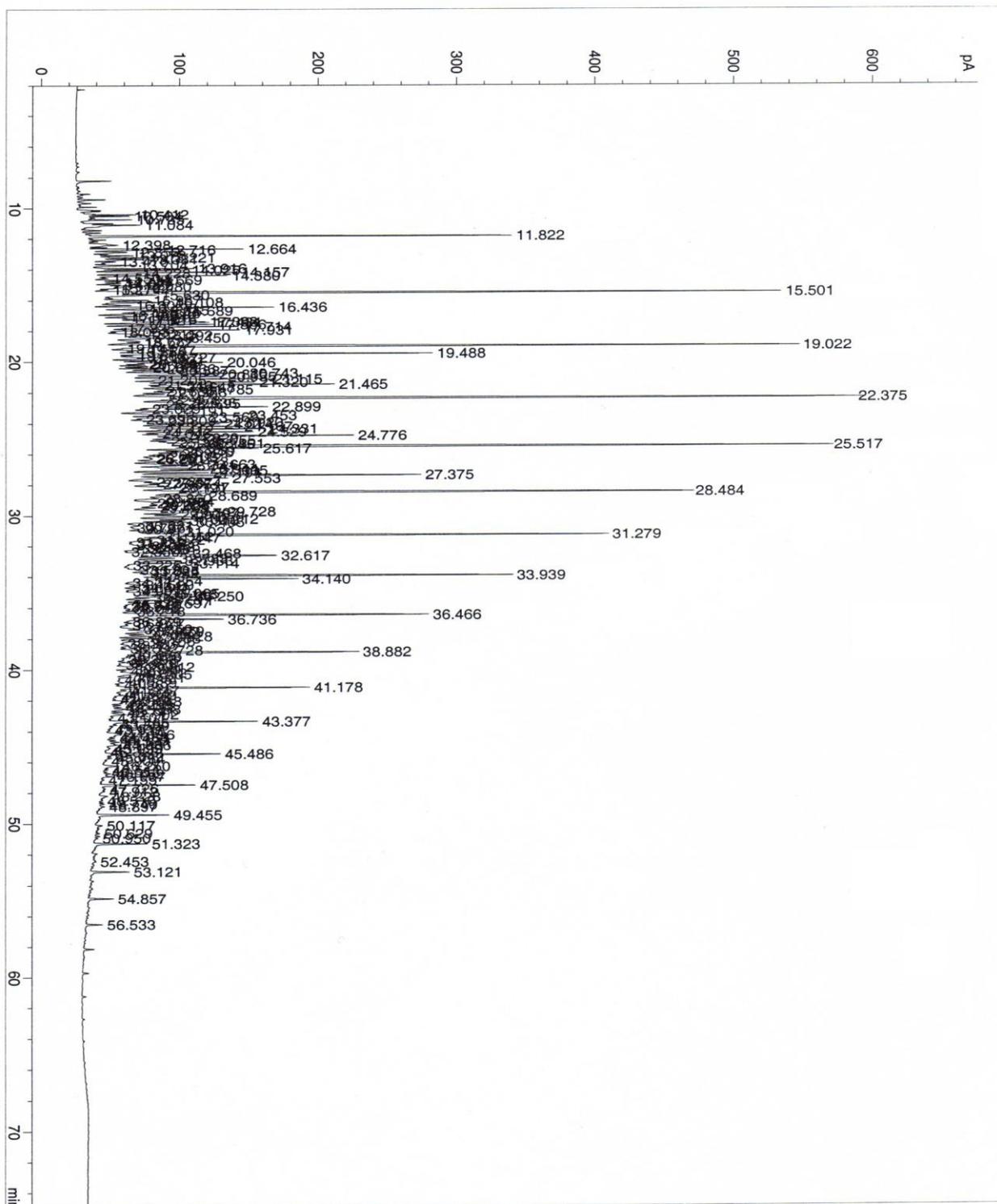


Figure 6.3 : Spectre chromatographique de la souche LB (jour 21)

## B) Résultats expérimentaux de la chromatographie :

n-alcanes	Gasoil		Souche SA		Souche LB	
	Temps de rétention	Surface %	Temps de rétention	Surface %	Temps de rétention	Surface %
<b>C10</b>	14.07	2.494	11.866	0.806	11.822	1.028
<b>C11</b>	16.902	3.157	15.540	1.940	15.501	2.265
<b>C12</b>	19.482	3.652	19.056	2.189	19.022	2.522
<b>C13</b>	21.879	4.733	22.409	2.939	22.375	3.220
<b>C14</b>	24.117	4.100	25.554	2.830	25.517	2.959
<b>C15</b>	26.215	3.663	28.522	2.805	28.484	2.757
<b>C16</b>	28.201	2.868	31.322	2.285	31.279	1.975
<b>C17</b>	30.075	2.434	33.985	1.883	33.939	1.672
<b>C18</b>	31.861	2.053	36.517	1.834	36.466	1.559
<b>C19</b>	33.565	1.740	38.928	1.440	38.882	1.160
<b>C20</b>	35.193	1.510	41.224	1.206	41.178	0.938
<b>C21</b>	36.744	1.078	43.422	0.891	43.377	0.629
<b>C22</b>	38.230	0.790	45.528	0.666	45.486	0.527
<b>C23</b>	39.658	0.619	47.543	0.510	47.508	0.406
<b>C24</b>	41.039	0.429	49.484	0.417	49.455	0.330
<b>C25</b>	42.614	0.352	51.349	0.298	51.323	0.257
<b>Pristane</b>	30.175	1.035	34.180	1.006	34.140	0.852
<b>phytane</b>	32.020	0.789	36.778	0.833	36.736	0.709

## Annexe 7:

### NORMES ET REGLEMENTATION EN MATIERE DE PROTECTION DES SOLS

En Algérie les grands principes qui régissent la réglementation en matière de protection du sol et du sous-sol sont formulés par les textes suivants :

- La loi n°83-03 du 05/02/1993, prend en considération la pollution du sol. Le législateur définit les déchets et pose les principes et les règles générales de leur gestion.

Concernant cette dernière, la loi fait obligation à tout détenteur ou producteur de déchets d'assurer ou de faire assurer leur élimination en évitant seulement, et non en supprimant, les effets néfastes sur le sol, la faune, la flore, etc...

- Le décret exécutif n°93-160 du 10/07/1993, réglemente le déversement des huiles et lubrifiants aussi bien dans le milieu naturel que dans le réseau d'assainissement.
- Le décret exécutif n°93-162 du 10/07/1993, fixe les modalités de récupération et de traitement des huiles usagées.

- Le décret exécutif n°94-43 du 30/01/1994, fixe les règles de conservation des gisements d'hydrocarbures et de protection des aquifères.

L'Algérie a fixé des normes de rejets des eaux industrielles et en particulier des huiles, mais jusqu'à présent les normes et les seuils de contamination des sols et des eaux souterraines n'ont pas été établis. (Voir tableau 7.I).

Parmi les normes fixées qui définissent pour chaque polluant une valeur seuil facilitant les prises de décision et permettant de dire qu'un sol doit être dépollué ou non, sont celles établies par la Hollande représentés par le tableau 7.II.

**Tableau 7. I: Valeurs limites maximales des paramètres de rejets des installations de déversement en Algérie (J.O.R.A, 1993)**

<b>Paramètres</b>	<b>Valeurs maximales</b>
<b>Huiles et graisses</b>	<b>20 mg/l</b>
<b>Hydrocarbures</b>	<b>20 mg/l</b>
<b>Phénols</b>	<b>0.5 mg/l</b>
<b>Solvant organique</b>	<b>20 mg/l</b>
<b>Chlore actif</b>	<b>0.1 mg/l</b>
<b>PCB</b>	<b>0.001 mg/l</b>
<b>Détergents</b>	<b>0.2 mg/l</b>
<b>Tensioactifs anioniques</b>	<b>10 mg/l</b>

Le problème posé par de telles normes est qu'elles ne tiennent pas compte de :

- L'Etat du sol avant pollution (les bruits de fond géochimiques) ;
- L'utilisation ultérieure du sol ;
- La vulnérabilité du site (la proximité d'une nappe phréatique),

Les avantages de l'approche hollandaise sont :

- La simplicité d'emploi tant pour le diagnostic que pour les objectifs de traitement ;
- Sa valeur exutoire lorsqu'elle est reconnue ;

**Tableau 7. II : Normes hollandaises de qualité des sols (Gatelier, 1992).**

mg/Kg de matière sèche	<b>A</b> Seuil de référence	<b>B</b> Seuil de risque	<b>C</b> Seuil de danger
<b>COMPOSES AROMATIQUES</b>			
Benzène	0.01	0.5	5
Ethylbenzène	0.05	5	50
Toluène	0.05	3	30
Xylène	0.05	5	50
Phénol	0.02	1	10
Total composés aromatiques	0.1	7	70
<b>HYDROCARBURES POLYCYCLIQUES (HAP)</b>			
Naphtalène	0.01	5	50
Anthracène	0.1	10	100
Phénanthrène	0.1	10	100
Fluoranthène	0.1	10	100
Pyrène	0.1	10	100
Benzo(a)pyrène	0.05	1	10
Total HAP	1	20	200

## Annexe 8

Tableau 8.I: Caractéristiques physico-chimiques des gasoils

Caractéristiques physico-chimiques	Gasoil Algérien	Gasoil sans soufre NF EN 590 : 2004	Spécifications du gasoil Norme Algérienne NA 8110-1992
Densité à 15°C, g/cm <sup>3</sup>	<b>0.8321</b>	De 0.820 à 0.845	de 0.810 à 0.860 g/cm <sup>3</sup>
°API	38.4		
Viscosité Cinématique en cSt, à :			9 cSt Max
✚ 20°C	<b>4.615</b>		
✚ 37.8°C	2.960		
✚ 40°C	2.001	De 2.00 à 4.50 mm <sup>2</sup> /s	
Point d'écoulement, °C	<b>-29</b>		Hiver -12 °C max
Point de congélation, °C	-32		{ Eté -7°C Max
Point d'éclair, °C	<b>89.8</b>		{ 55°C min
Indice d'acidité, mg KOH/g	0.859		
Teneur en Soufre	<b>734 ppm</b>	10.0 mg/kg max	2500 ppm Max
Teneur en eau et sédiments, BSW, %Vol	<0.1		Traces non dosables
Teneur en eau par extraction, %Vol	<b>Nulle</b>	max 200 mg/kg	2.5 Max
Couleur ASTM	<b>4.5L</b>		
Corrosion à la lame de Cuivre (3h à 50°C)	1a	classe 1	
Indice de Cétane	<b>55.3</b>	min 51.0 (mesuré) min 46.0 (calculé)	48 Min
Température Limite de Filtrabilité, °C	-16	Classe E (max -15°C) Classe B (max °C)	
Facteur de caractérisation, Kuop	11.90		
Poids moléculaire, g / mole	208		
Pouvoir Calorifique Supérieur, Kcal/ Kg	10 940		
Distillation ASTM			
✚ Point initial, °C	207.9		
5 % Vol	222.7		
10 "	230.1		
20 "	239.9		
30 "	249.5		
40 "	259.6		
50 "	270.8		
60 "	282.5		
70 "	296.2		
80 "	312.7		
90 "	336.2		
95 "	355.8		
✚ Point Final, °C	362.9		
✚ Distillat, % Vol	98.5		
✚ Résidu "	0.6		
✚ Pertes "	0.9		
		% (v/v) récupéré à 350 °C : 85% min	65% Vol 250°C Min 90% Vol 350°C Max Point Final 390°C Max

