

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
*Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique*  
*Université M'hamed Bougara de Boumerdès*  
*Faculté des sciences de la Nature et de la Vie*  
*Département de Biologie*



## Mémoire de master académique

*Filière : Biotechnologie*  
*Spécialité : Biotechnologie microbienne*

### *Intitulé*

# Recherche des souches bactériennes d'intérêts dans l'industrie pétrolière

*Présenté par :*

**Benamara Loubna**

**Cherdoune Chaima**

**Nedjar Nour el houda**

*Devant le jury composé de:*

**Présidente : M<sup>me</sup> Mohand Kaci**      MCA (UMBB)

**Promotrice : M<sup>me</sup> Benzina**      MCA (UMBB)

**Examinatrice : M<sup>me</sup> Ait kaki**      MCA (UMBB)

Date de soutenance : 22 Octobre 2020

Année universitaire 2019-2020

## *Remerciements*

*Nous commençons par remercier Dieu le tout puissant de nous donné le courage, volonté, l'amour du savoir et surtout la patience pour produire*

*ce*

*modeste travail*

*C'est pour nous autant de plaisir qu'un devoir d'exprimer notre gratitude*

*et notre reconnaissance à Mme BENZINA FARIDA qui nous a orienté et guidé à*

*fin de mener à bien ce travail.*

*Nous remercions aussi très sincèrement les membres de jury la présidente*

*Mme Mohand Kaci et Mme Ait Kaki qui nous ont fait l'honneur d'évaluer ce travail.*

*Nous voudrions aussi témoigner notre reconnaissance et exprimer toute notre gratitude à nous enseignants qui ont participé pour une grande*

*part dans*

*notre cursus.*

*Enfin, nous tenons à remercier toute personne qui a contribué de près*

*ou*

*de loin à la réalisation de ce modeste travail et à tous ceux qui nous ont*

*apporté*

*leur aide.*

---

## *Dédicace*

*Du plus fond du cœur et avec l'intensité de mes émotions, J'offre ce modeste travail :*

*A ceux qui m'ont mis au monde, que je respect et qui M'honorent, ma mère fouzia qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi et mon père Nacer.*

*A mon cher frère Sofiane et mes chères sœurs Nassima et Naila. Pour vos sourires qui font ma joie dans les moments heureux et qui me donnent le courage de continuer dans les moments difficiles.*

*Merci d'être toujours à mes côtés. Que Dieu nous garde toujours unies.*

*A mes cousins et cousines : Khadidja, Moufida, Amira, Achouak, Sanaà, hayem, Lotfi, Ramy, Naim, Mohamed et Youcef.*

*A ma grande famille qui sont nombreux et que je ne citerai pas ici volontairement de peur d'oublier l'un d'entre eux avec tout mon respect.*

*A tous mes amies et en particulier Neama, Roumaissa, Fairouz, Ibtissam, Sarah Hind et Rima Pour tous les moments que nous avons partagés durant ces années des plus difficiles aux meilleurs, en espérant pouvoir en partager encore tant d'autres.*

*A Ceux qui sont la source de mon inspiration et mon courage. Ceux qui m'ont encouragé et soutenu moralement et matériellement pendant les moments les plus difficiles et durant mes études.*

*A Ceux que J'aime et qui m'aiment.*

*Houda*



## *Dédicaces*

*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 patiente, compréhensif et encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort*

*A*

*Mes grande mère Messaouda et Rabeh et mes grande père Ali et Ali Merci pour leur présence, leur aide, leur compréhension et leur amour*

*A*

*Mes sœurs Wided, Chourouk, Hiba, Ritaj, et mes frère Salah et Ayoub*

*Mes proches, toute ma famille mes tantes Zozo, Aicha, Lila, Rachida, Farida, Fatima, Meriem, Hanane, Samra, Jamila, Cher oncle Abd Elmadjid et tous mes amies Sarah, Bouchera, Youssra, Sihem, Amira, Asma, Roumaissa, wissem, boutheina. Merci pour leurs amour et d'être toujours à mes côtés Ainsi qu'à tous ceux qui sont cher*

**Chaima**



## *Dédicace*

*Du plus fond du cœur et avec l'intensité de mes émotions, J'offre  
ce modeste travail :*

*A ceux qui m'ont mis au monde, que je respect et qui  
M'honorent, ma mère Sadjia qui n'a pas cessé de m'encourager et de  
prier pour moi et mon père Mohamed.*

*A mes chers frères Okba, Lounesse et Ali et mes chères sœurs  
Zahra, Soumia et Yousra.*

*A ma nièce Maram et mon neveu Anes  
Pour vos sourires qui font ma joie dans les moments heureux et qui  
me donnent le courage de continuer dans les moments difficiles.  
Merci d'être toujours à mes côtés. Que Dieu nous garde toujours  
unies. A ma grande famille qui sont nombreux et que je ne citerai  
pas ici volontairement de peur  
d'oublier l'un d'entre eux avec tout mon respect.*

*A tous mes amies et en particulier  
Amina Roumisa Bouchra Merieme Amina Noura Sara Rania  
Imane  
Rania*

*A mon bonheur Mohamed  
Pour tous les moments que nous avons partagés durant ces années  
des plus difficiles aux meilleurs, en espérant pouvoir en partager  
encore tant d'autres.*

*Ceux qui m'ont encouragé et soutenu moralement et matériellement  
pendant les moments les plus difficiles et durant mes études.*

*A Ceux que J'aime et qui m'aiment.*

**Loubna**



## Sommaire

<b>Introduction Générale.....</b>	<b>1</b>
<b>I. Synthèse bibliographique .....</b>	<b>3</b>
<b>I.1 INTRODUCTION .....</b>	<b>3</b>
<b>I.2 LES CONSTITUANTS DU SOL .....</b>	<b>4</b>
I.2.1 PHASE SOLIDE.....	4
I.2.2 PHASE LIQUIDE .....	4
I.2.3 PHASE GAZEUSE .....	4
I.2.4 ORGANISMES VIVANTS .....	4
<b>I.3 PROPRIETES DU SOL.....</b>	<b>4</b>
I.3.1 PROPRIETES PHYSIQUES .....	4
I.3.1.1 Structure du sol.....	4
I.3.1.2 Texture du sol.....	4
I.3.1.3 Perméabilité du sol.....	4
I.3.1.4 Porosité du sol.....	5
I.3.2 PROPRIETES CHIMIQUES .....	5
I.3.2.1 Potentiel d'hydrogène (pH).....	5
I.3.2.2 Conductivité électrique .....	5
I.3.2.3 Matière organique .....	5
I.3.3 PROPRIETES BIOLOGIQUES .....	5
<b>I.4 POLLUTION DU SOL.....</b>	<b>6</b>
I.4.1 HYDROCARBURES .....	6
I.4.1.1 Classification.....	7
a) Hydrocarbures aromatique .....	7
b) Hydrocarbures aliphatiques.....	7
I.4.1.2 Origines des hydrocarbures .....	8
I.4.1.3 Devenir des hydrocarbures dans l'environnement .....	9
a) Volatilisation .....	9
b) Transformation.....	9
c) Biodégradation .....	9
<b>I.5 METHODES DE TRAITEMENTS DE SOLS CONTAMINES PAR LES HYDROCARBURES.....</b>	<b>9</b>
I.5.1 METHODES PHYSIQUES.....	10
I.5.1.1 Les procédés physiques par évacuation.....	10
a) Excavation.....	10
b) Stripping.....	10
I.5.1.2 Les procédés physiques par piégeage.....	10
a) Le confinement.....	10
b) Stabilisation-solidification .....	11
I.5.2 METHODES THERMIQUES.....	11
I.5.2.1 Incinération.....	11
I.5.2.2 Désorption thermique.....	11
I.5.3 METHODES CHIMIQUES .....	12
I.5.3.1 Oxydation chimique .....	12
I.5.3.2 Mobilisation et d'extraction.....	12
I.5.4 METHODES BIOLOGIQUES.....	13
I.5.4.1 Phytoremédiation .....	14
I.5.4.2 Bioaugmentation .....	14

---

I.5.4.3 Biostimulation .....	16
<b>I.6 MICROORGANISMES UTILISES DANS LA DEGRADATION DES HYDROCARBURES.....</b>	<b>16</b>
I.6.1 BACTERIES.....	17
I.6.2 CHAMPIGNONS .....	17
I.6.3 ACTINOMYCETES.....	18

## **II. Matériel et méthodes..... 19**

<b>II.1 PRESENTATION DE LA REGION D'ETUDE ET LE SITE DU PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS</b>	<b>19</b>
<b>II.2 MATERIEL .....</b>	<b>20</b>
II.2.1 MATERIEL BIOLOGIQUE.....	20
II.2.2 MATERIEL NON BIOLOGIQUE.....	20
<b>II.3 METHODES .....</b>	<b>20</b>
II.3.1 METHODE D'ECHANTILLONNAGE.....	20
II.3.2 METHODES D'ANALYSES .....	20
II.3.2.1 Analyses physicochimiques du sol.....	20
II.3.2.1.1 Préparation du lixiviat de l'échantillon du sol.....	21
II.3.2.1.2 Caractérisations physico-chimiques .....	21
a) Le potentiel d'hydrogène (pH).....	21
b) Conductivité électrique (CE).....	21
c) Dosage des sulfates.....	22
d) Nitrate .....	22
e) Nitrite .....	23
f) Azote ammoniacal .....	23
g) Phosphate .....	24
h) Azote total.....	24
i) Matière en suspension (MES) .....	25
j) Détermination de la DCO.....	26
k) Carbone Organique Total (COT).....	27
II.3.2.2 Analyses microbiologiques du sol.....	28
II.3.2.2.1 Isolement et caractérisation des micro-organismes du sol pollué .....	28
II.3.2.2.2 Criblage d'isolats Productifs du biosurfactant et dégradants les hydrocarbures .....	29
a) Mesure de la production des biosurfactants et des bioémulsifiants .....	29
b) Caractérisation des biosurfactants .....	29
II.3.2.2.3 Identification des isolats .....	30
II.3.2.2.3.1 Etude morphologique .....	30
a) Aspect macroscopique.....	30
b) Aspect microscopique.....	30
c) Coloration de Gram .....	31
d) Recherche de spores.....	31
II.3.2.2.3.2 Etude biochimique.....	31
a) API 20E .....	31
b) La galerie API 20NE.....	31
II.3.2.2.3.3 Etude moléculaire.....	32
a) Le Séquençage.....	32
II.3.2.2.4 Essais de dégradation des hydrocarbures .....	32
a) Par la mesure de la densité optique et la croissance microbienne .....	32
b) Par la méthode gravimétrique .....	32
c) Par chromatographie en phase gazeuse .....	33
II.3.2.2.5 Méthodes d'analyses de la concentration des hydrocarbures .....	33

---

II.3.2.2.6 Analyse statistique .....	34
--------------------------------------	----

**III. Résultats et discussion..... 35**

**III.1 RESULTATS..... 35**

III.1.1 ANALYSES PHYSICOCHIMIQUES DU SOL .....	35
--	----

III.1.2 ANALYSES MICROBIOLOGIQUES DU SOL .....	36
--	----

III.1.2.1 Isolement des bactéries du sol contaminé : .....	36
--	----

III.1.2.2 Criblage d'isolats productifs du biosurfactantset dégradants les hydrocarbures.....	36
---	----

a) Mesure de la production du biosurfactant et du bioémulsifiant .....	37
--	----

b) Caractérisation des biosurfactants.....	38
--	----

III.1.2.3 Identification des isolats.....	39
---	----

III.1.2.3.1 Etude morphologique et biochimique. ....	39
--	----

III.1.2.3.2 Etude moléculaire.....	41
------------------------------------	----

III.1.2.3.3 La cinétique de croissance des isolats purifiés.....	42
--	----

III.1.2.3.4 Détermination de la biodégradation des hydrocarbures par la méthode gravimétrique .....	43
---	----

III.1.2.3.5 Analyse de la biodégradation des hydrocarbures par chromatographie en phase gazeuse	44
---	----

III.1.2.4 Méthode d'analyse de la concentration des hydrocarbures .....	45
---	----

**III.2 DISCUSSION ..... 46**

**IV. Conclusion et perspectives..... 52**

BIBLIOGRAPHIE .....	
---------------------	--

ANNEXE.....	
-------------	--

RESUME .....	
--------------	--



## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Proportion des principaux composants du sol .....	3
<b>Figure 2:</b> A : Carte de l'Algérie représente la région d'étude ; B : région d'échantillonnage du sol contaminé par les hydrocarbures pétroliers – raffinerie. Le point rouge indique le site de l'échantillonnage .....	19
<b>Figure 3 :</b> Etat des bourbiers dans le champ de Hassi Messaoud.....	20
<b>Figure 4 :</b> Technique de préparation et de récupération du lixiviat .....	21
<b>Figure 5 :</b> Cercle de dissolution d'hydrocarbure formé sur une plaque de gélose à l'hydrocarbur .....	37
<b>Figure 6 :</b> La capacité émulsifiante et de dégradation d'hydrocarbures des 19 isolats isolés.....	38
<b>Figure 7:</b> les caractéristiques macroscopiques (1a et 2c) et microscopiques après coloration de Gram (1b et 2d) observés sous microscope optique au (Gx100) pour les isolats B2 et P1 respectivement.....	39
<b>Figure 8 :</b> L'arbre phylogénique basée sur le séquençage d'ADNr 16s des souches isolées.....	42
<b>Figure 9:</b> Courbe de croissance des isolats P1 et B2 en bouillon BH supplémenté avec 2% d'hydrocarbure .....	43
<b>Figure 10 :</b> Le suivie de la concentration microbienne des isolats en présence d'hydrocarbure pendant 12 jours d'incubation.....	43
<b>Figure 11 :</b> Taux de dégradation des hydrocarbures par les isolats bactériens après 12 jours d'incubation.....	44
<b>Figure 12:</b> l'analyse GC-FID d'hydrocarbure obtenu avant (A) et après traitement avec des isolats microbiens pendant 5 jours d'incubation: P1 (B) et B2 (C) .....	44

---

---

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Microorganismes capables de dégrader les hydrocarbures pétroliers.....	14
<b>Tableau 2 :</b> Résultats des analyses physico-chimiques du sol .....	35
<b>Tableau 3 :</b> La relation entre la CCM et la méthode réaction phénol-acide sulfurique .....	38
<b>Tableau 4 :</b> Les caractéristiques de souches P1 et B2 isolées du sol contaminé .....	40



## **Liste des annexes**

**Annexe 01** : Matériel et réactifs utilisés

**Annexe 02** : Composition des milieux de cultures utilise

**Annexe 03** : Présentation des galeries API 20 E et API 20NE

**Annexe 04** : Etude morphologique (État frais, Coloration de Gram)



## Liste des abréviations

**P1** : *Pseudomonas aeruginosa*

**Cot** : Carbone organique total

**B2** : *Brevibacillus laterosporus*

**Ce** : Conductivité électrique

**BNA** : Bouillon d'agar nutritif au sang

**TSB** : *Bouillon Tryptone Soja*

**T** : Téhéran

**MES** : Matière en suspension

**E** : Ispahan

**UV** : Ultra-Violet

**E24** : L'indice d'émulsion (24%)

**CCM** : Chromatographie sur couche mince

**Rf** : Facteur de retard

**BH**: Bushnell and Haas

**BLAST**: Basic Local Alignment Search Tool

**ARNr 16S**: l'ARN ribosomal 16S

**CPG-FID** : Chromatographie en phase gazeuse

à détection par ionisation de flamme

**DCO** : Demande Chimique en Oxygène.

**HAPs** : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.

**pH** : Potentiel d'Hydrogène

**UFC** : Unité formant colonie

**DO<sub>600</sub>**: La densité optique à 600 nm

**BMS** : Milieu salin basal

**GC-MS** : Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse

**CRD** : Centre De Recherche Et De Développement

---

### Introduction

La pollution des sols par les hydrocarbures, qu'elle soit chronique ou accidentelle constitue l'un des phénomènes de pollution les plus préoccupants car elle ne cesse de se développer du fait que ces derniers jouent un rôle stratégique et politique sur la scène mondiale au tant qu'une matière première pour l'industrie chimique et comme source d'énergie très utilisée (elle présente l'avantage qu'elle est non onéreuse), cette pollution constitue une menace très sérieuse pour l'environnement et peut avoir un impact soit direct ou indirect, sur l'équilibre des écosystèmes (**Benchouk, 2017**).

L'Algérie est considérée comme un des grands pays producteurs et explorateurs des hydrocarbures ce qui entraîne des risques de pollution autour de toute installation dues à l'extraction, le transport et l'utilisation et au déversement des hydrocarbures lors du remplissage des cuves de la station et lors de la distribution de cette source (**Ali ahmed, 2011**).

La prise de conscience des risques conduit de la pollution par les hydrocarbures nécessite d'établir des diagnostics de pollution et de mettre en œuvre des moyens de réhabilitation. Les procédés de dépollution faisant appel à différents techniques (thermiques, physiques et chimiques) ont été largement pratiqués mais présentent l'inconvénient qu'elles sont très coûteuses et requièrent des ressources matérielles énormes et peuvent entraîner des pollutions supplémentaires. Pour cette raison, le mérite d'augmenter les connaissances scientifiques sur le développement de nouveaux moyens de lutte et de prévention (**Lecomte, 1998**) à l'exemple des techniques biologiques curatives qui présentent l'avantage qu'elles s'adressent à un grand nombre de polluants organiques et inorganiques, peu onéreuses et n'influent pas l'équilibre des écosystèmes. Ces techniques biologiques sont nommées la biodégradation puisque elles font appel à des organismes vivants (**Koller, 2004**).

Le recours aux bioprocédés, fondés sur l'emploi de microorganismes capables de dégrader les hydrocarbures et en particulier les bactéries est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement et peut constituer une alternative dans la mesure où ils sont efficaces, rentables, économiques et écologiques. Il s'agit là d'une technique douce dont le principe se repose sur la minéralisation complète des produits

pétroliers sans génération d'aucun produit toxique contrairement aux procédés physiques, chimiques et thermiques.

Avant d'opter pour à un biotraitement plusieurs paramètres doivent être mis en charge notant à titre d'exemple : le type d'agent biologique utilisé (conditions de croissance associées) ainsi que sa capacité de dégrader les hydrocarbures, type du processus de dégradation impliqué, présence de proportion suffisante de nutriments, les propriétés physicochimiques du sol tels que l'humidité, le pH, le taux d'oxygène, la disponibilité des nutriments, la nature et la quantité du polluant (Akmouci-Toumi, 2009 ).

La biodégradation des hydrocarbures est observée en aérobie et en anaérobie, et la vitesse peut être augmentée par l'ajout de bactéries produisant des biosurfactants, car le facteur exogène est un élément crucial pour progresser la biodisponibilité des polluants et donc être dégradé efficacement ; Ce processus peut être renforcé par la bioaugmentation ou la biostimulation.

Plusieurs espèces bactériennes sont recensées et qualifiées aptes à dégrader des hydrocarbures tel que *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus* spp. Ces microorganismes qui jouent un rôle fondamental dans la bioremédiation.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude dont l'objectif principal est de rechercher les souches bactériennes d'intérêts dans l'industrie pétrolier isolées de bourbiers au niveau des raffineries de Hassi Messaoud. La réalisation de ce mémoire est arrangée en trois chapitres : le premier chapitre présente une synthèse bibliographique portant sur la pollution des sols par les hydrocarbures, leur classification, leur comportement dans le sol, leurs effets à différentes échelles, ainsi que les méthodes de décontamination, le second chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisés. Nous avons réussi à faire la partie pratique qui concerne les caractéristiques physicochimiques du sol cependant la partie microbiologique concernant l'isolement, l'identification et la capacité de dégradation des hydrocarbures par isolats microbiens n'a pas pu être réalisée en raison de situation actuelle de Covid19 on la fait accordant à des articles traités. Un troisième chapitre consacré aux résultats et discussion fait par la synthèse des travaux de recherche entrepris sur notre thématique qui sera suivi d'une conclusion et perspectives.

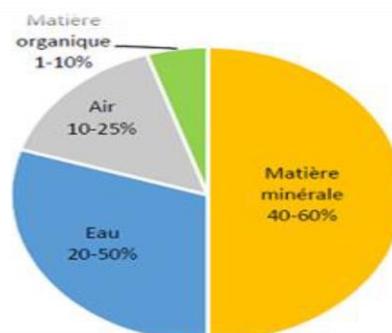
## I. Synthèse bibliographique

### I.1 Introduction

Les sols constituent l'une des ressources naturelles essentielles de la terre, cependant ils sont souvent considérés comme acquis. Ces derniers ainsi que leurs fonctions au sein d'un écosystème varient fortement d'un endroit à un autre à cause de nombreux facteurs comme les différences du climat, les matériaux dont ils sont issus, et la position du sol au sein de son environnement. Les scientifiques prennent en compte les propriétés physiques et chimiques d'un sol, ainsi que sa température et son humidité (**Demenois, 2019**).

Le comportement d'un polluant dans un sol dépend à la fois de ses propriétés physico-chimiques et de celles du sol, parmi les polluants majeurs, on cite les hydrocarbures ; Leur présence dans les sols est généralement associée aux activités de production de gaz (cokeries, anciennes usines à gaz), de raffinage du pétrole ou de traitement du bois. Le traitement adapté des terres polluées, a pour but de limiter ou stopper le développement d'une pollution, de protéger l'environnement, ou de rendre une valeur d'usage à un terrain agricole, industriel ou habitable (**Lipinska et al., 2014**).

La science qui étudie les sols, leur formation, leur constitution et leur évolution, est la pédologie. Le sol est la couche superficielle minérale et / ou organique de la terre qui a subi un certain degré d'altération physique, biologique et chimique (**Atlas et al., 1992**). Il est composé de particules minérales, de matière organique, d'eau, d'air et d'organismes vivants organisés en horizons génétiques du sol (**Iso, 2013**). La figure ci-dessous représente les fractions des principaux composants du sol.



**Figure 1:** Proportion des principaux composants du sol (**Mazziotti, 2017**).

## I.2 Les Constituants du sol

### I.2.1 Phase solide

Elle se compose par des constituants minéraux qui sont classés selon la grosseur ou la composition minérale (pierres, gravier, sable, limon et argile) et organiques provenant des résidus végétaux et des animaux (**Finch et al., 2014**).

### I.2.2 Phase liquide

Elle est constituée par l'eau (**Finch et al., 2014**) qui contient des substances dissoutes organiques et non organiques, ionisé et non ionisée (**Raoul, 2003**).

### I.2.3 Phase gazeuse

Elle est encore appelée l'atmosphère du sol est composé en général d'oxygène, du gaz carbonique et d'azote (**Calvet, 2003**), elle occupe une quantité variable des espaces poreux. (**Finch et al., 2014**).

### I.2.4 Organismes vivants

Ils sont nombreux et très importants dans la décomposition des résidus organiques et la formation de l'humus. Les principaux groupes sont : les bactéries, les champignons, les actinomycètes, les algues à la surface du sol et les Protozoaires (**Finch et al., 2014**).

## I.3 Propriétés du sol

### I.3.1 Propriétés physiques

#### I.3.1.1 Structure du sol

C'est le mode d'assemblage des particules du sol (sable, limon, argile, matière organique et engrais) en composés poreux, lesquelles se regroupent sous forme de grumeaux ou d'agrégats. Les grands espaces vides entre les agrégats (macropores) permettent à l'eau et à l'air de circuler, et aux racines de s'enfoncer dans le sol (**Kumar Rai, 2017**).

#### I.3.1.2 Texture du sol

La texture indique la teneur relative en particules de différentes tailles comme le sable, le limon et l'argile dans le sol (**Soltner, 2011**). Elle influe la quantité d'eau et d'air qu'il contient et la vitesse à laquelle l'eau peut pénétrer et traverser le sol (**Phan et al., 2008**).

#### I.3.1.3 Perméabilité du sol

La perméabilité d'un sol désigne sa capacité de l'air à se déplacer et d'absorber de l'eau dans le sol, de la retenir ou de la laisser s'infiltrer (**Elhakim, 2016**).

#### **I.3.1.4 Porosité du sol**

La porosité du sol fait référence à la quantité de pores, ou espace ouvert entre les particules de sol, qui contiennent de l'eau et de l'air (**Shicheng *et al.*, 2019**).

### **I.3.2 Propriétés chimiques**

#### **I.3.2.1 Potentiel d'hydrogène (pH)**

La réaction du sol est une indication de l'acidité ou de l'alcalinité du sol. Elle est mesurée en unités de pH. Le pH est un indicateur de la concentration en ions hydrogène (potentiel Hydrogène) dans la solution de sol et permet de définir l'état du complexe absorbant et le taux de saturation (**Mccauley, 2017**).

#### **I.3.2.2 Conductivité électrique**

D'après (**Visconti *et al.*, 2010**), La conductivité électrique est la référence pour évaluer la salinité du sol. Elle exprime la concentration des solutés ionisables présents dans l'échantillon c'est-à-dire le degré de salinité.

#### **I.3.2.3 Matière organique**

La matière organique du sol se compose d'une variété de composants (débris végétaux et animaux à divers stades de décomposition, de cellules et de tissus, des microbes du sol) ; Elle augmente la fertilité du sol et assure la stabilité globale; sa capacité à conserver et fournir au fil du temps les nutriments essentiels tels que l'azote, le phosphore, le carbone, le calcium, le magnésium et potassium et la biodiversité microbienne du sol (**Lindboet al., 2018**).

### **I.3.3 Propriétés biologiques**

Le sol possède un réseau complexe et divers d'organismes vivants, qui ont diverses fonctions et qui peuvent créer un impact sur les propriétés physiques et chimiques du sol.

Il a été classé comme entité vivante dynamique pour l'activité des organismes vivants dont le taux de décomposition dépend de son activité (production de matières organiques, consommation et rupture de matière organique, reproduction).

L'indisponibilité de microbes dans le sol a un impact négatif sur la fertilité du sol, sa productivité et ses propriétés physiologiques.

Le volume des organismes vivants dans le sol est estimée être (<0,5%) à partir de volume total du sol, et malgré sa très petite fraction, elle a des impacts énormes sur les propriétés et les opérations du sol par le flux de nutriments à travers le réseau trophique microbien. La

grande quantité de biomasse microbienne dans le sol a une signification dans la grande diversité des réactions biochimiques résultant de la population microbienne dans le sol.

Les populations microbiennes désintègrent les corps végétaux, animaux et microbiens et sont une source de nourriture pour certains des niveaux supérieurs. La fonction la plus globale des microbes du sol est de reconstituer les réserves de dioxyde de carbone et de décomposer la matière organique. Toutes ces fonctions sont influencées par la profondeur du sol, la matière organique, les nutriments, le microclimat et l'environnement physique et chimique du sol (**Osman et al., 2013**).

#### **I.4 Pollution du sol**

La pollution du sol est connue par la présence d'un produit chimique toxique ou une substance dans le sol avec une concentration plus élevée que l'habitude, qui affecte négativement tout l'organisme vivant (**Rodríguez Eugenio et al., 2018**). Les processus naturels sont considérés comme des causes de pollution des sols, mais la raison principale en est les activités humaines qui causent de grands dommages au système environnemental par le biais de produits chimiques trouvés en quantités excessives tels que les herbicides, les hydrocarbures pétroliers, le naphthalène de plomb et d'autres (**Cachada et al., 2018**).

La Pollution des sols entraîne une baisse de la sécurité alimentaire en raison d'un manque de rendement des cultures et de la production de cultures non éligibles et dangereuses pour la consommation et des dégâts écologiques très grave tels que la pollution des nappes phréatiques (**Rodríguez Eugenio et al., 2018**).

##### **I.4.1 Hydrocarbures**

Les hydrocarbures sont des composés organiques contenant exclusivement des atomes de carbones(C) et de l'hydrogène(H) (**Franennec et al., 1998**). Ils possèdent une formule brute de type  $C_nH_n$  (**Pimsee, 2014**).

Le terme « Hydrocarbures » est une appellation générique qui désigne le pétrole sous toutes ses formes (pétrole brut, le fuel-oil, les résidus d'hydrocarbures et les produits raffinés, huiles minérales, gasoils et essences,...etc.)(**Cabane, 2012**). Ils constituent la fraction la plus importante d'un brut pétrolier, ils représentent entre 65 et 95 % de la plupart des pétroles bruts.

### I.4.1.1 Classification

Seule l'hydrogène et le carbone ont la capacité de constituer des molécules, qu'elles soient saturées ou non saturées, cycliques ou linéaires.

Le pétrole brut est un mélange complexe d'hydrocarbures se divise en plusieurs familles selon leurs structures (aliphatiques, aromatiques) comportant de 1 à 40 atomes de carbone, associés à des composés oxygénés, azotés et sulfurés ou métalliques (**Richard, 2000**).

#### a) Hydrocarbures aromatique

Les hydrocarbures aromatiques sont des polluants organiques comprenant que des hydrocarbures insaturés présentant une faibles solubilité, persistants, aux origines multiples et qui ont un caractère ubiquiste dans l'environnement. Ils représentent 10 à 30% des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier (**Soltani, 2005**).

Les composés aromatiques sont des molécules hydrocarbonées cycliques.

Ils sont principalement divisés en : (a) hydrocarbures aromatiques monocycliques(HAM) à savoir : BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène et xylènes) et (b) hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (**Zenati, 2018**).

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) contiennent plusieurs noyaux aromatiques accolés) (**Lassale et al., 2010**). Les HAP comportant au moins deux cycles benzéniques, le plus simple d'entre eux est le naphthalène composé de 2 cycles et le plus complexe est le coronène (7 cycles) (**Hentati, 2018**).

Ces composés sont figurés dans la liste des substances prioritaires selon l'Agence de Protection de l'Environnement des Etats-Unis (EPA-US) puisqu'ils sont dotés de faible biodégradabilité, d'une hydrophobicité élevée et pour certains d'une forte toxicité (**Hentati, 2018**).

#### b) Hydrocarbures aliphatiques

Les hydrocarbures aliphatiques sont tous les hydrocarbures non aromatiques qui sont des composés constitués de carbone et d'hydrogène a chaine linéaire, saturé ou insaturé.

Les molécules saturées constituées d'une simple liaison entre les atomes de carbones appelés alcanes, et les molécules insaturées possédant une ou plusieurs doubles ou triples liaisons

entre deux atomes de carbone sont de deux types ; les alcènes et les alcynes (**Ali Ahmed, 2011**).

#### **Les alcanes ou paraffines ( $C_nH_{2n+2}$ )**

Les hydrocarbures aliphatiques saturés portent le nom générique d'alcanes. Chaque atome de carbone d'alcane portant de 0 à 3 atomes d'hydrogène (sauf le méthane  $CH_4$ ). Toutes les liaisons carbone-carbone (C-C) sont simples et tous les atomes de carbone sont tétraonaux (**Cortial, 2006**).

#### **Les alcènes ou « oléfine » ( $C_nH_{2n}$ )**

Hydrocarbures insaturés qui présentent un déficit en hydrogène, linéaires ou ramifiés, cycliques ou non qui sont caractérisés par la présence d'au moins une double liaison  $C=C$  (**Cortial, 2006**).

#### **Les alcynes ( $C_nH_{2n-2}$ )**

Hydrocarbures insaturés et linéaires caractérisés par la présence d'une seule triple liaison carbone-carbone (**Cortial, 2006**).

#### **I.4.1.2 Origines des hydrocarbures**

Les hydrocarbures résultent de la dégradation à long terme de la matière organique (d'origine biologique) piégée dans des sédiments. Du fait des mécanismes d'altération, le pétrole déversé dans l'environnement est convertie rapidement (chimiquement et mécaniquement), qu'il empêche l'identification de son origine. Les hydrocarbures dans l'environnement peuvent avoir plusieurs origines:

**Les hydrocarbures fossiles** : dont la formation date d'environ 20 à 350 million d'année. Ils proviennent de l'accumulation et la décomposition de la matière organique en grande quantité localisée dans les sédiments des milieux peu oxygénés.

**Les hydrocarbures actuels** : c'est le résultat de la décomposition de la matière organique en faible quantité par des bactéries dans des zones humides.

**Les rejets industriels et urbain** : qui est les sources d'hydrocarbures pétroliers pyrolytiques (**Soltani, 2005**).

### I.4.1.3 Devenir des hydrocarbures dans l'environnement

Le devenir des hydrocarbures est déterminé par la distribution des produits pétroliers dans l'environnement après un déversement. La prédiction du devenir d'hydrocarbure est une science très complexe, car elle doit tenir non seulement de la complexité de la variabilité des mélanges pétroliers, mais aussi de leur transfert massique, de leur cinétique de dégradation et des conditions du milieu (**Green et al., 1989**).

Parmi les différents altérations que peut subir un hydrocarbure on citera les facteurs environnementaux suivants :

#### a) Volatilisation

C'est le passage d'une substance à l'état gazeux. La volatilisation permet de diminuer la concentration du contaminant dans le milieu, mais n'est jamais destructive (**Saada et al., 2005**).

Ce phénomène dépend du type d'hydrocarbure et du nombre d'atome du carbone, ainsi que du taux d'humidité du sol. Plus que celui-ci est élevé, moins la volatilisation sera importante (**Ali Ahmed, 2011**).

#### b) Transformation

Il peut s'agir d'un phénomène biologique lorsqu'elle fait intervenir la matière vivante ou non biologique (hydrolyse, oxydation et réaction photochimique) (**Ali Ahmed, 2011**).

#### c) Biodégradation

La biodégradation est l'ensemble des mécanismes de transformation d'un contaminant (hydrocarbures) en différents sous-produits, par l'action des microorganismes (bactéries et champignons) (**Saada et al., 2005**).

### I.5 Méthodes de traitements de sols contaminés par les hydrocarbures

Les hydrocarbures polluants du sol peuvent influencer sa qualité et ses propriétés, car ils constituent une classe des produits chimiques organiques dangereux dont certains de leurs effets toxiques sont reconnus comme fortement cancérigènes (**Das et al., 2011**). Cette pollution nécessite donc l'intervention de différents facteurs pour l'élimination de ces derniers. Selon le degré de pollution des sols et du risque qu'ils représentent directement pour la santé humaine et les écosystèmes. Des méthodes particulières de dépollution s'appliquent et qui peuvent être regroupées en quatre grands groupes associant éventuellement la

combinaison de plusieurs techniques : physiques, chimiques, thermiques et une technique alternative plus intéressante à ces dernières est la biologique (**Ouvrard, 2016**).

### **I.5.1 Méthodes physiques**

Elles constituent la majorité des techniques mises en œuvre actuellement, leur principe consiste à transférer et concentrer les polluants, sans les modifier ou les détruire, en se servant de fluides comme vecteur pour transporter la pollution vers des points d'éliminations et d'extractions (**COLIIN, 2000**).

Il s'agit de deux types: celle par évacuation et celle par piégeage, alors que chaque type comporte différentes méthodes.

#### **I.5.1.1 Les procédés physiques par évacuation**

##### **a) Excavation**

C'est la méthode la plus simple à réaliser, elle consiste à extraire les terres polluées ; ces terres excavées sont souvent acheminées vers un centre du traitement ou d'enfouissement technique afin de supprimer rapidement la source de pollution locale, des tensioactifs sont ajoutés au fluide du lessivage permettant ainsi la dispersion des polluants dans la phase liquide. Cette technique présente le risque d'étendre la pollution si l'ouvrage est mal implanté, ce qui attirera la pollution vers une zone non contaminée.

##### **b) Stripping**

C'est l'extraction par venting appliquée à la nappe. Il est réalisé sur site après avoir pompé l'eau. Le dispositif est généralement formé d'une colonne, l'eau est introduite au sommet et percole par gravité jusqu'au fond où elle est récupérée. L'air est introduit en bas de la colonne et est récupérée au sommet. Les polluants volatils contenus dans l'eau sont désorbés et entraînés par le flux d'air vers le sommet où ils sont récupérés puis traités avant que l'air ne soit rejeté dans l'atmosphère (**Colombano et al., 2010**).

#### **I.5.1.2 Les procédés physiques par piégeage**

##### **a) Le confinement**

C'est une technique pour maintenir dans le sol donné et pendant une durée donnée une pollution susceptible de l'affecter, il consiste à enfermer physiquement du matériel contaminé par un dispositif de parois (horizontales, verticales, couverture de surface) en injections dans

le sol ou en enrobage des déchets (encapsulation) de façon à prévenir d'une manière pérenne leur propagation (**Colombano et al., 2010**).

#### **b) Stabilisation-solidification**

C'est l'une des techniques les plus efficaces qui permet de piéger les polluants à l'intérieur d'une matrice (elle cherche à piéger ou à immobiliser les contaminants dans leur milieu au lieu de les éliminer par traitement physique, chimique ou biologique); Elle s'applique principalement sur des sols excavés (**COLIIN, 2000**).

### **I.5.2 Méthodes thermiques**

La pyrolyse, la vitrification et la thermolyse sont des traitements thermiques, mais qui restent encore pas assez développés pour que leur utilisation soit préférable à celle de la désorption thermique ou de l'incinération. Leur principe consiste à chauffer le matériel contaminé pour la décontamination, il s'agit donc d'utiliser des modes opératoires tels que l'incinération et la désorption thermique avec des types d'installations et de chauffage correspondants pour extraire les polluants et les détruire dans la majorité des cas (**Dufresne, 2013**). Deux méthodes de traitement sont appliquées :

#### **I.5.2.1 Incinération**

Parmi les techniques de traitement les plus anciennes et elle correspond à la seule technique qui détruit réellement les polluants (l'efficacité d'élimination par destruction les 99,99 % cela dépend des conditions d'exploitation et la teneur initiale du polluant et les caractéristiques du sol.); Elle consiste à brûler les sols contaminés dans un four atteignant des températures extrêmes de 870 à 1200 °C. Les contaminants sont donc détruits ou volatilisés (**Roudier, 2005**).

#### **I.5.2.2 Désorption thermique**

Le sol en place est chauffé par différents moyens, ce qui provoque une élévation de la température ayant pour effet de favoriser la désorption des contaminants fortement adsorbés sur la matrice sol, d'augmenter la tension de vapeur des composés peu volatils afin de pouvoir les volatiliser et les extraire en phase gazeuse puis récupérer via un réseau d'extraction, qui seront ensuite éliminés par oxydation catalytique. Les rendements de cette méthode sont de 95 à 99 % d'élimination pour les hydrocarbures et cela dépend aussi des modes opératoires, de la teneur initial du polluant (**Dufresne, 2013**).

### I.5.3 Méthodes chimiques

Ces procédés reposent sur l'utilisation de réactifs chimiques pour détruire les polluants contenus dans le sol, en provoquant des réactions entre ceux-ci et un réactif additionné afin de les rendre inertes (sorption), les détruire (oxydation), ou les transformer en composés moins nocifs et/ou plus facilement biodégradables ou modifier leurs caractéristiques (mobilité et toxicité différentes) (Mazziotti, 2017). Ces techniques sont généralement appliquées sur site ou sur sol excavés et habituellement exigent que les sols soient sous forme de boues ou que les contaminants soient mobilisés dans un milieu liquide.

Le groupe des méthodes de traitement par voie chimique fait appel à un principe réactionnel (action d'un solvant, d'un acide, d'une électrolyse) pour enlever ou transformer la contamination, alors que les sols pollués par les hydrocarbures sont généralement traités par oxydation chimique, on trouve: l'hydrogène, l'ozone, le bioxyde de chlore, les hypochlorites, le chlore et le peroxyde qui sont ajoutés dans le sol souillé pour convertir les hydrocarbures en forme plus stables et moins mobiles, et/ou pour fournir une source d'oxygène aux microorganismes (Clozel *et al.*, 2002).

Parmi ces méthodes on site :

#### I.5.3.1 Oxydation chimique

C'est l'apport d'un oxydant dans la zone polluée du sol (in situ) afin de détruire totalement (minéralisation) ou partiellement (sous-produit plus dégradables) le polluant. Les agents oxydants généralement utilisés pour le traitement des hydrocarbures sont l'ozone O<sub>3</sub>, le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Ce traitement par oxydation provoque une augmentation de la concentration en O<sub>2</sub> dans le milieu, ce qui favorise l'action de la population microbienne. Des agents chimiques comme des surfactants peuvent être ajoutés afin d'améliorer la désorption des contaminants, alors que le résultat sera d'autant meilleur que le contact entre le polluant et l'oxydant est étroit (Mazziotti, 2017).

#### I.5.3.2 Mobilisation et d'extraction

Les applications in-situ se font par aspiration du sol contaminé par une solution chimiquement réactive (ex : solvant, surfactant, tensioactif), qui va s'infiltrer dans le sol et mobiliser le polluant et le transférer à l'extérieur du milieu pollué. La solution occupée de polluants est ramenée en surface par pompage dans les puits et traitée et purifiée (Akmouci-Toumi, 2009).

#### I.5.4 Méthodes biologiques

Les voies d'élimination qu'elles soient physiques, chimiques ou thermiques, sont coûteuses et très consommatrices d'énergie (incinération, chaleur, transport...) et de matériel technique. Pour la plupart, elles sont destructrices pour la biodiversité et laissent un sol mort, difficile à revégétaliser après traitement. Pour cette raison, des techniques biologiques curatives développées ou en développement, sont utilisées car elles sont peu coûteuses et permettent de maintenir les propriétés physicochimiques du sol (**Origo et al., 2012**).

La bioremédiation (biodépollution) est le traitement biologique permettant la réhabilitation du sol qui a pour avantage indéniable qu'il est naturel (et donc aucun effet supplémentaire sur la flore), et qu'il n'implique aucune intervention humaine mais il se repose sur le métabolisme et l'activité des systèmes biologiques présents dans la nature qui peuvent être : microorganismes (bactéries, champignons, algues) ou organismes supérieurs (végétaux). Ces organismes peuvent être indigènes (déjà présents dans la sol pollué), ou exogènes (ajoutés au sol), ou encore être prélevés sur le sol contaminé, cultivées au laboratoire puis réintroduits (bioaugmentation) grâce à des mécanismes de digestion, transformation, d'accumulation, d'absorption ou de dégradation (**ADEME, 2006**).

Elle consiste donc à stimuler l'atténuation naturelle des hydrocarbures, pour en augmenter le rendement, afin de détruire le polluant organique qui sera utilisé comme source de carbone (**Lectome, 1998**).

La décontamination se fait in situ, en introduisant dans le sol les éléments nécessaires au développement de la biomasse, ou ex situ si la flore locale est inadaptée à la dégradation des polluants ou est peu abondante en traitant le sol excavé pour la dégradation des hydrocarbures (**Colin., 2000**), alors ceux sont des procédés de dépollution reposant sur l'extraction ou la dégradation du polluant.

Avant d'opter pour le biotraitement plusieurs paramètres doivent être mis en charge notant à titre d'exemple : le type de (micro) organisme utilisé (conditions de croissance associées), type du processus de dégradation impliqué, présence de proportion suffisante de nutriments ... (**Ademe, 2006**).

Parmi les technologies de la bioremédiation on cite :

#### I.5.4.1 Phytoremédiation

La phytoremédiation regroupe toutes les technologies reposant sur le pouvoir décontaminant des espèces végétales et de la microflore présente en rhizosphère des plantes pour transformer, dégrader, concentrer, stabiliser ou volatiliser des polluants (hydrocarbures) ,Elle permet l'accélérer la biodégradation (**Fatima et al., 2016**).

La stimulation de la croissance ou d'activité microbienne se fait par l'intervention directe ou indirecte des racines, On distingue plusieurs procédés de phytoremédiation notant à titre d'exemple : phytotransformation, phytovoltarisation et phytostimulation (**Joner et al., 2003**).

#### I.5.4.2 Bioaugmentation

Cette technologie est une méthode de traitement in –situ, consiste à l'adjonction des cultures de microorganismes au sol pollué en vue d'améliorer l'activité microbienne indigène responsable de la biodégradation des hydrocarbures présents dans ce site. Les microorganismes introduits peuvent être exogènes au sol (capables d'utiliser les hydrocarbures comme source de substrat pour leur métabolisme) (**Ademe, 2006**) ou indigènes (prélèvement de ces derniers qui sont aptes à dégrader le polluant, cultivés ex situ puis réinjectés) (**Colombano et al., 2010**).

La meilleure approche pour la sélection des microorganismes compétents doit être basée sur leur aptitude à dégrader les composés organiques présents dans le site à dépolluer (souvent des bactéries dotées d'une grande capacité de digestion des hydrocarbures) (**Benchouk, 2017**).

Ce processus est réalisé lorsque les microorganismes indigènes ne sont pas adaptés à la dégradation d'hydrocarbures ou lorsque ces polluants sont présents à des concentrations toxiques.

La bioaugmentation peut requérir l'ajout d'oxygène et des nutriments dont l'objectif est d'optimiser l'activité des microorganismes introduits dans le sol (**Chedly, 2007**).

Le tableau ci-dessous présente les principaux microorganismes capables de dégrader certains hydrocarbures (**Colombano, 2010**).

Tableau 1: Microorganismes capables de dégrader les hydrocarbures pétroliers (**Saada et al., 2005**)

Contaminant	Microorganismes	Efficacité
Benzène	<i>pseudomonas putida</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Methylosinus trichosporium OB3d</i> , <i>Nocardia sp.</i> , méthanogènes, anaérobies	Modérée à haute
Toluène	<i>Methylosinus trichosporium OB3d</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> (ortho-monooxygénase), <i>pseudomonas putida</i> , <i>Cunninghamella elegans</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>P.mildenberger</i> , <i>pseudomonas aeruginosa</i> , <i>pseudomonas sp.</i> (ou <i>thauera aromatica</i> : bactérie dénitrifiante), <i>Geobacter metallireducens</i> (bactérie ferroséductrice), <i>Desulfocula</i> (bactérie sulfato-réductrice), <i>Achromobacter sp.</i> , méthanogènes, anaérobies.	Haute
Éthylbenzène	<i>pseudomonas putida</i> , <i>pseudomonas sp.</i> (ou <i>thauera aromatica</i> : bactérie dénitrifiante)	Haute
Xylène	<i>pseudomonas putida</i> , <i>pseudomonas sp.</i> (ou <i>thauera aromatica</i> : bactérie dénitrifiante), méthanogènes, anaérobies.	Haute
Naphtalènes	<i>pseudomonas putida</i> (dioxygénase)	-
Alcanes	<i>pseudomonas oleovorans</i> (hydroxylase), <i>Methanosarcina barkeri</i>	-
Kérosène	<i>Torulopsis</i> , <i>Candidatropicalis</i> , <i>Cprynebacterium hydrocarboclastus</i> , <i>Candidaparapsilosis</i> , <i>C.guilliemondii</i> , <i>C.lipolytica</i> , <i>trichosporon sp.</i> , <i>Rhohosporidium toruloides</i> , <i>Cladosporium resinae</i>	Haute

Pour que l'addition de microorganismes soit efficace, il faut s'assurer :

- Du transport des microorganismes jusqu'au sol contaminé.
- De la fixation des microorganismes aux matériaux de la zone polluée.
- De la survie et de la croissance des micro-organismes, ainsi que de leur meilleure activité dégradante.

Parmi les paramètres ayant une influence sur les résultats de la bioaugmentation, on cite :

- Les propriétés du contaminant (biodisponibilité, concentration, toxicité pour les microorganismes dégradants).
- Les propriétés du sol (taux d'humidité, taux de matière organique, pH, capacité d'échange cationique).
- L'écosystème microbiologique (présence de prédateurs, compétition inter espèces).

— La microbiologie (présence de Co-substrats, patrimoine génétique des souches présentes, stabilité des enzymes, activité des enzymes) (Vogel).

#### **I.5.4.3 Biostimulation**

Le bon développement des microorganismes indigènes dans le sol peut être limité par de nombreux facteurs y compris une mauvaise aération, manque des nutriments, le PH, la température, l'humidité, le taux de matières organiques, le ratio CN, les propriétés du sol et la présence de contaminants etc... (Al-Sulaimani *et al.*, 2010), et lorsque ces paramètres ne sont pas favorables alors les hydrocarbures polluants ne sont pas complètement dégradés (la dégradation est partielle) et dans certains cas la formation des produits intermédiaires avec une toxicité supérieure aux contaminants d'origine, dans ce cas-là on fait appel à la biostimulation qui a pour effet d'accélérer le phénomène de dégradation naturelle (Duchesne, 2013).

La biostimulation (appelée également atténuation naturelle) est une méthode de traitement in-situ; Elle consiste à stimuler la dégradation des hydrocarbures par les micro-organismes indigènes au moyen d'adjuvants chimiques ou biochimiques et donc elle présente l'avantage qu'elle ne comprend pas l'ajout des microorganismes dans le sol, mais son principe est de fournir un environnement favorable (par contrôle et puis modification de ce dernier) pour augmenter le potentiel de biodégradation ciblée et stimuler l'activité de ces populations microbiennes autochtones (biomasse indigène) (Benchouk, 2017). Parfois, agir sur un seul paramètre est suffisant pour obtenir une amélioration significative des performances.

La réunion de bioaugmentation, biostimulation et l'ajout de biosurfactants, selon les caractéristiques du site contaminé, pourrait être une stratégie prometteuse pour optimiser la bioremédiation (Baek, 2007).

#### **I.6 Microorganismes utilisés dans la dégradation des hydrocarbures**

La bio-dépollution des écosystèmes terrestres contaminés par les hydrocarbures se réalise grâce à de nombreuses populations microbiennes indigènes et spécifiques (Les bactéries, les moisissures, les levures et les algues).

Les bactéries et les champignons semblent être les microorganismes les plus efficaces dans la bioremédiation des hydrocarbures et qui engendrent des capacités importantes dans le processus de biodégradation (ils peuvent métaboliser une large gamme des hydrocarbures,

en les transformant partiellement en métabolites ou en les minéralisant complètement) (**Hentati, 2018**).

### I.6.1 Bactéries

En raison de leurs pouvoir d'adaptation, et par ce que' elles utilisent le polluant comme source de carbone et d'énergie, les bactéries sont le groupe de microorganismes les plus abondants et les plus activement impliqués dans la dégradation des hydrocarbures des zones contaminées ; Cette dégradation se fait en plusieurs étapes afin d'obtenir des composées simples servant comme source de carbone ; L'attaque bactérienne des hydrocarbures commence généralement par l'intermédiaire de l'enzyme dioxygénase qui conduit à la formation de cis-dihydrodiols, une oxydation ultérieure est l'origine de l'apparition du catéchol qui se dégrade à son tour en composés simples facilement utilisables par les microorganismes (**Hentati, 2018**).

Parmi les bactéries ayant une capacité à dégrader les HAPs celles appartenant aux genres : *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Collimonas*, *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Flavobacterium*, *Gordonia*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* , *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Variovorax* et d'autres clones bactériens.

La biodégradation quasi-totale des hydrocarbures nécessite la mise en place d'un consortium bactérien en vue que chaque genre bactérien cité précédemment n'est capable de dégrader qu'un nombre étroit d'hydrocarbure alors que le pétrole est composé de centaines voire de milliers de molécules différentes (**Verdin et al., 2006**).

L'un des essentiels mécanismes responsables de l'évolution de la dégradation accrue des hydrocarbures par les bactéries c'est bien d'entraîner une adaptation à de nouveaux contaminants par : l'induction d'enzymes spécifiques, les mutations (modifications génétiques qui aboutissent à des voies métaboliques par transfert horizontal de gènes réalisé par conjugaison via des plasmides, la transformation ou la transduction) et l'enrichissement sélectif de microbes capables de transformer les hydrocarbures.

### I.6.2 Champignons

Les champignons filamenteux sont utilisés pour la biodégradation des hydrocarbures de gros poids moléculaire en raison de leur mécanisme d'attaque par des enzymes extracellulaires qui fournit au système enzymatique une accessibilité au substrat bien supérieure à celle des

systèmes intracellulaires, en outre le mycélium qu'ils possèdent leur confère un avantage majeur qui est l'aptitude à se propager dans les sols ce qui est l'origine de l'utilité et l'efficacité de ces derniers dans la bioremédiation de ces sols pollués par les hydrocarbures (Costes *et al.*, 1997); Contrairement aux bactéries, les champignons et au cours de la dégradation n'emploient pas les hydrocarbures comme une seule et unique source de carbone ou d'énergie mais ils exigent la présence d'autres sources, ce qui explique que le but de l'attaque n'est pas la croissance mais pour réduire les patrimoines toxiques, mutagéniques et cancérigènes de ces composés (en les transformant en métabolites détoxifiés).

parmi les champignons dégradant les HAPs ceux qui appartiennent aux genres: *Amorphoteca*, *Neosartorya*, *Talaromyces*, *Graphium*, *Candida*, *Yarrowia*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Pencillium*, *Cunninghamella*, *Fusarium*, *Mucor*, *Phanerochaete*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* et *Trichoderma* (Singh, 2006).

Le métabolisme des hydrocarbures par les champignons se fait par l'intervention de deux voies primordiales: la voie des enzymes ligninolytiques et celle des enzymes de type monooxygénase à cytochrome P-450 (Chaillan *et al.*, 2004).

Chez les moisissures non ligninolytiques, l'ouverture du cycle est lancée par des monooxygénases à cytochrome P-450. En premier lieu le métabolisme génère un époxyde qui peut être ensuite évoluer en trans-dihydrodiol, puis en catéchol ou en phénol. À son tour la dégradation du catéchol constitue la dernière étape de biodégradation commune à tous les HAPs.

Pour les champignons ligninolytiques (ayant la capacité de dégrader la lignine) ils ont souvent la capacité de produire l'une et/ou l'autre de ces enzymes extracellulaires: laccase et peroxydases (qui peuvent dégrader les HAPs possédant des analogies de structure avec la lignine) qui sont impliqués dans la dégradation des HAPs (cométabolisme). Cette voie est qualifiée de non spécifique, mène à la genèse de métabolites de type quinones.

### I.6.3 Actinomycètes

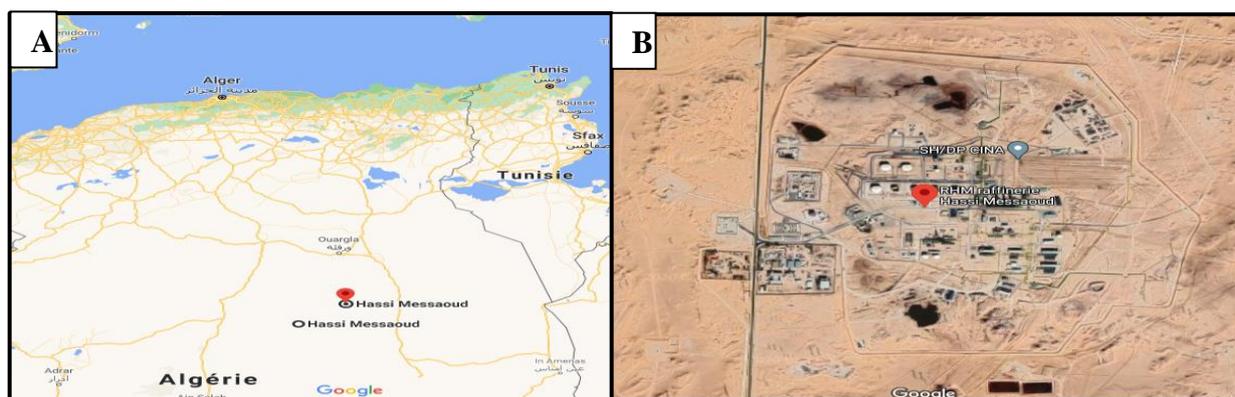
Ils jouent un rôle écologique important car ils ont l'aptitude de dégrader des molécules complexes non dégradées par les champignons ou les bactéries alors ils aident ainsi à la décontamination des sols. Les actinomycètes sécrètent des enzymes (Hubert, 2020).

## II. Matériel et méthodes

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire du département d'environnement du Centre de Recherche et De Développement CRD Sonatrach, elle a pour but d'analyser et de rechercher des souches bactériennes d'intérêt dans l'industrie pétrolière à partir d'un sol pollué par les hydrocarbures. Une partie de ce travail qui concerne l'étude des paramètres physico chimiques a été réalisée et les résultats obtenus sont exploités. Par contre l'analyse microbiologique qui a pour objectif l'isolement, la caractérisation et la sélection des souches microbiennes impliquées dans la dégradation biologique des hydrocarbures n'a pu être réalisée suite à la situation sanitaire spécifique (COVID-19).

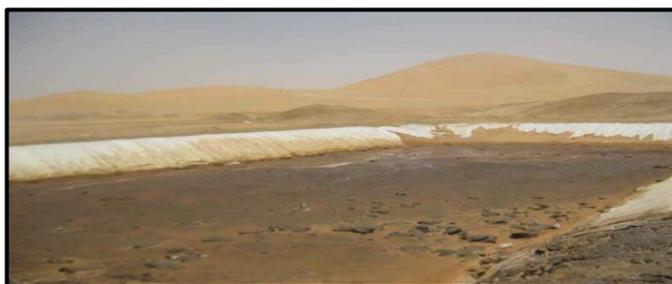
### II.1 Présentation de la région d'étude et le site du prélèvement des échantillons

L'échantillonnage a été effectué au niveau de la station contaminée de Hassi Messaoud; Elle est caractérisée par la présence des activités de forages pétroliers, et se situe à environ 850 km au Sud-Est d'Algérie et à 350 km à l'Ouest de la frontière tunisienne (voir figure 2).



**Figure 2:** A : Carte de l'Algérie représente la région d'étude ; B : région d'échantillonnage du sol contaminé par les hydrocarbures pétroliers – raffinerie. Le point rouge indique le site de l'échantillonnage.

Ce site est caractérisé par un climat désertique, avec une précipitation moyenne annuelle de 45mm et une température moyenne annuelle de 23,7 °C. Les eaux de la nappe dans le champ de Hassi Messaoud sont exposées au risque de contamination par les rejets des hydrocarbures constitués par les eaux résiduelles des centres de traitement ou de forages pétroliers (Figure 3).



**Figure 3 :** Etat des bourbiers dans le champ de Hassi Messaoud.

## II.2 Matériel

### II.2.1 Matériel biologique

- **Le sol**

Les échantillons utilisés dans notre étude expérimentale sont des bourbiers contaminés par des rejets de forages au niveau de Hassi Messaoud. Le choix de ce site est justifié par le fait qu'il y a une fuite d'hydrocarbures, ce qui aboutit à la contamination des sols.

### II.2.2 Matériel non biologique

La liste d'appareillages, d'équipements et de verreries ainsi que les réactifs utilisées afin d'effectuer l'échantillonnage et caractérisation physicochimiques de notre sol est présentée en annexe (1).

## II.3 Méthodes

### II.3.1 Méthode d'échantillonnage

Le prélèvement sur terrain d'une quantité notamment importante que celle qui sera utilisée pour les essais proprement dits. La méthode utilisée est l'échantillonnage à faible profondeur qui se réalise à moins d'un mètre de profondeur (**Modulo et al., 2008**).

Les échantillons qui sont prélevés de 5 points différents, à partir des bourbiers à 50 cm de profondeur sont mélangés dans un récipient en matière inerte, propre et suffisamment grand.

### II.3.2 Méthodes d'analyses

#### II.3.2.1 Analyses physicochimiques du sol

Les analyses physico-chimiques du sol permettent d'estimer le degré de pollution du borbier étudié. Les méthodes d'analyse nécessitent des échantillons liquides qui sont réalisées à partir des lixiviats préparés selon la norme (Norme NFX 31 160).

### II.3.2.1.1 Préparation du lixiviat de l'échantillon du sol

Quatre bouteilles de 800 ml de l'eau distillée stérile additionnées avec 80g de l'échantillon (sol contaminé) ont été soumises sous agitation pendant 24h, le mélange a subi une décantation pendant 24h et le lixiviat a été récupéré après par une filtration à l'aide de papiers filtre stérile de 190mm du diamètre (Figure 3).



Figure 4 : Technique de préparation et de récupération du lixiviat.

### II.3.2.1.2 Caractérisations physico-chimiques

La caractérisation physicochimique a été réalisée à partir des étapes et techniques suivantes :

#### a) Le potentiel d'hydrogène (pH)

Le pH est déterminé par la différence du potentiel existant entre une électrode en verre et une électrode de référence plongeant dans la solution du sol.

La méthode de détermination du pH se fait par électrométrie (PH mètre), nous avons prélevé à l'aide d'une pipette une prise d'essai de 50 ml et l'introduit dans un bécher propre, puis on a placé ce dernier sous agitation magnétique. L'électrode du pH mètre est rincé avec de l'eau distillé avant son introduction dans la solution du sol à analyser. La valeur du pH est celle affichée par le pH mètre après sa stabilisation.

#### b) Conductivité électrique (CE)

La conductivité électrique consiste un moyen de mesure commode et rapide, couramment utilisé pour évaluer la minéralisation ou la salinité d'une eau. Pour la mesure de la conductivité électrique, nous avons utilisé un multi paramètres de type HACH. La technique consiste à prélever 50 ml de lixiviat puis le mettre dans un bécher propre. Par la suite la sonde

de conductivité est introduite dans l'échantillon puis la touche de mesure est activée. La valeur affichée après stabilisation indique la CE de l'échantillon.

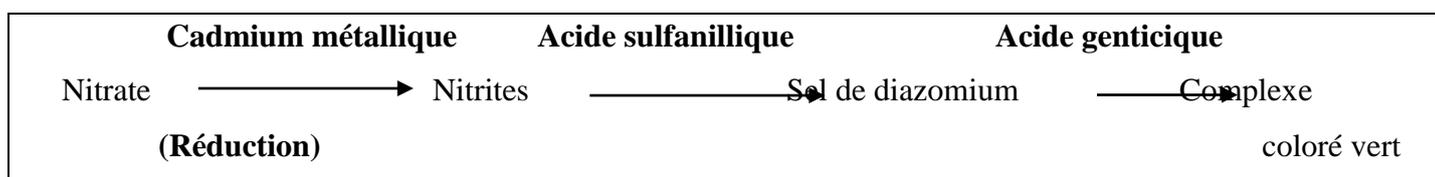
### c) Dosage des sulfates

Les ions sulfates présents dans l'eau réagissent avec le baryum contenu dans le réactif Sulfa Ver 4 et produisent une turbidité due aux sulfates de baryum insoluble. La quantité de turbidité formée est proportionnelle à la concentration en sulfate. Pour mesurer le sulfate nous avons suivi la méthode HACH II.

La prise de deux cellules en verre de 10 ml de capacité, une cellule est remplie avec l'échantillon à analyser plus le contenu d'une gélule de réactif Sulfa Ver4 et la laisser une période de réaction pendant 5 minutes. Remplissage de la seconde cellule avec d'eau à analyser (le blanc). Ce dosage s'effectue l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible de type DR 1900 programmé pour les sulfates (SO) à une longueur d'onde de 450 nm. Le temps de réaction est 5 minutes et le résultat s'affiche en mg/l.

### d) Nitrate

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



Le Cadmium métallique contenu dans les gélules de réactifs réduit les nitrates présents dans l'échantillon en nitrites. Les nitrites réagissent en milieu acide avec l'acide sulfanillique pour former un sel de diazonium. Ce sel réagit avec l'acide gentique pour former un complexe coloré ambre. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en nitrates.

La détermination de dosage des nitrates se fait selon la méthode de HACH.

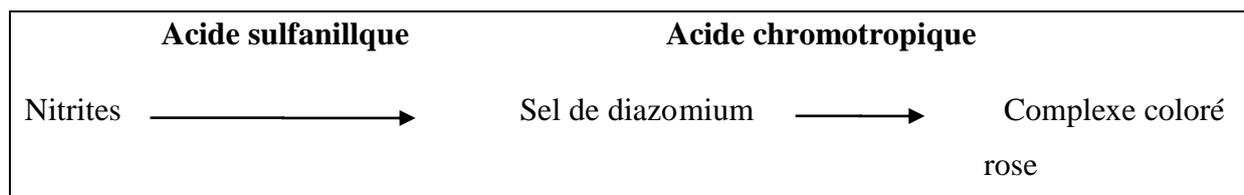
La prise de deux cellules en verre de 10ml, remplissage de la première avec l'échantillon plus le contenu d'une gélule de Nitra Ver 5, et on remplit la seconde avec de l'eau distillée (le blanc).

La mesure se fait par le spectrophotomètre DR 1900 programmé pour le dosage des nitrates concentration moyenne. La longueur d'onde à 400 nm. Le résultat s'affiche en mg/l.

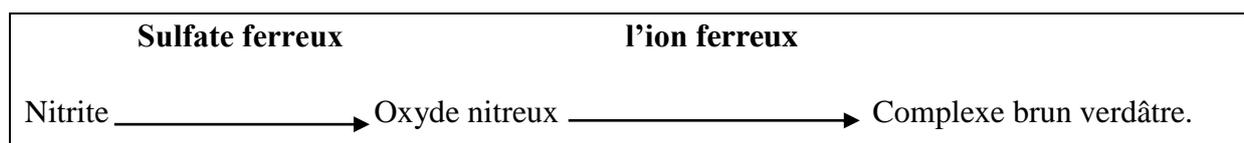
## e) Nitrite

Le dosage des nitrites 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:



Pour les faibles teneurs, le principe consiste en la réaction des nitrites présents dans l'échantillon avec l'acide sulfanillique, pour former le sel de diazomium qui réagit avec l'acide chromotropique pour produire un complexe coloré rose dont la coloration est proportionnelle à la quantité de nitrites présents.

La lecture des résultats se fait par l'utilisation de la Gamme I (0 à 0,3 mg/l), à l'aide d'un spectrophotomètre DR 1900 programmé pour les nitrites faibles concentrations, la longueur d'ondes est réglé à 507 nm.

Pour le dosage des fortes concentrations on refait le même protocole des autres dosages en utilisant cette fois ci une gélule de Nitri Ver 3.

## f) Azote ammoniacal

Le composé ammoniacal monochloroamine réagit avec le salicylate pour former le 5-aminosalicylate. Ce dernier est oxydé en présence d'un catalyseur au nitroprusside pour former un complexe coloré en bleu. La coloration bleue est masquée par la coloration jaune du réactif en excès pour donner une solution finale colorée en vert dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en azote ammoniacal présent.

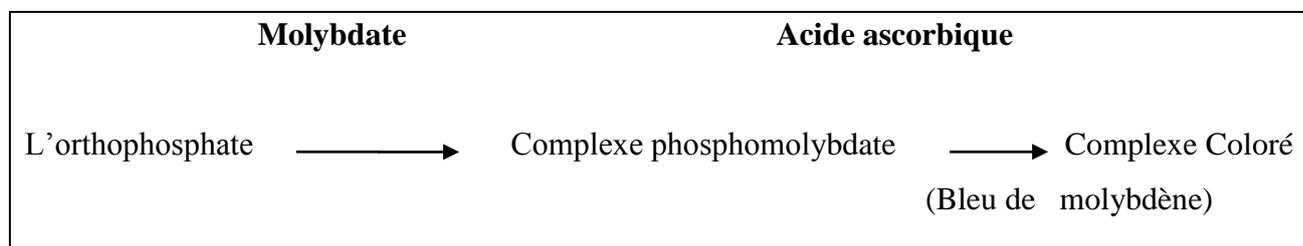
On utilise deux réactifs en gélules: le Salicylate et le Cyanurate alcalins.

La technique consiste à remplir les deux cellules en verre de 10 ml de capacité , l'une avec de l'échantillon à analyser et l'autre avec de l'eau bidistillée (utilisée comme blanc), puis on procède à l' Ajout du contenu d'une gélule de Réactif Salicylate dans chacune des cellules, boucher et agiter pour dissoudre . Après 3 minutes de réaction, on ajoute le contenu de deuxième gélule le cyanurate alcalin dans les deux cellules; les boucher et agiter pour dissoudre le réactif (la période de réaction est de 15 minutes).

Le dosage s'effectue à l'aide d'un spectrophotomètre U.V./visible de type DR 1900, à une longueur d'onde de 655 nm.

### g) Phosphate

Le phosphore en solution 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 transformées 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 la réaction suivante :



Le Remplissage d'un flacon colorimétrique avec 25 ml d'échantillon et l'ajout du contenu d'une gélule de réactif Phos Ver 3 au flacon préparé.

Remplissage d'un deuxième flacon colorimétrique avec 25 ml d'échantillon (le blanc).

Le dosage s'effectue à l'aide d'un spectrophotomètre type DR 1900 à une longueur d'onde de 890 nm ; l'intensité de la coloration sera proportionnelle à la concentration en phosphore. Le temps de réaction est de 2 minutes et le résultat s'affiche en mg/l.

### h) Azote total

La détermination de la concentration de l'azote total se réalise par la gamme lck138.

Prélever 1,3 ml de l'échantillon et le mettre dans un tube à essai, sur lequel 1,3 ml de réactif A et un disque du réactif B sont ajoutés.

Après 30 min du chauffage, à 120°C, le tube est refroidi (sa température devient 18° à 20°C).

Ensuite prélever 0,5 ml de ce dernier tube et le verser dans un autre tube additionné de 0,2 ml de réactif D, puis le laisser réagir pendant 15 min.

Le dosage s'effectue à l'aide d'un spectrophotomètre type DR 1900 à une longueur d'onde de 345nm.

### i) Matière en suspension (MES)

#### • Principe

La méthode utilisée pour la détermination des matières en suspension est la filtration. L'échantillon est filtré sur un filtre en fibres de verre. Le filtre est ensuite séché à 105°C et la masse du résidu retenu sur le filtre est déterminée par pesée. La présence de l'huile ou autre liquide organique non miscible interfère et pour cela le résidu filtré peut être lavé par un solvant organique (chloroforme) avant d'être séché.

#### • Méthode

Le filtre à vide est placé dans l'entonnoir du dispositif de filtration. Après une agitation vigoureuse de l'échantillon, une prise d'essai ( $\geq 100$  ml) est versée sur le filtre et le dispositif de filtration est mis en marche. Filtrer puis rincer l'éprouvette graduée avec environ 20 ml d'eau distillée et utiliser cette portion pour laver le filtre. Si l'eau à analyser est huileuse, le résidu filtré peut être lavé par un solvant organique (chloroforme) avant d'être séché. Le filtre est retiré à l'aide d'une pince et placé sur un support de séchage (exemple ; boîte de Pétri). Le filtre est séché dans l'étuve à 105°C pendant 1 heure.

Après refroidissement du filtre au dessiccateur les résultats sont exprimés comme suit :

Expression des résultats : le taux de matières en suspension exprimé en mg/l est donné par la formule :  $MES (mg/l) = (m_2 - m_1) \cdot 10PE$

$m_1$  = la masse du filtre vide (en mg)

$m_2$  = la masse du filtre plein (en mg)

PE = le volume de la prise d'essai d'eau à analyser (en ml)

## j) Détermination de la DCO

## • Principe

Le test de la DCO consiste en la mesure de l'oxygène équivalent à la quantité de matière organique oxydable par le dichromate de potassium  $K_2Cr_2O_7$ , dans une solution d'acide sulfurique à 50%. Un composé à base d'argent est ajouté comme catalyseur, un autre composé mercurique est ajouté pour réduire les interférences dues à l'oxydation des ions chlorures par le dichromate.

L'oxydation s'effectue à une température de 150 °C pendant 2h ; la lecture se fait par colorimétrie. Pour la forte gamme de 0 à 1500 mg/l (620 nm), la coloration obtenue est verte, elle correspond à la quantité de chrome trivalent produite selon la réaction suivante :

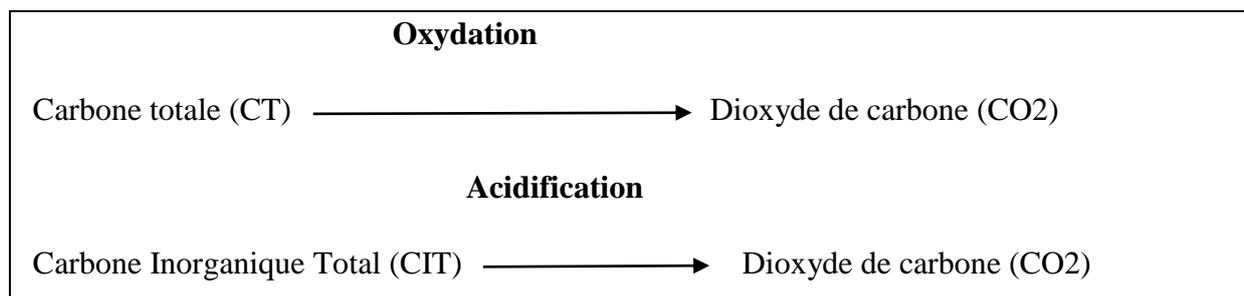


## • Mode opératoire

- Homogénéiser le lixiviat à analyser en agitant pendant deux minutes ;
- Allumer le réacteur à DCO et préchauffer à 150°C
- Tenir le tube incliné à 45, prélever 2 ml de lixiviat à analyser et les introduire dans le tube.
- Fermer hermétiquement le bouchon du tube, en tenant le tube par le bouchon au-dessus d'un évier, le retourner plusieurs fois pour mélanger le contenu, placer le tube dans le réacteur.
- Préparer un blanc en remplaçant l'échantillon par de l'eau distillée.
- Chauffer les tubes dans un thermoréacteur pendant 2h.
- Eteindre le réacteur, attendre environ 20 minutes, le refroidissement des tubes à 120 °C ou au-dessous.
- Retourner chaque tube plusieurs fois pendant qu'il est encore chaud, placer les tubes sur un portoir, attendre que les tubes soient refroidis.
- La lecture se fait une longueur d'onde de 620 nm et le résultat s'affiche en mg/l de DCO.

**k) Carbone Organique Total (COT)****• Principe**

La mesure du carbone organique total (COT) est un test non spécifique, qui ne permet pas de déterminer quels composés particuliers sont présents mais permet de connaître la quantité totale du carbone organique présente dans des échantillons. La transformation du Carbone Total (CT) et du Carbone Inorganique Total (CIT) en dioxyde du carbone (CO<sub>2</sub>) selon les réactions suivantes :

**• Mode opératoire**

Le CO<sub>2</sub> quitte la cuve d'analyse, lorsqu'il traverse une membrane pour pénétrer dans la cuve indicatrice. La variation de la couleur de l'indicateur est soumise à une évaluation photométrique.

Le COT (Carbone Organique Total) est la différence entre les valeurs CT et CIT. La détermination de la quantité du carbone organique totale se réalise par la gamme LCK 381.

Tout d'abord, l'échauffement du thermostat à 100 °C (212 °F).

- Pour le CT : la transformation du réactif oxydant A 1 x dans la cuve CT avec l'ajout de 0.2 ml d'échantillon dans la cuve CT.
- Pour le CIT, l'ajout de 1.0 ml d'échantillon dans la cuve CIT.

L'ouverture des deux cuves indicatrices bleues et les visser immédiatement en utilisant le double bouchon à membrane et les fermer immédiatement à fond l'une avec la cuve CT et l'autre avec la cuve CIT.

Après, on procède à l'échauffement des deux combinaisons de cuvettes simultanément dans le thermostat préchauffé (2 heures à 100 °C (212 °F)).

La lecture des résultats s'effectue à l'aide de spectrophotomètre Dr 1900.

### II.3.2.2 Analyses microbiologiques du sol

➤ **Trois articles ont été analysés dans cette partie**

**Article 1: Benchouk Amina and Chibani Abdelwaheb, 2016**, Biodegradation of diesel and isomerate by *Pseudomonas aeruginosa* and *Brevibacillus laterosporus* isolated from hydrocarbons contaminated soil in Algérie, *Advances in Environmental Biology*, P 208-215.

**Article 2: Ebadi A., Olamaee M., Khoshkholgh Sima N., Nasrabadi R., Hashemi M, 2016**, Isolation and Characterization of Biosurfactant Producing and Crude Oil Degrading Bacteria from Oil Contaminated Soils, *Iran J Sci Technol Trans Sci*.

**Article 3: HuanLiu, Jing Xu, Rubing Liang, Jianhua Liu, 2014**, Characterization of the Medium and Long Chain nAlkanes Degrading *Pseudomonas aeruginosa* Strain SJTD-1 and Its Alkane Hydroxylase Genes 5, *Plos one*, 9(8): 1-14.

#### II.3.2.2.1 Isolement et caractérisation des micro-organismes du sol pollué

Les bactéries dégradant les hydrocarbures ont été isolées sur milieu Bushnell-Haas (BH) (La composition du milieu BH est la suivante : (g/l): 1,0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,0, NH<sub>4</sub>N<sub>3</sub>; 0,2, MgSO<sub>4</sub>·1H<sub>2</sub>O; 0,05, FeCl<sub>3</sub>; 0,02, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O).

Avant de procéder à l'isolement le milieu de culture a été complété avec 2% d'hydrocarbure et puis 10g de sol du sol pollué ont été introduite pour l'enrichissement, une incubation à l'obscurité a été réalisée sur un agitateur rotatif à 150 tr /min à 30°C; après une semaine, 2 ml du milieu enrichi ont été transférés dans un nouveau milieu BH frais (incubation est effectuée en gardant les mêmes conditions). Cette opération a été répétée trois fois chacune comprenant un court intervalle d'incubation d'une semaine. Après les trois transferts consécutifs, les microorganismes ayant la capacité de dégrader les hydrocarbures ont été isolés par étalement de 100 µL de la dernière culture sur milieu BH agar additionné par 100 µL d'hydrocarbures et incubées à 30°C.

Les colonies qui présentent des différences morphologiques ont été isolées et purifiées par la méthode de repiquage en stries et conservées à 4 °C sur GN incliné, pour une longue durée les isolats sont conservés dans le glycérol (30 %) à -50 °C.

### II.3.2.2.2 Criblage d'isolats Productifs du biosurfactant et dégradants les hydrocarbures

Pour évaluer la capacité d'isolats à produire des biosurfactants, la technique d'étalement de la culture microbienne sur les plaques d'agar nutritif au sang (BNA) a été choisie. Les colonies avec des cercles hémolytiques claires et du grand diamètre ont été sélectionnées et étiquetées. Ces souches ont été inoculées dans le milieu liquide TSB (contenant 20 g/L Peptone de soja, 2.5 g/L Glucose, 5 g/L NaCl, 2.5 g/L Phosphate dipotassique), suivies d'une incubation à 30°C à 180tr/min pendant 24h. Cet inoculum servira pour l'inoculation du milieu de fermentation pour la production des biosurfactants et des bioémulsifiants.

#### a) Mesure de la production des biosurfactants et des bioémulsifiants

La mesure de la production des biosurfactants et des bioémulsifiants a été faite par l'inoculation de bouillon de fermentation des biosurfactants (contenant  $\text{NaNO}_3$  2.5g L<sup>-1</sup>,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  4.0 g L<sup>-1</sup>,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4.0 g L<sup>-1</sup>,  $\text{CaCl}_2$  0.1 g L<sup>-1</sup>,  $\text{MgSO}_4$  0.2 g L<sup>-1</sup>, NaCl 17.55 g L<sup>-1</sup>, KCl 1.0 g L<sup>-1</sup> et extrait de levure 1.0 g L<sup>-1</sup> ) et complété avec 3% de l'huile de friture comme seule source de carbone. 2.5 ml d'inoculum précédemment préparée a été introduite dans le milieu de fermentation. Une incubation à 30°C, 180tr/min pendant 3jours a été réalisée suivies d' une centrifugation à 9000g pendant 20 min.

La Mesure de la capacité de production de biosurfactants et de bioémulsifiants été faite par :

- **Test d'épandage d'huile** : consiste à versé 30 ml de l'eau distillée stérile dans des boites Pétri, suivis de l'ajout de 90µl de diesel sur la surface d'eau + 5µl de bouillon de fermentation dilué au 1/10eme au milieu du film d'huile (Mesure du diamètre de la zone claire formé dans la surface d'huile).
- **-Indice d'émulsification (E<sub>24</sub>)** : l'E<sub>24</sub>des échantillons de culture a été déterminé en ajoutant 2 ml de l'huile brute pour la même quantité de culture, en mélangeant dans un vortex pour 2min et après une période du repos de 24h l'indice d'émulsification (E<sub>24</sub>) est défini comme un pourcentage de la hauteur de couche émulsionnée (mm) divisée par la hauteur totale du colonne de liquide (mm).

#### b) Caractérisation des biosurfactants

La chromatographie sur couche mince (CCM) est la méthode utilisée pour déterminer la nature chimique des biosurfactants produits par les isolats.

**Analyse par CCM :** l'extraction du surnageant du bouillon de fermentation produisant des biosurfactants par chloroforme: méthanol = 2: 1 (V / V) et la soumission ensuite à une plaque CCM, avec une solution chloroforme: méthanol: eau = 65: 15: 2 (V / V / V) comme solvant de développement. La pulvérisation du réactif chromogène (3 g de phénol et 5 ml d'acide sulfurique dissous dans 95 ml d'éthanol) après migration forme des taches brunes sur la plaque indiquant la présence des composants lipidiques.

Pour détecter les biosurfactants lipopeptidiques, 1 ml de surnageant centrifugé et 3 gouttes de solution de ninhydrine à 0,5% ont été placés dans un flacon de 1,5 ml, Les flacons ont ensuite été placés dans un bain-Marie pendant quelques minutes pour observer le changement de couleur du mélange réactionnel.

La quantification de la capacité de production de biosurfactants a été déterminée en mesurant la concentration totale des glucides en utilisant la méthode phénol-acide sulfurique (car le biosurfactant est un composé de type glycolipide). En bref, 2 ml du bouillon de fermentation dilué 100 fois ont été mélangés avec 1 ml de solution du phénol à 5% et 5 ml d'acide sulfurique, puis incubés pendant 15 minutes avant de mesurer l'absorbance à 490 nm.

#### **II.3.2.2.3 Identification des isolats**

L'identification des isolats a été faite sur les études morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires.

##### **II.3.2.2.3.1 Etude morphologique**

###### **a) Aspect macroscopique**

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation. Les éléments d'identifications macroscopiques sont: La forme, la taille et le diamètre des colonies, la chromogénèse, l'élévation, la surface et l'opacité: opaque, translucide ou transparente.

###### **b) Aspect microscopique**

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.

**c) Coloration de Gram**

Les bactéries peuvent être groupées en 2 catégories selon la méthode de coloration de Gram. Après coloration, les bactéries Gram+ deviennent violettes alors que les bactéries Gram- apparaissent en rose. La répartition des bactéries en Gram+ ou Gram- est un critère systématique important pour la classification des bactéries.

Le violet de gentiane se fixe sur des composants cytoplasmiques et après ce temps de coloration, toutes les bactéries sont violettes. Chez les bactéries à Gram négatif, la paroi riche en lipides, laisse passer l'alcool qui décolore le cytoplasme alors que, chez les bactéries à Gram positif, la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool et le cytoplasme demeure coloré en violet.

**d) Recherche de spores**

Ce test a été réalisé en utilisant les galeries traditionnelles pour la souche microbiennes, permettant de distinguer la présence ou l'absence des spores.

**II.3.2.2.3.2 Etude biochimique****a) API 20E :**

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

L'identification se fait par un programme d'identification microbienne.

**b) La galerie API 20NE**

La galerie API 20 NE (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture des résultats et l'identification se fait par le logiciel de apiweb.

### II.3.2.2.3.3 Etude moléculaire

#### a) Le Séquençage

Les isolats présentant une production élevée de biosurfactants et la dégradation d'hydrocarbures ont été sélectionnés et identifiés par séquençage du gène de l'ADNr 16S d'abord par la culture dans un bouillon de soja tryptique et ensuite l'extraction totale de l'ADN de la suspension cellulaire par six méthodes représentant différents types et combinaisons de mécanismes de lyse cellulaire et de méthodes de purification d'ADN et différents kit de biologie moléculaire.

Pour l'amplification du gène de l'ADNr 16S par PCR deux amorces bactériennes universelles de 27F (50 AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG30) et 1429R (50 TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T30) ont été utilisées et l'analyse BLAST a été utilisée afin de comparer la similitude des séquences partielles d'ADNr et d'autres séquences d'ADNr obtenues à partir du NCBI / GenBank. Finalement la construction d'arbre phylogénétique avec la méthode des groupes de paires non pondérées avec moyenne arithmétique (UPGMA) et analyse BOOTSTRAP avec 1000 répliques dans le logiciel MEGA 5.

### II.3.2.2.4 Essais de dégradation des hydrocarbures

#### a) Par la mesure de la densité optique et la croissance microbienne

Pour évaluer la capacité à dégrader les hydrocarbures, ils ont préparé des flacons (1) de 250ml contenant 100 ml du milieu BH liquide avec 2 ml (2 %) d'hydrocarbure. Les isolats ont été incubés dans 5ml de bouillon à 30°C. Après une nuit, les cellules ont été collectées par centrifugation des cultures à 6000 tr / min pendant 15 minutes, ensuite lavées 3 fois avec milieu BH et remises en suspension dans 5 ml du même milieu jusqu'à ce que la DO<sub>600</sub> soit équivalente à 0,91. Un ml d'inoculum a été transféré dans des flacons (1) et des flacons non inoculés restent comme témoins. Les cultures ont été incubées dans l'obscurité à 30 ° C avec agitation constante (160 tr / min) pendant 12 jours. Les modèles et les profils de croissance ont été obtenus par la mesure de la densité optique à 600 nm et le nombre total viable (CFU / ml) des isolats à intervalles de 2 jours.

#### b) Par la méthode gravimétrique

Les hydrocarbures résiduels ont été récupérés par extraction liquide-liquide. Dans un flacon 4 ml d'hexane et 2 ml de l'acétone ont été ajoutés au bouillon de culture et bien agités. Après, à l'aide d'un entonnoir de séparation l'élimination de la phase aqueuse a été réalisée, l'hexane

et l'acétone ont été évaporés par un évaporateur rotatif à 50 ° C de tous les flacons. Après l'évaporation complète, le résidu hydrocarboné obtenu a été pesé et pris comme valeur gravimétrique pour un calcul ultérieure.

Le pourcentage d'hydrocarbure dégradé est déterminé à partir de la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'hydrocarbures dégradés} = (\text{Pt} - \text{Pr}) / \text{Pt} \times 100\%$$

**Pr:** poids du pétrole résiduel ou du diesel dans les cultures.

**Pt:** poids du pétrole résiduel ou du diesel dans les témoins.

### c) Par chromatographie en phase gazeuse

La capacité des isolats à dégrader l'hydrocarbure a été examinée par l'ensemencement des erlenmeyers de 250 ml qui contiennent 100 ml de BH additionné par 2 % d'hydrocarbure, ont été inoculés avec des souches à une DO<sub>600</sub> finale de 0,91 à 30°C avec l'agitation à 160 tr/min, des erlenmeyers parallèles, qui n'ont pas été inoculés avec les isolats, considérés comme témoins pour surveiller la perte des hydrocarbures due à la volatilisation. Après 5 jours d'incubation, l'hydrocarbure résiduel des erlenmeyers inoculés et des témoins non inoculés sont extraits. Les extraits obtenus ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse avec CP-Sil PONA CB Colonne et Flame Ionization Detector (FID) dans les conditions suivantes :

Température initiale 40 °C pendant 1 min, Température finale 150 °C pendant 1 min, Température FID 300 °C min, Débit de température 10 °C/min, Injecteur (mode déversé / splitless) 250 °C, Constant de gaz vecteur (hélium) 40 ml / min.

#### II.3.2.2.5 Méthodes d'analyses de la concentration des hydrocarbures

La détermination des concentrations d'hydrocarbure était par la technique de chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS). L'hélium a été utilisé comme gaz porteur avec un débit constant de 1,0 ml/min. La température d'injecteur et du connecteur était de 270°C et 280°C respectivement et le rapport de division était de 10 :1. Les températures de la source d'ions et du quadripôle étaient de 230 °C et 150 °C, respectivement. La température de four a colonne a été maintenue à 150°C pendant 2min, puis élevée à 200°C à un taux de 5°C/min, suivi d'une augmentation à 290°C à un taux de 30°C/min et à une isotherme de 290°C. Le calcul de l'abondance relative des différents résidus

d'hydrocarbures par le rapport de la surface du pic de chaque hydrocarbure sur la surface de pic du n-pentadécane dans le chromatographe GC.

Calcul le rapport de résidu des hydrocarbures avec l'équation  $R = [S] / [I]$ ,

R=rapport des résidus alcane, [S]=les concentrations de résidus de n-alcane dans les échantillons, [I]=la concentration avant l'inoculation.

Les résultats ont été exprimés en valeurs moyennes avec écart.

#### **II.3.2.2.6 Analyse statistique**

Toutes les expériences ont été réalisées en trois répétitions e la signification statistique des résultats a été évaluée en utilisant Logiciel ANOVA par SPSS.

### III. Résultats et discussion

#### III.1 Résultats

##### III.1.1 Analyses physicochimiques du sol

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

**Tableau 2 :** Résultats des analyses physico-chimiques du sol.

Ph	8,07
Humidité (%)	4,8
Nitrates (Mg/L)	0,4
Nitrites (Mg/L)	5
Phosphore (mg/l)	0,46
sulfate (mg/l)	112
Conductivité (ms/cm)	4,66
DCO (mg/l)	16.5
Azote total (mg/l)	9,62
Azote ammoniac (mg/l)	0,41
Carbone organique total (%)	66,82

Le pH légèrement alcalin 8,05 due au borbier est influencé par celui des boues rejetées présentant des pH allant de 9 à 10 pour éviter la corrosion du matériel de production.

La faible humidité relative du sol (4.8%) étudiée peut être directement liée aux conditions climatiques de la zone d'étude et / ou à la texture du sol.

La composition chimique du sol étudié indique un déficit en éléments azotés et phosphorés (Tableau 2). 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. Ces éléments rentrent dans l'édification des constituants cellulaires lors de la multiplication des microorganismes (synthèse d'ADN, protéines...etc.).

Le milieu contient également, une certaine concentration en électrolytes tels que les nitrites, les nitrates et les dérivés du phosphore, considérés comme indicateurs de la pollution organique. Cependant le nitrate peut provoquer un appauvrissement en oxygène, en servant d'accepteur d'électrons en anaérobiose.

La teneur en COT dans ce sol est très élevée.

De ce fait, il est bien clair que les résultats de ces paramètres indiquant un fort degré de pollution dans le borbier, en aval du déversement des fluides de forage.

### **III.1.2 Analyses microbiologiques du sol**

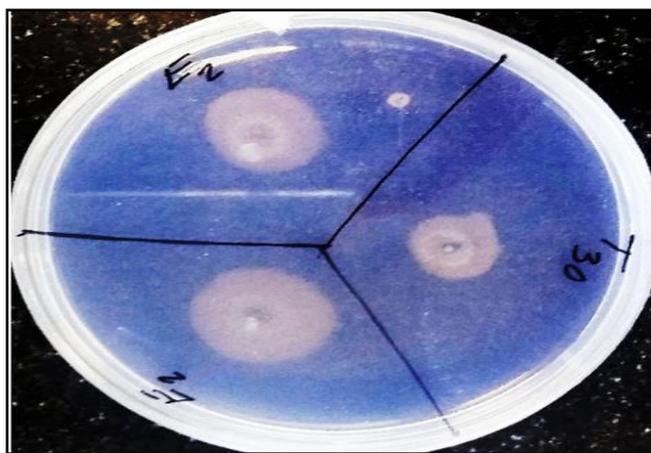
#### **III.1.2.1 Isolement des bactéries du sol contaminé**

Dans cette partie du travail théorique réalisé on va prendre en considération toutes les souches bactériennes isolées et caractérisées par les différents auteurs des articles analysés par la suite on va parler des critères de choix des meilleures souches et leurs identifications phénotypiques et moléculaires.

Au total 57 isolats bactériens présentant des caractéristiques macromorphologiques différentes (taille, couleur, consistance, élévation, forme...ect) ont pu pousser sur le milieu BH additionné de 2% d'hydrocarbure. Ces isolats ont fait l'objet de notre étude.

#### **III.1.2.2 Criblage d'isolats productifs du biosurfactantset dégradants les hydrocarbures**

Le test choisi pour la sélection des bactéries productrices de biosurfactants est le test hémolytique. En se basant sur la formation d'un cercle hémolytique clair et du grand diamètre sur les plaques d'agar nutritif au sang (BNA) indiquant les isolats productives des biosurfactants, les 54 isolats ont montré leurs capacités à produire le biosurfactant. Le diamètre de la zone clair autour de la colonie bactérienne ainsi que la capacité d'utiliser l'hydrocarbure comme source de carbone (L'observation d'un cercle de dissolution de l'hydrocarbure clair qui représente leur potentiel de dégradation de l'hydrocarbure) ont permis de sélectionner 19 isolats pour le reste du travail (Figure 5).



**Figure 5 :** Cercle de dissolution d'hydrocarbure formé sur une plaque de gélose à l'hydrocarbure (Ebadi, 2017).

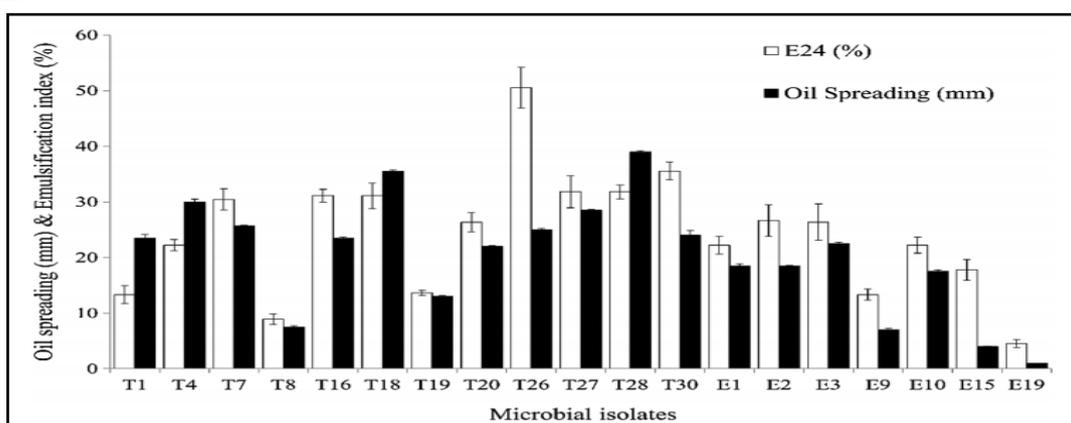
**a) Mesure de la production du biosurfactant et du bioémulsifiant**

Les 19 colonies avec des cercles hémolytiques claires et du grand diamètre ont été étiquetées en fonction des sites d'échantillonnage (Téhéran par T et Espahan par E).

Le test d'épandage a révélé que les différents isolats ont une capacité à produire des composés tensioactifs ; l'isolat T28 a présenté un cercle avec le plus grand diamètre de 3.9cm alors que les diamètres d'isolats T18, T4 et T27 étaient de 3.5, 3, et 2.8 cm respectivement. L'isolat E19 a montré le plus faible diamètre de 0,1cm qui est négligeable significativement proche de celui des témoins (Figure 6).

L'indice d'émulsion E24 qui évalue la capacité émulsifiante a démontré que l'isolat T26 avait la capacité d'émulsion la plus élevée (50.4%) suivi de T30 et T27 avec (37.3%) et (34.2%) respectivement (Figure 6). Une corrélation claire entre l'expulsion des hydrocarbures et la capacité émulsifiante révèle la relation entre la capacité de production de biosurfactants et ces caractéristiques.

Les biosurfactants réduisent les tensions de surface et inter faciales dans les solutions aqueuses et les mélanges d'hydrocarbures et cette capacité les rendent des agents potentiels pour la bioremédiation.



**Figure 6 :** La capacité émulsifiante et de dégradation d'hydrocarbures des 19 isolats isolés (Ebadi, 2017).

### b) Caractérisation des biosurfactants

La caractérisation des biosurfactants a été faite par une analyse en CCM. L'apparition des taches brunes sur la plaque a révélé que 10 isolats produisent les biosurfactants glycolipidiques (les valeurs du rapport frontal (Rf) confirment probablement la production de glycolipides).

Le test de réaction à la ninhydrine a montré qu'aucune modification de couleur n'a été observée ce qui suggère l'absence de production de lipopeptide et donc aucun de 19 isolats ne produit les biosurfactants lipopeptidiques.

Les résultats de caractérisation des biosurfactants sont résumés dans le tableau 3, qui ont indiqué une forte corrélation entre la CCM et la méthode de réaction phénol-acide sulfurique; donc la présence des taches brunes sur la plaque de CCM indique un taux élevé des glycolipides alors qu'une quantité basse ne reflète aucun signe. La quantification de la production de biosurfactants la plus élevée était liée à l'isolat T27 ( $3.7 \text{ g L}^{-1}$ ) suivi par T28 ( $2.4 \text{ g L}^{-1}$ ) et T18 ( $2.39 \text{ g L}^{-1}$ ).

**Tableau 3 :** La relation entre la CCM et la méthode réaction phénol-acide sulfurique (Ebadi, 2017).

Les isolats	Glycolipides $\text{g L}^{-1}$	Les taches brunes en CCM
T1	$0.019 \pm 0.012$	-
T4	$2.08 \pm 0.025$	+
T7	$0.017 \pm 0.012$	-
T8	$0.013 \pm 0.012$	-

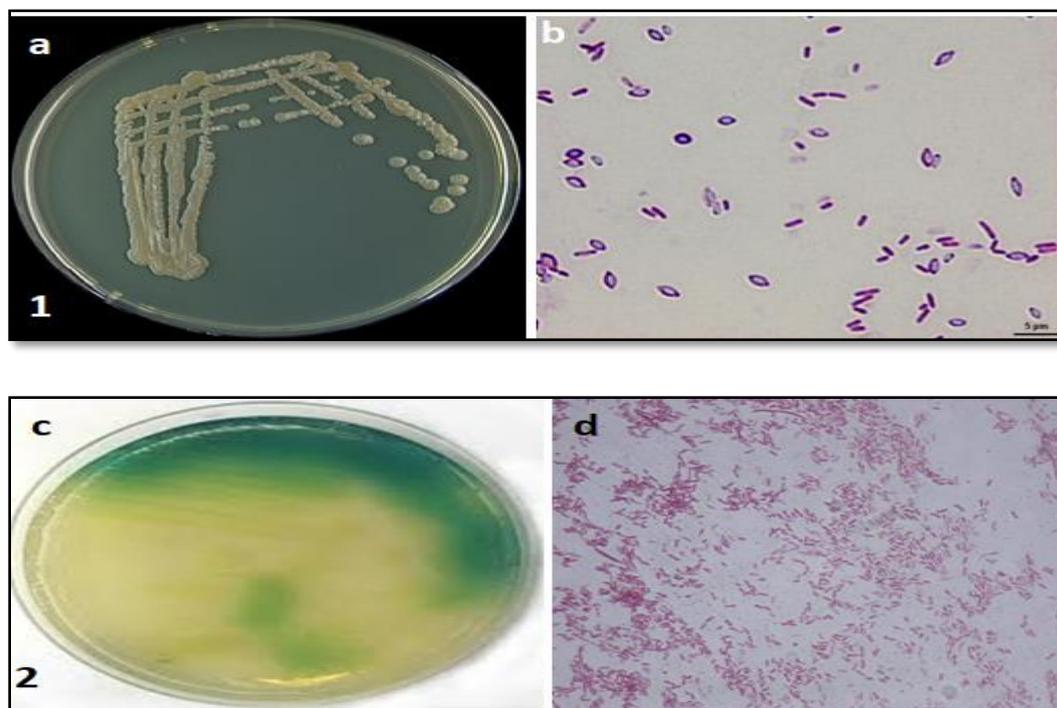
T16	2.18 ± 0.09	+
T18	2.39 ± 0.04	+
T19	0.016 ± 0.015	-
T20	0.028 ± 0.012	-
T26	0.046 ± 0.012	-
T27	3.72 ± 0.3	+
T28	2.46 ± 0.14	+
T30	2.12 ± 0.21	+
E1	2.2 ± 0.19	+
E2	1.93 ± 0.026	+
E3	1.97 ± 0.043	+
E9	0.011 ± 0.004	-
E10	2.19 ± 0.23	+
E15	0.041 ± 0.015	-
E19	0.37 ± 0.034	-

### III.1.2.3 Identification des isolats

Les deux isolats P1 et B2 isolés et purifiés précédemment ont été identifiés en se basant sur les études morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires en étant *Pseudomonas aeruginosa* et *Brevibacillus laterosporus* respectivement.

#### III.1.2.3.1 Etude morphologique et biochimique.

La forme des colonies bactériennes des isolats P1 et B2 ainsi que le résultat de la coloration de Gram sont représentées dans les figures suivantes (Figure 7 : a, b, c et d).



**Figure 7:** les caractéristiques macroscopiques (1a et 2c) et microscopiques après coloration de Gram (1b et 2d) observés sous microscope optique au (Gx100) pour les isolats B2 et P1 respectivement (Benchouk, 2016).

Les résultats de l'étude morphologique (microscopique) et l'identification biochimique (les galeries API 20 E et API 20NE) ainsi que le pourcentage de similarité avec les souches citées sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 4 :** Les caractéristiques de souches P1 et B2 isolées du sol contaminé (Benchouk, 2016).

les caractères	P1	les caractères	B2
Gram	-	Gram	+
Oxydase	+	Oxydase	-
Catalase	+	Catalase	+
Réspiration	aérobicobligatoire	Réspiration	anaérobie facultative
Mobilité	+	Mobilité	+
KingA	+	NO <sub>3</sub>	-
KingB	+	GLU (fermentation)	+
MCC	-	ADH	-
NO <sub>3</sub>	+	URE	-
TRP	-	GEL	+
GLU(fermentation)	-	ONPG	+
ADH	+	ARA	-
URE	+	MAN	+
ESC	-	LDC	-
GEL	+	ODC	-
PNPG	-	TDA	-
GLU	+	IND	-
ARA	-	VP	-
MNE	-	INO	-
MAN	+	CIT	-
NAG	+	SOR	-
MAL	-	RHA	-
GNT	+	SAC	-
CAP	+	MEL	-
ADI	+	AMY	-
MLT	+	H <sub>2</sub> S	-
CIT	+	Hémolyse Sur Le Sang	gamma
PAC	-	Amylase	-
		Lécithinase	-
		Caseïne	+
		Formation De Spore	+
Identitéprovisoire	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Identitéprovisoire	<i>Brevibacilluslaterosporis</i>
Similarité %	99.9	Similarité%	94.1

L'identification biochimique a pu être réalisée à l'échelle du genre en effet, les deux isolats ont été associés selon Bergey's Manual of Determinative Bacteriology comme appartenant aux genres suivants :

#### ***Pseudomonas* :**

La souche P1 : rattachée au genre *Pseudomonas* car elle présente les caractéristiques suivantes : Gram négatif, oxydase positive, catalase positive, non sporulées. Ceci nous a orientés vers la culture de cette souche sur milieux King A et King B spécifiques des *Pseudomonas*. La révélation d'une couleur bleu verte sur King A et un jaune verdâtre fluorescent sur King B confirme l'appartenance au genre *Pseudomonas*. Cette bactérie a un caractère aérobic strict, ADH et citrate positif. Une identification biochimique par les galeries API20NE (tableau 4) a permis de différencier cette souche bactérienne et de l'identifier au tant que : *Pseudomonas aeruginosa*.

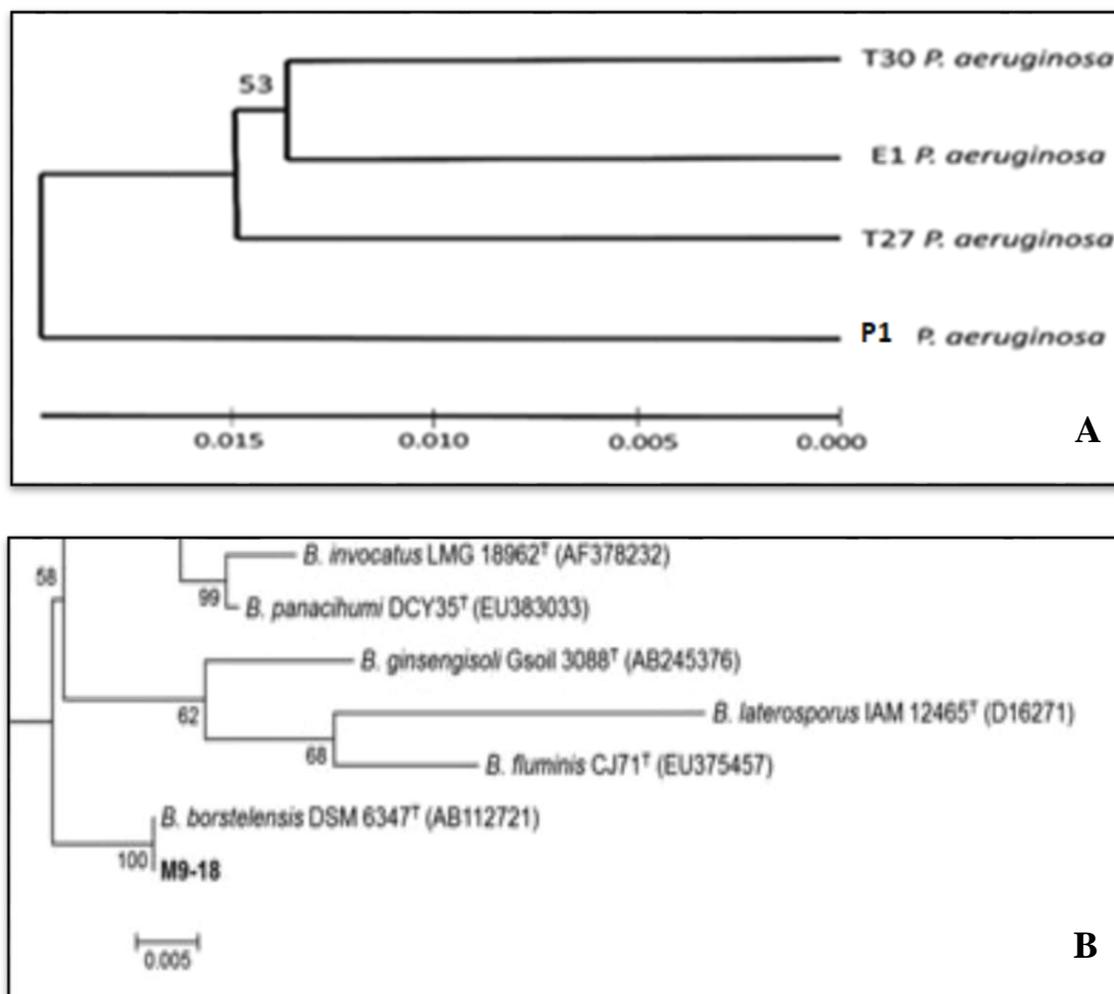
#### ***Bacillus***

La souche B2 est affiliée au genre *Bacillus* en raison qu'elle est mobile, gram positive, capable de former des endospores, aéro-anaérobie facultatif et qui possède une catalase. En effet, ceux sont des caractères spécifiques du genre *Bacillus*.

#### **III.1.2.3.2 Etude moléculaire**

L'analyse par le programme BLAST des 2 souches isolées, en utilisant le séquençage du gène de l'ADNr 16S a montré que ces dernières présentent une homologie très élevée de 99% avec *Pseudomonas aeruginosa*. L'arbre phylogénique illustre que les souches T30, E1 et T27 sont regroupées les unes avec les autres alors que P1 appartenait à un groupe différent ce qui a fait la particularité de cette souche.

Pour l'espèce B2 (*Brevibacillus laterosporus*), elle a été regroupée avec d'autres espèces appartenant au même genre à savoir l'espèce *Brevibacillus ginsengisoli* et *Brevibacillus fluminis* avec des pourcentages de similitude de 62% et 68% respectivement.



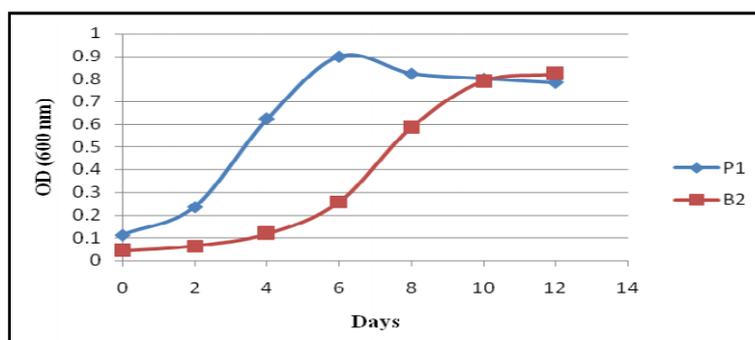
**Figure 8** :L'arbre phylogénique basé sur le séquençage d'ADNr 16s des souches isolées.

A : *Pseudomonas aeruginosa* (Ebadi, 2017); B : *Brevibacillus laterosporus* (Benchouk, 2017).

### III.1.2.3.3 La cinétique de croissance des isolats purifiés

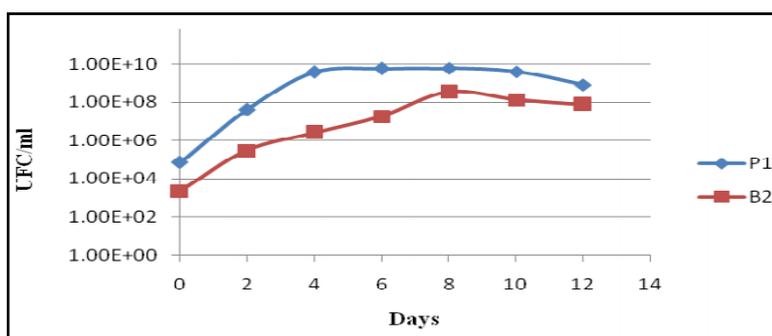
La cinétique de croissance des isolats en présence de 2% d'hydrocarbure a été suivie en mesurant la DO<sub>600</sub> et la concentration microbienne en fonction du temps.

L'augmentation significative de la densité cellulaire à 600 nm et le comptage alterné des colonies après 12 jours d'incubation indique la capacité des souches de cultures à utiliser et à dégrader l'hydrocarbure comme la seule source de carbone, cela a été observé entre le 4<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> jour d'incubation et elle est limitée après le 8<sup>ème</sup> jour d'incubation (Figure 9).



**Figure 9:** Courbe de croissance des isolats P1 et B2 en bouillon BH supplémenté avec 2% d'hydrocarbure (Benchouk, 2016).

Le nombre des cellules P1 et B2 capable de croître sur le milieu BH liquide additionné par l'hydrocarbure a augmenté rapidement pendant l'incubation. Il est passé de  $7 \times 10^4$  CFU/ml pour P1 et de  $2,3 \times 10^3$  CFU/ml pour B2 au premier jour à  $5,9 \times 10^9$  CFU/ml et  $3,4 \times 10^8$  CFU/ml respectivement après 8ème jour d'incubation (Figure 10).

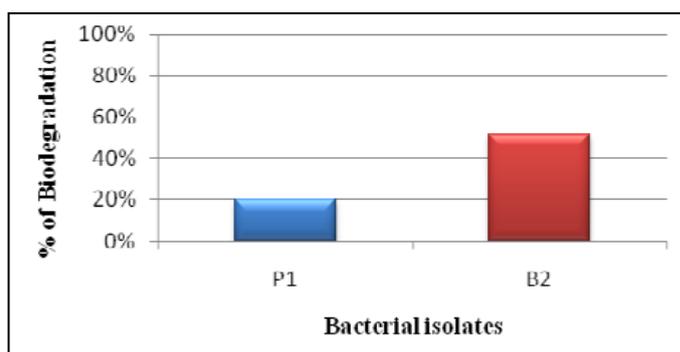


**Figure 10 :** Le suivi de la concentration microbienne des isolats en présence d'hydrocarbure pendant 12 jours d'incubation (Benchouk, 2016).

#### III.1.2.3.4 Détermination de la biodégradation des hydrocarbures par la méthode gravimétrique

Le test de biodégradation a été effectué pour déterminer la capacité des isolats à dégrader les hydrocarbures en inoculant séparément les isolats dans un milieu BH liquide contenant 2% d'hydrocarbure comme seule source du carbone afin d'estimer le potentiel de la biodégradation (Figure 11).

Les résultats ont montré que B2 avait un pourcentage de dégradation plus élevée que P1 de 51,5% et 20% respectivement (tant que le pourcentage de dégradation est supérieur à 5%, le microorganisme est considéré comme un dégradant d'hydrocarbure).

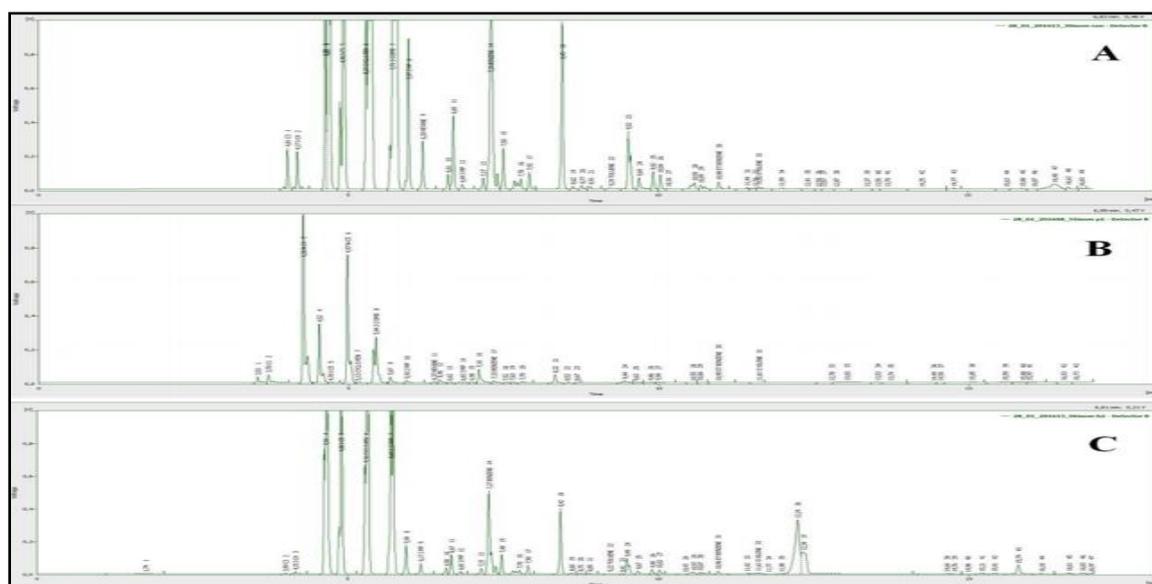


**Figure 11** : Taux de dégradation des hydrocarbures par les isolats bactériens après 12 jours d'incubation (Benchouk, 2016).

### III.1.2.3.5 Analyse de la biodégradation des hydrocarbures par chromatographie en phase gazeuse

Les chromatogrammes d'hydrocarbure inoculé avec les isolats et non inoculé (témoin) sont illustrés dans la figure A. Les résultats d'analyse de l'isolat P1 ont montré que le niveau d'hydrocarbure a été significativement réduit accompagné de l'apparition de produits de dégradation (C1, N-C4, N-C5 et 2-2 diméthyl-butane) (figure B) cela peut être expliquer par la dégradation enzymatique due aux souches microbiennes, la disparition de C3, I-C4, 2-3diméthylbutane et toluène est illustrée dans la figure B.

La figure C montre que la souche B2 a causé la disparition totale d'hydrocarbure du type hexane et a diminué l'hydrocarbure du type isomérate.



**Figure 12**: l'analyse GC-FID d'hydrocarbure obtenu avant (A) et après traitement avec des isolats microbiens pendant 5 jours d'incubation: P1 (B) et B2 (C) (Benchouk, 2016).

#### III.1.2.4 Méthode d'analyse de la concentration des hydrocarbures

La dégradation et l'utilisation des milieux de cultures par SJTD-1 des n-alcanes ont été étudiées en surveillant sa croissance cellulaire pendant 7 jours dans le milieu BMS. Aux plus hautes concentrations des hydrocarbures, la biomasse est plus accumulée par la souche SJTD-1 (comme reflété par  $DO_{600}$ ), et nécessite plus du temps pour atteindre la phase stationnaire. La détermination de l'efficacité de dégradation des hydrocarbures par la souche SJTD-1 était avec GC-MS et les résultats ont montré que la consommation de substrat a été suivie de près par l'augmentation de la biomasse (la perte en raison de la vaporisation et de l'extraction a été exclue en exécutant deux contrôles vides). De plus, pour trouver la plus forte concentration d'hydrocarbures que la souche SJTD-1 pourrait tolérer et utilisait pour la croissance, des analyses de son efficacité de dégradation pour le n-hexadécane ont été faites (concentration allant de 250 mg / L à 2,0 g / L) car le n-hexadécane était peut-être sa plus grande source de carbone. Tous le n-hexadécane pourrait être complètement dégradé en trois jours ; De plus, 250 mg / L et 500 mg / L de n-hexadécane étaient totalement dégradés en 36 h; comme pour 1,0 g / L et 2,0 g / L de n-hexadécane, il a fallu environ un jour de plus pour une dégradation complète. Par conséquent, la souche SJTD-1 peut tolérer et biotransformer complètement 2,0 g / L de n-hexadécane en une quantité relativement importante de biomasse ( $DO_{600} = 1,7$ ).

Ces résultats montrent sa grande capacité de tolérance, sa dégradation rapide et efficacité d'utilisation élevée pour les hydrocarbures (**Huanet *al.*, 2014**).

## III.2 Discussion

### Synthèse des travaux de recherche entrepris sur la thématique « la recherche des souches bactériennes d'intérêts dans l'industrie pétrolier »

La scène économique mondiale est en développement, l'homme est devenu de plus en plus responsable de la pollution de l'environnement, et l'une des pollutions environnementales majeures aujourd'hui est celle causée par les hydrocarbures résultant des activités liées à l'industrie pétrochimique qui d'une façon ou d'une autre contaminent les sols et comme les composants hydrocarbonés appartiennent à la famille des polluants organiques cancérigènes et neurotoxiques, un processus de dépollution doit s'imposer nécessairement. En raison du coût élevé et la limite des processus physiques, chimiques et thermiques, la bioremédiation est donc la technologie prometteuse pour le traitement de ces sites contaminés et qui peut être définie comme étant une dégradation des composés organiques par des procédés biologiques (microorganismes) pour éliminer ces derniers (hydrocarbures) (**Das et Preethy, 2011**).

Afin d'évaluer la qualité de sol et d'estimer le degré de pollution, une détermination d'un certain nombre de paramètres physico-chimiques a été établie. Les paramètres physico-chimiques testés comportant le pH qui est l'un des facteurs les plus importants dans les écosystèmes terrestres (**Ballot1 et al., 2016**). Les résultats d'analyse montrent que le pH trouvé au cours de cette étude est 9,71 donc pH alcalin, pauvre en matière en suspension, riche en phosphate, sulfate et nitrite qui favorise la croissance des bactéries et des champignons et par conséquent assurait un déroulement efficace de la biodégradation des hydrocarbures (**Hafidi et al., 2020**). La teneur en COT dans ce sol est très élevée 66,82% , ce résultat confirme bien une pollution par les hydrocarbures, cette pollution causée par le rejet de boues de forages constitue une source de carbone importante pour les microorganismes. La composition chimique du sol étudié indique un déficit en éléments azotés et phosphorés. Selon **Eckford et al., (2002)** la pollution des sols par les hydrocarbures a pour conséquence un déficit en azote par rapport au carbone, ce qui peut limiter la biodégradation des hydrocarbures. Pour tout traitement biologique, un enrichissement du sol par le phosphore et l'azote 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. Ces éléments rentrent dans l'édification des constituants cellulaires lors de la multiplication des microorganismes (synthèse d'ADN, protéines...etc.) (**Ballerini, 1999**).

Le milieu contient également, une certaine concentration en électrolytes tels que les nitrites, les nitrates et les dérivés du phosphore, considérés comme indicateurs de la pollution organique. La salinité globale du sol est exprimée par la conductivité électrique (CE), les résultats montrent que le sol prélevé est trop salé (CE =2550ms/cm). Ces propriétés physico-chimiques peuvent influencer la population microbienne indigène et accroître leur capacité à dégrader les hydrocarbures et autres source de carbone (**Wellman et al., 2001**)

Plusieurs souches microbiennes ont été identifiées par leurs capacités à dégrader les hydrocarbures, il s'agit par exemple de: *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* (**Oudot et al., 1987**), *Bacillus ssp* (**Lai et al., 2009 ; Tabatabaee et al., 2013 ; Al-Bahry et al., 2016**) *Azospirillum*, *Nitratireductor*, *Acinetobacter*, *Bosea*, (**Al-Bahry et al., 2016**), *Candida tropicalis* (**Farag et al., 2011**), *Pseudomonas aeruginosa* (**Zhang et al., 2007 ; Lai et al., 2009 ; John et al., 2011; Zhang et al., 2012**),). Parmi les travaux réalisés en Algérie **Benchouk et Chibane (2016)** ont isolé deux souches par l'application de la technique d'enrichissement à partir du sol contaminé de la raffinerie d'Arzew (Oran, Algérie), l'identification morphologique et biochimique a permis de différencier deux genres de bactéries ; *Pseudomonas aeruginosa* (P1) et *Brevibacillus sp* (B2); D'autre part, la souche SJTD-1 a été identifiée comme *Pseudomonas aeruginosa* par **Liu et al, (2014)** après des cultures d'enrichissement à partir du sol contaminé de Daqing en Chine. En revanche **Ebadi et al, (2017)** ont isolé 4 souches par l'application de la technique d'enrichissement à partir de deux sols contaminés des raffineries de Téhéran et d'Isphan à Iran comme étant capables de dégrader les hydrocarbures en se basant sur le diamètre des cercles de dissolution.

Les bactéries sélectionnées pour leur capacité à dégrader les hydrocarbures ont fait l'objet d'une identification génétique par le séquençage des gènes codants l'acide ribonucléique ARNr16S et la construction de l'arbre phylogénétique de ces isolats. Après l'amplification des gènes codant ARNr16S par la technique PCR, le séquençage des gènes amplifiés a été réalisé et révèle des informations cruciales à propos des souches isolées. Après comparaison des séquences nucléotidiques convenables avec la totalité des gènes séquencés et publiés dans la base de données NCBI, les résultats d'analyse des 4 souches fait par **Ebadi et ces collaborateurs (2017)** présentent une homologie très élevée de 99% avec *Pseudomonas*

*aeruginosa*. **Liu et al (2014)** à leurs tours ont pu identifier par séquençage la souche SJTD-1 comme *Pseudomonas aeruginosa*; De nombreuses études ont accordé une importance majeure à l'identification génétique des bactéries. **Tabatabaee (2013)** a identifié génétiquement une souche de *Bacillus cereus* à partir d'un sol pollué par du pétrole à l'unité de distillation de la raffinerie de Téhéran (Iran). Dans une autre étude réalisée par **Hentati (2018)** quatre souches ont été identifiées comme: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stratosphericus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus sp* avec des homologies de 99%. L'isolat de bactérie utilisé dans l'étude réalisée par (**El Mahdi et al., 2016**) a été isolé d'une zone polluée par l'hydrocarbure du Champ pétrolifère de Nafoora en Libye, le séquençage de l'ARNr 16S de la bactérie permet de l'identifier comme *Pseudomonas sp*. **Benchouk (2017)** également identifié génétiquement 4 souches (B2, P1, P3 et P4) et l'analyse bioinformatique des données issues du séquençage a indiqué un taux de similitude de 99 % de l'isolat B2 avec *Bacillus sp*. Cependant l'isolat P1 présente un taux de similitude de 100 % avec *Pseudomonas aeruginosa*. Le degré d'homologie des deux isolats P3 et P4 est équitable à 99 % avec la souche de *Pseudomonas putida*; Ces études confirment que l'utilisation de techniques génétiques est l'une des méthodes les plus fiables et précises appliquées à l'échelle internationale pour l'identification microbienne.

La dégradation des hydrocarbures a été observée par **Benchouk (2016)** par l'augmentation significative de la concentration microbienne en milieu BH complété avec 2% d'hydrocarbures de  $7 \times 10^4$  CFU / ml pour *Pseudomonas aeruginosa* à  $5,9 \times 10^9$  CFU /ml et de  $2,3 \times 10^3$  CFU / ml pour *Brevibacillus sp* à et  $3,4 \times 10^8$  CFU / ml. Du même **Ebadi (2017)** a trouvé que *Pseudomonas aeruginosa* utilise les hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie et leur dégradation se manifeste par changement de couleur. D'autre part et d'après les études de **Liu (2014)**, en présence d'hydrocarbure dans le milieu BSM la souche SJTD-1 identifiée comme *P.aeruginosa* a présenté une croissance et une augmentation dans la biomasse ce qui justifié que cette dernière utilise les hydrocarbures comme source du carbone et elle les dégrade du fait elle prend du temps pour qu'elle passe à la phase stationnaire. Ces résultats concordent avec ceux de **John (2011)**, **Rahman (2002)** et **Kayode-Isola (2008)** qui ont trouvé que *Pseudomonas sp* présentent les plus grandes concentrations bactériennes et les plus grandes capacités à dégrader les hydrocarbures, également les résultats de **Xu (2012)** ont montré qu'en présence des hydrocarbures comme source de carbone, la concentration bactérienne a élevé progressivement, à mesure que le temps de bioremédiation progresse.

Les biosurfactants sont un groupe hétérogène de molécules tensioactives et amphiphiles produits généralement par des organismes vivants à savoir les bactéries, les champignons et les levures (**Marchant et Banat, 2012**), d'après **Ebadi (2017)** l'utilisation des biosurfactants produites par la souche *Pseudomonas aeruginosa* pour la dégradation des hydrocarbures a amélioré significativement la biodégradation et donc la capacité de la production des biosurfactants et la biodégradation des hydrocarbures par les bactéries sont deux paramètres très liés, ce qui indique que la production du biosurfactant est un facteur crucial pour une bioremédiation efficace des sols contaminés par les hydrocarbures. Ces résultats ont été confirmés également par **Zhang et al. (2012)** et **Szulc et al. (2014)**. Les genres bactériens connus par leur production des biosurfactants comprennent: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Acinetobacter*, *Thiobacillus*, *Serratia*, *Arthrobacter*, *Alcanivorax*, et *Halomonas* (**Mnif et al., 2011**). Cependant *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* sont les souches les plus étudiées par rapport à la production des biosurfactants (**Banat et al., 2000**). **Ebadi et al (2017)** et par un test d'épandage ont révélé que différentes souches ont une capacité à produire des composés tensioactifs en mesurant le diamètre des cercles hémolytiques alors que l'indice d'émulsion  $E_{24}$  qui évalue la capacité émulsifiante a démontré que *Pseudomonas sp.* avait la capacité d'émulsification la plus élevée (50.4%). Les travaux de **Benchouk (2017)** ont montré que le diesel était le substrat le plus approprié pour les souches *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas putida* avec un  $E_{24}$  maximum de 53, 53 et 50% respectivement. Dans ce sens les résultats obtenus dans l'étude de **Sutton et al (2011)** ont indiqué que la capacité de *Pseudomonas sp.* à utiliser les hydrocarbures comme seule source de l'énergie et du carbone organique est expliqué par la production de biosurfactants lipidiques qui augmentent la capacité de biodégradation et qui à leurs tour améliorent la bioremédiation par deux mécanismes. Le premier comprend l'augmentation de la disponibilité du substrat pour les micro-organismes, tandis que le second implique une interaction avec la surface cellulaire, ce qui augmente l'hydrophobicité de la surface, permettant aux substrats hydrophobes de s'associer plus facilement aux cellules bactériennes (**Magdalena et al., 2014**). L'amélioration de l'accessibilité et la biodisponibilité des hydrocarbures pétroliers non miscibles à l'eau pour la dégradation des hydrocarbures se réalise par pseudosolubilisation (**Zhang et al., 2012**) qui est confirmé par les travaux de **Ebadi et al (2017)** qui ont constaté que les biosurfactants réduisent les tensions de surface et inter faciales dans les solutions aqueuses et les mélanges

d'hydrocarbures, ce qui les rend des agents potentiels pour la bioremédiation. Ces derniers ont constaté également et par une analyse en CCM que *Pseudomonas sp.* produise des biosurfactants glycolipidiques du type (mono et di) rhamnolipides qui concorde avec les résultats du **Abdel-Mawgoud et al. (2010)** qui ont constaté que les biosurfactants sont produits principalement par l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*. D'autre part **Wadekar et coll (2012)** ont constaté également que *Pseudomonas sp.* cultivé en milieu enrichi en huile végétale produit un mélange de deux types de rhamnolipides.

La capacité à dégrader Les hydrocarbures a été déterminés par la méthode gravimétrique, la dégradation a été analysée pour plusieurs espèces fongiques et bactériennes. Les résultats des travaux de **(Veerapagu et al., 2019)** montrent que *P. aeruginosa* et *B.subtilis* isolés à partir de site contaminé présentaient une capacité de dégradation maximale du pétrole brut 88,75% et 87,41% respectivement par analyse gravimétrique après 30 jour d'incubation. Alors que les travaux de **Benchouk (2016)** ont montré que les souches B2 (51,35%) et P1 (20%) ont les meilleurs niveaux de biodégradation du diesel après 12 jours d'incubation. **Panda et al. (2013)** ont observé que le pourcentage de dégradation du diesel de *Pseudomonas aeruginosa* isolé des sols contaminés, était de 49,93% après une période d'incubation de 20 jours. Autres travaux **(Chithra et Hema, 2014)** ont constaté que *Pseudomonas sp.* possédait un taux de dégradation de l'huile de (92,3%) qui était meilleur que d'autres espèces dont *Bacillus* (83,7%) et *Micrococcus* (35,5%) après 25 jours d'incubation.

La biodégradation des hydrocarbures a été étudiée également par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID), et en comparaison avec un témoin incubé dans les mêmes conditions. Les chromatogrammes de GC-FID expriment une réduction dans le niveau d'hydrocarbure accompagné de l'apparition de produits de dégradation, C1, N-C4, N-C5 et 2-2 diméthyl-butane, en présence de *Pseudomonas aeruginosa*. L'hydrocarbure du type hexane a été disparus totalement et l'hydrocarbure du type isomérate a été réduit par la souche *Brevibacillus laterosporus*. Ceci confirme qu'il les a utilisés comme source de carbone **(Benchouk, 2016)**. D'autre part **Ebadi (2017)** qui a identifié quatre isolats T30, T27, T4 et E1 comme étant: *Pseudomonas sp.* et a révélé qu'ils étaient capables de réduire les hydrocarbures du poids moléculaire faible et élevé. D'autres résultats trouvés par **Hantati (2018)**, les chromatogrammes de GC-FID exposent que la souche *Bacillus licheniformis* est active sur l'hydrocarbure du type pyrène. Ceci est confirmé par la diminution du pyrène, aussi la souche *Staphylococcus* est capable de dégrader 72% des

hydrocarbures aliphatiques présents dans le pétrole brut (1%, v/v) après 20 jours d'incubation à 37 °C et ce résultat a été confirmé par la diminution ou la disparition totale des pics correspondants aux différents alcanes de C13-C29. Une autre souche de *Pseudomonas putida*, joue un rôle important dans la dégradation des HAPs mixtes (naphtalène, phénanthrène et pyrène) (**Dutta et al., 2017**). En revanche des analyses GC-MS, ont été également réalisées pour étudier la dégradation des n-alcanes par la souche SJTD-1 identifiée comme *Pseudomonas aeruginosa*. Les résultats obtenus indiquent la capacité de *Pseudomonas* a dégradé plus 250 mg / L et 500 mg / L de n-hexadécane en 36h. **El Mahdi et al., (2016)** ont examiné la biodégradation du pétrole brut par la souche NAF1 par le moyen de la CG-SM. Ils ont prouvé que la souche *Pseudomonass* sp. était active avec les hydrocarbures aliphatiques totaux présents dans le pétrole brut (C11–C30) après 28 jours d'incubation. En outre Les résultats d'**Akmouci (2009)** manifeste que la souche *Pseudomonass* sp, représente un taux de biodégradation important des n-alcane C10 C25 (68% POUR n-C10).

### IV. Conclusion et perspectives

Les hydrocarbures sont considérés comme des contaminants environnementaux prioritaires à cause de leur caractère récalcitrant et leur activité mutagène et/ou cancérigène. La biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes est considérée comme le processus primordial d'élimination de ces contaminants.

La bioremédiation des milieux contaminé par les hydrocarbures pétroliers repose sur la capacité des microorganismes à décomposer ce type de polluants. Des études ont été menées sur les microorganismes présents dans des sols soumis à une contamination en hydrocarbures chronique et élevée depuis plusieurs décennies.

Dans un premier volet, nous nous sommes intéressés à la caractérisation physico-chimique des échantillons étudiés. Les résultats prouvent une contamination par des micropolluants organiques (hydrocarbures) qui sont considérés comme des excellents traceurs de la pollution urbaine et industrielle et ils font partie des composés les plus toxiques étant donné leur faible biodégradation.

Par ailleurs, l'approche microbiologique par des tests morphologiques et biochimiques par des galeries, et l'approche moléculaire PCR et le séquençage d'ADN 16s ont été utilisées pour identifier et caractériser les espèces bactériennes isolées. Deux souches ont été isolées et identifiées comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Brevibacillus laterosporus*.

La capacité de dégradation des souches bactériennes isolées a été prouvée par le test de la croissance sur des milieux contenant des hydrocarbures comme seule source de carbone et par leurs capacités à épuiser ou réduire ces composants.

Afin de mesurer la capacité de dégradation de bactéries sélectionnées en réponse à l'effet polluant ou stimulant de l'hydrocarbure, plusieurs méthodes ont été utilisées: l'index d'émulsification (E<sub>24</sub>), la détermination de pourcentage de biodégradation par la méthode gravimétrique et l'analyse de la biodégradation des hydrocarbures par chromatographie en phase gazeuse.

Les résultats globaux montrent que la biodégradation se fait dans les 96 heures après l'incubation et décélère avec le temps et que le genre *Pseudomonas* était le principal acteur de la dégradation, il est le plus connu pour être utilisé dans la biodégradation des hydrocarbures à

cause de sa production de biosurfactants, qui jouent un rôle majeur dans l'amélioration de la bioremédiation en solubilisant les hydrocarbures hydrophobes adsorbés sur les particules des sols.

En guise de perspectives, nous recommandons de développer les points suivants :

A travers cette étude, nous constatons que la méthode de traitement biologique s'avère la solution optimale, du fait qu'elle ne demande pas trop d'appareillage, ni de grand budget.

Il serait important de favoriser les technologies « in situ » dont la bioremediation.

Il serait aussi important de connaître les mécanismes enzymatiques impliqués dans la dégradation et la transformation des hydrocarbures qui permettra d'optimiser les techniques de bioremediation.

De plus, il est important d'étudier les interactions : sol/microorganisme, en vue de développer des stratégies précoces pour évaluer la qualité des sols en réalisant les objectifs :

- Développer des méthodes pour classer les sites pollués dans le but de leur décontamination.
- Développer des méthodes d'évaluation des risques, pour caractériser l'impact écotoxicologique (mesurer un risque).

