

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة امحمد بوقرة بومرداس
Université M'Hamed BOUGARA de Boumerdès



Faculté des Sciences
Département de Biologie

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de Master II
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Thème

***Valorisation Et Traitement Des Rejets Pétroliers
Par Voie Microbienne***

Réalisé par :

Mme Zella Nassima , Mme Bouchireb Naima et Mme Chaouche Sabrina

Soutenu 26/09/2022, devant le Jury :

<i>Présidente</i>	<i>KHEMILI-TALBI Souad</i>	<i>Pr.</i>	<i>UMBB</i>
<i>Examinatrice</i>	<i>LENCHI Nessrine</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. Alger 1</i>
<i>Promotrice</i>	<i>KEBBOUCHE-GANA Salima</i>	<i>Pr.</i>	<i>UMBB</i>
<i>Co promotrice</i>	<i>ANGAR Yassmina</i>	<i>MCA</i>	<i>UMBB</i>

Année universitaire 2021/2022

Remerciements

Avant tout nous remercions ALLAH tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et les moyens pour accomplir ce travail.

Nous tenons à remercier vivement notre promoteur Mme Kebbouche Salima, professeur à l'Université de Boumerdés qui était à l'origine du choix de ce thème, pour avoir dirigé ce travail, nous lui devons beaucoup de respects, il a su se rendre disponible pour répondre à la moindre de nos incertitudes.

Nos plus sincères remerciements et gratitude s'adressent à notre Co promotrice : Mme Anger Nessma pour ses conseils, et ses orientations judicieuses tout au long de ce travail.

Nos remerciements s'adressent également aux membres du jury qui ont accepté de nous faire l'honneur du juger ce travail.

En fin, à ceux qui n'ont pas été cités par omission involontaire de notre part et qui ont contribué de près ou de loin de la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

*À ma chère mère **Zahia**, l'amour, la flouer de ma vie,*

*À mon chère Père **Kamel**, mon soutien*

Je vous remercie de votre confiance et de votre encouragement, que dieu vous préserver en bonne santé et vous accorder bonheur et longue vie.

*À mes chers frères **Mounir**, **Abderaouf** et mon bras droit **Walid**.*

*À mes très chers sœurs **Samia** et **Wissem**.*

*À mes chères petites enfants de ma famille **María**, **Assil**, **Khaoula**, **Djomana** et **Dania**.*

*À mes nouvelles sœurs **Ibtissam** et **Nidhal**.*

*À tous mes cousines **CRAZY GYRLS** : **Imene**, **Amína**, **Rania**, **Nour El Houda**, **Manel** et **Yassmin** .*

Marwa**, **Amira**, **Anfal**, **Karima**, **Hakima** et **Mouna

*À mes amis proches : **Yassmin**, **Soumia**, **Nassima**, **Nadjla** **Samar**.*

*A mes chère trinôme **Naïma** et **Sabrina**.*

*À toute la famille **ZELLA** et **BOUTAKIL**.*

À toute ceux qui j'aime et ceux qui m'aiment.

ZELLA Nassima

Dédicace

A mes très chers parents.

*A toute ma famille. Je vous dédie cette mémoire en
guise de reconnaissance.*

À toute la famille Bouchireb et BechBkit.

*A mes amies, de la promotion de Biotechnologies
microbienne 2021-2022.*

A tous ceux qui m'aiment et m'aiment

Naïma Bouchireb

Dédicace

Avant toute dédicace, je tiens à remercier dieu le tout puissant qui m'a donné le courage et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour :

A celle qui ma arrosé de tendresse et d'espoirs, à la source d'amour incessible, à la mère des sentiments fragiles qui ma bénie par ces Prières.....ma mère

A mon support dans ma vie, qui m'a appris, m'a supporté et ma dirigé Vers la gloire.....mon père

A mes chères frères azeddine et lyes

Et ma adorable petite sœur manel

Puisse dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorde-le bonheur, la santé, longue vie incha'allah.

A tout personne qui m'a aidé et mon encouragé pour réaliser se modeste travail.

A mes chère trinôme Nassima ET Naima

A toute la promotion BTM 2022

A toutes ET tous que j'aime et qui m'aiment

Chaouche sabrina

Résumé

Ce travail a pour but de valoriser et de traiter des rejets pétroliers en étudiant la capacité de biodégradation des bactéries "pouvoir émulsifiant" d'un échantillon contaminé par les hydrocarbures pétroliers. D'autre part, la caractérisation et l'isolement des souches bactériennes présentes dans notre échantillon qui se trouve autour des bacs de stockage et anciens bourbiers au niveau de la zone industrielle Haoud El- hamra Ouergla.

Pour cela on a isolé à partir de ces anciens bourbiers deux types d'échantillons : des sols (sous différents aspects) et des échantillons de l'eau contaminés par des hydrocarbures. L'isolement nous a permis de purifier 88 souches et l'étude de leurs pouvoirs émulsifiants via le test d'émulsification E24 nous a permis par la suite, de sélectionner seulement cinq souches qui ont un pouvoir émulsifiant considérable.

Ces souches émulsifiantes ou bactéries hydrocarbonolastes ont donc la capacité de produire des bio molécules ; les biosurfactants agiront au niveau des sites de contamination en dégradant ces hydrocarbures.

L'identification macroscopique, microscopique et biochimique a été révélée leurs appartenances au genre *Bacillus*.

Mots clés : biosurfactants, pouvoir émulsifiant, bactéries hydrocarbonolastes

Abstract

This work aims to valorize and treat oil waste by studying the biodegradation capacity of bacteria "emulsifying power" of a sample contaminated by petroleum hydrocarbons. On the other hand, the characterization and isolation of hydrocarbonoclast bacterial strains, present in our sample, which is found around storage tanks and old sloughs at the level of the Haoud Elhamra Ouergla industrial zone.

For this, two types of samples were isolated from these old quagmires: soil (in different aspects) and water samples contaminated with hydrocarbons. The isolation allowed us to purify 88 strains and the study of their emulsifying power via the E24 emulsification test allowed us to select only five strains, which have considerable emulsifying power.

These emulsifying strains or "hydrocarbon bacteria" therefore have the capacity to produce biomolecules biosurfactants acting at contamination sites by degrading these hydrocarbons.

The macroscopic, microscopic and biochemical identification revealed their belonging to the genus *Bacillus*.

Keywords: biosurfactants, emulsifying power, hydrocarbonolaste bacteria, *Bacillus*

ملخص

يهدف هذا العمل إلى تثمين ومعالجة النفايات النفطية من خلال دراسة قدرة التحلل البيولوجي للبكتيريا "قدرة الاستحلاب" لعينة ملوثة بالهيدروكربونات البترولية. من ناحية أخرى، فإن توصيف وعزل السلالات البكتيرية للطبقة الهيدروكربونية الموجودة في عينتنا والتي توجد حول صهاريج التخزين والكبريتات القديمة في منطقة حوض الحمراء الصناعية.

لهذا الغرض، تم عزل نوعين من العينات من هذه المستنقعات القديمة: التربة (تحت جوانب مختلفة) وعينات المياه الملوثة بالهيدروكربونات. سمحت لنا العزلة بتنتقية 88 سلالة ودراسة قدرتها على الاستحلاب عبر اختبار الاستحلاب 24E سمحت لنا باختيار خمس سلالات فقط لها قوة استحلاب كبيرة.

وبالتالي فإن سلالات الاستحلاب أو "البكتيريا الهيدروكربونية" لديها القدرة على إنتاج الجزيئات الحيوية؛ العوامل الحيوية الخافضة للتوتر السطحي تعمل في مواقع التلوث عن طريق تحطيم هذه الهيدروكربونات.

كشفت التحديد العياني والميكروسكوبي والكيميائي الحيوي عن انتمائهم إلى جنس العصيات.

الكلمات المفتاحية:

Bacillus، المواد الحيوية، قوة الاستحلاب، بكتيريا الهيدروكربونات

Remerciements	
Dédicaces	
Résumé	
Table des matières	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des annexes	
Introduction générale	1

PARTIE SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 01 : Généralités sur les rejets Pétroliers

I Les Bourbiers	2
I.1 Définition Des Bourbiers :	2
I.2 Caractéristiques des bourbiers	3
I.3 Influence des bourbiers sur l'environnement	4
I.4 Stockage des bourbiers.	5

Chapitre 02 Procédés de Traitement des Sites Contaminés Par les Hydrocarbures.

I. Introduction	7
II. Différents procédés adoptés pour l'élimination des hydrocarbures	7
II.1 Traitement physique.	7
II.2 Traitement thermique.	7
II.3 Traitement chimique.	8
II.4 Traitement biologique.	8

II.4.1 Principe.	8
II.4.2 Applications	9
II.5 Perspectives des traitements biologiques,	10
II.5.1 Les traitements combinés	10
III Facteurs influençant le déroulement d'un traitement biologique	10
IV La biodégradation biologique par l'utilisation de biosurfactants.	12
IV.1 Les biosurfactants	13
IV.2 Structures des biosurfactants.	14
IV.3 Classification des biosurfactants et microorganismes producteurs	15
IV.4 Propriétés des biosurfactants	16
IV.5 Microorganismes producteurs et paramètres influençant la production des biosurfactants.	17
IV.6 Utilisation des biosurfactants.	18

PARTIE MATERIEL ET METHODES

I. Matériels	21
I. 1. Matériels non biologiques	21
I.2. Matériel biologique	21
II. Méthodes	23
II.1 Méthodes physicochimiques	23
II.2. Méthodes microbiologiques	24
II.2.1. Isolement des microorganismes	24
II.2.1.1 Préparation des dilutions et ensemencement sur milieu solide	24
II.2.1.2 Enrichissement en milieu liquide	24
II.2.1.3 Purification des colonies	25
II.2.1.4 Conservation des souches	25

II.2.2. Sélection de microorganismes produisant les biosurfactant par le test d'émulsification E ₂₄ :	25
II.2.2.1 Préparation du moût de fermentation :	25
II.2.3. Identification préliminaire des souches :	27
II.2.3.1 Aspect macroscopique	27
II.2.3.2 Aspect microscopique	27
II.2.4. Caractérisation biochimique et physiologique des souches sélectionnées	29
II.2.4.1 Identification des bactéries par les galeries biochimiques miniaturisées 20E et CH50	30
II.2.5 Production de biosurfactants microbiens en masse	33
II.2.5.1 Culture en Erlen	33
II.2.5.2 Extraction des biosurfactants	33
II.2.5.3 Essai de purification des biosurfactants et caractérisation des extraits semi purifiés	33

PARTIE RESULTATS ET DISCUSSION

I Introduction	37
II.1 L'analyse physico-chimique des échantillons	39
II.2. Les résultats des méthodes microbiologiques	39
II.2.1. Résultats d'isolement des microorganismes	39
II.2.1.1 Préparation des dilutions et ensemencement sur milieu solide	39
II.2.1.2 Résultats d'enrichissement en milieu liquide	41
II.2.1.3 Résultats de purification des colonies	44
II.2.2 Sélection de microorganismes producteurs des biosurfactants par le test d'émulsification E ₂₄	50
II.2.3. Identification préliminaire des souches	54
II.2.4. Caractérisation biochimique et physiologique des souches sélectionnées	56
II.2.4.1 Identification des bactéries par les galeries biochimiques miniaturisées 20E	56

et CH50	57
II.2.5 Production de biosurfactants microbiens en masse	58
II.2.5.1 Culture en Erlenmeyer	
II.2.5.2 Essai de purification des biosurfactants et caractérisation des extraits semi purifiés	
II.2.5.2.1 Chromatographie sur couche mince	
Conclusion	
Références	
Annexes	

Liste des abréviations

μL : Microlitre

API : Appareillage et Procédé d'Identification

ATP : Adenosine triphosphate.

BDD : Base De Données

BMAB : Bioinformatique, Microbiologie Appliqué et biomolécule

BN : Bouillon nutritif

BP : Boue pétrolière

BTEX : Benzène, toluène, éthylbenzène et xylènes

C° : Degré Celsius de température.

CCM : Chromatographie sur couche mince

CE50 : Concentration effective à 50 %, c'est à dire affectant 50 % de la population testée.

CMC : Concentration Micellaire Critique.

D : Dilution

DCRD : Direction centrale de recherche et de développement

E24 : Indice d'émulsification

G, mg : Gramme, milligramme.

GN : Gélose nutritive

H, min, s : heure, minute, seconde.

H₂O : L'eau

H₂O₂ : Le peroxyde d'hydrogène

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

Hc : Hydrocarbure

HCl : Acide chlorhydrique

HEH : Haoud El Hamra

IR : Infrarouge

MEOR : Microbial-Enhanced Oil Recovery (récupération du pétrole par voie microbiologique).

Liste des abréviations

n : Nombre des colonies dénombrés N : nombre des microorganismes

NaOH : Hydroxyde de sodium

NAPL : Phase liquide non aqueux

NAPL : Phase liquide non aqueux

ONPG : Ortho-nitrophényle B- galactosidase

PDA: Potato Dextrose Agar

PET: Polyéthylène

pH : Potentiel Hydrogène

Sp : Espèce non précisée.

T : Température

TPH : Taux d'hydrocarbure totaux

UFC : Unité formant colonie

UO : Microorganisme

V : Volume

SFA : Spectrométries de fluorescence atomique

NB : Nouveaux bourbiers

BE : Bassin d'évaporation

PAB : Plus anciens bourbiers

ABF : Anciens bourbiers fond

MR : Mouraj

Liste des figures :

Figure 1 : Bourbiers avant l'opération de forage à Hassi-Messaoud	2
Figure 2 : Bourbiers après l'opération de forage à Hassi- Messaoud.	2
Figure 3 : Bourbier issu de la fracturation hydraulique à In Salah lors du forage de schiste d'Ahnet en association avec la société Française Total	3
Figure4 : Schéma résumant les impacts des bourbiers sur l'environnement	5
Figure 5 : Réservoirs sous pression	5
Figure 6 : Réservoirs atmosphérique	6
Figure7 : Réservoirs à toit flottant	6
Figure 08 : Structure de tensioactif	13
Figure 09 : Les différents types de tensioactifs.	14
Figure 10 : Les anciens bourbiers (NB 01et NB 02) (Centre de Recherche et de Développement, Sonatrach Boumerdes 2022).	21
Figure 11 : Points d'échantillonnage (Centre de Recherche et de Développement, Sonatrach Boumerdes 2022).	22
Figure 12 : Représentation schématique avec photos originale du principe du test d'émulsification.	27
Figure 13 : Principe de la coloration de la spore	30
Figure 14 : Révélation des tests positifs dans l'API 20 E	34
Figure 15 : Culture en erlens des souches microbiennes bactériennes	35
Figure 16 : Principaux éléments d'une séparation CCM	36
Figure 17 : Le taux d'hydrocarbure totaux présent dans les échantillons prélevés.	37
Figure 18 : la salinité présente dans les échantillons prélevés de différentes zones	38
Figure 19 : pH mesuré des échantillons prélevés de différentes zones.	38
Figure 20 : Teneur en mercure (Hg) (ug/L) des échantillons prélevés.	39

Figure 21 : Teneur en plomb ($\mu\text{g /L}$) des échantillons prélevés.	39
Figure 22 : Résultats de culture par enrichissement.	42
Figure 23 : Pouvoir émulsifiant E24% des souches isolées après 24 h de la réalisation de test.	53
Figure 24: Culture En Erlenmeyer dans un incubateur agitateur	61

Tableau 1 : Facteurs influençant les performances d'un traitement biologique.	11
Tableau 2 : Synthèse des principes options généralement disponibles pour la séparation et l'élimination d'hydrocarbures et des macro-déchets.	12
Tableau 03 : Principales classes de biosurfactants selon le poids moléculaire.	15
Tableau 04 : Principales classes de biosurfactants selon la nature chimique et ces micro-organismes producteurs.	16
Tableau 05 : Toxicité de biotensioactifs comparée à celle de surfactants chimiques	17
Tableau 06 : Applications des biosurfactants dans l'industrie pétrolière	19
Tableau 07 : Provenance des différents échantillons utilisés	22
Tableau 08 : Tableau de lecture de la galerie Api 20 E	33
Tableau 09 : Les résultats obtenus des analyses physico-chimique des certains échantillons.	37
Tableau 10 : Les colonies bactériennes des solutions mères et des dilutions 10^{-3} et 10^{-6} des différents échantillons	40
Tableau 11 : Photos d'isolement après enrichissement	42
Tableau 12 : photos de purification des souches isolées	44
Tableau 13 : Observation macroscopique et microscopique des champignons purifier	49
Tableau 14 : observation macroscopique de souches purifiées.	51
Tableau 15 : l'activité émulsifiante des isolats obtenu par le calcul de l'index d'émulsification (E24%).	53
Tableau 16 : observation macroscopique et microscopique des émulsions	54
Tableau 17 : observation microscopique X100 par microscope photonique de souches purifiées.	55
Tableau 18 : Résultats des tests biochimiques.	56
Tableau 19 : Les résultats de la galerie biochimique API 20 E.	57
Tableau 20 : Les résultats de la galerie biochimique API 50 CH	58

Liste des annexe

Annexe 1 : liste des appareils, verrerie et réactifs utilisés.

Annexe 02 : composition des milieux de cultures et solutions utilisées.

Annexe 03 : tableau de démembrement des colonies.

Annexe 04 : Les tests biochimiques.

Annexe 05 : Photos des tests de révélation.

Annexe 06 : Méthodes opératoire d'analyse physico-chimique des échantillons.

Annexe 07 : Images des équipements utilisés.

Introduction générale :

Les hydrocarbures pétroliers forment une classe de produits d'usage mondialement répandu et d'applications multiples.

L'Algérie est l'un des grands pays producteur et importateur de sources énergétiques fossiles (gaz et pétrole) (Rammade, 2007). Cet usage massif peut engendrer une pollution par les hydrocarbures des sites et des sols qui se situent alentour des équipements et des installations de l'industrie pétrolières (Norini, 2007).

La pollution du sol par les hydrocarbures pose d'importants problèmes environnementaux nécessitant des procédés performants de traitement. Cependant, les voies d'élimination physique et chimique ont certaines limites d'applications à cause de leur coût et de leurs impacts secondaires sur l'environnement. En revanche, la voie biologique est actuellement la plus employée grâce à ses avantages diverses. (Ali Ahmed, 2011).

La biodégradation est basée sur les capacités enzymatiques de certains microorganismes à activité hydrocarbonolaste ces microorganismes proviennent de milieux très variés et peuvent vivre dans des conditions extrêmes : des températures en dessous de 0°C ou au contraire, très élevées, dans des milieux mondés ou en plein désert, en présence d'un excès d'oxygène ou milieu anaérobie. En raison de leur pouvoir d'adaptation. L'existence d'organismes susceptibles de métaboliser les hydrocarbures a été signalée dès le début du 20ème siècle par Sohgen (Gatellier, 1970).

Les bactéries sont des acteurs essentiels dans le recyclage des composés organiques de toutes natures, contribuant ainsi à la biodégradation d'une foule de substances utilisées comme source d'énergie ou comme source de carbone directement assimilable par les cellules (Pelmont, 1995).

En effet, certaines bactéries ont le pouvoir de synthétiser des biomolécules appelées biosurfactants, qui ont des propriétés fonctionnelles spécifiques qui ont plusieurs applications, tels que ; la bioremédiation, l'extraction du pétrole, des applications cosmétiques, détergentes et émulsifiantes pour l'industrie alimentaire.

Les biosurfactants les plus étudiés et les plus utilisés sont d'origine glycolipidique et lipopeptidique. Les rhamnolipides sont des métabolites de *Pseudomonas aeruginosa* alors que les surfactines sont issus de la souche *Bacillus* sp. Le principal obstacle de l'utilisation des biosurfactants est leurs coûts. A l'heure actuel, il est possible de les diminuer grâce à la valorisation des sous-produits. Il est possible d'utiliser des déchets agricoles et d'autres déchets de diverses industries (huiles de moteurs usagées...) pour diminuer les coûts de production des bio surfactants, d'une part, et diminuer la quantité des déchets à traiter d'autre part (Makkar et Cameotra., 2002).

ce modeste manuscrit est structuré de trois chapitres : le premier chapitre présente une synthèse bibliographique autour des borbiers et packs de stockages des rejets pétrolier ainsi les différents traitements physique, chimique, thermique et essentiellement biologique utiles pour l'élimination des sols pollués par les hydrocarbures par production des biosurfactants

par des bactéries hydrocarbonolastes ,le second décrit le matériel biologique et non biologique et les méthodes utilisés dans le laboratoire, et un troisième chapitre consacré aux résultats et discussions.

***PARTIE SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE***

Chapitre 01

Généralités Sur Les rejets Pétroliers

Les bourbiers de forages

I. Les Bourbiers

I.1 Définition Des Bourbiers :

Dans le domaine de l'exploitation pétrolière, un bourbier est une panoplie de produits chimiques employée dans la formulation des boues de forage. Ces composés de natures différentes et dont la toxicité et La biodégradabilité sont des paramètres mal définis, sont cependant déversés dans la nature. En plus des hydrocarbures (HC, tels que le gaz-oil) constituant majeur des boues à base d'huile, on note les déversements accidentels du pétrole, ainsi que d'une variété d'autres produits et additifs spéciaux (tensioactifs, polymères, ..) qui peuvent exister sur les sites de forage **Figure 1 2 3**. Ces rejets sont généralement stockés dans des endroits appelés "bourbiers" (**khodja, 2008**).

Les deux figures qui suivent nous donnent les images sur les bourbiers avant et après l'opération de forage sur la zone de Hassi-Messaoud :



Figure1 : Bourbiers avant l'opération de forage à Hassi-Messaoud (**Hadj Abbas, 2011**)



Figure2 : Bourbiers après l'opération de forage à Hassi- Messaoud. (**Hadj Abbas, 2011**)



Figure 3 : Bourbier issu de la fracturation hydraulique à In Salah lors du forage de schiste d'Ahnet en association avec la société Française Total (DADA, 2010)

Ainsi, le bourbier se définit comme une excavation à ciel ouvert avec en moyenne, 30 à 60 m de largeur, 50 à 100 m de longueur et 1 à 3 m de profondeur. Son fond est normalement imperméabilisé par une géomembrane composée d'un film synthétique en polyéthylène (PET) et une couche en bentonite. Il fonctionne comme bassin récepteur des rejets de forage et également des étapes suivantes telles que la complétion et la production. Par ailleurs, les rejets changent en volume et en nature, en fonction des différentes phases du forage.

Parfois, les bourbiers sont utilisés comme option de disposition (ou dépôt) finale des boues. Dans ce cas-là, la phase liquide est soit pompée, soit évaporée naturellement, quand les conditions d'ensoleillement le permettent, et les solides restants sont recouverts par le sol. Cependant, cette option représente un risque considérable de pollution de la nappe, de noyade et intoxication pour certains animaux, en particulier les oiseaux (**Ramirez, 2000**).

A Hassi- Messaoud, depuis quelques années, les bourbiers qui se situent sur les zones où le toit de la nappe du MioplIOCène est de 30 à 60 m sont systématiquement imperméabilisés avec la géomembrane (**Dhina et al., 2004**). Cependant, il arrive souvent, d'après les informations recueillies, que l'intégrité de la géomembrane soit atteinte par les hautes températures d'été pouvant dépasser 45°C ainsi que les grands écarts de températures diurnes et nocturnes en hiver, qui sont caractéristiques de ce climat aride. Ceci conduit, alors, à l'effritement et à la déchirure de la géomembrane.

I.2 Caractéristiques des bourbiers

Le bourbier est une fosse septique sans toit qui est étanché par un plastique (liner) imperméable qui joue le rôle d'une plateforme (**Khoja, 2008**), cette architecture qui est inadéquate à cause de la possibilité de pénétration des métaux dans le sol d'une part et concentrer les vapeurs des hydrocarbures au voisinage de ce sol d'autre part. Le bourbier est un lieu d'isolement des déchets de boue du forage les éléments essentiels qui constituent ces déchets sont des hydrocarbures (gasoil), l'eau, et les solides composés essentiellement de métaux lourds (**Slimani et al, 2011**).

A : Métaux lourds

Certains contaminants tels que les métaux, sont susceptibles d'être toxiques de façon immédiate envers un être vivant. En raison de leurs propriétés chimiques (solubilité, état d'oxydation) les métaux se présentent sous différentes formes (ions, complexes) et liés à divers ligands. Leur spéciation influe directement sur leurs toxicités et leurs biodisponibilités (**Khoja, 2008**). La présence simultanée de plusieurs métaux peut engendrer une toxicité supérieure à celle de chaque métal séparé. Par exemple, le zinc, le cadmium et le cuivre sont toxiques à faibles pH et agissent en synergie (**Slimani et al, 2011**).

B : gas-oil

Composant de base, la stabilité des hydrocarbures aliphatiques est assez élevée, leur dissolution dans l'environnement, sous l'effet de la lumière ou des bactéries étant très lente, sans toit et exposé à de haute température connue au désert algérien, le borbier subit l'évaporation du gas-oil qui donne naissance à des vapeurs de benzène et du toluène, qui restent dangereuses même à faibles concentrations.

- Conception des bassins d'évaporation :

Les bassins d'évaporation sont constitués de quatre bassins séparés par des digues et le dispositif d'étanchéité par Géomembrane à base de complexe Géosynthétique est composé de trois éléments :

Structure de support : composée par une couche de forme et couche de support, cette couche est composée de deux éléments : une couche de 150mm de tuf compacté et un panneau de géotextile non tissé.

Structure d'étanchéité : composée d'une Géomembrane polyéthylène haute densité lisse et aussi composée à 97% de résine vierge.

Structure de Protection : composée de deux éléments : Un Géotextile non tissé et une couche de béton. Ce dispositif doit être conçu pour limiter le risque de perte d'étanchéité ainsi que l'endommagement liée aux sollicitations mécaniques au-dessus de ce dernier et de faire face aux contraintes d'abrasion et de poinçonnement localisé.

I.3 Influence des borbiers sur l'environnement

Les borbiers sont principalement contaminés par des hydrocarbures (gasoil ou pétrole, provenant de la boue à base d'huile) et des métaux lourds (provenant principalement des additifs de la boue). Les boues risquent de contaminer le sol et le sous-sol par les actions suivantes, qui sont résumées dans la **Figure 4 (Khoja, 2008)** :

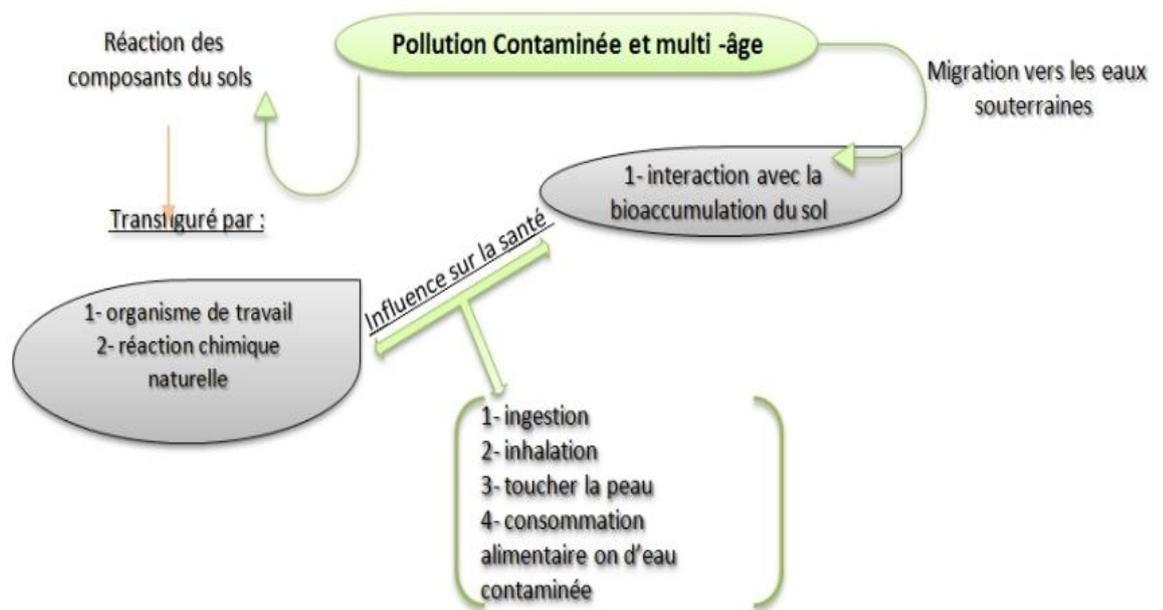


Figure 4 : Schéma résumant les impacts des bourbiers sur l’environnement (Khoja, 2008)

I.4 Stockage des bourbiers :

Le parc de stockage est une zone généralement de grande surface où se situe un ensemble des bacs de stockage. Ils peuvent être de différente ou de même capacité. Ils sont bien sûr connectés à une canalisation d’entrée et une autre de sortie et éventuellement connectés entre eux. On a divisé le groupe des bacs en trois, en fonction de leurs états : groupe en phase de remplissage, en phase de décantation et en phase de vidange (Figure 5, 6 et 7) (Kardacheet al, 2016).



Figure5 : Réservoirs sous pression (Kardache et al, 2016)



Figure 6: Réservoirs atmosphérique (Kardache et al, 2016)



Figure7 : Réservoirs à toit flottant (Kardache et al, 2016)

Chapitre 02

Procédés de Traitement des Sites Contaminés Par les Hydrocarbures.

I. Introduction

L'environnement est agressé par beaucoup d'industries notamment : les industries pétrolières, comme l'activité de forage, production, transport, stockage, et raffinage, générant des quantités considérables de déchets huileux dangereux. En Algérie, les raffineries représentent la source majeure de ces déchets. La boue pétrolière (BP), est le déchet huileux le plus abondant, c'est un matériau pâteux semi-solide composé d'hydrocarbures (HC), d'eau, des métaux lourds, des minéraux et sédiments (Liu et al, 2009).

En raison de la teneur élevée en fraction pétrolières dans les boues, la récupération et le recyclage des huiles brutes s'avèrent nécessaires, non seulement pour la protection de l'environnement mais aussi pour l'optimisation des ressources énergétiques. Ces huiles pourraient être directement réutilisées comme matière première ou comme fuel. L'extraction par solvant, est l'une des méthodes de traitement qui a été largement utilisée pour récupérer l'huile présente dans les BP (Mrayyan et al, 2005).

II.1 Différents procédés adoptés pour l'élimination des hydrocarbures :

II.1. Traitement physique :

Selon, Mougin et al. 1996), la décontamination physique se base sur l'application de différentes méthodes. Nous citons,

-le lavage qui s'applique particulièrement sur les grosses particules, il est réalisé pour récupérer des masses résiduelles d'un polluant piégé dans la matrice de sol.

-Le venting qui s'applique exclusivement à la zone insaturée de sol polluée généralement par des contaminants volatils à l'exemple des HAP légers, benzène, Il se base sur l'extraction de l'aire du sol « extraction sous vide ».

- une autre application qui est le stripping qui consiste à ré-vaporisé l'eau des soutirages d'une unité de distillation, pour en réduire la teneur en produits trop volatils et en ajuster le point d'inflammabilité.

- pour minimiser la teneur des contaminants dans le sol, une autre technique sur basant sur "la stabilisation" est appliquée. Les contaminants ne seront pas détruits mais leur effet néfaste sur l'environnement va se réduire (Caron et Carmant, 1997).

Quand la pollution touche la nappe phréatique, (nappe d'eau que l'on rencontre à faible profondeur, c'est la nappe la plus à exposé à la pollution en provenance de la surface), l'application de pompage puis traitement est effectué (Cousquer, 2017).

II.2. Traitement thermique :

Ça consiste à éliminer des polluants après avoir chauffé les matériels contaminés. Le traitement s'effectué sur site ou dans un centre collectif qui est généralement réservées aux produits très chargés en HAP (Costes et Druelle, 1997 ; Mougin et al. 1996).

D'abord, La désorption thermique consiste à apporter une source de chaleur dans le sol pour le volatiliser puis en extraire certains polluants (volatils et semi-volatils) par chauffage de sol indirectement à 400-500°C., de quelques dizaines de minutes à quelques heures. Les composés organiques peuvent aussi être décomposés par "la pyrolyse" par

élévation de température (450-600°C) en absence d'oxygène pour éviter toute oxydation et aussi la combustion.

La vitrification est une autre technique qui est par élévation de température de sol pollué (chauffage par des électrodes jusque à 2000°C), il transforme les polluantes en un matériau fondu inerte qui est le verre silicaté par pyrolyse après vaporisation des composés présents (Caron et Carmant, 1997).

L'incinération est aussi utilisée pour détruire toute types de déchets est qui s'effectué par deux étapes : La volatilisation : à 400°C et La destruction : à plus de 1000°C. Elle s'applique aux poussières résiduelles dans lesquelles se concentre la pollution jusqu'à 20g /Kg (Koller, 2004).

II.3. Traitement chimique :

Il se fait par mobilisation des contaminants ou par les réactifs qui agiront chimiquement soit par :

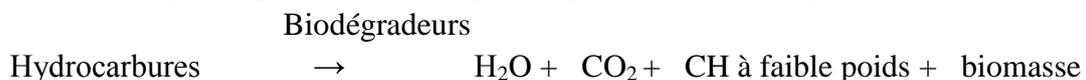
-La mobilisation des contaminants, selon la nature par l'utilisation d'une solution chimique (solvant, biosurfactants, les acides-bases...) et le transférer vers un autre milieu pour le traitement.

-Les réactions chimiques se basent sur les réactifs capables de réagir avec les polluants avant de les rendre moins toxiques avec des mobilités différentes. Il en existe trois types (Caron et Carmant, 1997) :

- l'oxydation : par l'utilisation d'ozone ou l'eau oxygénée.
- la réduction : par des métaux en poudre.
- la déchloration : diminution de toxicité par transformation de molécules chlorées en molécules moins chlorées.

II.4. Traitement biologique :

La biodégradation consiste à transformer la matière organique contenue dans ces hydrocarbures par l'utilisation des organismes vivants ou des micro-organismes. Elle se résume par la réaction donnée par Chaîneau et al. (1996) qui suit, elle est considérée comme le moyen le plus économique et rentable, qui ne coute qu'environ 1/5 et 1/10 du cout des traitements chimiques et procédés thermiques respectivement (Mougin et al. 1996).



II.4.1. Principe :

Il se base sur l'exploitation de pouvoir auto épurateur naturel des micro-organismes (met à profit ses propriétés). Il existe dans notre environnement naturel des microorganismes non pathogènes s'appelant autochtones ou endogènes qui ont une capacité adaptative aux conditions de leurs milieux (Holden et Firestone ,1997). Au cours de déroulement d'étape de biodégradation ces populations bactériennes dégradent les polluants complexes tels que (BTEX, HAP), dans un site contaminé aqueux ou terrestre mais ce dernier est toujours encore de développement.

II.4.2. Applications :

L'application de traitements biologiques peut s'effectuer en trois dispositifs (Caron et Carmant, 1997) :

-En bioréacteur :

Utilisé dans le but de biodégrader les polluantes en forte teneur en polluants organiques (sol ou déchets) ou dans le cas où les microorganismes sont incapables de se développer dans des conditions défavorables. Il assure de meilleur contrôle des paramètres physico-chimiques et il est composé de deux types : «slurry» utilisé dans la phase boueuse et «pan» utilisé dans la phase solide.

-In situ :

Le site pollué subit une charge d'oxygène et de nutriments afin de stimuler la population microbienne biodégradable des HAP. Cette méthode consiste à excaver de sol et le mettre dans des plateaux espacés dont le déroulement de biodégradation qui relativement lent dans des conditions optimales. Des substrats organiques sont ajoutés (Caron et Carmant 1997), cette technique est en deux types :

•Land farming :

Après étalement sur des surfaces imperméables, des fertilisants seront ajoutés en favorisant son aération et sa prolifération microbienne. Ces surfaces après décontamination pouvant être exploité comme un terrain agricole (Caron et Carmant 1997).

•Les biopiles ou biotertres :

Elle se base sur la mise en tas du sol et le recouvrir par une membrane imperméable ainsi que les substances à traiter, sont aussi étalées en surface imperméable. Un système d'aération est assuré par un tuyau fixé à la base de tas, assisté par un système d'humidification, les gaz résultants sont traités avant d'être libérer en atmosphère (Caron et Carmant 1997).

-Bioventing ou « biosparging » :

Ça consiste à introduire l'air dans la zone polluée pour les oxyder et les capter par aspiration en favorisant un métabolisme oxydatif pour les communautés microbiennes aérobies pour biodégrader les hydrocarbures. Un apport en nutriments est aussi nécessaire pour la stabilisation du rapport Carbone, Azote, phosphore. Les composants volatils aspirés seront fixés sur un filtre de charbon actif puis vont être traités dans une unité spécialisée, avec la libération d'air sec et de la vapeur dans l'atmosphère (Caron et Carmant 1997).

-Phytoremédiation :

C'est un procédé utilisant des plantes pour accélérer la biodégradation afin de dépolluer ou stabiliser les sols contaminés par les métaux lourds et les HAP. Selon Joner et Leyval (2003), les racines interviennent directement ou indirectement en stimulant la croissance et l'activité des microorganismes. Dans ce cas, la phytotransformation, stimule la dégradation des contaminants organiques complexes généralement facilement à biodégrader en composés simples et la phyto-stimulatio permet d'éliminer les produits organiques existants dans la zone

contaminée par la mobilisation de la dégradation microbienne sous l'effet des exsudats (résultant du suintement d'un arbre) et les enzymes libérées dans la rhizosphère.

-Bioremédiation :

Au début de traitement de bioremédiation, on assure une oxygénation idéale du sol, ce qui permet une accélération de biodégradation, la disponibilité du carbone, la formation des réseaux de circulation d'eau au sein de sol, le développement des populations microbiennes autour de rhizosphère et puis le changement dans la restructuration de sol.

- A la fin de bioremédiation : appliqué sur des terrains déjà traités destinés à revégétaliser ou être utilisé comme remblais. Pour les métaux lourds les végétaux peuvent agir par les phénomènes de Rhizofiltration, phytoextraction et la phytostabilisation.

II.5. Perspectives des traitements biologiques :

II.5.1. Les traitements combinés

Leur but majeur est d'améliorer l'efficacité des traitements biologiques par le fait de :

- Minimiser la taille moléculaire des contaminants ayant de nombre de cycles élevés ou les mouillés directement par l'intermédiaire des agents émulsifiants (biosurfactants) ce qui traduit : l'accessibilité des polluants aux microorganismes (Caron et Carmant, 1997).

-La bioaugmentation :

Ça s'applique au départ ou en plein traitement d'un site pollué par l'intermédiaire des souches microbiennes exogènes (qui sont sélectionnées et multipliées au laboratoire), elles donnent une opportunité de synergie aux microorganismes endogènes déjà existant dans le sol sous traitement.

- La biostimulation :

Elle se base sur l'augmentation de la capacité biodégradable de sol par l'ajoute des nutriments qui conviennent à ce processus tel que ; l'azote, le phosphore...

- L'utilisation d'inoculum fongique :

Les moisissures possèdent une excellente capacité enzymatique extra cellulaire « ligninases » à dégrader les particules de HAP que celles des enzymes intracellulaires, elles sont cultivées et ajoutées au sol contaminé.

III. Facteurs influençant le déroulement d'un traitement biologique :

Il faut bien connaître les différents facteurs influençant le processus de la biodégradation pour le suivi de la traçabilité et le bon contrôle. Ces facteurs sont regroupés dans les tableaux suivants :

Tableau 1 : Facteurs influençant les performances d'un traitement biologique
(Caron et Carmant, 1997).

La nature de sol	Distribution de polluant dans le sol (HAP)	La fraction aromatique	Les facteurs environnementaux
<p>-Composition granulométrique de la fraction minérale solide, qui caractérise la texture du sol.</p> <p>- Composition chimique : qui caractérise la phase minérale et organique.</p> <p>- Caractéristiques physiques : conductivité électrique et hydrauliques....</p> <p>- Caractéristiques géotechnique : teneur en eau, porosité, densité, indice de plasticité.</p> <p>- Caractéristiques biologiques : nombre de germes par gramme de sol(UFC), genre microbien des dégradeurs de HAP.</p>	<p>-NAPL : phase liquide non aqueux : gouttelettes plus ou moins solidifiées.</p> <p>- Adsorption à l'intérieur d'agrégats de fines particules.</p> <p>- Adsorption autour de grain de grains individuels.</p>	<p>-Proportion de (2 cycles ,3cycles, 4cycles et 5-6 cycles aromatiques) le nombre de cycle influant sur :</p> <ul style="list-style-type: none"> - les propriétés physicochimiques du polluant. - solubilité dans l'eau. -pression de vapeur. -dégradabilité. <p>-Densité et viscosité des goudrons contenant les HAP.</p> <p>-importance des fractions lourdes de ces goudrons associées aux HAP (résines, asphaltènes).</p>	<p>-La teneur en eau.</p> <p>-Le pH.</p> <p>-La teneur en oxygène.</p> <p>-La teneur en nutriment</p> <p>-La température.</p> <p>-Le potentiel d'oxydation.</p>

Tableau 2 : Synthèse des principes options généralement disponibles pour la séparation et l'élimination d'hydrocarbures et des macro-déchets (Caron et Carmant, 1997).

	Type de produit	Méthodes de séparation	Option de traitement
de	HAP non émulsionnés et eau usées	-Séparation de l'eau libre par décantation /gravité -L'eau récupérée peut nécessiter un traitement /filtrage complémentaire	-Utilisation des HAP récupérés comme combustible ou stock d'alimentation de raffineries -Retour à la source de l'eau traitée
	HAP émulsionnés	-Emulsion brisée pour libérer l'eau par : -Traitement thermique -Application de désémulsifiant	-Utilisation des HAP récupérés comme combustible ou stock d'alimentation de raffineries -Stabilisation et réutilisation - Incinération
e	HAP mélangés au sable	-Récupération des HAP liquide qui suintent à travers le sable de plage pendant le stockage temporaire -Extraction des HAP de sable par lavage à l'eau ou à solvant. -Collecte des HAP solides ou des boulettes par criblage.	-Utilisation des HAP récupérés comme combustible ou stock d'alimentation de raffineries -Stabilisation et réutilisation- - Incinération -Retour à la source de l'eau traitée—Enfouissement--Dégradation par épandage ou compostage
	HAP mélangés aux galets et graviers	-Récupération des HAP liquide qui suintent à travers le sable de plage pendant le stockage temporaire--Extraction des HAP de sable par lavage à l'eau ou à solvant.	-Retour à la source des pierres nettoyées - Stabilisation et réutilisation-- Enfouissement
	HAP mélangées à de bois, du Plastique, des algues, des coquillages, et des absorbants. -- Matériel et stock de pêche pollués : filets, flotteurs et casiers	-Récupération des HAP liquide qui suintent à travers le sable de plage pendant le stockage temporaire -Lavage par jets d'eau basse pression des débris-- Collecte de l'eau libre. -- Compression	-Stabilisation et réutilisation suite à la collecte des plastiques et des débris de grande taille. -Dégradation par épandage agricole ou compostage pour les hydrocarbures mélangés à des algues, des coquillages des absorbants naturels. —Enfouissement--Incinération
	Boulettes d' HAP	-Séparation du sable par criblage	- Stabilisation et réutilisation -Enfouissement—Incinération-

IV. La biodégradation biologique par l'utilisation de Biosurfactants :

Selon Rosenberg (1992), la dégradation des HAP nécessite un contact direct des UO avec leur substrat. Parmi les substrats que la bactérie peut réagir avec elle, la synthèse des émulsions extracellulaires ou biosurfactants. Ainsi ; l'amélioration de solubilité des polluants organiques par des agents amphiphiles « tensioactifs » moussants et mouillants permet de modifier la tension superficielle et permettre au microorganisme l'accès au substrat.

Les biosurfactants présentent une grande diversité structurale, ce qui élargit leurs domaines d'application (Lin et al. 1994), ainsi que leur pouvoir biodégradable. Par contre, les surfactants synthétiques sont résistants à la biodégradation et sont toxiques quand ils s'accumulent dans les écosystèmes (Babu et al., 1994 ; Banat, 1995 ; Lin et al., 1994).

IV.1. Les biosurfactants :

Les surfactants « Surface Active Agent » sont des agents à activité de surface (tensioactifs), synthétisés chimiquement ou par voie biologique (biosurfactants) (Al-Arajil et al., 2007).

Les surfactants sont parfois dénommés selon la fonction qu'ils remplissent : détergents, agents dispersants, agents de solubilisation, agents mouillants, agents émulsifiants et agents moussants (Santos et al., 2016). Les caractéristiques physico-chimiques qui définissent un agent tensioactif sont sa capacité à augmenter la solubilité des composés hydrophobes dans l'eau pour former des émulsions d'hydrocarbures avec l'eau, et réduire la tension de surface (Dessai et Banat, 1997). Plus la concentration de surfactant en solution est élevée, plus la tension de surface est réduite. La tension de surface atteint une valeur minimale constante à une certaine concentration de surfactants, c'est la concentration micellaire (Santos et al., 2016).

La production mondiale actuelle de surfactants chimiques se chiffre à plus de 18 millions de tonnes par année. Les tensioactifs synthétiques sont des produits dérivés du pétrole et présentent 95% du marché international des surfactants en 2012 (Markets and Markets, 2016). Mais ce type de surfactant présentent un risque pour l'environnement car ils sont toxiques et non biodégradables (Santos et al., 2016). C'est pour cette raison, et depuis plusieurs années, que les scientifiques se sont intéressés à des surfactants produits par des organismes vivants : les tensioactifs biologiques ou biosurfactants. Les biotensioactifs possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ont l'avantage d'être biodégradables, non ou faiblement toxiques (Sriram et al., 2011).

Les biosurfactants constituent un groupe hétérogène de molécules tensioactives et amphiphiles produits par des organismes vivants : les bactéries, les champignons et les levures (Marchant et Banat, 2012).

Ces molécules capables de réduire les tensions inter-faciales entre une ou deux phases de polarités différentes comme l'huile et l'eau, l'air et l'eau ou l'eau et un solide (Banat et al., 2000).

La plupart des biosurfactants sont des agents extracellulaires (Salihu et al., 2009) 16, mais on peut trouver des biosurfactants intracellulaires (Padmapriya et al., 2013).

Les biosurfactants sont produits par des micro-organismes, son rôle physiologique principal est de permettre aux micro-organismes se développer sur des substrats non miscibles à l'eau en réduisant la tension superficielle à la limite de phase, rendant ainsi le substrat plus facilement disponible pour l'absorption et le métabolisme (Fakruddin, 2012).

Un autre rôle est leur action antimicrobienne. Une activité contre plusieurs micro-organismes. Il est impliqué aussi dans l'adhérence cellulaire qui confère une grande stabilité dans des conditions environnementales hostiles et de virulence et dans la désorption cellulaire lorsque les organismes ont besoin de trouver des habitats pour survivre (Fakruddin, 2012).

IV.2. Structures des biosurfactants :

Les biosurfactants sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe non polaire, le groupement hydrophile est constitué d'acides aminés, peptides ou de polysaccharides (mono ou di), s'immergent dans l'eau. Ces agrégats de molécules tensioactives forment des micelles, le groupement hydrophobe est constitué d'acides gras saturés ou non saturés **Figure 8** (Desai et Banat, 1997).

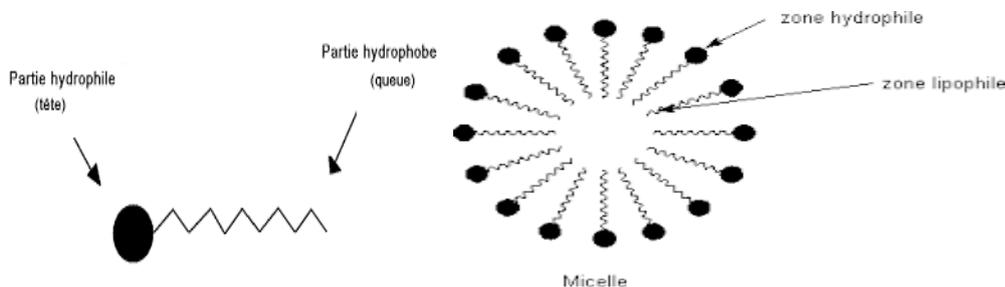


Figure 8 : Structure de tensioactif (Desai et Banat, 1997).

On distingue quatre types chimiques de biosurfactants selon la partie hydrophile de la molécule :

- les cationiques, charges positives.
- les anioniques, charges négatives.
- les non ioniques, sans charge.
- les amphotères (zwitterioniques), une charge négative et une charge positive.

Selon le pH de la solution, ils peuvent agir en tant qu'espèce anionique, cationique ou neutre (**Figure 09**) (West et Harwell, 1992).

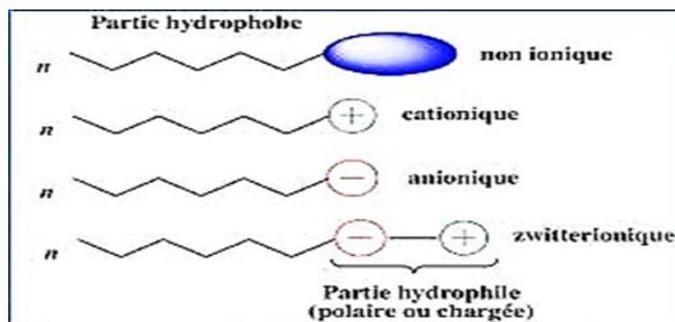


Figure 09 : Les différents types de tensioactifs.

IV.3. Classification des biosurfactants et microorganismes producteurs :

D’après Saharan et al., (2011) et Banat et al. (2010) les biosurfactants sont classés en deux classes selon le poids moléculaire : Faible poids moléculaire et haut poids moléculaire **Tableau 03.**

Tableau 03 : Principales classes de biosurfactants selon le poids moléculaire.

	Classes	Biosurfactant
Solon le poids moléculaire	Faible poids moléculaire	Rhamnolipides
		Surfactine
		Polymyxines
		Acides gras
		Sophorolipides
	Haut poids moléculaire	Sulfolipides
		Emulsan
		Polysaccharides Sulfatés

D’après Healy et al., (1996) les biosurfactants sont classés en cinq classes selon la nature biochimique : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les lipopolysaccharides et les lipides neutres et les acides gras **Tableau 04.**

Tableau 04 : Principales classes de biosurfactants selon la nature chimique et ces micro-organismes producteurs. (d'après Desai et Banat, 1997 ; Pacwa–Plociniczak et al ., 2011) :

Classes	Biosurfactants	Microorganisme
Glycolipides	Rhamnolipides	<i>P. aeruginosa et P. putida</i> <i>P. chlororaphis</i> - <i>Bacillus subtilis</i> <i>Renibacterium -Salmoninarum</i>
	Sophorolipides Tréhalose lipides Mannosylerythriol Lipides	<i>Candida bambicola et C. apicola</i> <i>Rhodococcus spp</i> <i>Tsakamurella sp et arthrobacter sp</i> <i>Candida antarctica</i> <i>Kurtzmanomyces sp</i>
Lipopeptides et lipoproteins	Surfactines Lichenysine Peptide-lipide Viscosine Serrawettine Subtilisine Gramicidine Polymyxine	<i>Bacillus subtilis</i> <i>B. licheniformis</i> <i>Bacillus licheniformis.</i> <i>Pseudomonas fluorescens.</i> <i>Serratia marcenscens.</i> <i>Bacillus subtilis.</i> <i>Bacillus brevis.</i> <i>Bacillus polymyxa.</i>
Acides gras, lipides neutres et Phospholipides	Acides gras lipides neutres phospholipides	<i>Corynebacterium lepus.</i> <i>Nocardia erythropolis.</i> <i>Thiobacillus thiooxidans.</i>
Biosurfactants polymers	Emulsan Biodispersan Liposane Carbohydrate-lipide-protéine Mannane-lipide-protéine	<i>Acinetobacter calcoaceticus.</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus.</i> <i>Candida lipolytica.</i> <i>Pseudomonas fluorescens.</i> <i>Candida tropicalis</i>
Biosurfactants particulaire	Vésicules	<i>Acinetobacter calcoaceticus.</i>

IV.4 Propriétés des biosurfactants :

Les principales caractéristiques des surfactants dérivés des microorganismes sont :

• **Concentration micellaire critique (CMC)** : Le tensioactif permet de réduire la tension superficielle et la tension interfaciale. Des biosurfactants sont très efficaces par rapport les

tensioactifs chimiques en raison de leur faible CMC (Desai et Banat, 1997). La CMC est la concentration en solution d'un agent de surface au-dessus de laquelle une partie des molécules dispersées au sein de la solution se rassemblent pour former des micelles (Poré, 1992). Les micelles se forment lorsque les portions hydrophobes, incapables de former des liaisons hydrogène en phase aqueuse, créent une forte augmentation de l'énergie libre du système. Une façon d'abaisser cette énergie est d'isoler la partie hydrophobe de l'eau par adsorption sur des matrices organiques ou de former des micelles (Haigh, 1996).

- **Tolérance à la température, pH et la salinité** : La plupart des biotensioactifs sont résistants à la température, la salinité et le pH (Banat et al., 2000).

- **Biodégradabilité** : Ils sont facilement dégradés par les organismes microscopiques, et ne possèdent pas beaucoup de menace sur l'environnement (Mohan et al., 2006).

- **Toxicité** : les biosurfactants sont des produits non ou faiblement toxiques et sont appropriées pour les utilisations pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires (Mohan et al., 2006). Ce tableau regroupe quelques valeurs de concentrations effectives, et montre qu'en général les biosurfactants sont moins toxiques que leurs analogues chimiques (**Tableau 05**).

Tableau 05 : Toxicité de biotensioactifs comparée à celle de surfactants chimiques

(d'après Christofi et Ivshina, 2002).

Surfactant	Origine	CE50 (mg.L-1)
<i>Rhodococcus ruber</i> AC 235 glycolipide complexe	Biologique	650
Tréhalose dicorynomycolate de <i>R. erythropolis</i>		49
Tréhalose tétraester de <i>R. erythropolis</i>		286
Rhamnolipides de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		50
Stéarate de sucrose (DK 50)		67
Finasol OSR-5	Chimique	7
Corexit 9597		5
Inipol EAP 22		0,004

CE50 : concentration effective à 50 %, c'est à dire affectant 50 % de la population testée

- **La matière première** : Les déchets renouvelables et des sous-produits peut être utilisé comme des sources de carbone pour produire les biosurfactants, ce qui permet de réduire l'impact de ces déchets et le coût de production de ces biomolécule (Banat et al., 2000).

IV.5. Microorganismes producteurs et paramètres influençant la production des biosurfactants :

Les microorganismes produisent les biosurfactants dans un milieu aqueux contenant des sources de carbone (les hydrates de carbone, les huiles ou les hydrocarbures) (Bognolo, 1999 ; Mulligan et al., 2001). Ces organismes sont des levures, des champignons ou des bactéries. Le genre *Pseudomonas* permet de produire de grandes quantités de glycolipides, appelé les rhamnolipides. Aussi le *Bacillus subtilis* est capable de produire les biosurfactants de classe lipopeptide appelé surfactine ou subtilisine. Autre microorganisme, *Candida bombicola* et *Candida lipolytica* sont les levures les plus étudiées. Des nombreuses espèces produisent des biosurfactants mais leur régulation de leur synthèse est encore mal connue, sauf pour les *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* qui sont les plus étudiées (Banat et al., 2000). D'après Mulligan et collaborateurs (Mulligan et al., 2014), la production de biosurfactant est affectée par la composition de milieu (source de carbone, l'azote, les éléments minéraux) et les conditions de croissance (température, agitation, pH, etc).

Le pH :

Le pH est également un facteur environnemental important et influe sur la stabilité et la solubilité des métabolites (Lee et al. 2018). L'effet du pH sur le biosurfactant produit a été étudié par Zinjarde et Pant qui ont rapporté que la meilleure production se produisait lorsque le pH était de 8,0 qui est le pH naturel de l'eau de mer (Fakruddin, 2012). La production de rhamnolipides chez *Pseudomonas* spp était à son maximum à pH 6,0 et 6,5, et diminuait fortement au-dessus de pH 7. La production de lipide penta et disaccharide chez *N.corynacteroides* n'est pas affectée à pH variant de 6,5 à 8,0 (Desai et Banat, 1997).

La température :

Chez *A.paraffineus* et *Pseudomonas* sp. Souche DSM-2874, la température provoque une altération de la composition de biosurfactant produit. *Bacillus* sp thermophiles produit les biosurfactants à des températures supérieures proches de 40°C (Desai et Banat, 1997). L'activité du biosurfactant produit par des souches thermophiles à une température supérieure à 40°C est restée constantes après autoclavage à 120°C pendant 20 min (Santos, 2013).

L'agitation du milieu de culture :

Pour les souches bactériennes, l'augmentation de la vitesse d'agitation des milieux de cultures induit une augmentation des vitesses de cisaillement et donc un rendement moindre (Edwarde et al., 1991). Pour les levures la production de biosurfactant augmente lorsque les taux d'agitation augmente (Desai et Banat, 1997).

IV.6 Utilisation des biosurfactants :

Le problème qui entrave l'utilisation des biosurfactants est leur coût. Le succès de l'utilisation et la production des biosurfactants passe par une diminution des coûts de production. Cette diminution pourra être atteinte grâce à la valorisation de substrats de croissance de produits à faible coût. Par exemple, Makkar et Cameotra (2002), indiquent qu'il est possible d'utiliser des déchets et des produits agricoles pour diminuer les coûts de production, mais aussi pour diminuer les quantités de déchets à traiter de diverses entreprises (huiles de moteurs usagées...) dans le **tableau 06**, nous citons les principales applications de l'utilisation des biosurfactants y compris dans l'industrie pétrolière.

Tableau 06 : Applications des biosurfactants dans l'industrie pétrolière d'après (Banat et al., 2000 ; Santos et al., 2016 ; Fakruddin, 2012)

Domaine	Application
Pétrole	Récupération améliorée du pétrole (MEOR). Nettoyage des déversements d'hydrocarbures, Nettoyage de camions-citernes contaminés par du pétrole, Contrôle de la viscosité-émulsification de l'huile, et Élimination du pétrole brut des boues.
Environnement	Bioremédiation : Amélioration de la biodégradation des hydrocarbures dans le sol et le milieu marin, Assainissement des métaux lourds d'un sol, d'un sédiment et d'une eau contaminés Récupération des huiles.
Aliments	Activité antimicrobienne Amélioration de la texture et de la durée de conservation des produits contenant de l'amidon, le contrôle de l'agglomération de globules gras, stabilisant aéré systèmes...
Médical	Activité antibactériens, antiadhésifs, antifongiques, antiviral, adjuvant immunologique non toxique et apyrogène - Anti-cancéreux, livraison de gènes.
Agriculture	Biopesticides ; fongicides ; antiparasites. Biocontrôle et formulation de pesticides : facilitation des mécanismes de biocontrôle des microbes tels que parasitisme, antibiose, concurrence, résistance systémique induite ethypovirulence, émulsifiant. Engrais phosphatés : empêcher l'agglutination pendant le stockage.
Cosmétiques	Émulsifiants, agents moussants, solubilisant, agents mouillants, nettoyants, agents antimicrobiens, médiateurs de l'action enzymatique, antiacides, tampons contre l'acné, produits antipelliculaires, contact solutions pour lentilles, produits pour bébés, mascara, rouges à lèvres, dentifrice, dentine nettoyante.
Chimie	Détergent domestique et industriel. Peinture : dispersant, émulsifiant.

	Textile: agent de maquillage.
Biologique	Ingrédient fonctionnel : interaction avec les lipides, protéine et les carbohydrates agent de protection. Microbiologie : comportement physiologique ; la mobilité, la communication et la concurrence cellulaire...
Bioprocédés	Processus en aval : biotransformation, récupération des produits intracellulaires, amélioration de la production d'enzymes extracellulaire et produit de fermentation.

PARTIE MATERIEL ET METHODES

Introduction :

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de Bioinformatique, Microbiologie Appliquée et Biomolécules (BMAB) de l'Université M'Hamed Bougara de Boumerdès en collaboration avec la Division Laboratoires de la SONATRACH de Boumerdès. Cette étude a pour but, la caractérisation physico-chimique et microbiologique d'échantillons de rejets pétroliers d'origine différente (sol et borbier contaminé par les hydrocarbures ; en effet, après les opérations d'extraction du pétrole, un volume important de ces rejets est déversé dans des zones prédestinées appelés bourbiers, ce qui engendre un problème de pollution pour ces régions.

I. Matériels :**I. 1. Matériels non biologiques :**

L'ensemble des appareils (**photos Annexe 05**), verreries, réactifs, milieux de culture et produits chimiques utilisés dans la réalisation de ces expériences sont cités dans (**Annexe 01**).

I.2. Matériel biologique :

Nous avons utilisé des échantillons de sol, d'huile d'olive que nous avons récupérée nous-même et d'autres de borbier qui ont été prélevés par les agents de SONATRACH dans la période du 04 au 11-05-2022 au niveau des puits des champs pétroliers de Sonatarch "Haoud el hamra" à Hassi Messaoud wilaya de Ouargla, au niveau de différentes zones de stockage dans lesquels la quantité de déchets solides générés et stockés est estimée en 2020 à 7797 tonnes de déchets pétroliers.

- Ces régions sont classées comme suit :

- Les anciens bourbiers : ils en existent 02 anciens bourbiers qui datent depuis les années 2000.



Figure 10 : Les anciens bourbiers (NB 01 et NB 02) (Centre de Recherche et de Développement, Sonatrach Boumerdes 2022).

- **Les nouveaux bourbiers :** La boue issue des bacs des stockages et des séparateurs ainsi que les sols contaminés sont déversés dans 3 bourbiers nouvellement construits couverts par la géomembrane.

- **Le bassin d'évaporation** : Les eaux traitées par les séparateurs sont drainées vers le bassin construit en béton ce qui permettra leur évaporation, à la surface, il a été observé une couche du brut qui s'est formée au fil du temps.

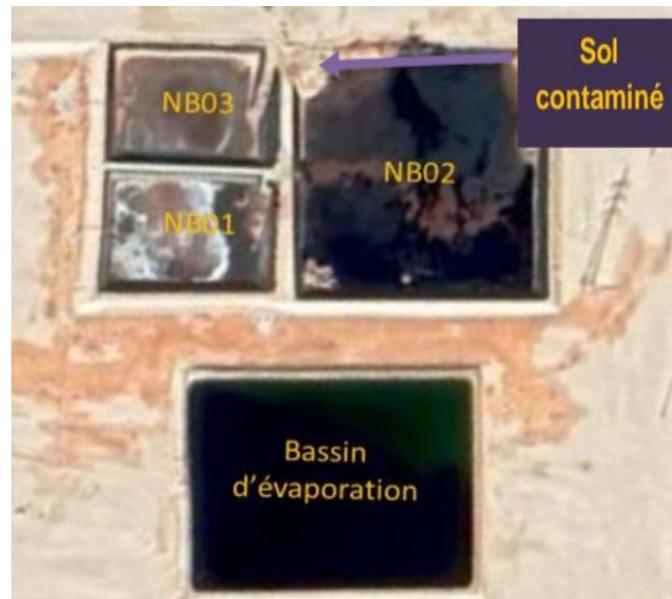


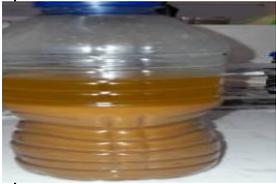
Figure 11 : Points d'échantillonnage (Centre de Recherche et de Développement, Sonatrach Boumerdes 2022).

- L'échantillonnage a été réalisé sur les boues, les sols et les eaux contaminés qui se trouvent au niveau des sites des stockages (bourbiers, bassin d'évaporation et dépôts). Cependant, l'équipe de projet a recommandé un prélèvement d'une boue fraîche à partir des bacs des stockages, durant l'opération de nettoyage pour la caractériser dans cet état.

- Différents échantillons de trois types différents des isolats (sol, eau et l'huile) ont été prélevés à partir des sites contaminés en HDR de différents : aspect, zones et date de prélèvement.

La quantité prélevée pour chaque échantillon est de 1kg pour les produits solides et entre 500 ml à 1000ml pour l'échantillon liquides, Les boues prélevées ont été conservées à 15°C au niveau de laboratoire du CDHL/HEH jusqu'à leur acheminement vers la DCRD, ensuite vers l'université de Boumerdes à travers des Glacières (Tableau 07).

Tableau 07 : Provenance des différents échantillons utilisés

Code de l'Echantillon	Photos	Régions	Provenance
Sol 1		Boumerdes Tidjelabine	-Rejet de la pompe à essence
Muraje 1		Bouira	-Eau + huile d'olives (oliverie)
NB 01		Haoud el Hamra- Hassi messaoud	-Bourbier dont le déversement est en cours
NB 02			
NB 03			
AB fond			-Bourbier datant depuis 20 ans
AB extrémité			
Ancien bourbier			-Bourbier datant depuis plus de 30 ans

Liquide			-Bassin d'évaporation
---------	---	--	-----------------------

II. Méthodes :

Nos échantillons ont été orientés pour subir des analyses physico-chimiques et microbiologiques.

II.1 Méthodes physicochimiques :

Dans un premier temps, nous avons mesuré quelques paramètres physicochimiques de certains échantillons avant de pouvoir les caractériser partiellement, nous avons recherché le taux d'hydrocarbure totaux (TPH), la teneur en Asphaltènes et paraffines, nous avons aussi recherché les teneurs en Plomb, le Fer, le Zinc et le Silicium. La mesure de la salinité et le pH ont été estimés. La caractérisation physicochimique a été réalisée au niveau du CRD par l'utilisation de techniques normalisées, illustrées dans l'annexe I.

II.2. Méthodes microbiologiques :

Nous avons suivi les mêmes méthodes pour les deux échantillons l'eau et le sol pour l'identification bactérienne et aussi pour la réalisation du test E₂₄.

II.2.1. Isolement des microorganismes :

Vu que notre projet possède un aspect " économique " on s'intéresse par l'isolement des bactéries et des champignons producteurs de biosurfactants afin de les appliqués à grand échelle.

II.2.2.1 Préparation des dilutions et ensemencement sur milieu solide :

- Une masse de 10 g ont été prélevés de chaque échantillon et ont été mis en suspension dans 90 ml d'eau physiologique stérile dans un erlenmeyer stérile. Ce dernier a été bien agité pendant 5 minutes.

- Dans un flacon stérile le surnagent a été récupéré pour chaque échantillon de sol. Les échantillons liquides sont été considérés comme des solutions mères.

- Un volume de 1 ml de solution mère est ajouté à 9 ml d'eau physiologique stérile pour obtenir une dilution de 10⁻¹, une série des dilutions est préparé jusqu'un 10⁻⁶.

- Les ensemencements ont été faits à partir de solution mère et des dilutions (10⁻³ et 10⁻⁶) pour chaque échantillon, 1 ml de la dilution prélevée et ensemencé sur une GN (gélose nutritive) pour les bactéries, et sur le PDA pour les levures et les champignons. (Annexe 02).

- Les boîtes ont été incubées dans l'étuve à 37°C pendant 48 heures pour les bactéries et à 30°C pendant 72 heures pour les levures et les moisissures.

Le nombre de germes est déterminé en calculant la moyenne arithmétique des résultats obtenus et en tenant compte du facteur de dilution, selon la formule suivante :

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

N : nombre des microorganismes en UFC/ ml.

n: nombre des colonies dénombrées.

V: Volume prélevé.

d: Dilution.

II.2.2.2 Enrichissement en milieu liquide :

A partir des échantillons précédents, 10g sont prélevés et sont mis en suspension dans 90 ml de milieu liquide stérile ayant la même composition que le milieu GN (**Annexe 02**) répartis dans 06 erlenmeyers ayant une de 150 ml chacun. Ces derniers sont fermés par du coton cardé stérile et incubés dans un agitateur-incubateur à 40°C pendant 48h. Les ensemencements sont faits à partir du milieu liquide vers le milieu solide, 1 ml du milieu liquide est prélevée et ensemencé sur la gélose nutritive pour les bactéries, et sur le milieu PDA pour les levures et les champignons (Annexe 02).

Les boîtes ont été incubées dans l'étuve à 37°C pendant 48 heures pour les bactéries et à 30°C pendant 72 heures pour les levures et les moisissures.

II.2.2.3 Purification des colonies :

Après l'observation de l'aspect macroscopique des colonies, les colonies qui ont été isolées sont repiquées successifs sur le même milieu nutritif. La purification a été réalisée pour obtenir des souches pures à partir du différent isolat. Les boîtes ont été incubées dans l'étuve à 37°C pendant 48 heures pour les bactéries et à 30°C pendant 72 heures pour les levures et les moisissures.

II.2.2.4 Conservation des souches :

Les colonies bactériennes qui ont une activité émulsifiante élevé ($E_{24\%} \geq 45\%$) ont été sélectionnées comme productrices de biosurfactants et ensemencé dans des tubes à essai contenant un milieu GN inclinée et incubées à 30°C pendant 24heures puit conservées à température de 4°C, pour pouvoir toujours disposer des souches viables.(considérer comme des souches performants).

II.2.2. Sélection de microorganismes produisant les biosurfactant par le test d'émulsification E_{24} :

Ce test permet de vérifier la capacité des souches à émulsionner une phase hydrophobe (gasoil) dans une phase hydrophile (le milieu de culture), ainsi que la détection d'agents émulsifiants (biosurfactants) (Cooper et Goldenberg., 1987).

Vu le nombre élevé des bactéries purifiées, nous avons procédé à une sélection des souches les plus performantes, grâce au test d'émulsification. Seules les souches présentant un E_{24} élevés ont été sélectionnées puis identifiées. L'une des caractéristiques les plus importantes, de la dégradation bactérienne des hydrocarbures, est la capacité d'émulsionner les hydrocarbures en solution, par la production d'agents de surface active (les biosurfactants) (Ganesh, 2009).

II.2.2.1 Préparation du moût de fermentation :

Chaque souche bactérienne estensemencée dans des erlenmeyers de 100 ml contenant 10 ml de milieu liquide additionné de à 1% de gasoil, chaque erlenmeyer est bouché par le coton cardé pour assurer la respiration des souches tout en évitant la contamination, l'incubation a lieu à 30° C, pendant 24 heures ou plus sous agitation à 70 tours/minutes.

Le test consiste à mélanger 3 ml du milieu de culture avec 3 ml de gasoil dans des tubes stériles. Les tubes sont agités au vortex pendant 3 min, on estime à l'œil nu après 24h de repos à température ambiante la qualité de l'émulsion, et ceci par comparaison au témoin où le moût de fermentation est remplacé par le milieu de culture aseptique.

Ce test permet d'éliminer de l'étude toutes les souches qui n'émulsifient pas le gasoil.

Pour les souches qui émulsifient le gasoil, on obtient dans le tube 3 phases (**figure 12**)

- La 1^{ère} phase : le moût de fermentation en bas.
- La 2^{ème} phase : le gasoil émulsifié au milieu.
- La 3^{ème} phase : la fraction du gasoil qui n'a pas été émulsifiée à la surface (Ganesh, 2009).

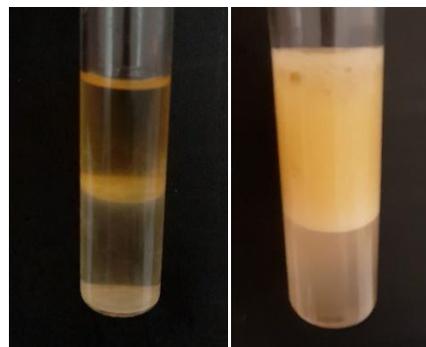
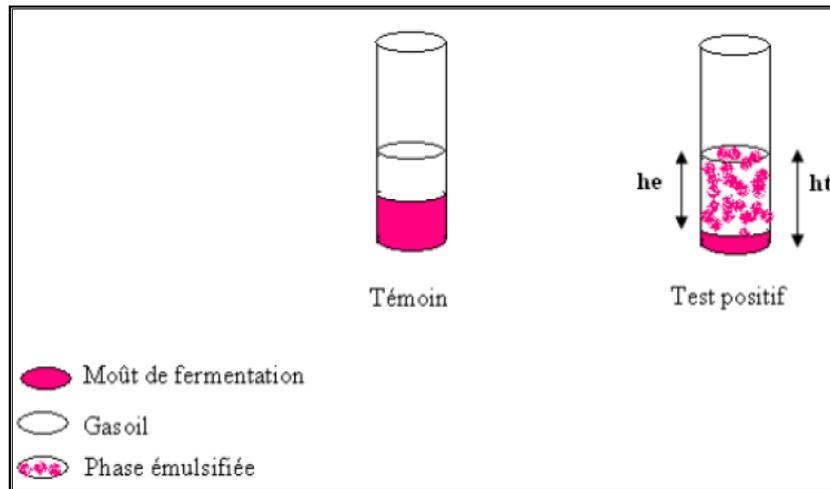
Calcul de l'index d'émission E_{24}

L'index d'émulsion est calculé selon la méthode décrite par Cooper *et al.*, (1978) : c'est le rapport de la hauteur de l'émulsion formée sur la hauteur totale du mélange, multiplié par 100.

$$E_{24}\% = \frac{He}{Ht} \times 100$$

He : hauteur d'émulsion.

Ht : hauteur totale du mélange.



Résultat- Résultat +

Figure 12 : Représentation schématique avec photos originale du principe du test d'émulsification.

La présence de la phase émulsionner est confirmé par observation microscopique entre lame et lamelle à l'objectif X 40, où on observe de grandes gouttelettes huileuses. La présence de la phase émulsionner est confirmé par observation microscopique entre lame et lamelle à l'objectif X 40, où on observe de grandes gouttelettes huileuses.

II.2.3. Identification préliminaire des souches :

Dans le cadre de ce travail, nous avons identifié les microorganismes : bactéries, levures et moisissures productrices des biosurfactants. Cette identification est basée sur une étude des caractères morphologiques et physiologiques des isolats (**Sharpe et al., 1966**) :

II.2.3.1 Aspect macroscopique :

Ce test permet de constater la morphologie des colonies obtenues sur milieux solide. L'étude macroscopique est basée sur les éléments d'identification donnés par (**Joffin et Leyral. 2014**) :

- ✓ La forme des colonies : rondes, irrégulières...etc.
- ✓ La taille des colonies : par mesure du diamètre : punctiformes ou non punctiformes.
- ✓ L'opacité : opaque, translucide.
- ✓ L'aspect de la surface.
- ✓ L'aspect de contour.
- ✓ La consistance.
- ✓ L'odeur : présence ou absence.
- ✓ L'élévation : convexe, concave, plate.
- ✓ La chromogènes : couleur de la colonie.

II.2.3.1 Aspect microscopique :

Basé sur la morphologie des cellules bactériennes et leur mode d'association observés par microscope optique.

- **Etat frais :**

Une coloration de Gram et un examen en état frais ont été faits selon **Denis et al (2007)** pour savoir le type de Gram. La taille des cellules (**Narayanasamy,2013**), le mode de regroupement et la mobilité (**Delarras,2014**). Les bactéries ont été observées au microscope photonique à l'état frais une goutte de l'eau distillée stérile entre lame et lamelle. Il est conseillé d'examiner des cultures jeunes. L'examen à l'état frais permettra d'examiner la mobilité des bactéries et d'en déceler la forme, bien que ce renseignement soit plus accessible sur des frottis colorés (**Annexe 03**).

Protocole

- ✓ Nous déposons une petite goutte d'eau stérile sur la lame.
- ✓ Nous prélevons une fraction de colonies sur gélose
- ✓ On fait une suspension homogène dans la goutte d'eau en incorporant progressivement l'inoculum,
- ✓ Nous recouvrons d'une lamelle en évitant d'enfermer des bulles d'air.
- ✓ Le liquide ne doit pas déborder (sinon jeter la lame dans une solution désinfectante et recommencer).
- ✓ Nous observons à l'objectif x40
- ✓ Des bactéries sont considérées comme mobiles lorsque des trajets très différents sont observés (déplacement dans toutes les directions). Une bactérie immobile est animée de mouvements d'agitation normaux appelés mouvements browniens, qu'il ne faut pas confondre avec la mobilité.

- **Coloration au bleu de méthylène :**

La coloration au bleu de méthylène peut apporter des informations concernant la morphologie des germes (**Canler, 2005**).

Protocole

Sur le frottis fixé et refroidi :

- ✓ On fait couler la solution de bleu de méthylène jusqu'à ce que toute la lame soit recouverte.
- ✓ On laisse agir 1 minute.
- ✓ Nous rinçons abondamment la lame avec le jet d'une pissette d'eau distillée, ou à l'eau du robinet jusqu'à élimination des colorants en excès.
- ✓ On sèche à l'air ou devant le bec Bunsen, ou encore sécher délicatement entre deux feuilles de papier filtre fin (ou buvard), sans frotter.
- ✓ Nous examinons au microscope, objectif 100 avec une goutte d'huile d'immersion.
- ✓ Les bactéries sont colorées en bleu sombre.

- **Coloration de Gram :**

Principe :

Les bactéries sont imprégnées par une première solution colorante, le violet de gentiane, puis elles sont fixées par un mordant, la solution de Lugol (solution d'iode dans l'iodure de potassium). On fait ensuite agir un décolorant (alcool le plus souvent), suivant la composition de leur paroi : certaines bactéries résistent à cette décoloration et apparaissent colorées en violet elles sont dites Gram positif. D'autres bactéries ne résistent pas et ne sont plus visibles. On doit donc utiliser un deuxième colorant de teinte contrastante (fuchsine, ou safranine, colorants rouges), ces bactéries apparaissent alors colorées en rose, elles sont dites Gram négatif (Baldent, 1997).

Protocole

Sur le frottis fixé et refroidi :

- ✓ On fait recouvrir totalement la lame avec le violet de Gentiane
- ✓ On laisse agir 20 secondes à 1 minute selon la force du colorant utilisé.
- ✓ On élimine le violet de gentiane en faisant couler sur la lame la solution de Lugol.
- ✓ On repose la lame et la recouvrir de solution de Lugol. On laisse agir 15 à 20 secondes, (2 fois en laissant agir chaque fois 20 secondes).
- ✓ On procède à la décoloration par l'alcool, en laissant couler rapidement l'alcool sur le frottis, tenu verticalement ou en position très inclinée, jusqu'à ce que l'alcool s'écoule non teinté (5 à 10 secondes).
- ✓ Nous rinçons aussitôt à l'eau.
- ✓ On recolore par la fuchsine pendant 10 à 20 secondes.
- ✓ On passe au rinçage et séchage
- ✓ Nous examinons au microscope, objectif 100 avec une goutte d'huile d'immersion.

- **Recherche de spores**

La coloration au vert de malachite permet l'observation de la morphologie cellulaire et la présence ou l'absence des spores (Delarras2014).

Protocole :

- ✓ Prenez une lame propre sans graisse et faites un frottis.
- ✓ Sécher à l'air et fixer l'organisme sur une lame de verre et couvrir d'un carré de papier buvard ou d'essuie-tout coupé pour s'adapter à la lame.
- ✓ Saturer le papier buvard avec une solution de teinture vert malachite et le vaporiser à la vapeur pendant 5 minutes, en gardant le papier humide et en ajoutant plus de colorant au besoin. En variante, la lame peut être vaporisée sur un récipient d'eau bouillante.
- ✓ Lavez la lame à l'eau du robinet après retrait du papier filtre.
- ✓ Contre-colorer avec 0,5% de Fuchisine pendant 30 secondes.
- ✓ Laver à l'eau du robinet, séchez.
- ✓ Examinez la lame au microscope à l'immersion ($G \times 100$) pour la présence d'endospores

La lecture : Les cellules végétatives seront roses et les endospores seront vert foncé.

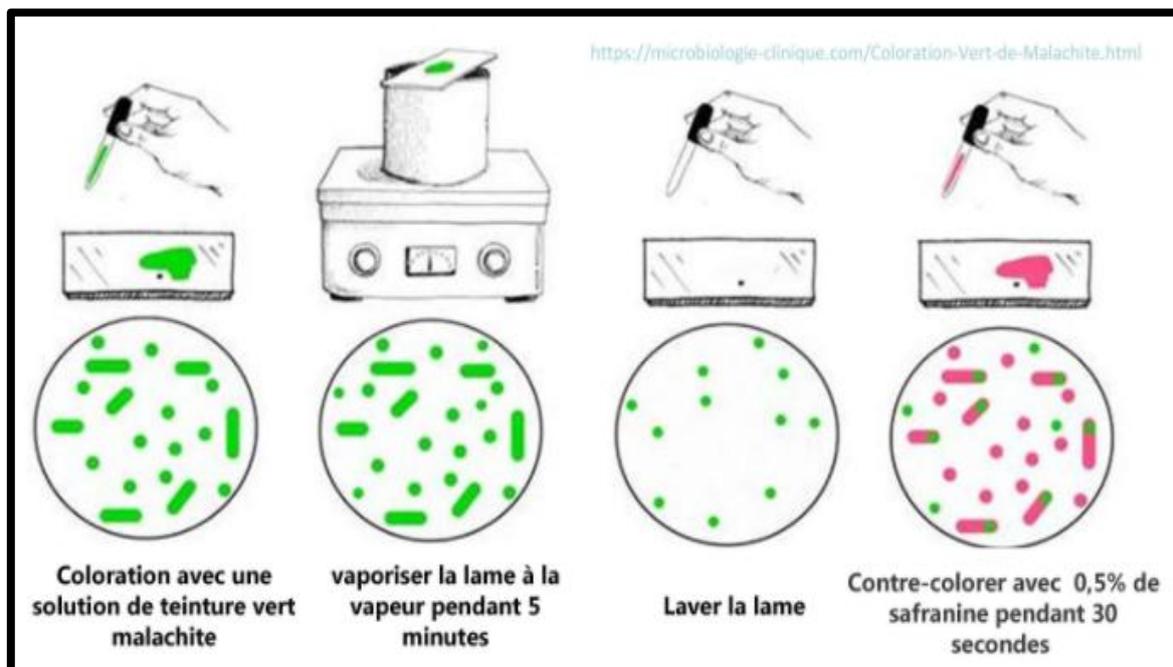


Figure 13 : Principe de la coloration de la spore (Delarras 2014).

II.2.4. Caractérisation biochimique et physiologique des souches sélectionnées :

Les épreuves biochimiques permettent en général de distinguer les espèces, même étroitement apparentées entre elles (Marchal et al., 1982), en utilisant « les galeries biochimiques traditionnelles ». Cette étude permet s'intéresse aux critères suivants :

a. Recherche de la catalase :

C'est une enzyme catalysant la décomposition de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) avec dégagement d'oxygène moléculaire selon la réaction suivante :



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

b. Recherche de l'oxydase :

La présence de l'enzyme phénylène diamine oxydase est mise en évidence après le dépôt du disque d'oxydase sur une lame propre et leur imprégnation avec une suspension bactérienne pendant **2 minutes**. Une réaction positive de la présence de l'oxydase se manifeste par le virage de la couleur du disque au rose-rouge (**Joffin et Leyral, 2006**).

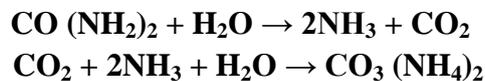
c. Test ONPG :

Principe

IL repose sur le fait que comme le lactose, l'ONPG est un composé incolore, est scindé par l'enzyme en libérant de l'ortho-nitro-phénol, composé soluble jaune (**Sayad,2008**). La recherche de β -galactosidase ou test ONPG (Ortho-nitrophényle β -Dgalactosidase) permet de détecter l'enzyme capable de scinder la molécule de lactose positive des bactéries lactose négatives (**Sayad,2008**) (**Annexe 03**).

d. Test uréase :

L'urée contenue dans le milieu urée-indole est hydrolysée sous l'action d'une produite par la souche test, elle conduit à la formation d'ammoniac et de dioxyde de carbone, qui se traduit par le virage de la couleur du milieu en coloration rouge violacée ou orange foncée selon la réaction :



e. Identification des bactéries par les galeries biochimiques miniaturisées 20E et CH50

Principe

D'après la documentation bioMérieux, la galerie API 20 E, commercialisée par la société « bioMérieux,» est un système Miniaturisé, prêt à l'emploi et standardisé. La galerie biochimique miniaturisée comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés un sigle indique la nature du test. Chaque tubule contient un substrat différent sur lequel le micro-organisme considéré va réagir. Les tubes sontensemencés avec une suspension bactérienne calibrée (de densité différente selon la galerie).

Les réactions produites au cours de la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Delarras, 2006).

La préparation des 3 types de galeries utilisés, a été préparée de la même manière Pour les substrats dont le sigle est encadré, la cupule doit être remplie de manière à créer un ménisque. Pour les substrats dont le sigle est souligné, la cupule doit être remplie de l'huile de vaseline.

Les creux du support de la galerie doivent être remplis d'eau pour former une chambre humide, puis la galerie est posée dans le support et le couvercle par-dessus. L'ensemble est incubé à une température adaptée pendant 24 à 48h (Ferry, 2007).

Après addition des réactifs nécessaire à la révélation de différents tests, la galerie est lue conformément aux indications du fabricant et codée, pour cela, les tests sont groupés par trois successivement de gauche à droite, les derniers triplets pouvant inclure des caractères bactériens comme la morphologie, le Gram, la mobilité, la catalase, etc. qui ne sont étudiés dans la galerie mais qui sont indispensables à son interprétation.

Les tests négatifs sont toujours codés 0 alors que le code affecté aux tests positifs varie selon la position du test dans le triplet : 1 pour le premier test, 2 pour le second, 4 pour le troisième.

Les 3 résultats du triplet sont additionnés (il existe seulement huit possibilités pour la somme d'un triplet : (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7)). Les sommes de chaque triplet lues de gauche à droite forment un code d'au moins 7 chiffres qui correspondent au profil biochimique du micro-organisme étudié.

L'admission de ce code dans le logiciel ApiwebTM permet l'identification du micro-organisme (Meyer, 2008).

- **La galerie biochimique API 20 E** : La galerie API 20 E, est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif aérobies fermentaires du glucose, avec oxydases variées (oxydase plus ou moins), cette galerie comprend 20 tests biochimiques miniaturisés, où le test d'oxydase effectué en dehors de la galerie, constitue le 21^{ème} test d'identification a noté sur la fiche des résultats (Delarras, 2006).

Tableau 08 : Tableau de lecture de la galerie Api 20E.

Test	Réactions	Composants actifs	Ajout de réactif	négatif	positif
ONPG	Bêta-galactosidase	2-nitrophényl-bêta-Dgalactopyranoside	Non	Incolor	Jaune
ADH	Arginine dihydrolase	L-arginine	Non	Jaune	Orange ou Rouge
LDC	Lysine Décarboxylase	L-lysine	Non	Jaune	Orange ou Rouge
ODC	Ornithine décarboxylase	L-ornithine	Non	Jaune	Orange ou Rouge
CIT*	Assimilation du Citrate	Citrate trisodique	Non	Vert pâle ou jaune	Bleu-vert ou Bleu
H₂S	Thiosulfate Réductase	Thiosulfate de sodium	Non	Incolore ou grisâtre	Dépôt noir
URE	Uréase	Urée	Non	Jaune	Orange ou rouge violacé
TDA	Tryptophane désaminase	L-tryptophane	TDA	Incolore ou jaune	marron ou brun foncé
IND	Production d'indole	L-tryptophane	James	Incolore ou jaune	Rose ou rouge
VP*	Production d'acétoïne	Pyruvate de sodium VP1	VP1 VP2	Incolore	Rose ou rouge
GEL*	Gélatinase	Gélatine de boeuf	Non	Non diffusion du charbon	Diffusion du charbon
GLU	Glucose	D-glucose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
MAN	Mannitol	D-mannitol	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
INO	Inositol	Inositol	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
SOR	Sorbitol	D-sorbitol	Non	Bleu ou bleu ver	Jaune
RHA	Rhamnose	L-rhamnose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
SAC	Saccharose	D-saccharose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
MEL	Mélibiose	D-mélibiose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Amygdaline	Non	Bleu ou bleu	Jaune

				vert	
ARA	Arabinose	L-arabinose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune

Pour les tests dont les sigles sont écrits en lettres noires, seul le tube doit être ensemencé.

- Pour les tests CIT, VP et GEL, le tube et la cupule doivent être ensemencés.

- Pour les tests dont les sigles sont soulignés, seul le tube doit être ensemencé.

Après ensemencement, la cupule doit être remplie d'huile de paraffine pour créer une Anaérobiose.



Figure 14 : Révélation des tests positifs dans l'API 20 E (Murray et al., 2003).

d. Galerie API 50CH:

Le teste biochimique la galerie API 50CH est un système standardisé composé de 50 microtubes. Ce test est utilisé pour connaitre si la souche permet de fermenter les 49 sucres de la galerie API 50 CHB ou non. Les microtubes de la galerie API 50 CH sont inoculés avec une suspension bactérienne jeune de 12h, incubées à une température de 30°C pendant 48 heures.

Les réactions se traduisent par des virages colorés par l'addition de réactifs. La lecture de l'API 50 CH se fait en cherchant dans chaque tube l'acidification produite qui se traduit par le virage au jaune du rouge de phénol contenu dans le milieu.

II.2.5 Production de biosurfactants microbiens en masse

II.2.5.1 Culture en Erlens

Des Erlenmeyers de 250 mL sont préparés et autoclavés à 120°C pendant 20 min, puis remplis par 25 mL du milieu liquide préalablement préparé. Le milieu est ensemencé par la souche bactérienne et incubé dans un incubateur agitateur à 40 °C pendant 48h à 72h avec agitation de 120 tours/min (Fig15)



Figure 15 : Culture en Erlens des souches microbiennes bactériennes

II.2.5.2 Extraction des biosurfactants

Pour extraire les biosurfactants du milieu de croissance, il est d'abord nécessaire de séparer les bactéries du milieu de culture par centrifugation. La récupération des biosurfactants dépend principalement de leur charge ionique, de leur solubilité et de leur localisation (extracellulaires ou liés aux cellules). Au cœur de cette étude, nous avons utilisé le protocole d'extraction de biosurfactants de Cooper *et al.*, (1981).

L'extrait brut des biosurfactants a été obtenu après centrifugation du moût de fermentation en culture (10 000x g, 10 min, 4° C), le surnageant formé est ajusté à pH 2 au moyen d'une solution d'acide chlorhydrique 1 N HCl. Le liquide acidifié a été maintenu à 4°C pendant une nuit, le précipité qui s'est formée a été collecté par centrifugation (17,300x g, 30 min, 4°C). Le précipité est dissous dans de l'eau distillée, le pH a été ajusté à 7,0 à l'aide d'une solution NaOH 1N, l'extrait est séché et ensuite pesé. A partir du produit brut, on procède ensuite à une triple extraction par un mélange de solvant chloroforme / méthanol (2:1, v/v), L'extrait est séché à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide. Le concentré est ensuite lyophilisé.

II.2.5.3 Essai de purification des biosurfactants et caractérisation des extraits semi purifiés

II.2.5.3.1 Chromatographie sur couche mince

Principe :

La chromatographie est une méthode physique d'analyse basée sur la séparation de constituants d'un mélange ; les différents constituants de ce mélange appelés solutés sont séparés et entraînés par un fluide (un liquide ou gaz) que l'on appelle phase mobile ; ils interagissent ou au contraire n'interagissent pas avec une phase fixe que l'on appelle phase stationnaire qui exerce sur eux un effet retardateur. L'origine du mot chromatographie vient peut-être de la séparation de composés colorés puisque chroma en grec, signifie couleur et graphe signifie écrire (Mahmoudi *et al.*, 2013 ; Talbi *et al.*, 2015) **Figure 16.**

Protocole expérimentale :

Les plaques de CCM utilisées sont de type gel de silice 60A (Merck). Elles ont été activées à 120°C avant d'être utilisées. Les composés glucidiques et peptidiques ont été séparés dans un système de solvant S1 (chloroforme-méthanol-acide acétique, 80:18:2, v/v). Les constituants peptidiques ont été visualisés par vaporisation de la ninhydrine (5 mg de ninhydrine dans 50 ml de butanol-50 ml de mélange d'acétone) et de chauffage à 100°C pendant 5 min (Hodge et Hofreiter, 1962). Les composés sucrés ont été localisés par chauffage des plaques à 110°C pendant 5 min après pulvérisation du réactif à l'antrone (Hodge et Hofreiter, 1962).

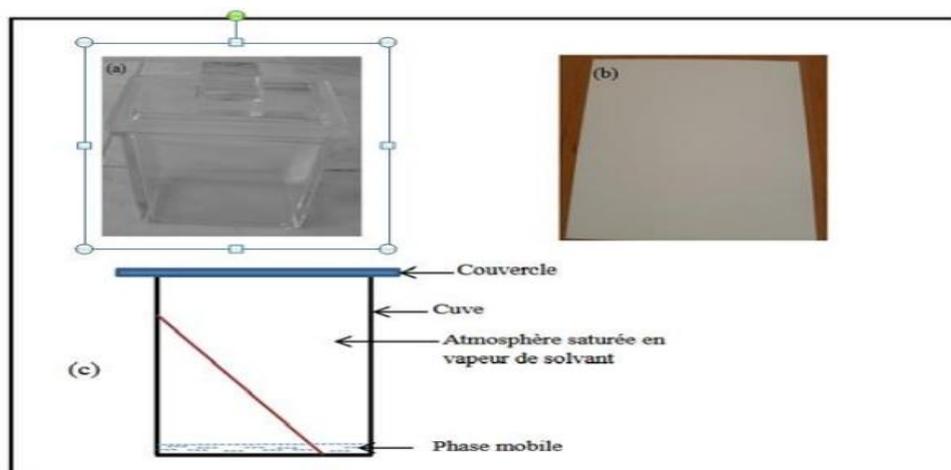


Figure 16 : Principaux éléments d'une séparation CCM

(Mahmoudi et al.,2013;Talbi et al.,2015).

(a) Cuve chromatographique

(b) Plaque CCM

(c) Schéma d'un montage CCM

PARTIE RESULTATS ET DISCUSSION

I Introduction :

Ce chapitre est consacré à l’exploitation des résultats des différentes étapes des expérimentations réalisées au laboratoire, à savoir ; l’identification des souches isolées (des bactéries, champignons, moisissures et levures), l’étude de leur caractéristiques, leurs aptitude à produire des biosurfactants. Ainsi que la discussion de ces résultants et leur comparaison avec les données bibliographiques.

II.1 L’analyse physico-chimique des échantillons :

Dans ce présent travail, les sites de prélèvements ont été choisis sur la base de leur contamination des sols et des eaux par les hydrocarbures. L'eau rejetée est toujours chargée par divers contaminants (hydrocarbures, métaux lourds et éléments toxiques) (Zaghden et al, 2016).

Les résultats des quelques paramètres physicochimiques de certains échantillons. Nous constatons que chaque échantillon a des mesures spécifiques de TPH, salinité, métaux lourds. La teneur en mercure est inférieure à 01 (µg/L) pour tous les échantillons. Les résultats obtenus des analyses sont présentés sur le tableau ci-dessous.

Tableau 09 : Les résultats obtenus des analyses physico-chimique des certains échantillons.

Echantillons	NB1	AB extrémité	NB 02	AB FOND	PLUS ANCIEN BOURBIER	EAU
TPH (mg/g)	94857	11,2	44	470,09	47,6	8920(mg/L)
Salinité PSU	3,05	2.71	1,30	1,37	2,37	>70PSU
pH	4,88	6,62	7,14	6,043	6,496	3,2
Mercure (µg/L)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Plomb (µg/L)	243,983	64.28	58.719	139.994	386,224	11175.108

TPH :

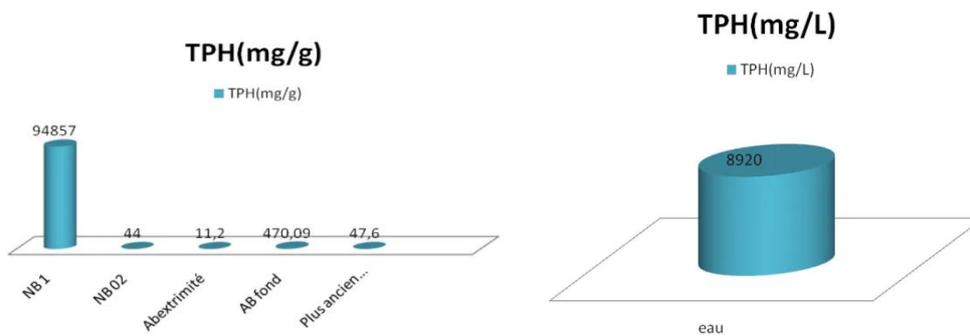


Figure 17 : Taux d’hydrocarbure totaux présent dans les échantillons prélevés.

L'échantillon NB1 possède un taux très élevé d'hydrocarbure qui présente 94857 (mg/g) par rapport aux autres échantillons prélevés. En effet, l'échantillon de l'eau est moins chargé en TPH avec un taux de 8920 (mg/L). Par ailleurs, les autres échantillons de AB fond, l'ancien borbier, NB 02 et AB extrémité ont de faibles taux d'hydrocarbure qui sont successivement : 470.09, 47.6, 44 et 11,2 (mg/g).

Salinité PSU :

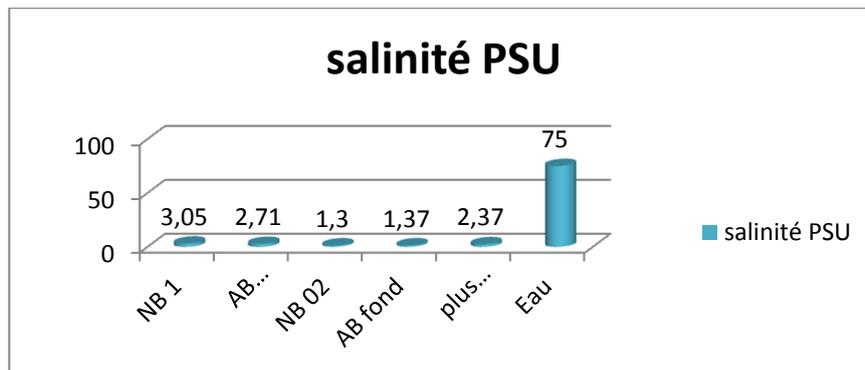


Figure 18 : Salinité des échantillons prélevés de différentes zones.

L'échantillon de l'eau présente une teneur de sel très élevée supérieure à 70 PSU et les autres échantillons possèdent des teneurs variables entre 1 et 3. Cependant, La salinité fait diminuer le nombre de micro-organismes dans le sol, elle inhibe les processus de l'humification et de la minéralisation des matières organiques, notamment, la nitrification et le dégagement de CO₂, Les fortes salinités constituent donc une barrière naturelle de la biodégradation. (BLIFERT et PERRAUD, 2004)

pH :

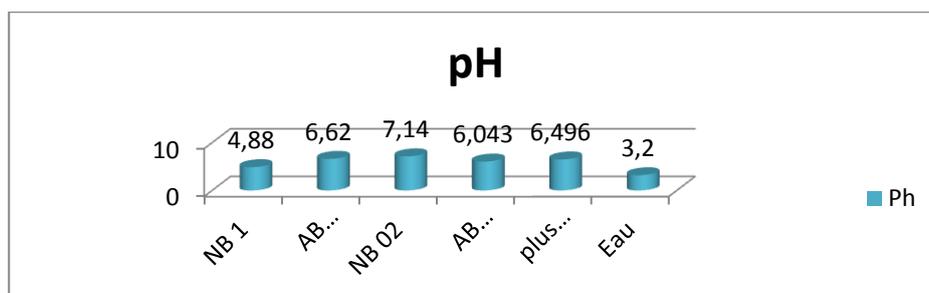


Figure 19 : pH des échantillons prélevés de différentes zones et aspect.

Les échantillons AB extrémité, NB 02, AB fond et plus ancien borbier possèdent un pH neutre entre 6 et 7,14. En outre, les échantillons et de l'eau ont des pH acide avec les valeurs de 4,88 et 3,2 respectivement. Cependant, de nombreuses activités biologiques ne peuvent se produire que dans une gamme étroite de pH (Faragallah et al, 2009), (Margesin et Schinner, 2001), ou ils expliquent.

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

Mercure :

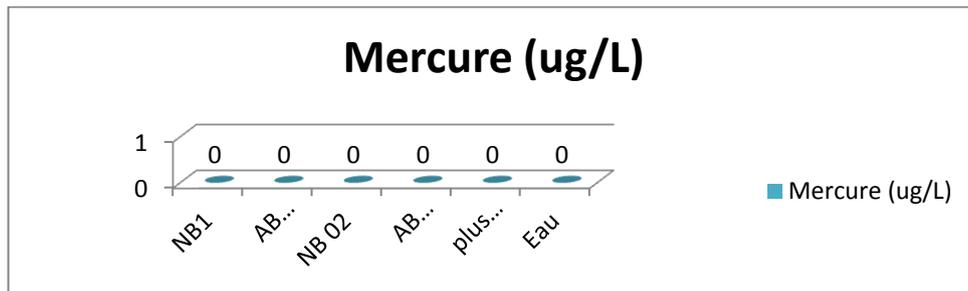


Figure 20 : Teneur en mercure (Hg) (µg /L) des échantillons prélevée.

Tous les échantillons ont des teneurs en mercure très faible inférieur à 0,1 (µg /L), C'est la même valeur que la valeur limite de quantification (LQ) obtenu après analyse par spectrométrie de fluorescence atomique (SFA).Nicolas ALSAC (2007).

Le plomb :

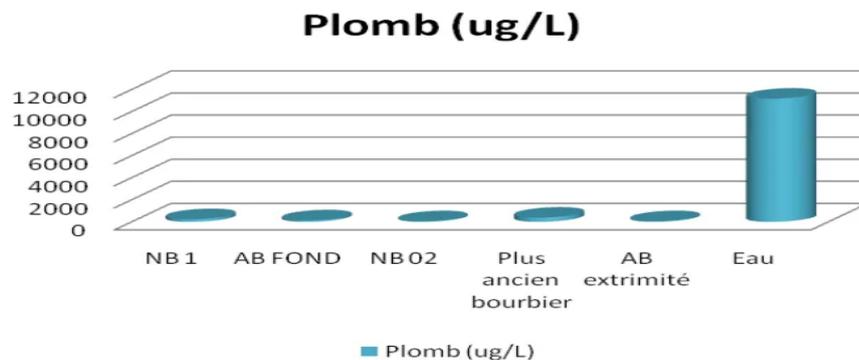


Figure 21 : Teneur en plomb (µg /L) des échantillons prélevée.

D'après les histogrammes de la figure !!!, on constate que l'échantillon d'eau a une teneur en plomb la plus élevée, égale à 11175,108 (µg /L) et les autre échantillons : NB1, AB extrémité, NB 02, AB fond, plus ancien bourbier ont des teneurs de : 243,983, 64,28, 58,719, 139,994, 386,224 (µg /L) respectivement.

II.2. Résultats de l'analyse microbiologique:

II.2.1. Résultats d'isolement des microorganismes :

II.2.1.1 Préparation des dilutions et ensemencement sur milieu solide :

Les échantillons du sol et de l'eau prélevés à différentes du bac de stockage de pétrole brut, contiennent probablement des concentrations différentes de pétrole, plus on s'approche du bac, plus l'échantillon sera saturé par le pétrole, ce qui explique la différence de couleur et de texture de nos échantillons et la diminution de populations microbiennes. Pereira et al, (2013) ont isolé des souches à partir d'un champ pétrolier au Brésil.

Dans le présent travail, deux milieux d'isolement ont été préparés, le milieu GN pour les bactéries et le milieu PDA pour les levures moisissures, la composition des milieux sont décrites dans l'annexe 02. Après 24 heures d'incubation à 37° C, les colonies bactériennes sont préalablement identifiées par leurs aspects macroscopiques : tailles, formes et couleurs. D'autre part, les colonies des levures et moisissures ont été identifiées par leurs aspects macroscopique : lisse, rugueuses, pigments, adhérent à la gélose, de différentes tailles, duveteuses, poudreuses, cotonneuse, le couleur (vert, jaune, brun, noir, bleu ...), plats ou plissées, après 48 jusqu'à 72 heures d'incubation à 30° C.

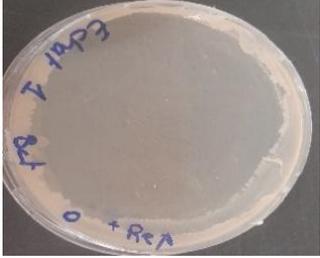
D'après les résultats trouvés, les culturesensemencées à partir des solutions mères ont donné des souches indénombrables de tous les échantillons testés mouradj, le sol et Nb1, les plus anciens bourbiers et AB fond sont dénombrables Annexe 03. En effet, le nombre de colonies apparues est diminué avec la dilution jusqu'à la disparition totale des colonies à une dilution 10⁻⁶ pour tous les échantillons à l'exception de l'échantillon du sol. Cependant, les boites d'ensemencement des échantillons NB2 et BE sont vide et dépourvues des colonies microbiennes pour la solution mère et toutes les dilutions effectuées.

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

Les souches isolées sont désignées par des codes composé par des lettres et des numéros comme : NB1 1, NB2 2...etc. Le tableau 02 réunit les photos des différentes colonies bactériennes des dilutions 10⁻³,10⁻⁶ et celle de solution mère de nos échantillons.

Tableau 10 : Quelques photos d'isolement de bactéries selon les dilutions des différents échantillons

Photos des cultures			
Echantillon	Solution mère	Dilution 10 ⁻³	Dilution 10 ⁻⁶
Mouraj			
Sol			

NB1			aucun
NB2	aucun	aucun	aucun
NB3		aucun	aucun
ABF		aucun	aucun
PAB		aucun	aucun
BE	Vide	aucun	aucun

II.2.1.2 Résultats des enrichissements après culture en milieu liquide :

Les microorganismes isolés sont exigeants et ayant un faible taux de croissance, c'est pour cela, nous avons utilisé une méthode microbiologique spécifique permettant d'augmenter leur développement et leur taux de croissance. Cette méthode est l'enrichissement.

Des séries de cultures par enrichissements bactériens sur un milieu liquide nutritif ont été réalisées à 37 °C. Les résultats obtenus après 72h d'incubation montrent l'apparition d'un trouble dans les flacons ce qui indique qu'il y a une croissance bactérienne.

A partir de ces cultures liquides, nous avons ensemencé un millilitre de chaque erlenmeyer sur un milieu solide GN pour isoler les bactéries et un milieu PDA solide pour isoler les levures et les moisissures, ensuite incubé respectivement à 37° C pendant 48h pour les boîtes de GN et à 30°C pendant 72h pour les boîtes de PDA.

D'après les résultats trouvés, nous avons observés que la culture des échantillons NB2 et ABF ont une très bonne croissance. Cependant, pour les autres cultures de NB1 le nombre de colonies est 1 pour la boîte 1 et 2 pour la boîte 2. Pour le NB2, le nombre de colonies sont 122 pour la boîte 1, 1600 pour la boîte 2 et 5432 pour la boîte 03. Par ailleurs, le nombre de colonies de l'échantillon NB3 sont : 1 pour la boîte 1 et 4 pour la boîte 2. L'échantillon PAB a montré l'apparition de 2 colonies dans la boîte 1 et 2 pour la boîte 2. Les boîtes 3 de NB1, NB3 et PAB ne présentent aucune colonie bactérienne. L'échantillon BE a uniquement une seule colonie dans sa première boîte.

Plusieurs microorganismes peuvent être isolés du sol, il représente leur principal habitat (Logan et De Vos, 2009), ils peuvent être également isolé à partir l'eau (Oguntoyinbo, 2007). Selon (Dommergues et Mangenot, 1970), les densités bactériennes dans les sols sont soumises à des conditions écologiques dures (régions arides et régions polaires), elles sont faibles mais elles ne tombent rarement en dessous de 10⁴- 10⁵ germes /g de sol sec dans les horizons superficiels.

Le rejet des produits pétroliers dans les milieux terrestres entraîne une prolifération des microorganismes aptes à se développer sur les hydrocarbures et leurs produits de dégradation. Leur nombre est beaucoup plus important dans les zones polluées de façon chronique et s'accroît après un apport d'hydrocarbures dans les sites dépourvus de contamination (Heinrich et Hergt, 1993).

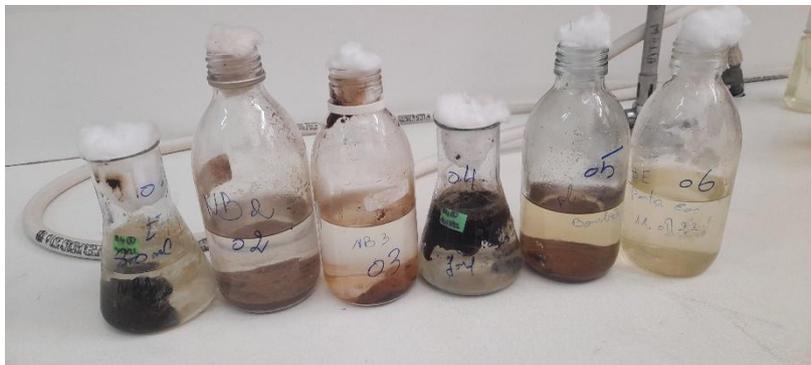
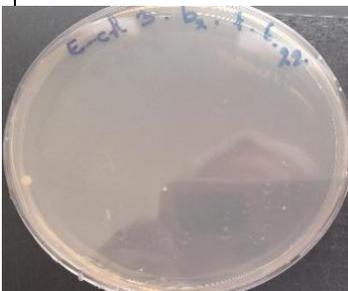


Figure 22 : Résultats de culture par enrichissement.

Le tableau 03 présente plusieurs colonies bactériennes qui ont été isolées à partir de différents enrichissements réalisés :

Tableau 11 : Quelques photos d'isolement de bactéries après enrichissement :

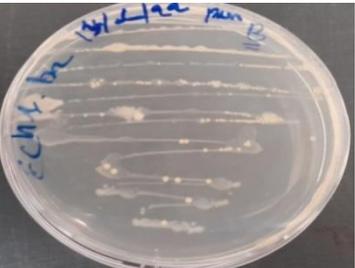
Echantillon	Photos des cultures		
	Boite 01	Boite 02	Boite 03
NB1			Aucune culture
NB2			
NB3			Aucune culture
PAB			Aucune culture

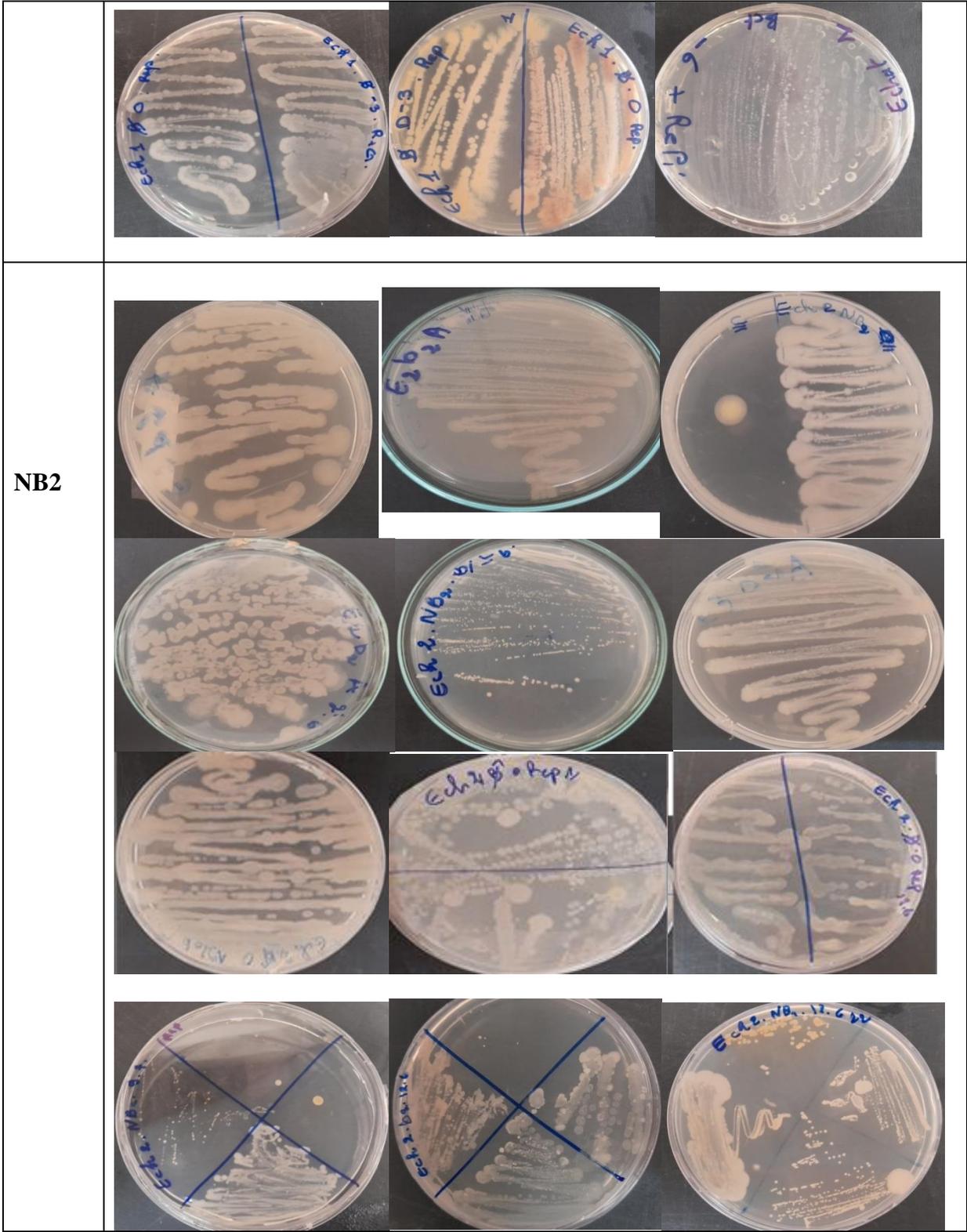
<p>ABF</p>			
<p>BE</p>		<p>Aucune culture</p>	<p>Aucune culture</p>

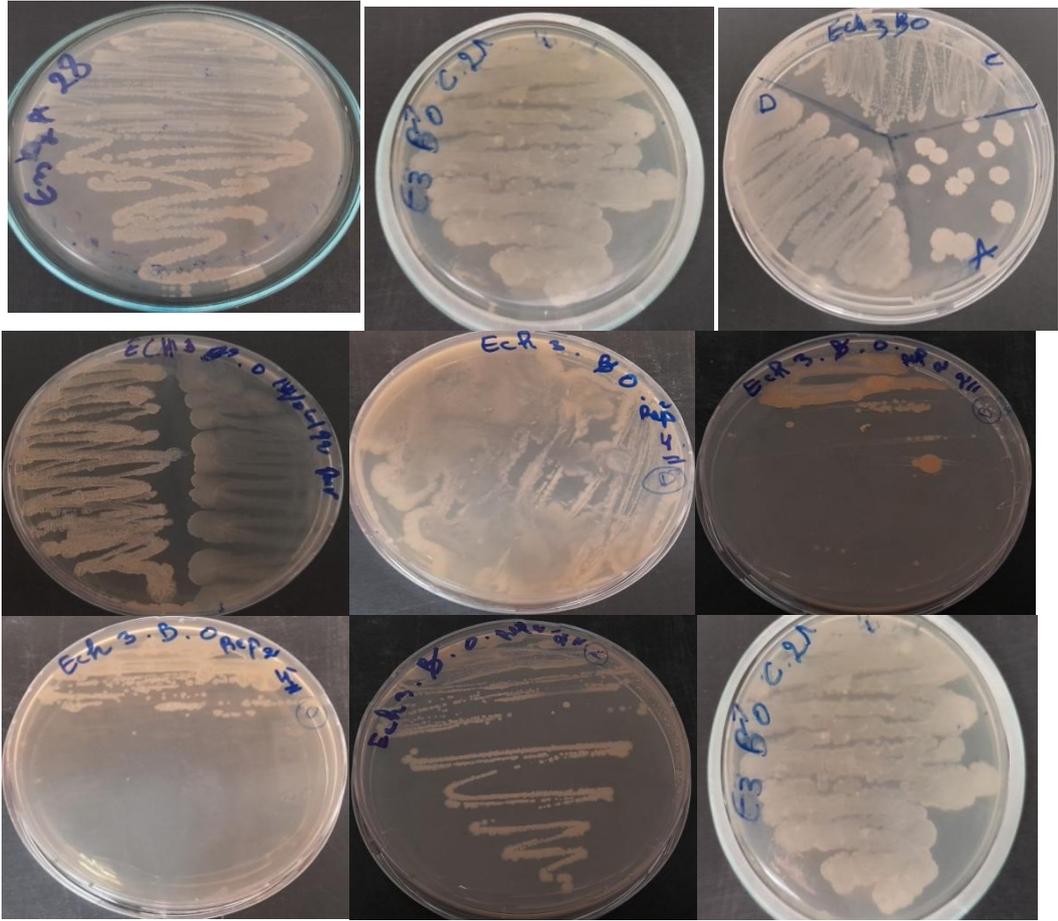
II.2.1.3 Résultats de purification des colonies :

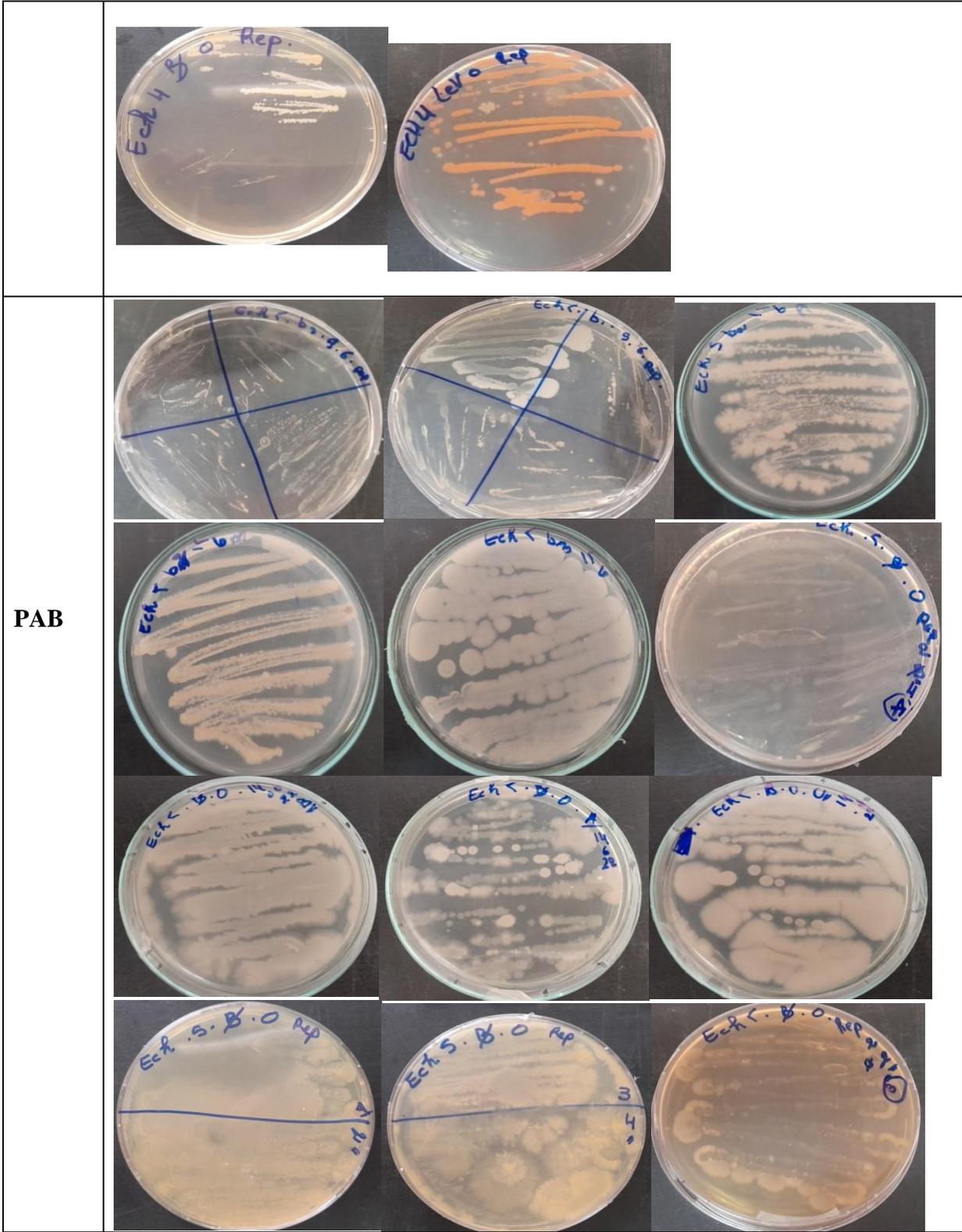
La purification a été réalisée pour obtenir des souches pures à partir des différents isolats. Les boîtes ont été incubées dans l'étuve à 37°C pendant 48 heures pour les bactéries et à 30°C pendant 72 heures pour les levures et les moisissures.

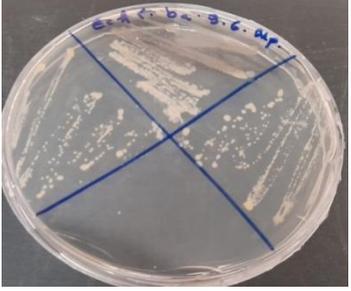
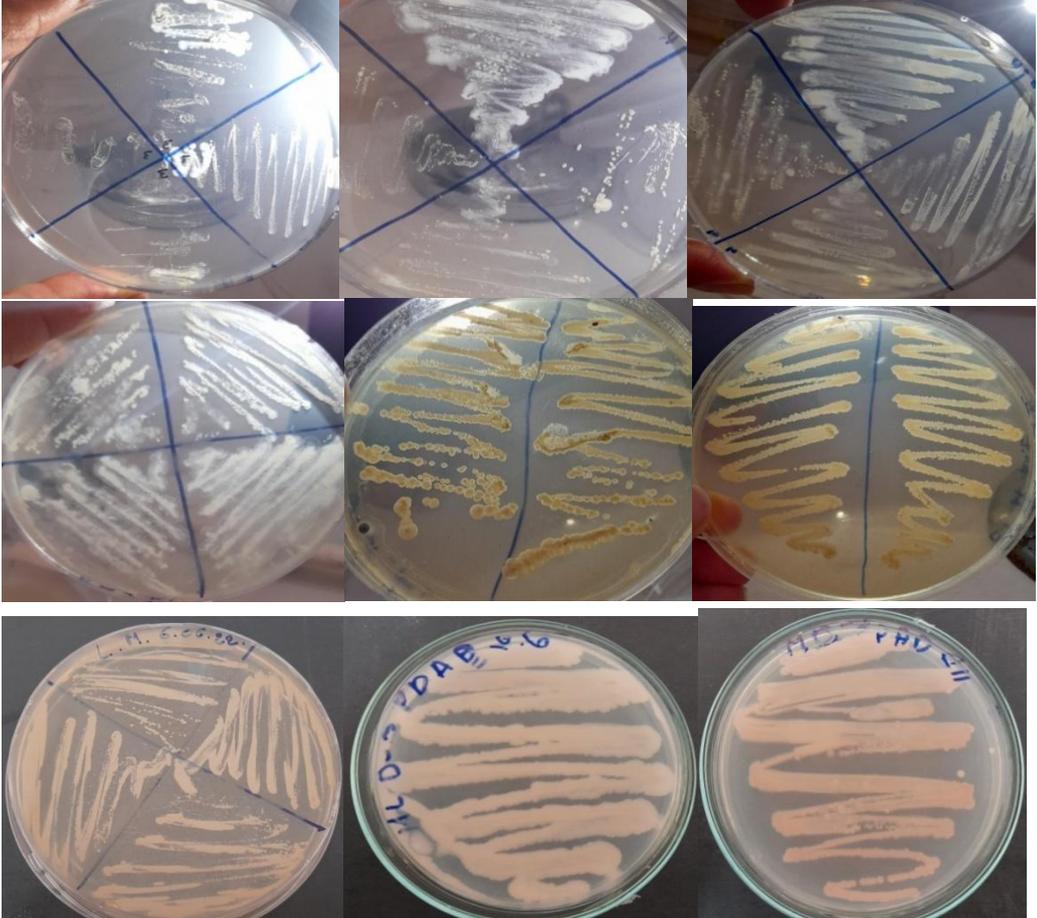
Tableau 12 : Photos de culture après purification des souches isolées.

Eche	Photos de purification		
<p>NB1</p>			
			



	
NB3	
ABF	



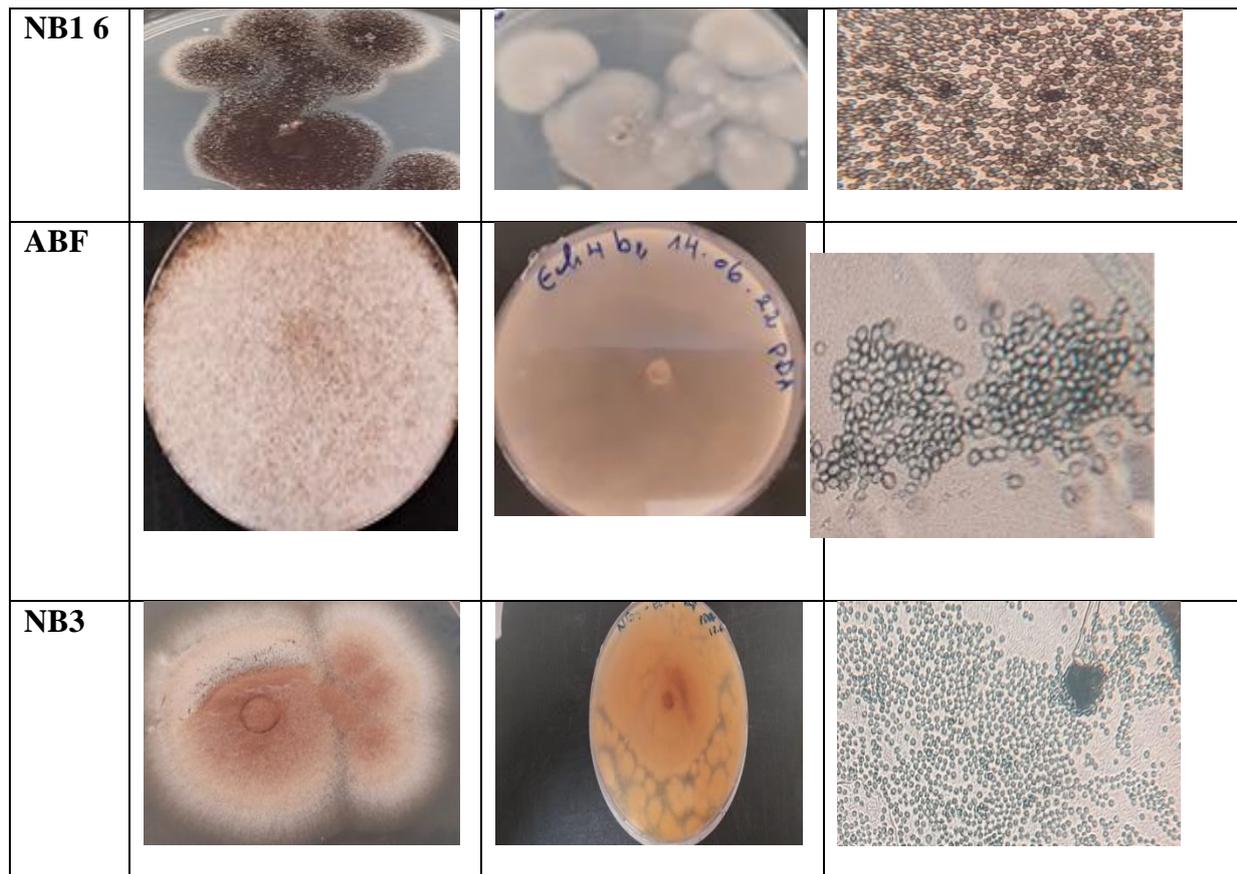
		
BE		
Sol		



Nous avons pu isoler 88 isolats des bactéries, des levures et des moisissures dont la répartition est comme suit : 13 isolats à partir des NB1, 21 isolats à partir des NB, 9 isolats à partir des NB3, 6 isolats à partir de ABF, 20 isolats à partir de PAB, 1 isolat de BE, 11 isolats à partir du sol et 7 isolats à partir des échantillons de MR.

Tableau 13 : Observation macroscopique et microscopique des champignons purifiés.

Isolate	Observations macroscopiques		Observations microscopiques X 40
	Surface	Revers	
NB1 5			



Ce tableau représente certain levures et moisissures purifiés sur milieux PDA.

Les caractéristiques macroscopiques (aspect, couleur et vitesse de croissance des colonies) des souches du tableau 06 :

- La souche NB1 5 a des colonies cotonneuses, blanche grisâtre, ombiliquée, à contour régulier et revers blanche.
- La souche NB1 6 a des colonies plate avec croissance rapide, poudreuse, avec couleur noir, contour échancré, à revers blanc-verdâtre.
- La souche ABF a des colonies cotonneuses, blanche, ombiliquée, à contour régulier et revers blanche jaunâtre.
- La souche NB3 a des colonies jaune-verdâtre, ombiliquée à contour irrégulier. Revers jaune brun à brun au centre.

II.2.2 Sélection de microorganismes producteurs des biosurfactants par le test d'émulsification E_{24} :

Pour déterminer la capacité des différents isolats à produire les biosurfactants, nous avons procédé à un criblage par la méthode du test d'émulsification E24, pour sélectionner les souches les plus performantes.

Certains isolats présentant des valeurs d'index d'émulsification élevés arrivent jusqu'à 40% indiquent que ces derniers ont une capacité productrice de biosurfactants à activité émulsifiante, d'autres isolats présentent des valeurs très basses de 10% et d'autres ont présentés des valeurs de 0%. Mukesh et al.

ont rapporté que l'indice d'émulsification diffère selon la nature du biosurfactant et du microorganisme producteur.

Des résultats proches de nos résultats ont été montrés par Benincasa et Accorsini, (2008) et Lovaglio et al, (2011) avec un index d'émulsion de 50% et 58% respectivement. Patel et Desai, (1997). Pereira et al, (2013) ont isolé une souche appartenant au genre de *B.subtilis*, avec un pouvoir émulsifiant de n-hexadecane de 52.7 %. Wei et al, (2005) ont rapporté que différentes souches de *Pseudomonas aeruginosa* sont dotées de pouvoir émulsifiant et stabilisateur de plusieurs types d'hydrocarbures et des huiles.

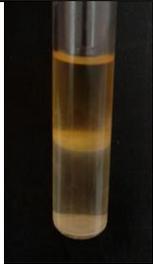
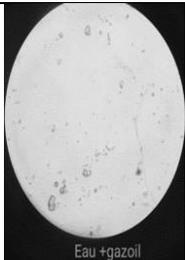
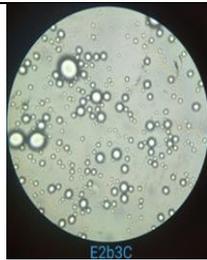
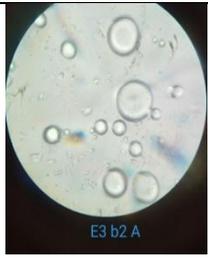
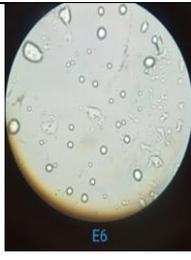
Par ailleurs, cinq (5) isolats indiqués en gris dans le tableau N°6 ont été sélectionnés comme étant performants à cause de leur capacité de production de biosurfactant. Le tableau 07 représente les résultats du test d'émulsification E24 effectué sur 88 souches isolées à partir des différents échantillons.

Tableau 14 : l'activité émulsifiante des isolats obtenu par le calcul de l'indice d'émulsification (E24%).

Isolat	E24%		Isolat	E 24 %	
	À t= 0	Après 24h		À t= 0	Après 24h
NB1 1	7,7	0	ABF 2	0	0
NB1 2	9,9	0	ABF 3	0	0
NB1 3	0,22	0	ABF 4	0	0
NB1 4	0	0	ABF 5	0	0
NB1 5	0	0	ABF 6	18	1,6
NB1 6	0	0	PAB 1	10,9	7,40
NB1 7	59	50	PAB 2	0	0
NB1 8	3,77	1,88	PAB 3	0	0
NB1 9	1,9	0	PAB 4	40	6
NB1 10	10	8	PAB 5	2	0
NB1 11	13	2	PAB 6	0	0
NB1 12	9	4	PAB 7	40,82	0
NB1 13	22	6	PAB 8	10	0
NB2 1	0	0	PAB 9	0	0
NB2 2	7,14	0	PAB 10	0	0
NB2 3	17,31	3,8	PAB 11	1,88	0
NB2 4	0	0	PAB 12	2	0
NB2 5	67,31	62	PAB 13	12	0
NB2 6	3,8	0	PAB 14	10	0
NB2 7	0	0	PAB 15	0	0
NB2 8	10	0,6	PAB 16	0	0
NB2 9	2	0	PAB 17	1,88	0

NB2 10	2	0		PAB 18	2	0
NB2 11	78,57	78		PAB 19	26	6
NB2 12	20	6		PAB 20	0	0
NB2 13	0	0		BE	50	45
NB2 14	0	0		Sol 1	47,17	1,82
NB2 15	0	0		Sol 2	26	8
NB2 16	20	18		Sol 3	10	0
NB2 17	0	0		Sol 4	0	0
NB2 18	0,2	0		Sol 5	18	2
NB2 19	1	0		Sol 6	0	0
NB2 20	0	0		Sol 7	0	0
NB2 21	0	0		Sol 8	33,33	10
NB3 1	0	0		Sol 9	10	3,84
NB3 2	51	46		Sol 10	0,97	0
NB3 3	0	0		Sol 11	0	0
NB3 4	0	0		MR 1	6	2
NB3 5	28,8	4		MR 2	5,88	0
NB3 6	1,8	0		MR 3	15,38	5,66
NB3 7	19,51	2		MR 4	0	0
NB3 8	0	0		MR 5	0,16	0
NB3 9	0	0		MR 6	33,89	17,64
ABF 1	1,88	0		MR 7	0	0

Tableau 15 : Aspects macroscopiques et microscopiques de quelques émulsions

EMULSIONS EN TUBE					
					
EMULSIONS OBSERVEES AU MICROSCOPE G x 40					
					
Temion	NB1 7	NB2 5	NB2 11	NB3 2	BE
E24 %	50	67,31	78	46	50

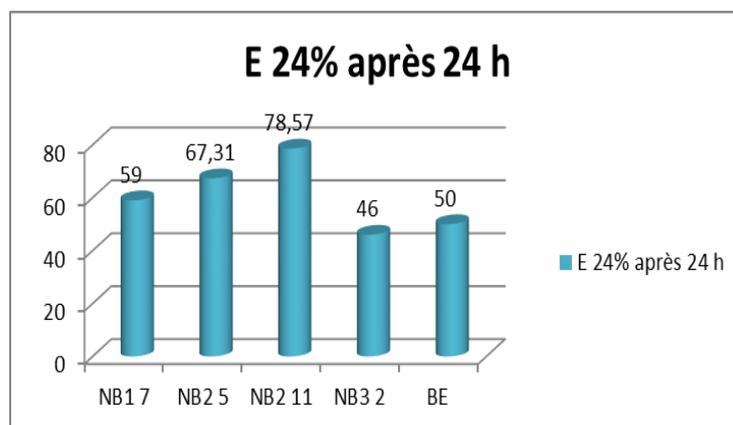


Figure 23 : Pouvoir émulsifiant E24% des souches isolées après 24 H

Les résultats d’observation macroscopique d’émulsion et les calculs de l’indice d’émulsification révèlent que pour les souches : NB1 7 Souche NB2 5, Souche NB2 11, Souche NB3 2 et BE : ont montré L’apparition de deux phases après le mélange de la suspension bactérienne avec le gazoil. La phase supérieure a une coloration blanchâtre et sombre ce qui indique la formation des micelles servant de piéger les hydrocarbures (gazole) par l’effet bactérienne entraînant. La hauteur de la phase trouble est un peu variable d'une souche à une autre ce qui explique donc la différence des indices des émulsions. La souche

NB2 11 a donné le taux le plus élevé (jusqu'à 78%), les souches NB2 5, BE, NB1 7 et NB3 2 ont donnés des taux variables moins importants de 67.31 %, 50 % et 46% respectivement.

Franey et al. (1991) ont trouvé que des micro-organismes présents dans un sol contaminé par des hydrocarbures étaient avantagés par la production d'agents émulsifiants. Les émulsions sont des systèmes dispersés de stabilité limitée (possède un minimum de stabilité cinétique) ou thermo dynamiquement instables formés de deux liquides non miscibles. L'un est dispersé sous forme de globules dans l'autre grâce à la présence d'émulsifiants. (ROSENM et al, 2004).

Ces résultats peuvent être comparés aux résultats obtenus par Guregouri en 2010. Qui a trouvé un indice E24=63 de la souche C (bactérie à Gram négatif) correspondante a la souche la plus productrice des biosurfactants. Donc le taux de biodégradation des hydrocarbures est différent d'un groupe bactérien a un autre.

Rodríguez-Rodríguez et al. (2012) ont rapporté qu'un E24 > 50% indique que le microorganisme produit potentiellement des biosurfactants. Néanmoins, il faut tenir compte les conditions optimales pour la productivité maximale des biosurfactants.

II.2.3. Identification préliminaire des souches :

L'identification de ces souches microbiennes a pour but d'étudier leur capacité à produire les biosurfactants. Les isolats qui ont une activité émulsifiante élevée supérieure à 45 % ont été sélectionnés.

a. Aspect macroscopique :

L'aspect macroscopique des colonies isolées ont permis de faire une identification préliminaire des souches. De plus, l'ensemencement des souches, productrices de biosurfactants sélectionnées sur la surface de la gélose nutritive et l'incubation à une température de 30°C pendant 24-48 h a permis l'observation des colonies dans le tableau 08.

Tableau 16 : Observation macroscopique des souches purifiées.

Observation macroscopique				
				
NB1 7	NB2 5	NB2 11	NB3 2	BE

D'après les résultats présentés dans le tableau, on observe que la souche NB1 7 a des colonies et contour irrégulières, de couleur blanche avec un diamètre supérieur à 2mm, opaque. La surface est lisse, crémeuse, plate. Présence de l'odeur. Par ailleurs, la souche NB2 5 présente des colonies rondes à contour irrégulier, de couleur blanche avec un diamètre inférieur à 3 mm, opaque. La surface est rugueuse, crouteuse et concave sans odeur. Pour la souche NB2 11 ses colonies sont rondes à contour régulier, de couleur blanche avec un diamètre inférieur à 2mm, opaque. La surface est lisse, crouteuse et concave. Absence de l'odeur. D'autre part, la souche NB3 2 a des colonies rondes à contour régulier, de couleur blanche avec un diamètre du 2mm, opaque. La surface est rugueuse, crémeuse et concave. Absence de l'odeur. La souche de BE a des colonies et contour irréguliers, de couleur beige opaque avec un diamètre ~~de~~ supérieur à 3mm, La surface est lisse, crémeuse et convexe. Présence de l'odeur C'est un bacille gram négatif mobile, en paires, isolait, ou en chaînes (Kerstens et al., 1996; Young, 2010). Sur gélose nutritive, les colonies sont rondes, blanches et lisses (Gaignard, and Luisetti, 1993)

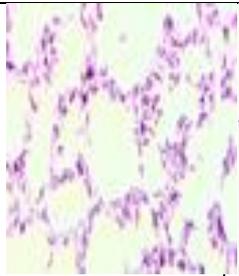
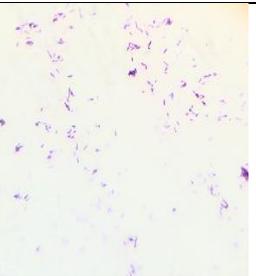
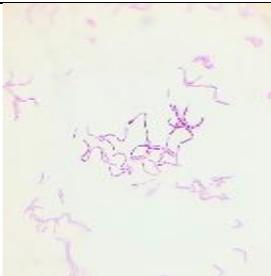
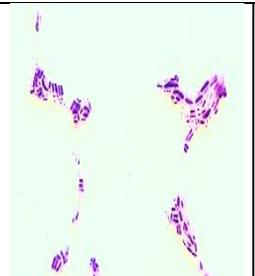
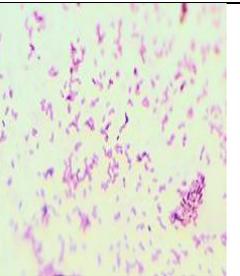
b. Aspect microscopique :

L'observation microscopique est basée sur : la coloration de Gram, l'observation à l'état frais et la recherche de spores et les résultats sont présente dans le (tableau 09)

D'abord la souche NB1 7 elle s'agit des bactéries mobiles, se présente sous une forme bacillaire du groupe Gros bacilles assemblées en amas avec une paroi indique qu'il appartient à Gram positive en absence des spores. Pour la souche NB2 5, sont aussi des bactéries mobiles, possédant une forme bacillaire, du groupe petit bacilles isolées, Elles présentent une paroi à Gram négative avec absence des spores. D'autre parte la souche NB2 11 les bactéries sont mobiles, présente une forme bacillaire du groupe gros bacille assemblées en chainettes, une paroi à Gram négative, absence des spores.

La souche NB3 2, sont des bactéries mobiles d'une forme bacillaires du groupe gros bacilles assemblées en amas, Elles présentent une paroi à Gram négative, l'absence des spores est remarquable. la souche BE sont aussi des bactéries mobiles d'une forme bacillaire du groupe petit coccobacilles isolées. Une paroi à Gram négative, présence des spores.

Tableau 17 : Aspect microscopique des souches purifiées.

Observation microscopique à immersion					
Photos de coloration de gram					
Isolat	NB1 7	NB2 5	NB2 11	NB3 2	BE
Gram	+	-	-	-	-
Spore	-	-	-	-	+

(-) : négative, (+) : positif,

Les résultats montrent que les isolats présentent une diversité micro-morphologique. Les bactéries du sol ont une grande variété de formes. Elles peuvent être mobiles ou immobiles, et possèdent ou non des formes de résistance (spore) (Dommergues, 1970).

Ces souches sont proches à ceux de Prescott et al. (2013) qui ont décrit le genre *Bacillus* par sa forme punctiforme et ronde avec un diamètre de colonie compris entre 1 et 3 mm et d'une couleur beige ou crémeuse, et ceux d'Arahal et al. (2002), qui les ont décrits par leur aspect lisse, opaque avec un relief plat ou convexe. C'est un bacille gram négatif mobile, en paires, isolait, ou en chaînes (Kersters et al., 1996; Young, 2010), similaire à l'observation macroscopique de la souche NB2 11. Sur gélose nutritive, les colonies sont rondes, blanches et lisses (Gaignard, and Luisetti, 1993).

Selon Maheswaran et al, (2010) tous leurs isolats sont mobiles. Brossard et al. (2006) ont déclaré que toutes les espèces de *Bacillus* sont mobiles sauf *B. anthracis* ce qui nous avons trouvé dans nos résultats. Les résultats de coloration de Gram montrent que des cinq souches sélectionnés (NB 1 7) sont à Gram positif tandis que les restes sont à Gram négatif. Selon (Lahreche et Bouhamida, 2017), Les souches les plus fréquemment décrites dans la biodégradation des hydrocarbures appartenant aux genres à Gram positif.

Gurgouri en 2010, qui a montré que parmi les souches testées elle présume ces différents genres : *Pseudomonas.sp*, *Bacillus.sp*, *Enterobacter.sp*. D'après Gaudu (2014), les bactéries capables de dégrader les hydrocarbures font partie aux genres *Bacillus*.

II.2.4. Caractérisation biochimique et physiologique des souches sélectionnées :

Pour connaître les caractéristiques des souches sélectionnées commettant des souches performantes productrices de biosurfactants, nous avons réalisé certains tests biochimiques, les résultats de ces tests sont résumés dans le tableau 10 et présentés aussi dans l'Annexe 03.

Tableau 18 : Résultats des tests biochimiques.

	NB1 7	NB2 5	NB2 11	NB3 2	BE
Oxydase	+	-	-	+	-
Catalase	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	-
Ure-ase	-	-	-	-	-

(-) : négative, (+) : positive,

Le teste oxydase est positive pour les souches NB1 7 et NB3 2, donc ces souche possèdent l'enzyme phénylène diamine oxydase et les souches NB2 5, NB2 11 et BE présentent des résultats négatifs. Selon Jong-Kang et Jurtschuk (1986), toutes les souches de *Bacillus* possédant une oxydase, alors que Das et Dangar (2007) ont trouvé que tous leurs isolats ne la possèdent pas.

Par ailleurs, Toutes les souches testées présentent des résultats négatifs pour le teste catalase à cause de l'absence l'enzyme responsable de la catalyse de la décomposition de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Pour le teste ONPG, pas de virage de la couleur du milieu pour les 5 tests, donc les souches ne possèdent pas l'enzyme capable de scinder la molécule de lactose.

De même, pour le test uréase nos résultats sont négatifs, ce qui indique l'absence de la formation d'ammoniac et de dioxyde de carbone.

II.2.4.1 Identification des bactéries par les galeries biochimiques miniaturisées 20E et CH50 :

Logan et Berkeley, (1984), décrit un système pour l'identification rapide et précise d'isolats de Bacillus à l'aide d'une matrice de résultats de tests utilisant les galeries API 20 E et API 50CHB. Pour confirmer l'appartenance des cinq souches sélectionnées au genre Bacillus, des tests biochimiques les galeries API 20E et API 50 CHB ont été utilisées et les résultats obtenus sont montrés dans l'annexe 04.

La galerie biochimique API 20 E :

Les souches que nous avons sélectionnées sont du genre de Bacillus. D'après certaines études bibliographiques, le test convenable de ce genre des bactéries est celui des galeries API 20 E. Les résultats obtenus de la lecture des palettes des galeries après 24h d'incubation sont présentés dans le tableau 11.

Tableau 19 : Les résultats de la galerie biochimique API 20 E.

	NB2 11	NB3 2	NB2 5	BE
ONPG	-	-	-	-
ADH	-	-	-	-
LDC	+	+	+	+
ODC	-	-	-	-
CIT	-	-	-	-
H25	-	-	-	-
URE	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-
IND	-	-	-	-
VP	+	+	+	+
GEL	+	+	+	+
GLU	-	-	-	-
MAN	+	+	-	+
INO	-	-	-	-
SOR	+	-	+	-

RHA	+	+	+	+
SAC	-	-	-	-
MEL	+	+	+	+
AMY	+	+	+	+
ARA	+	+	+	+

Selon la galerie API 20E les souches NB2 11;NB3 2;NB2 5 et BE possède lysine décarboxylase et ont la capacité de produire l'acéton (VP),hydrolyser la gélatine (GEL)et de fermenter le mannose(MAN) sauf la souche NB2 5,et aussi à assimiler le sorbitol (SOR) sauf NB3 2 et BE et par ailleurs Toutes ces souches ont la capacité à assimiler le rhamnose (RHA), le melibiose(MEL),l'amygdaline(AMY)et l'arabinose (ARA).

- **Galerie API 50 CH :**

La souche NB1 7, est la seule souche isolée qui a un Gram positif, elle a été identifiée par utilisation de la galerie API 50 CHB. La lecture des résultats a été effectuée après 24 heures d'incubation à 37°C et collectés dans le tableau 12.

Tableau 20 : Les résultats de la galerie biochimique API 50 CH.

	résultat		résultat		résultat		résultat		résultat		résultat
1	+	10	+	19	+	28	+	37	+	46	+
2	+	11	+	20	+	29	+	38	+	47	+
3	+	12	+	21	+	30	+	39	+	48	+
4	+	13	+	22	+	31	+	40	+	49	+
5	+	14	+	23	+	32	+	41	+		
6	+	15	+	24	+	33	+	42	+		
7	+	16	+	25	+	34	+	43	+		
8	+	17	+	26	+	35	+	44	+		
9	+	18	+	27	+	3	+	45	+		

Les résultats obtenus sont positifs pour les 49 tests biochimiques effectués, cela peut indiquer une inadaptation de galerie ou un problème technique (JOFFIN ,1998). Pour le teste sculine (tube n°25), on observe un virage de couleur du préau NOIR (Annexe 03).

III.2.5 Production de biosurfactants microbiens en masse

Culture en Erlenmeyer

La production en masse a été réalisée uniquement pour les souches bactériennes ayant montré des tests positifs intéressants en présence du milieu liquide additionné de gasoil comme source de carbone (Figure24).



Figure 24: Culture en Erlenmeyer dans un incubateur agitateur

Extraction et caractérisation préliminaires des biosurfactants produits

Il existe certaines propriétés exigées du biosurfactant pour que la séparation par ces méthodes soit possible : pour la centrifugation, le biosurfactant insoluble devient précipité à cause de la force de centrifugation, pour la précipitation acide, le biosurfactant devient insoluble à des valeurs de pH inférieures, pour l'extraction par des solvants, le biosurfactant est dissous dans des solvants organiques grâce à sa partie hydrophobe (Koch et al., 1991). Après extraction et chromatographie unidimensionnelle sur couche mince. Les résultats obtenus affirment qu'il y a une production des substances extracellulaires par la souche bactérienne NB2 5 par la révélation de substances glucidiques et peptidiques. D'après le Tableau qui suit, les biosurfactants produits par cette souche comporte à la fois des composés peptidiques et glucidiques, ce sont probablement des glycoprotéines ou des glycopeptides

Tableau : valeurs de Rf obtenues après révélation des plaques de CCM

		Souche NB2-5	
		Nombre de tâches	Les valeurs de Rf
Substances	glucidiques	3	0.13 ; 0.17 0.47
	peptidiques	4	0.21 ; 0.27 0.31 ; 0.36
	lipidiques	0	-

Conclusion

Conclusion

Les objectifs de cette étude consistaient à l'isolement des souches performantes possédants une capacité efficace de production de biosurfactant dans le but de valoriser et traité les sols pollués par les hydrocarbures.

Les échantillons testés ont été prélevés à partir des anciens bourbiers et pack de stockage au niveau de Haoud el hamra, Hassi messaoud Ouregla.

Dans le cadre de cette étude, on a réussi à isolé 88 souches puis on a testé leur pouvoir émulsifiant et donc la capacité à produire de biosurfactants.

Parmi ces souches, cinq seulement (NB2 11 ; NB2 5 ; NB1 7 ; BE et NB3 2) ont avoir une valeur proche ou supérieur à 50 % qui nous approche à une production considérable.

Des études macroscopiques, macroscopiques physico-chimique et biochimique ont été faites pour une approche au genre bactérien probablement existé.

Le dosage physico-chimique montre des teneurs variable en TPH, plombe, mercure, et en pH et salinité d'un bourbier de prélèvement a un autre.

Quatre souche sélectionné sont à Gram négatif (NB2 11 ; NB2 5 ; BE et NB3 2) tandis qu'une seule souche est à Gram positif (Nb1 7), et l'observation microscopique montre des bacilles assemblés et d'autres isolés.

L'indice d'émulsification élevé indique une grande activité bactérienne, et que ces bactéries hydrocarbonolaste assurent une réaction enzymatique au niveau des sites pollués.

Les biosurfactants produire par ces souche pourraient être utilisés dans divers applications biotechnologie spécialement dans la récupération des pétroles, et des autre domaines comment agriculteurs, cosmétiques et médicales....

L'identification morphologique et biochimique des isolats nous orient vers l'espèce *Bacillus*.

Référence

A

Al-Arajil L., AbdRahman R. N. Z. R., Basri et Salleh M. A. B., (2007). Minireview: Microbial Surfactant. (AsPac) .J. Mol Biol Biotechnol., 15 (3): 99-105.

Ali Ahmed S.2011.Essai de rehabilitation d'un sol contamined par les hydrocarbures à l'aide de tensioactifs obtenus par voie BIOLOGIQUE. Thèse de magistère, école nationale supérieure agronomique, 99 pages.

B

BabuP.S. ; Deshpande M. ; Juwarkar A . ; Khanna P ., 1994: Characterization and properties of the microbial biosurfactant produced by Bacillus licheniformis strain BS1. Biotechnology. Vol.4. N°5. Pp : 302-305.

Baldent., 1997. Coloration usuelles en Bactériologie. Revue de Développement et santé. Février (1997). www.ledamed.org.

Canler J-P., 2005. Dysfonctionnements biologiques des stations d'épuration : Origines et solutions. Groupe Gis-Biostep. Doc & Tech. FNDAE n°33 : pp 100-104.

Baldent., 1997. Coloration usuelles en Bactériologie. Revue de Développement et santé. Février (1997). www.ledamed.org.

Banat I.M., 1995 : Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation : a review. Bioresource Technology. Vol.51. pp : 1-12.

Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T.J., Marchant, R., (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Appl. Microbiol. Biotechnol. 87, 427–444.

Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. Applied microbiology and biotechnology, 53(5), 495-508.

Benincasa M et Accorsini F. R. (2008). Pseudomonas aeruginosa LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. BioresourceTechnology, 99 : 3843–3849.

BLIFERT et PERRAUD,(2004).Chimie de l'environnementair, eau, sols,déchet. De Boeck université.P (369 ,372-375)

Bognolo G. (1999) Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons, Colloids and Surfaces A: Physico-Chemical and Engineering Aspects, 152, (1-2), 41-52.

C

Canler J-P., 2005. Dysfonctionnements biologiques des stations d'épuration : Origines et solutions. Groupe Gis-Biostep. Doc & Tech. FNDAE n°33 : pp 100-104.

Caron S. et S. Carmant (1997), Analyse des polluants organiques présents dans des sols d'anciennes usines à gaz : évaluation expérimentale de la chaîne analytique et préconisations. Gaz de France. Congrès mondial du gaz 10-13 juin 1997 à Copenhague.

CFG, Décembre 2001, Comité français des géosynthétiques (CFG), « Guide pour la réalisation et l'exploitation de planches d'essais sur DEG ».

Chaineau C.H. ; Morel J.L. ; Oudot J., 1996 : Land treatment of oil based drill cutting in an agricultural soil. Journal of environmental quality. Vol. 25. N°4. pp : 858-867.

Chimie physique - Walter J. MOORE - Indiana university DUNOD PARIS 1962 traduction autorisée par Prentice Hall, INC (2e édition 1955) New York.

Christofi, N., Ivshina I.B. 2002. A review: microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation, Journal of Applied Microbiology, 93, 915-929.

Comité français des géotextiles et géomembrane, « Recommandation générales pour la réalisation d'étanchéités par géomembrane » fascicule N°10 1991.

Cooper De et Goldenberg B. (1987). Surface-active agents from 2 Bacillus species. Appl Environ Microbiol. 53(2):224-229.

Costes J.M. ; Dreulle B., 1997: les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement : la réhabilitation des anciens sites industriels. Revue de l'institut Française du pétrole. Vol. 52. N°4. Pp : 944-947.

D

DADA Mohamed Abd errahman optimisation d'un procédé de traitement des boues des forages, mémoire présentée en vue de l'obtention du diplôme de magister 2010/2011 université M'hamed BOUGARA, Boumerdasse.

Debabza M. 2015. Emergence en milieu hospitalier des bacilles Gram négatifs multirésistants aux antibiotiques : étude bactériologique et moléculaire. Thèse de doctorat d'état, Université Badji Mokhtar-Annaba, pp. 5-60-61-62-63-64-65.

Delarras C, (2014). Pratiques en microbiologie de laboratoire. Lavoisier, France.

Denis F, Poly M, Martin C, Bingen E, Quentin R, (2007). Bactériologie Médicale : Techniques Usuelles. Elsevier Masson, France.

Denis SAVOYE, Daniel FAYOUX, Laurent SAUGER, étanchéité d'un lagunage aéré : vieillissement prématuré d'une géomembrane PVC sous climat de montagne. Rencontres Géosynthétiques 2009.

Desai J.D et Banat I.M. (1997). Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS. Vol. 61, No. 1, p. 47-64.

Dhina, O., and Aroun, M.C. (2004) - Environmental preservation in oil and gas stream activities in Algeria. Difficulties and Sustainable Development Challenge. 19th World Energy Congress, Sydney, Australia September 5-9, 2004.

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

E

Edwards, D.A., Luthy, R.G., Liu Z. 1991. Solubilisation of polycyclic aromatic hydrocarbon in micellar nonionic surfactant solution, Environ.Sci. Technol, 25(1), 127- 133.

ENSP, 2008, les boues de forage, formation.

F

Fakruddi, Md .2012. Biosurfactant : Production and Application. Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology, 3 :124,5 p.

Faragallah, H., Askar, A., Okbah, M., Moustafa, H. 2009. Physico-chemical characteristics of the open Mediterranean sea water far about 60 Km from Damietta harbor, Egypt. Journal of Ecology and the Natural Environment, 1(5), 106-119

Fukase, K., Kato, M., Kikuchi, S., et al for the Japan Gast Study Goup, (2008): Effect of Helicobacter pylori on incidence of metachronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer: an open-label, randomized controlled trial, Lancet. 372:392-397.

G

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

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

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

GUERGOURI I. (2010) Caractérisation des bactéries isolées de sol contaminées par les hydrocarbures (zone de Skikda) et productrices des biosurfactants. Thèse de magistère de l'Université Mentouri Constantine. Spécialité : Microbiologie.90p.

H

Haigh S.D. (1996). A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil, The Science of the Total Environment, 185, 161-170.

Healy M.G., Devine C.M. et Murphy R., (1996). Microbial production of biosurfactants. Resources, conservation and Recycling ,18 :41-57.

HEINRICH D., et HERGT M. (1993). Atlas de l'écologie. Le livre de poche, encyclopédies d'aujourd'hui. Edition Eyrolles.

Holden A. ;Firestone M.K.,1997:Soil microorganisms in soil clean-up :How can we improve our understanding. Journal of Environmental Quality. Vol.26. N°1. pp :32-40.

J

Joffin et Leyral (2014)Joffin JN and Leyral G, (2014). Microbiologie technique : Dictionnaire des techniques. Scérén, France.

Johnson J. L., Phelps C. F., Cummins C. S., London J et Gasser F., 1980. Taxonomy of Lactobacillus acidophilus group, International Journal of Systematic Bacteriology, 30: pp. 53-68.

Johnson J. L., Phelps C. F., Cummins C. S., London J et Gasser F., 1980. Taxonomy of Lactobacillus acidophilus group, International Journal of Systematic Bacteriology, 30: pp. 53-68.

Joner E.,J. . Leyval C., 2003: phytoremediation of organic pollutants using mycorrhizal plantsma new aspect rhizosphere interactions. Agronomie. Vol.23. pp : 495-502.

K

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

Khoja .M « Etude des performances et Considérations environnementales». Université Louis Pasteur Strasbourg – France, 2008,p 02.

Koller E .,2004: traitement des pollutions industrielles. Eau. Air. Déchets. Sols. Boues.Edt Dunod, Paris.Série Environnement et sécurité. L'usine nouvelle. 424p

Koumba k. 2010. Fréquence d'isolement des Klebsiella au laboratoire de bactériologie CVD du CHU Gabriel tour de 2002 à 2007.these de pharmacie université de Bamako, Mali, p53.

L

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

Lí'gia Rodrigues, Ibrahim M. Banat, Jose' Teixeira and Rosa'rio Oliveira. 2006. Biosurfactants: potential applications in medicine, Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2006) 57, 609–618.

Lin S.C. Carswell K.S. ; Sharma M.M., 1994 :Continuous production of the lipopeptide biosurfactants of *Bacillus Licheniformis* JF-2. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol.41. pp : 281-285.

Liu, J., Jiang, X., Zhou, L., Han, X., & Cui, Z. (2009). Pyrolysis treatment of oil sludge and model-free kinetics analysis. *Journal of hazardous materials*, 161(2), 1208-1215.

Lovaglio R. B., dos-santos F. J., Junior M. J., Contiero J. (2011). Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85 : 301–305.

M

M. KARDACHE & A .LOUNIS, Stockage des hydrocarbures, 1 ère Partie, Département Mécanique Pétrolière et Transport des HC, Ecole d'Arzew, IAP, février 2015. KARA , PFE Master TDH-DpT G.Transports, Université constantine1, 2016. hydrocarbures, 1 ère Partie, Département Mécanique Pétrolière et Transport des HC, Ecole d'Arzew, IAP, février 2015. Université constantine1, 2016-2017.

Maier R.M., (2003). Biosurfactant: evolution and diversity in bacteria. *Adv Appl Microbiol*. 52:101–121

Makkar R.S et Cameotra S.S. (1997). Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 18, 37– 42.

Makkar R.S. Et Cameotra S.S. (2002). An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 428-434.

Marchal N., Bourdon J.L., Richard C., 1982. Milieux et techniques réservés à l'étude de certains genres bactériens. In: *Les Milieux de Culture pour l'Isolément et l'Identification Biochimique des Bactéries*, pp. 235, 248, 273-283. Doin, Paris, France.

Marchal N., Bourdon J.L., Richard C., 1982. Milieux et techniques réservés à l'étude de certains genres bactériens. In: *Les Milieux de Culture pour l'Isolément et l'Identification Biochimique des Bactéries*, pp. 235, 248, 273-283. Doin, Paris, France.

Marchant, R., Banat, I.M. 2012. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends in Biotechnology*, 30(11), 558-565.

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

Markets and Markets, 2016. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biosurfactantsmarket-493.html>. Accessed March 8, 2018.

Mohan, P.K., Nakhla, G., Yanful, E.K. 2006. Biodegradability of surfactants under aerobic, anoxic, and anaerobic conditions. *Journal of Environmental Engineering*, 132(2), 279-283.

Mougin C. ;Chaplain V. ;GaillardonP.,1996: le traitement biologique des sols pollués par des composés organiques. Intérêts des champignons filamenteux. Le courrier de l'environnement n° 28, Aout 1996.

Mrayyan, B., & Battikhi, M. N. (2005). Biodegradation of total organic carbons (TOC) in Jordanian petroleum sludge. *Journal of hazardous materials*, 120(1), 127-134.

Mulligan C.N., Sharma S.K et Mudhoo A. (2014). Biosurfactants research trends and applications. International standard book number: 13:978-1-4665-1724-4-7.

Mulligan C.N., Young R.N. et GIBBS B.F. (2001). Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review, *Engineering Geology*, 60, 371-380.

N

Narayanasamy P, (2013). Biological management of diseases of crops: volume 1: characteristics of biological control agents. Springer Dordrecht Heidelberg New York London. India.

Nicolas ALSAC, Dosage des métaux lourds (As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn et Hg) dans les sols par ICP-MS. 5p, 2007.

Norini M.P., 2007 :Ecodynamique des hydrocarbures aromatiques polycycliques et des communautés microbiennes dans les sols à pollution mixte (HAP, métaux) avant et après traitement par biopile et par désorption thermique. Thèse de Doctorat, université Henri Poincaré, Nancy I.Pp :75-90.

P

Pacwa–Plociniczak, M., Plaza, G.A., Piotrowska–Seget, Z., Cameotra, S.S. 2011. Environmental applications of biosurfactants : Recent advances. *Int. J. Mol. Sci*, 13, 633–654.

Padmapriya, B., Suganthi, S., Anishya, R. 2013. Screening, optimization and production of biosurfactants by *Candida* species isolated from oil polluted soils. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 13(2), 227-233.

Patel R. M. et Desai A. J. (1997). Surface active properties of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* G3S. *J. Basic Microbiol.*, 37 :281-286.

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

Pereira J.F.B., Gudiña E. J., Costa R., Vitorino R., Teixeira J. A. , Coutinho J.A.P et Rodrigues L.R. (2013). Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel* 111 (2013) 259–268.

Pore J. (1992). Emulsions, micro-émulsions, émulsions multiples, Editions Techniques et Industries des Corps Gras, 270 p.

R

Ramade F., 2007 : Introduction à l'écotoxicologie. Fondements et applications. Ed etTEC et DOC. Lavoisier.618p.

Ramirez P. (2000) Wildlife Mortality Risk in Oil Field Waste Pits U.S. Fish and Wildlife Service Region 6 Contaminants Information Bulletin, p.

Resenberg E. ;Legmann R. ;Kushmaro A. ; Taube R. ; Ron E.Z., 1992: Petroleum bioremediation- A multiphase problem. Biodegradation. Vol.3. pp : 337-350.

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

S

Saharan BS, Sahu RK, Sharma D (2011). A review on biosurfactants: Fermentation, current developments and perspectives. Genetic Engineering and Biotechnology Journal 29: 1-14.

Salihu, A., Abdulkadir, I., Almustapha, M.N. 2009. An investigation for potential development on biosurfactants. Biotechnology and Molecular Biology Reviews, 4(5), 111-117.

Santos, D., Rufino, R., Luna, J., Santos, V., Sarubbo, L. 2016. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. International Journal of Molecular Sciences, 17(3), 401.

Santos, D.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A., Scrubbed, L.A. 2013. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. Journal of Petroleum Science and Engineering, 105, 43–50.

SayadL.,(2008).Qualitéphysicochimiqueetbactériologiedeseauxdel'écosystème lacustreLacdes Oiseaux(wilayadeTaraf).Mémoire de Magister.Université Badji Mokhtar Annaba.Algérie.125p.

Sharpe M.E., Fryer T.F., Smith D.G.,1966. Identification of the lactic acid bacteria. In (Eds) Identification methods for microbiologist's, Partie A. London: Academic Press.

Sharpe M.E., Fryer T.F., Smith D.G.,1966. Identification of the lactic acid bacteria. In (Eds) Identification methods for microbiologist's, Partie A. London: Academic Press.

SLIMANI Chafaa , BRAZANE DJOUAD<< thème : Conformité Réglementaire Sur La Gestion Des Déchets à SONATRACH (Direction Bejaia) ; spécialité : Pathologie des écosystèmes, université Abderrahmane Mira Bejaia, année 2010/2011 >>page 39-40-60

Sobrinho H.B.S., Luna J. M., Rufino R.D., Porto A.L.F and Sarubbo L.A. (2015). Biosurfactants: Classification, Propertiesv and Environmental Applications. Biotechnology Vol. 11: Bioremediation. Biodegradation of Vegetable Waste for Cellulase Production.1-29.

SONATRACH, Document SONATRACH' chapitre 6, FHC 2011, TSI/02, page 55.

Sriram, M.I., Kalishwaralal, K., Deepak, V., Gracrosepat, R., Srisakthi, K., Gurunathan, S. 2011. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), 174- 181.

Stiles ME.et Holzapfel WH., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36: pp 1-29.

Stiles ME.et Holzapfel WH., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36: pp 1-29.

T

Tabatabaee A., M.M. Assadi A.A. Nouhi et V.A. Sajadian (2005). Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil reservoirs. *Iranian J.Env. Health Sci. Eng.* 2: 6-12.

W

Wei Y.H., Chou C.L. et Chang, J.S. (2005). Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, 27 : 146–154.

West C.C et Harwell J.H. (1992). Surfactants and subsurface remediation, *Environ. Sci. Technol.*, 36, (12), 2324-2330.

Y

Yohann Cousquer. Modélisation des échanges nappe-rivière à l'échelle intermédiaire : conceptualisation, calibration, simulation. *Hydrologie*. Thèse en cours de validation, Université Bordeaux Montaigne Bordeaux Institut national Polytechnique, 2017.

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

ANNEXE

ANNAXE

Annexe 1 : liste des appareils, verrerie et réactifs utilisés

Verreries et matériels	équipements	Réactifs et produits
-Eprouvette de 1000 ml	-Microscope photonique Labomed	-Bleue de Méthylène
-Erlenmeyer de 100, 250, 500,1000 ml.	-Balance de précession OHAUS Navigator TM	-Alcool éthylique
-Bécher 100 ml	-Étuve (incubateur) pour bactéries NAHITA	-Violet de gentiane
-Tubes à essai de 20 ml	- Étuve (incubateur) pour chmpignons LABTECH	-Lugol
-Flacon en verre 20 ml	-Bain marie Memmert	-Fuchsine
-Lame / Lamelle	-Agitateur +plaque chauffante	-Huile à immersion
-Pipette Pasteur	Heidolph MR 3001 K	-Gasoil
-Boites de Pétri en verre et en plastique	-Incubateur + Agitateur WiseCube TM DAIHAN Scientific	-Eau distillée
-Anse de platine	-Autoclave Raypa ^R	-Eau physiologique
-Pince	-Vortex Witeg	-Chlorure de sodium (Na Cl)
-Spatule	-pH-mètre OHAUS Starter 2100	-Na OH
-Barreau magnétique	-centrifugeuse HERMLE Z 300 K	-Galerie Api 20E, CH 50
-Para film	-Micropipette (1000 ul)	- Réactif de TDA : perchlorure de fer.
-Papier aluminium	-Bec bunsen	-Réactif de Kovac's.
-coton cardé stérile	-Réfrigérateur Condor	-Réactive de VP1, VP2.
-Tubes à centrifugation		-Huile de paraffine stérile
-papier filtre		-Antibiotique (ATB) Augmentin.
-barreau magnétique		-vert de malachite
-		

Annexe 02 : composition des milieux de cultures et solutions utilisées

- Milieu nutritif liquide :

Produits	Quantité
Glucose	10g
Na Cl (Chlorure de sodium)	9g
Eau distillé (qsp)	1L

- Gélose nutritif (GN)

Produits	Quantité
Glucose	10 g
Agar-agar	15g
Extrait de levure	2g
Eau distillée (qsp)	1 L
pH =07	

- Gélose Sabouraud

Produits	Quantité
Glucose	10 g
Agar-agar	15g
Extrait de levure	2g
Eau distillée (qsp)	1 L
Antibiotique	1g
pH =07	

- Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

Produits	Quantité
Pomme de terre	200g
Eau distillée	700ml
Chauffage puis filtration puis ajoute :	
Glucose	10 g
Agar-agar	15g
Eau distillée (qsp)	1 L

pH =07

• **Milieu liquide nutritif (ML) :**

Produits	Quantité
Glucose	10 g
Extrait de levure	2g
Eau distillée (qsp)	1 L
pH =07	

Annexe 03 : tableau de démembrement des colonies

Echantillon	Nombre des colonies après l'isolement			Nombre des colonies après l'enrichissement		
	Solution mère	Dilution 10 ⁻³	Dilution 10 ⁻⁶	Biote 01	Biote 02	Biote 03
Mouraj	indinembrable	262	0	Pas d'enrichissement		
Sol	indinembrable	123	63			
NB1	indinembrable	10	0	1	2	0
NB2	0	0	0	122	1600	5432
NB3	10	0	0	1	4	0
ABF	2	0	0	2	2	1
PAB	7	0	0	648	641	659
BE	0	0	0	1	0	0

Annexe 04 : Les testes biochimiques.

LA galerie API 20E:

• **Préparation de la galerie :**

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée stérile dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Sortir la galerie de son emballage.
- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation (Debabza, 2014).

- **Préparation de l'inoculum :**

A l'aide d'une pipette Pasteur, prélever quelques colonies de jeunes cultures qui ont été cultivées pendant 24 heures.

- **Ensemencement de la galerie API 20 E:**

- Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles d'air :
- Pour les caractères soulignés ADH, LDC, ODC, H₂S, URE, ensemer le tubule par la suspension et la cupule par l'huile de vaseline stérile.
- Pour les caractères encadrés VP, CIT, Gel, ensemer le tubule et la cupule par la suspension.
- Pour les caractères non encadrés, non soulignés ensemer uniquement le tubule par la suspension.
- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 37°C pendant 18 à 24 heures (BioMérieux SA) (Debabza, 2014).

- **Inoculation de la galerie :**

-Remplir en posant la pipette contre la paroi de la cupule, pour éviter la formation de bulles d'air qui pourraient fausser le résultat.

-Les tubes et cupules sont remplis pour la réalisation des tests CIT, VP et GEL, pour les autres tests seuls les tubes sont remplis.

-Les tests anaérobies ADH, LDC, ODC, H₂S et URE nécessitent l'ajout de l'huile de Paraffine stérile dans leurs cupules afin de créer une aérobiose.

-Refermer la boîte d'incubation et la placer dans l'étuve à 37° C pendant 24 heures.

- **Lecture de la galerie :**

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture
Si trois tests ou plus (test GLU + ou -) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

-**Test TDA** : ajouter une goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

-**Test IND** : ajouter une goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

- **Test VP** : ajouter une goutte de réactif VP1 et VP2. Attendre au minimum 10 minutes.

Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.

Note : le test de la recherche de production d'indole doit être réalisé en dernier, car cette réaction libère des gaz qui risquent d'altérer l'interprétation d'autres tests de la galerie. Ne pas remettre le couvercle d'incubation après l'ajout du réactif.

Si le nombre de tests positifs avant ajout des réactifs (y compris le test GLU) est inférieur à trois :

- Réincuber la galerie 24 heures (plus ou moins 2 heures) de plus sans rajouter les réactifs
Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs (BioMérieux SA) (**Debabza,2014**).

➤ Teste à l'ONPG :

-Déposé un disque imprégné d'ONPG dans une suspension bactérienne qui a été préparée par un prélèvement d'une culture de bactérie sur un milieu Hektoén et mélange avec 5ml d'eau distillée.

-Placer Les tubes dans l'étuve à 37°C.

-Faire la lecture des tubes après **15mn, 30mn, 1h, et24h** d'incubation. Normalement la majorité des réactions positives sont observées entre **15 e t30mn**.

Lecture: (Sayad, 2008)

-Réaction: **ONPG +**: coloration jaune

ONPG - : pas de coloration.

Annexe 05 : Photos des tests de révélation.

➤ Résultat d'oxydase



➤ Résultat teste catalase

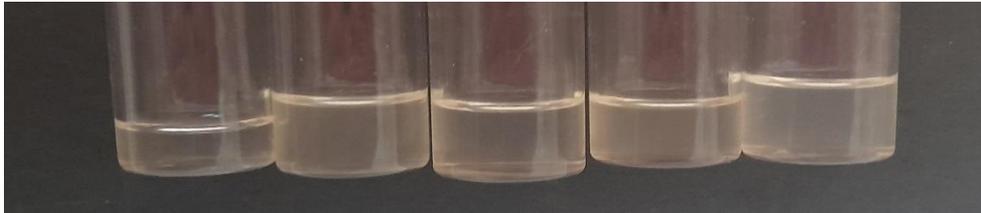


2. Résultat teste ONPG

Après 24 h ,48h, 72h : les résultats sont toujours négative.



➤ Résultat teste ure-ase :



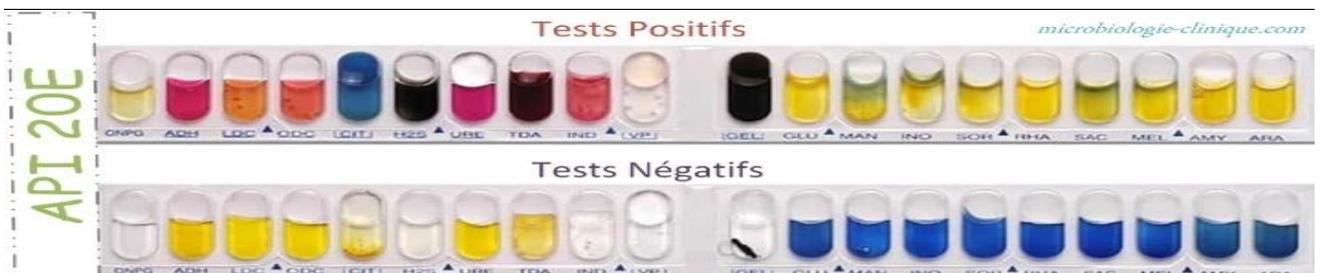
➤ Résultat d'identification biochimique par Galerie Api 20 E :

Avant l'ajoute des reactifs :

Après l'ajoute des reactifs :



Référence de lecture



➤ Résultat d'identification biochimique par Galerie 50CH de souche à Gram - E1b2A :

Résultat de galerie CH50
négative

référence de lecture positive

référence de lecture



Image des réactifs de révélation de galerie Api E20 (VP1, VP2, TDA, Kovacs)

Annexe 06 : Méthodes opératoire d'analyse physico-chimique des échantillons.

A. Paramètre physique :

1. Mesure du pH :

Le pH (potentiel hydrogène) est la mesure de la concentration en ions H^+ de l'eau. Il traduit ainsi la balance entre acide et base sur une échelle de 0 à 14 (Rodier et al. 1996).

1.1 Principe :

La différence de potentiel existant entre une électrode en verre et une électrode de référence (calomel-KCl saturé) plongeant dans une même solution est fonction linéaire du pH de cette solution. La détermination consiste en la mesure d'une différence de potentiel, cette dernière est liée à l'activité des ions H^+ .

1.2 Appareillage :

- Electrode de verre : à l'intérieur se trouve l'électrode de référence formant le relais (calomel-KCl). La partie utile de l'électrode de verre est formée par une ampoule sphérique de 1 cm de diamètre.
- Dispositif potentiométrique : spécialement conçus pour la mesure du pH, alimenté en courant constant.

- Pipette de précision de 50ml de volume.
- Agitateur magnétique.

1.3 Modes opératoire :

a- Cas de l'échantillon d'eau :

On prélève d'une pipette une prise d'essai de 10 ml et l'introduire dans un bécher propre l'électrode de pH-mètre est rincée avec de l'eau distillée, puis on le place sous l'agitateur magnétique, ce dernier est introduit dans l'échantillon, la valeur sera affichée par l'appareil après stabilisation.

a- Cas de l'échantillon de sol :

Mode opératoire :

- Introduire dans un bûcher 5 g de sol, ajuster avec de l'eau distillée jusqu'à 50 ml ;
- Laisser agiter la solution pendant 30 minutes ;
- Rincer abondamment l'électrode avec de l'eau distillée ;
- Placer le bûcher sous agitation magnétique ;
- Introduire l'électrode dans la solution à analysée ;
- Mettre en marche le potentiomètre.

□ □ Préparation du lixiviat :

Selon la norme (**Normes NFX 31 160**), l'extraction est réalisée selon le protocole suivant:

- Introduire 10 g d'échantillon de sol dans un bûcher contenant 100 ml d'eau distillée ;
- Agiter pendant 1 heure et filtrer (à l'aide d'un papier filtre plissé) le filtrat représente le lixiviat à analyser.
- Vu les très fortes concentrations des lixiviats préparés, nous avons effectués des dilutions de

2. Dosage du Fer par complexométrie :

2.1. Principe :

Le fer est dosé sous forme de fer ferrique. Le fer ferreux est oxydé en fer ferrique par l'acide nitrique, selon la réaction suivante : $\text{Fe}^{2+} \longrightarrow \text{Fe} + 2\text{e}^-$.

En présence d'acide sulfosalicylique, les ions ferriques produisent une coloration rouge.

La complexation de ces dernies à l'EDTA induit la disparition de cette couleur.

2.2. Appareillage :

- pH mètre.
- Dosimètre.
- Plaque chauffante.
- Pipette.

2.3 Mode opératoire :

Avec une pipette, on prélève 50 ml d'eau à analyser dans un bûcher, on ajoute 15 gouttes d'acide chlorhydrique ; ensuite on chauffe à ébullition sur une plaque chauffante, 15 gouttes d'acide nitrique sont ajoutées puis la solution est remise à ébullition.

Après refroidissement et à l'aide d'un pH mètre, le pH de la solution est ramené à 2,5 avec une solution d'hydroxyde. On ajoute 5 ml d'acide sulfosalicylique. S'il y a apparition de la coloration rouge on fait un titrage à l'EDTA jusqu'à disparition de cette couleur et on note le volume d'EDTA consommé. La concentration de fer dissous est donnée par la formule suivante :

$$\text{Fe (mg/l)} = x = \frac{V.N_{\text{EDTA}}.55,85.1000}{\text{PE}}$$

V= Volume d'EDTA consommé.

N= Normalité de la solution d'EDTA.

$55,85.10^3$ = Masse atomique de fer en mg.

PE = Prise d'essai de l'eau à analyser

3. Dosage des chlorures par volumétrie (mesure de la salinité) :

3.1. Principe :

Il consiste à doser les ions chlorures combinés à l'état de chlorure d'argent (AgCl) par le nitrate d'argent (AgNO₃) ceci en présence d'un indicateur coloré : le chromate de potassium (K₂CrO₄).

3.2. Appareillage :

- Dosimètre.
- Pipette.
- Agitateur.

3.3 Mode Opérateur :

On prélève une prise d'essai de 20 ml d'eau à analyser dans un Erlen Meyer, à laquelle on ajoute la même prise d'essai d'eau distillée, on vérifie que le pH est compris entre 6 – 8,5, dans le cas contraire le pH est réajusté avec l'acide nitrique ; 5 gouttes (1ml) d'indicateur sont additionnées, une coloration rouge est obtenue après avoir titré avec une solution de AgNO₃.

La concentration est obtenue par la formule suivante :

$$\text{Cl}^- \text{ (mg/l)} = x = \frac{V_{\text{AgNO}_3} . N_{\text{AgNO}_3} . 1000}{2a}$$

V= Volume en ml de Ag NO₃ nécessaire à la titration.

N= Normalité de la solution de AgNO₃.

$35,457.10^3$ = Masse atomique du chlore en mg.

PE= Prise d'essai de l'eau à analyser en ml.

3.4 Mesure de la salinité :

La salinité est la teneur de sel dissous dans l'eau (Rodier, 1996). Elle est mesurée par un salinomètre à électrode (méthode électrochimique). On peut l'exprimer aussi à partir de la chlorinité (Rodier, 1996).

$$S\% = 0.030 + 1.8050 \text{ Cl}\%.$$

4. Mesure de la concentration du Plomb, Zinc et le Silicium par absorption atomique :

La densité optique des solutions étalons des concentrations connus C1 C2 C3 C4 et C5 ainsi que de la solution témoin contenant l'élément considéré est mesurée à l'aide d'un spectromètre atomique (Perkin Elmer, Modèle 1100B). La détermination de la concentration de l'élément à doser est facilitée par l'utilisation d'une courbe étalon donnant la densité optique de l'élément à doser en fonction de la concentration de l'élément à doser.

4.1.Principe :

Les spectres d'adsorption atomique d'un élément sont observés en faisant passer un faisceau lumineux d'une source à spectre continu à travers une couche nuageuse renfermant des atomes libre de cet élément. Les atomes passent à l'état excité en absorbant des photons dont l'énergie est égale à la différence entre les niveaux énergétiques. La méthode d'absorption atomique est basée sur la loi de Beer-Lambert.

$$\text{Log } I_0/I = K.L.C = \text{DO.}$$

DO = Densité optique.

K = Coefficient d'absorption molaire.

L = Longueur du trajet optique.

C = Concentration de l'élément à doser dans la solution.

I = Intensité de la radiation après la traversée de la flamme.

I₀ = Intensité de la incidente.

4.2.Mode opératoire :

On prélève 100 ml d'eau distillée acidifiée par 10 ml d'acide nitrique et on porte à ébullition. Après refroidissement, le volume est ramené à 100 ml.

Des dilutions nécessaires sont effectuées. On ajoute une quantité de nitrate de strontium pour que sa concentration soit 0,5% dans la dilution qui sera utilisée.

5. Dosage des hydrocarbures totaux par infrarouge (IR)

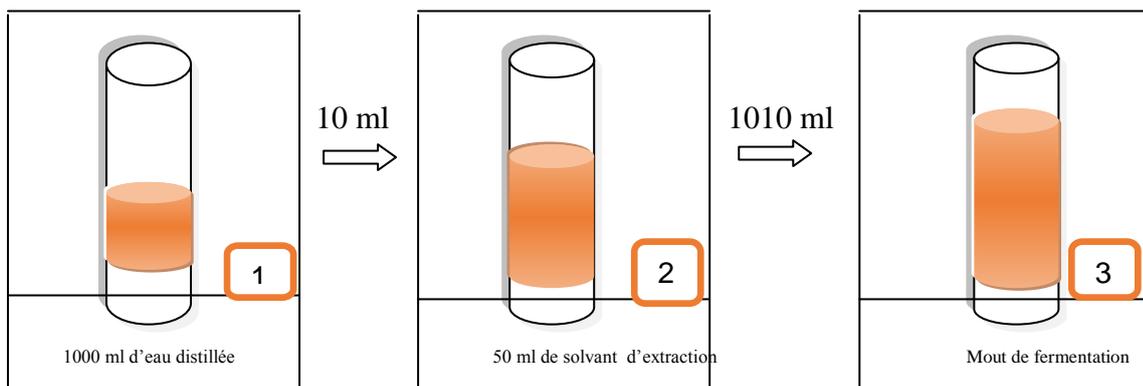
La spectroscopie infrarouge est un moyen de diagnostic permettant de déterminer la nature des liaisons chimiques présentes dans une molécule. Elle est basée sur l'interaction de la lumière IR avec le nuage électronique des liaisons chimiques. C'est un très puissant moyen de caractérisation pour identifier des groupements moléculaires et obtenir de nombreuses informations microscopiques sur leur conformation et leurs éventuelles interactions. Le principe de cette méthode se base sur l'étude des interactions avec les molécules, dans les mouvements de vibration des atomes et de rotations des molécules sous un nombre d'onde compris entre [0,12nm⁻¹ et 0,09μm⁻¹]. Les longueurs d'onde (ou les fréquences) infrarouges absorbées par l'extrait étudié permettent de mesurer quantitativement cette absorption. Les résultats sont donnés sous forme de graphe du pourcentage de la transmittance ou l'absorbance en fonction de la longueur d'onde.

Les hydrocarbures totaux sont constitués par des produits hydrocarbonés extractibles par le solvant organique CCl₄ en milieu acide, l'extrait est séché par le NaCl puis filtré par florisisl

afin d'éliminer toute substance organique autre que les hydrocarbures. La concentration en hydrocarbures est déterminée par la mesure de l'adsorption dans l'infrarouge (IR) à une longueur d'onde comprise entre 2900 et 3100 cm^{-1} (AFNOR T 90 – 114).

5.1 Protocole

On additionne 10 ml d'eau ou 10 g de sol à 1000 ml d'eau distillée, on agite durant 60mn. Par la suite, on additionne le mélange à 50 ml de solvant d'extraction suivi d'une agitation de 15 à 20 min. Ensuite, on récupère la phase claire après décantation dans une ampoule à décompte (extraction liquide /liquide). Le décantât est suivi de double filtration la première sur filtre contenant de l'NaCl (pour la rétention d'eau) et la 2^{ème} sur filtre contenant florisol. Les résultats vont s'afficher en mg/l grâce à un spectrophotomètre à infrarouge .



Extraction liquide/ liquide (décantation dans une ampoule à décompter)



Récupération de la phase claire



Filtration sur filtre contenant de florisil



Filtration sur filtre contenant NaCl

Figure n°15 : Protocole des étapes de dosage des hydrocarbures par IR**Annexe 06 : Méthodes analytiques**

Pour procéder à l'analyse des échantillons solides, nous avons opté pour une lixiviation à l'eau distillée, le lixiviat est récupéré après 2h d'agitation et 24h de décantation.

1. Analyse du taux en hydrocarbures totaux (Méthode Gravimétrique)

- Pour l'échantillon liquide, l'extraction liquide/liquide en présence d'un mélange d'acétone et d'hexane a été suivi pour déterminer la concentration des hydrocarbures totaux dans l'eau.

- Pour les échantillons solides, l'analyse s'est déroulée dans un Soxhlet en présence du dichlorométhane.

2. Mesure de la salinité et du pH

Le pH et la salinité ont été mesurés par le biais d'un multi-paramètres portatif.

3. Dosage du Mercure : La référence normative appliquée : ISO 12846 (2012)

4. **Détermination de la teneur en asphaltènes** : par gravimétrie selon la norme **AFNOR NF T 60 115** (% massique).

5. **Détermination de la teneur en paraffines** selon la norme **UOP 46-64** (% massique)

6. **La détermination des métaux lourds** se fait selon la norme **ISO11885**.

7.

Annexe 07 : Images des équipements utilisés



Spectrophotomètre



Centrifugeuse



Incubateur pour champignons



Bain marrie



PH mètre



Incubateur pour bactéries



Aautoclave



Agitateur-Incubateur



Balance



Vortex



Plaque Chauffante