

**République algérienne démocratique et populaire**  
**Ministère de l'enseignement Supérieur et de la recherche scientifique**  
**Université KASDI MERBAH – OUARGLA**  
**Faculté des sciences de la nature et de la vie**  
**Département des sciences biologiques**



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

**Filière : Sciences biologiques**

**Niveau : Master II Microbiologie Appliquée**

**Présente par : - GUERROUT Maroua**

**- BENDOUMA Malika**

**Thème :**

**Essai de traitement des échantillons de  
fluides de forage pétrolier par des  
bactéries hydrocarbonoclastes**

**Soutenant le :21/06/2022**

**Devant le jury:**

M. SIBOUKEUR A. ....MCB.....UKMO..... Président  
M. BOUDERHEM A..... MCB..... UKMO ..... Encadreur  
M.DJARBAOUI A. N. .... MAA ..... UKMO..... Examineur

**Année universitaire : 2021-2022**



## *Remerciements*

Nos remerciements les plus profonds et inexprimables, s'adressent avant tout à ALLAH le tout puissant, de nous avoir accordé la force, la santé et le courage afin de pouvoir accomplir ce modeste travail. Le présent travail a été réalisé au niveau de laboratoire de microbiologie de la faculté de S.N.V. de l'université KASDI MERBEH Ouargla, nous remercions les responsables de cet laboratoire de nous avoir accordé d'y accéder afin de réaliser nos expérimentations.

Nos très profondes reconnaissances et nos sentiments les plus sincères vont à notre Encadreur de mémoire, Madame : BOUDERHEM Amel, docteur au Département des Sciences Biologiques de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'Université KASDI MERBAH-Ouargla, pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant d'encadrer ce travail, de le diriger avec tant de compétence et de gentillesse. Ses conseils et ses orientations éclairées nous ont permis de mener à terme ce travail.

Nous tenons à remercier chaleureusement professeur Mme SIBOUKER A, Maître de conférences A à l'Université KASDI MERBAH- Ouargla, pour l'honneur qu'il nous fait en présidant ce jury.

Nous exprimons notre profonde gratitude au professeur : DJARBAOUI A.N. Maître assistant A à l'Université KASDI MERBAH – Ouargla , pour l'intérêt qu'il a apporté à ce travail , et d'avoir accepté de faire partie de ce jury .

Nous adressons nos vifs remerciements à Mr BEZOUÏ Salim Superintendant SH-DP Hassi Messaoud et Mr ALI ABDELLAOUI , pour nous avoir réalisé l'analyse quantité des hydrocarbures pétroliers.

Nous adressons nos vifs remerciements à M. SOUDANI EL ARBI le responsable de laboratoire d'analyse médicaux d'hôpital TOUGOURT pour nous avoir réalisé nos expérimentations.



## **Dédicace**

*Je dédie ce mémoire*

*Ames chers parents ma mère et mon père  
Pour leurs patiences, leur amour, leur soutien et  
leur encouragement*

*Ames chers frères MOHAMED DIEA EDDINE et  
YAHIA*

*A toute la famille GUERROUT et particulièrement*

*Mes grands père MOHAMMED et BRAHIM*

*Ames grandes mère KHEIRA et ZAKHROUFA.*

*Ames amies et mes camarades*

*A mon binôme, ma chère copine : Malika*

*Atout les professeurs que ce soit du primaire, du  
moyen, du secondaire ou de l'enseignement supérieur.*

*A toute la promotion de Microbiologie 2021/2022*

*-Maroua*



## Dédicace

*J'ai l'honneur de dédier ce travail :*

*A ma maman qui a toujours cru en moi et qui a été présente quand j'en avais besoin, ses encouragements, sa patience, son attention et ses sacrifices juste pour que je consacre tout mon temps rien que pour mon étude, que Dieu la protège.*

*A mon papa qui a su se montrer patient, compréhensif et encourageant*

*A la mémoire de mes grands parents qui auraient été si fiers de moi aujourd'hui, qu'ils reposent en paix.*

*A mon frère Radouane et a petit frère Saddam*

*A ma sœur que la vie m'a donnée, ma fidèle accompagnante dans le moment les plus délicats de ma vie, ma chère copine Cherifa.*

*A mes tantes et mes oncles.*

*A mon binôme, ma chère copine Maroua*

*A toute la Famille : BENDOUMA*

*Aux personnes qui m'ont aidé et encouragé de près et de loin, qui m'ont accompagné durant mon chemin d'étude, mes aimables amis et collègues.*

*A toute la promotion de Microbiologie 2021/2022*

*- Malika*

**Sommaire**

Remerciements	I
Dédicace	II
Dédicace	III
Liste des tableaux	VI
Liste des figures	VII
Liste des Photos	VIII
Liste des abréviations	IX
Introduction	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

**Chapitre I : Synthèse bibliographique**

I. Fluide de forage	5
I.1. Définition de fluide du forage	5
I.2. Classification des fluides de forage	6
I.2.1. Les fluides à base d'eau – WBM (Water based muds)	6
I.2.2. Fluides à base d'huiles – OBM (Oil based muds)	6
I.2.3. Fluides à base d'huiles synthétiques – SBM (Synthetic based muds)	6
I.2.4. Fluides de forage gazeux	7
I.2.5. Cas particulier : Les fluides de forage HTHP	7
I. 3. Propriétés des fluides de forage :	7
II. Hydrocarbures pétroliers	8
II.1. Définition	8
II.2. Classification	8
II.2.1. Hydrocarbures saturés	8
II.2.2. Composés polaires	9
II.2.3. Hydrocarbures aromatiques	9
II.2.4. Asphaltènes	9
II.3. Pollution de l'environnement par les hydrocarbures et leur impact	10
III. Bioremédiation des hydrocarbures	10
III.1. Bactéries hydrocarbonoclastes	11
III.1.1. Caractéristiques des bactéries aptes à biodégrader les hydrocarbures	11
II.1.2. Adaptation des bactéries hydrocarbonoclastes (HCB) aux polluants	12
III.1.3. Modes d'assimilation des hydrocarbures par la cellule bactérienne	12
IV. Biodégradation des hydrocarbures	13
IV.1. Principe	13
IV.2. Types de Type de biodégradation	14
IV.2.1. Biodégradation aérobie	14

## Sommaire

---

IV.2.2. Biodégradation anaérobie	15
V. Bio surfactants	16
V.1. Définition	16
V.2. Biosynthèse et rôle physiologique	16
V.3. Principales méthodes utilisées dans la bioremédiation	17
a) Bioaugmentation	17
b) Biostimulation	18
V.4. Facteurs influençant la biodégradation des hydrocarbures	18

### Chapitre II : Méthodologie

I. Matériel biologique	21
I.1 Méthodes	21
I.1.1. Echantillonnage	21
I.1.2. Isolement des bactéries dégradant le pétrole	22
I.1.2.1. Enrichissement (cultures liquides)	22
I.1.2.2. Isolement sur milieu M solide	22
I.1.2.3. Purification des bactéries	23
I.1.3 Conservation des souches purifiées :	24
I.1.4. Pré identification des souches purifiées :	24
α. Etude de caractères morphologique:	24
β. Analyses biochimiques	24
I.1.5 Bioremédiation	28
I.1.5.1. Essai de traitement des échantillons de fluide de forage	28
I.1.5.2. Bio augmentation	28
I.1.5.3. Préparation de l'inoculum	28
I.1.6. Biostimulation	28
I.1.7. Bioprocédé Test de dégradation	29
I.1.8. Evaluation des hydrocarbures résiduels	29

### Chapitre III : Résultats et Discussion

I.1.1. Caractéristiques des bactéries hydrocarbonoclastes isolées	32
1) Caractéristiques morphologiques :	32
2) Caractéristique biochimique :	34
3) Résultats de test de dégradation	36
Conclusion & perspectives	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Références Bibliographiques	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Annexe :	48
Résumé :	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

**Liste des tableaux**

<b>Tableau N° 1: Types des fluides de forage HTHP (BAKER HUGHES. 2001)</b>	6
<b>Tableau N° 2: Quelque genre bactérien dégradant les hydrocarbures (TARAYRE C .2012).</b>	10
<b>Tableau N° 3 : Quelques biosurfactants et les micro-organismes qui les produisent.</b>	15
<b>Tableau N° 4 : Aspect macroscopique des colonies bactériennes isolées.</b>	30
<b>Tableau N° 5: Aspects microscopiques des souches isolées</b>	31
<b>Tableau N° 6 : Résultats de la présence de enzyme respiratoire (catalase)</b>	33
<b>Tableau N° 7: Résultats des tests biochimiques des souches bactériennes isolées.</b>	33

Liste des figures

<b>Figure N° 1:</b> Cycle du fluide sur le site de forage . ( <b>BRAIKI et SAIDI , 2017</b> )	4
<b>Figure N° 2:</b> Représentation schématique des principales familles d'hydrocarbures et autres composés d'un pétrole avec quelques exemples de molécules.	8
<b>Figure N° 3:</b> communauté microbienne impliquée dans la biodégradation des hydrocarbures pétroliers	12
<b>Figure N° 4:</b> Mécanisme général de dégradation aérobie des hydrocarbures par les microorganismes ( <b>DAS et al, 2011</b> ).	13
<b>Figure N° 5 :</b> Dégradation anaérobie de matière organique ( <b>HONGWAY et al, 2003 et BEGBEG, 2008</b> ) .	14
<b>Figure N° 6:</b> Représentation schématique d'une micelle de biosurfactant ( <b>GABET. 2004</b> ).	15
<b>Figure N° 7:</b> Schéma de réalisation de la culture liquide.	20
<b>Figure N° 8:</b> Schéma d'isolement des bactéries hydrocarbonoclastes.	21
<b>Figure N° 9:</b> Schéma de purification des bactéries hydrocarbonoclastes .	21
<b>Figure N° 10:</b> Préparation d'inoculum bactérienne.	26
<b>Figure N° 11:</b> Stratégie de bio remédiation	27
<b>Figure N° 12:</b> Taux de dégradation dans les échantillons traités	34



Liste des Photos

<b>Photo N° 1:</b> Bourbier de ENAFOR chantier 25 ( <b>site de prélèvement</b> ).	19
<b>Photo N° 2 :</b> Procédure de lecture de l'eau et des sédiments lors de l'utilisation d'un tube à centrifuger en forme de cône ASTM de 100mm.	28
<b>Photo N° 3:</b> Aspects macroscopiques.	31
<b>Photo N° 4:</b> Aspects microscopiques ( <b>GX 100</b> ) .	32
<b>Photo N° 5 :</b> Résultat de test de biodégradation .	36

Liste des abréviations

**HAP** : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.

**HC** : Hydrocarbures.

**HCP** : Hydrocarbures pétroliers.

**OBM** : Fluides à base d'huile.

**WBM** : Fluides à base d'eau.

**SBM** : Fluides à base d'huiles synthétiques.

**pH** : Potentiel d'hydrogène.

**GN** : Gélose nutritive.

**BN** : Bouillon nutritive.

**M** : Milieu minéral.

**VP** : Voges Proskauer.

# **Introduction**

L'essor de l'industrialisation a conduit à une forte pollution des milieux terrestres et aquatiques par divers contaminants. De part son impact sur le fonctionnement du biotope, cette pollution devient un sujet de préoccupation majeure.

Les effets dévastateurs de l'industrie pétrolière et leur impact ont été évalués sur l'environnement. En effet, de nombreux dégâts réels ont été constatés lors des fuites accidentelles du pétrole, des rejets ou des déversements volontaires, pouvant entraîner des catastrophes écologiques irréversibles. Les dommages environnementaux causés par cette pollution touchent les différents compartiments terrestres : l'atmosphère, l'eau et le sol, pouvant avoir un impact soit direct ou indirect sur la santé humaine et sur l'équilibre des écosystèmes (**Gabet, 2004 ; Mendelsohn et al., 2012**).

Les hydrocarbures pétroliers pourraient être distribués dans l'environnement par de nombreux processus tels que la volatilisation, la photo-oxydation, l'oxydation chimique, la sédimentation, l'adsorption, la bioaccumulation et la biotransformation (**Callaghan et al., 2010**).

Les impacts de la pollution par les hydrocarbures sont multiples, la plupart de ces composés hydrocarbonés sont considérés comme immunotoxiques, cancérigènes, mutagènes et classés comme priorité environnementale par l'USEPA (Environmental Protection Agency des États-Unis) (**Widdel et Grundmann, 2010**).

À l'heure actuelle, différentes méthodes de récupération des hydrocarbures ont été développées, des méthodes physiques (comme la combustion contrôlée, l'écumage et l'absorption), des méthodes chimiques (telles que la dispersion et la solidification) et des méthodes biologiques dites de bioremédiation (**Widdel et Grundmann, 2010**).

L'objectif de ce travail est l'essai de traitement des échantillons de fluides de forage pétrolier pollué aux hydrocarbures en utilisant la méthode biologique. La méthode biologique est basée sur le phénomène de la biodégradation par les microorganismes appelés hydrocarbonoclastes.

Une approche est adoptée, concerne l'évaluation de la capacité des bactéries détectées à dégrader les hydrocarbures lorsqu'elles sont intégrées dans l'un des procédés de traitement des fluides de forage pollué " Biodégradation". La réalisation de cette étude se base sur des procédés biologiques impliquant une méthodologie appropriée.

Notre travail est structuré en trois parties dont la première, est une revue bibliographique présentant quelques données générales sur les fluides de forage, en seconde position vient la sélection des bactéries hydrocarbonoclastes, la méthodologie détaillée du travail et la troisième

discute les résultats obtenus de la caractérisation métaboliques des souches isolées. Et enfin une conclusion générale qui reprend les principaux résultats et quelques perspectives.

# **Chapitre I : Synthèse bibliographique**

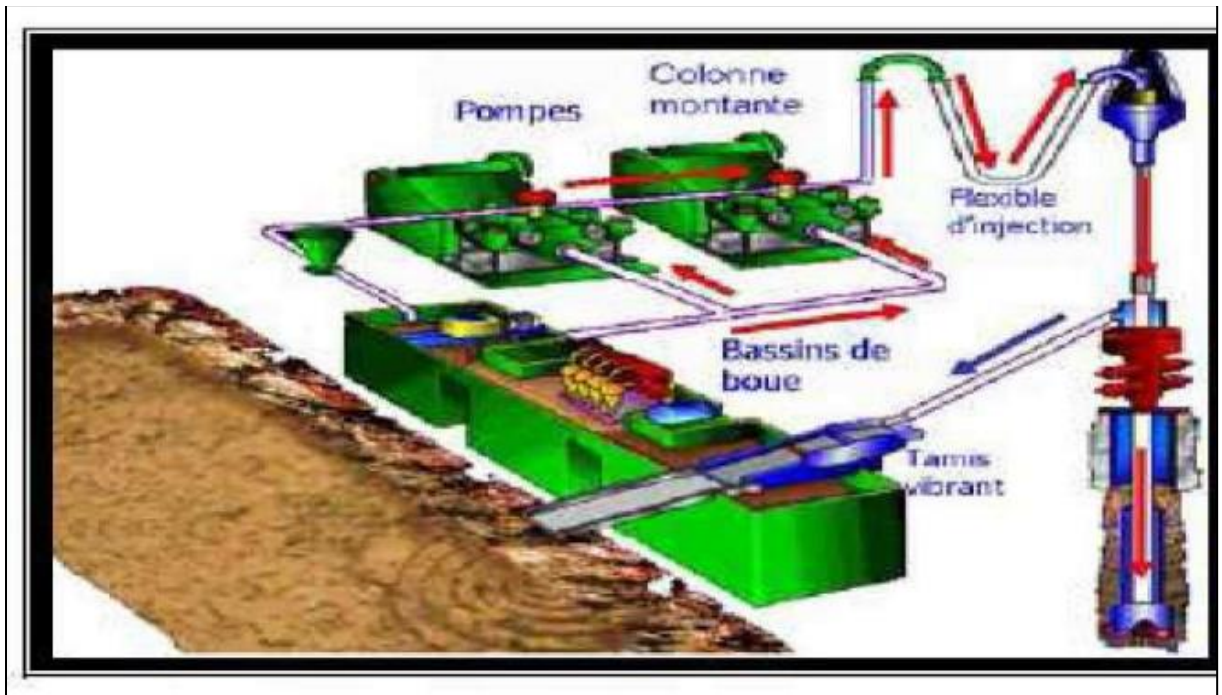
## **I. Fluide de forage**

### **I.1. Définition de fluide du forage**

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

Le fluide de forage était déjà présenté en 1933 lors du premier Congrès Mondial du Pétrole, où il a fait l'objet de cinq communications. Le premier traité sur les fluides de forage a été publié en 1936 par Evans et Red . En 1979, l'American Petroleum Institute (API) définit le fluide de forage comme un fluide en circulation continue durant toute la durée du forage, aussi bien dans le sondage qu'en surface. Le fluide est préparé dans des bacs à boues, il est injecté à l'intérieur des tiges jusqu'à l'outil d'où il remonte dans l'annulaire, chargé des déblais formés au front de taille (Figure 1).

A la sortie du puits, il subit différents traitements, tamisage, dilution, ajout de produits, de façon à éliminer les déblais transportés et à réajuster ses caractéristiques physicochimiques à leurs valeurs initiales. Il est ensuite réutilisé ( **BRAIKI et SAIDI , 2017** ) .



**Figure N° 1:** Cycle du fluide sur le site de forage . ( BRAIKI et SAIDI, 2017)

## **I.2. Classification des fluides de forage**

La composition des fluides de forage est passée d'un simple mélange d'eau et d'argile vers des combinaisons de plusieurs éléments, ayant une formulation adaptée pour chaque forage . Ces combinaisons associent l'eau, les huiles, et une multitude d'additifs avec à chacun une fonction bien précise (viscosifiant, réducteur de filtrat, alourdissant, colmatant, lubrifiant, etc.).

En général, les fluides de forage sont identifiés par les classes suivantes : WBM, OBM, SBM, fluides de forage gazeux, fluides de forage HTHP ( DADA , 2011).

### **I.2.1. Les fluides à base d'eau – WBM (Water based muds)**

Ces fluides sont composés d'un mélange d'eau et d'argile (bentonite), en plus d'autres additifs. Ils sont généralement employés pendant les premières étapes du forage. Exemple d'une formulation de WBM (76% d'eau, 14% de barite (alourdissant), 6% d'argile, 4% d'additifs) ( DADA., 2011).

### **I.2.2. Fluides à base d'huiles – OBM (Oil based muds)**

Ces fluides sont constitués d'une phase continue qui peut être une huile minérale ou organique (gazole), et d'une phase dispersée qui est l'eau.



Si l'eau se trouve avec une concentration de moins de 5%, le système (le fluide de forage) est dit fluide à base d'huile, sinon le système est dit fluide émulsionné inverse.

Les OBM sont utilisés lorsque le forage atteint certaines profondeurs où les WBM n'affichent pas d'excellentes performances. Exemple d'une formulation d'OBM (46% d'huile, 33% de barite, 18% d'eau saumâtre, 2% d'émulsifiant, 1% de gélifiant)( **DADA ., 2011**). .

### **1.2.3. Fluides à base d'huiles synthétiques – SBM (Synthetic based muds)**

A cause de la présence de substances toxiques (tel que les hydrocarbures aromatiques polycycliques "HAP") dans les OBM, et en raison de certaines restrictions visant à garantir la protection de l'environnement, une nouvelle gamme de fluide à base d'huiles synthétiques « SBM » a été conçue.

La formulation des SBM est presque la même que celle des OBM. Ils sont caractérisés par une phase continue composée des matières synthétiques (esters, éthers, paraffines et oléfines) ou d'huiles végétales, en plus d'autres additifs (émulsifiant, mouillant, viscosifiant, etc.).

Les SBM sont largement employés dans les forages, en raison de leur excellente biodégradabilité, et de leur faible toxicité ( **DADA, 2011**).

### **1.2.4. Fluides de forage gazeux**

Ces fluides sont constitués d'une phase continue (air, mousse, boue aérée) mélangée avec de l'eau ( **KHODJA . M. 2008**). Leurs utilisations est indispensable dans le cas où différents problèmes aient lieu pendant le forage, par exemple :

Les fluides à base d'air : Utilisés pour éviter des problèmes de perte de boues lors de leur circulation, ou dans le forage de formations sous pression, ainsi que du fait qu'ils soient légers ( **DADA, 2011**).

Les fluides à base de mousse : Dans le cas où les formations à forées sont fracturées, ou quand le forage à l'air est impossible du fait des faibles pressions développées par ce dernier ( **DADA, 2011**).

### **1.2.5. Cas particulier : Les fluides de forage HTHP**

Cette gamme de fluides est employée lorsque les puits à forées se trouvent dans des profondeurs caractérisées par des conditions extrêmes en pression et en température, d'où l'appellation fluides de forage HTHP. Dans ce contexte si particulier, les gisements

d'hydrocarbures sont localisés dans des formations géologiques identifiées par une pression et une température qui dépassent les 1034 bars et 177°C° (MISWACO . 2001)

Jusqu'à présent, trois gammes de fluides HTHP sont recensées, ils sont représentés dans le tableau suivant en fonction de la température et de la pression du gisement( BAKER HUGHES. 2001):

**Tableau 1**

**Tableau N° 1: Types des fluides de forage HTHP (BAKER HUGHES. 2001)**

<b>Fluides HTHP</b>	<b>Température (°C)</b>	<b>Pression (bars)</b>
<b>HTHP standard</b>	177 – 204	1034 – 1378
<b>Ultra HTHP</b>	204 – 260	1378 – 2068
<b>Extreme HTHP</b>	> 260	> 2068

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

Ses principales caractéristiques sont :

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

## **II. Hydrocarbures pétroliers**

### **I.**

### **II.**

#### **II.1.Définition**

Les hydrocarbures sont des composés organiques contenant exclusivement des atomes de carbones (C) et d'hydrogène (H) . D'après Harayama et *al.*, (1999), le terme « hydrocarbure pétrolier » est un terme générique qui désigne les mélanges de composés organiques présents dans des matières géologiques comme l'huile, le bitume et le charbon ou dérivés de ces matières ( GUERMOUCHE , 2014) .

#### **II.2.Classification**

Les hydrocarbures constituent la fraction la plus importante d'un brut pétrolier, ils représentent entre 65 et 95 % de la plupart des pétroles bruts. Ces hydrocarbures peuvent être classés en quatre familles principales qui sont présentes en proportions variables selon leur origine: les hydrocarbures saturés (30 à 70 %), les hydrocarbures aromatiques et polyaromatiques (20 à 40 %), les composés polaires (5 à 25 %) et les asphaltènes (0 à 10 %) (**Figure 2**). Selon Syakti (2004), les hydrocarbures pétroliers sont classés comme suit (**GUERMOUCHE , 2014**)

### **II.2.1.Hydrocarbures saturés**

Parmi les hydrocarbures saturés on distingue:

#### **a. Alcanes linéaires**

Les alcanes linéaires (n-alcanes,  $C_nH_{2n+2}$ ), dont la longueur de leur chaîne varie de 7 à 40 atomes de carbone constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier) ( **GUERMOUCHE , 2014** ).

#### **b. Alcanes ramifiés**

Les alcanes ramifiés les plus abondants sont les iso-alcanes (groupement méthyle en position 2). Les autres composés ramifiés antéiso (groupement méthyle en position 3) ou polyramifiés tels que les isoprénoïdes (exemple: pristane, phytane) sont beaucoup moins nombreux. Ces composés se trouvent dans le pétrole brut à des proportions sensiblement égales à celles des n-alcanes ( **GUERMOUCHE , 2014** ).

#### **c. Cycloalcanes**

Les cycloalcanes renferment des composés cycliques (à 5 ou 6 atomes de carbone) saturés et le plus souvent substitués. Quelques dérivés polycycliques sont aussi présents et certains d'entre eux tels que les stéranes et les triterpanes sont caractéristiques d'un pétrole brut. Cette famille peut représenter entre 30 et 40 % des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut ( **GUERMOUCHE , 2014** ).

### **II.2.2.Composés polaires**

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

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

Les dérivés soufrés sont dans la plupart des cas plus abondants que les composés oxygénés ou azotés ( **GUERMOUCHE , 2014** ).

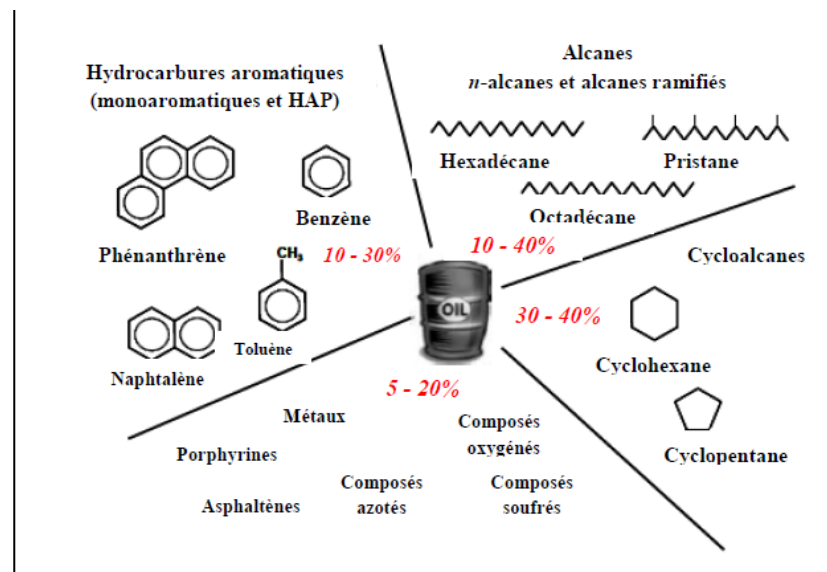
### **II.2.3.Hydrocarbures aromatiques**

Plusieurs familles d'hydrocarbures aromatiques et poly aromatiques dont le nombre de

noyaux varie de 2 à 6 sont présentes dans les pétroles bruts. Ces composés sont dominés par des composés mono-, di- et tri-aromatiques. En général, les hydrocarbures aromatiques sont moins abondants que les alcanes, et ne représentent que 10 à 30 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier (BOUDERHEM , 2011) .

#### II.2.4.Asphaltènes

Les asphaltènes regroupent dans une classe des composés de hauts poids moléculaires, insolubles dans le pentane ou l'hexane. Leur structure est mal connue à cause de leur composition chimique complexe ( AZROUG et HARRA, 2019) .



**Figure N° 2:**Représentation schématique de la structure moléculaire des principales familles d'hydrocarbures et autres composés d'un pétrole avec quelques exemples de molécules.

Modifié d'après Syakti (2004) ( GUERMOUAH , 2014).

#### II.3.Pollution de l'environnement par les hydrocarbures et leur impact

La notion de la pollution est toute relative. On peut considérer qu'il y a pollution par les hydrocarbures lorsque l'action de ceux-ci peut être considérée comme néfaste aux conditions de vie de l'homme directement, ou indirectement, si elle affecte les populations animales et végétales qui lui sont utiles( AZROUG et HARRAT. 2019).

La pollution est une modification défavorable du milieu naturel (dégradation, altération) qui apparaît en totalité ou en partie comme le sous-produit de l'action humaine ( AZROUG. et HARRAT. 2019).

Les hydrocarbures sont des contaminants environnementaux omniprésents. Ils constituent une classe des produits chimiques organiques dangereux dont certains de leurs effets toxiques sont reconnus comme fortement cancérigènes, génotoxiques, immunotoxique, mutagénique ou

tératogénique. Ils représentent une menace pour la santé publique ( **ERIKSSON et al. 2003** ).

### **III. Bioremédiation des hydrocarbures**

Les produits pétroliers et leurs dérivés constituent les principaux polluants organiques des sols et des eaux souterraines. Cependant, les polluants déversés dans un environnement subissent une série de transformations physiques, chimiques et microbiologiques aboutissant à plus ou moins long terme à leur disparition totale ou partielle (**SOLANO-SEREN, 2001, GROSSI et al., 2008**).

À l'heure actuelle, différentes méthodes de récupération des hydrocarbures ont été développées, des méthodes physiques (comme la combustion contrôlée, l'écumage et l'absorption), des méthodes chimiques (telles que la dispersion et la solidification) et des méthodes biologiques dites de bioremédiation (**WIDDEL et GRUNDMANN, 2010**).

Généralement, les traitements physiques et chimiques devraient être pris comme mesures d'urgence afin de contrôler rapidement la diffusion et la dérive du pétrole. Ces méthodes ne sont pas adaptées à la restauration écologique (**CALLAGHAN et al., 2006 ; WIDDEL et RABUS, 2011**).

A l'opposé, la bioremédiation est considérée comme l'une des plus importantes des technologies respectueuses de l'environnement et rentables pour l'écologie. Elle conduit à une décomposition des polluants en donnant des substances moins toxiques (**SO et al., 2003**). Ce procédé est basé sur l'utilisation d'organismes vivants pour faciliter l'élimination des substances toxiques des environnements pollués (**SAURET, 2011**).

L'organisme vivant utilisé peut être un microorganisme (bactérie, champignon) ou un macroorganisme (algue, plante, arbre). Ces organismes agissent sur le composé polluant par absorption, accumulation, digestion, transformation, dégradation, évapotranspiration... etc (**WIDDEL et RABUS, 2011**).

#### **III.1. Bactéries hydrocarbonoclastes**

Les microorganismes jouent un rôle important dans la biodégradation des polluants organiques dans les écosystèmes terrestres. Cette dégradation résulte de voies métaboliques qui mettent en jeu des populations microbiennes spécifiques ou des capacités métaboliques combinées concernant différentes communautés microbiennes.

On peut y retrouver tous les types de bactéries, des autotrophes, des hétérotrophes, des aérobies ; des anaérobies ; des mésophiles ; des psychrophiles et des thermophiles. De nombreux genres bactériens ont été recensés et décrits comme aptes à dégrader des hydrocarbures. De nombreuses études ont montré qu'elles étaient ubiquistes et présentes en faible quantité même dans les environnements dépourvus de contamination. Naturellement,

leurs effectifs sont accrus dans les zones chroniquement polluées par les hydrocarbures et augmentent après un apport de pétrole. Mais chacun de ces genres bactériens n'est capable de dégrader qu'un nombre restreint d'hydrocarbures alors que le pétrole est composé de centaines voire de milliers de molécules différentes ( SAURET. C. 2011).

Les bactéries hydrocarbonoclastes utilisent les hydrocarbures pétroliers comme seule source de carbone. La plupart de ces bactéries appartiennent aux  $\alpha$ -protéobactéries ( BRINCE. 2005).

**Tableau N° 2:** Quelque genre bactérien dégradant les hydrocarbures  
(TARAYRE C .2012).

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

### III.1.1. Caractéristiques des bactéries aptes à biodégrader les hydrocarbures

Selon PELMONT, (1995), les bactéries dégradant les polluants pétroliers sont caractérisées par les capacités suivantes :

- Apte à se reproduire rapidement suite à un entreposage (c'est l'action d'entreposer dans un entrepôt des produits pétroliers recommandés afin de réduire les risques de contamination des sols, des eaux de surface et des eaux souterraines) de longue durée
- Génétiquement stable
- Apte à biodégrader une vaste étendue de polluants pétroliers
- Activité enzymatique et croissance des bactéries dans des conditions environnementales optimales
- Aucun effet secondaire néfaste et produits finaux non toxiques
- La majorité des souches bâtonnets à Gram négatif
- 32% des bactéries motiles ou mobiles
- 20% des bactéries à Gram positif, filamenteux.

### II.1.2. Adaptation des bactéries hydrocarbonoclastes (HCB) aux polluants

L'adaptation de certaines communautés bactériennes aux hydrocarbures s'explique par trois mécanismes majeurs :

- Le pétrole stimule la prolifération des hydrocarbonoclastes (les milieux pollués chroniquement sont plus riches en hydrocarbonoclastes. En cas d'apport soudain de pétrole, l'abondance relative de ces HCB permet d'assurer la mise en place rapide d'un consortium de dégradation ( **AZROUG et HARRAT. 2019**).
- Les bactéries sont capables de transférer les gènes de catabolisme des hydrocarbures par conjugaison, la probabilité pour que ce type d'échange survienne dans un environnement chroniquement pollué est plus grande ( **AZROUG et HARRAT 2019**).
- Enfin, dans les zones polluées, des mécanismes d'induction des enzymes d'intérêt ont été retrouvés en présence de pétrole ( **SUZUKI et al. 2001, PRIEFERT et al. 2004**).

### III.1.3. Modes d'assimilation des hydrocarbures par la cellule bactérienne

Il y a quatre modes d'assimilation bactérienne de l'hydrocarbure liquide, soit :

- Par l'utilisation de composés organiques préalablement solubilisés,
- Par contact direct de la cellule avec le composé organique. Cela peut être facilité par des modifications cellulaires telles que la formation de fimbriae ou l'augmentation de l'hydrophobicité de la surface cellulaire qui favorise l'attachement de la cellule au composé organique ( **BOUDOUNE et BOUALEM. 2018**).
- Par contact direct avec les microgouttelettes dispersées dans la phase aqueuse
- Une assimilation améliorée via la synthèse des biosurfactants, qui augmentent la solubilité des hydrocarbures dans l'eau, ou peuvent encore faciliter l'attachement des cellules aux hydrocarbures ( **MAIER et al. 2009**).

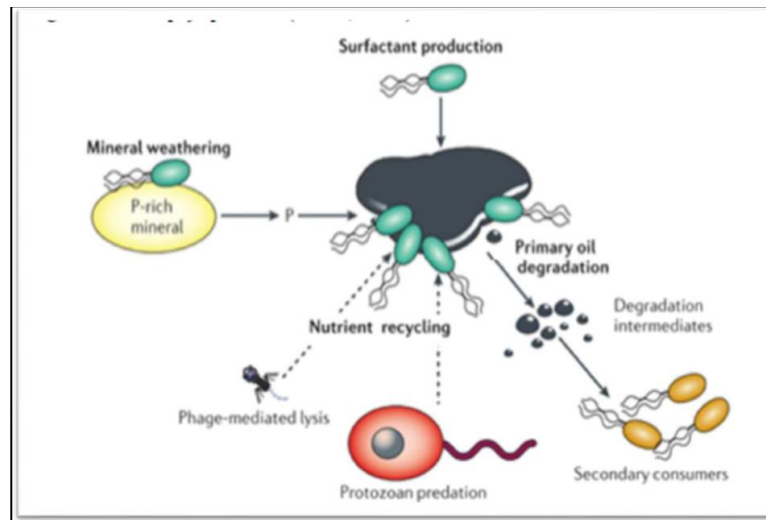
Dans ce cas l'intervention de biosurfactants produits par les microorganismes accélère le transfert des hydrocarbures en augmentant l'aire interfaciale entre les phases hydrophobe et hydrophile. On parle de transfert interfacial assisté. L'action des biosurfactants est souvent complexe. Ils participent à la pseudo-solubilisation des alcanes nécessaires à la croissance tout en restant associés aux cellules bactériennes pendant la croissance ( **BOUDERHEM. 2011**).

## IV. Biodégradation des hydrocarbures

### IV.1. Principe

La biodégradation est l'ensemble des mécanismes de transformation d'un contaminant en différents sous-produits, par l'action des micro-organismes (bactéries et microbes.....)(Figure 3)

( AZROUG et HARRAT, 2019) .



**Figure N° 3:** communauté microbienne impliquée dans la biodégradation des hydrocarbures pétroliers

Ce processus est destructif, ce qui est particulièrement intéressant pour l'atténuation naturelle à condition que les produits néoformés (métabolites) aient une toxicité moindre. Il en résulte généralement une diminution de la concentration de polluant initial. En revanche, selon les cas, les métabolites peuvent aboutir à un ralentissement ou à une accélération de la vitesse de propagation et un étalement ou à un resserrement du front de migration ( JUHASZ et NAIDU, 2000) .

## IV.2. Types de Type de biodégradation

### IV.2.1. Biodégradation aérobie

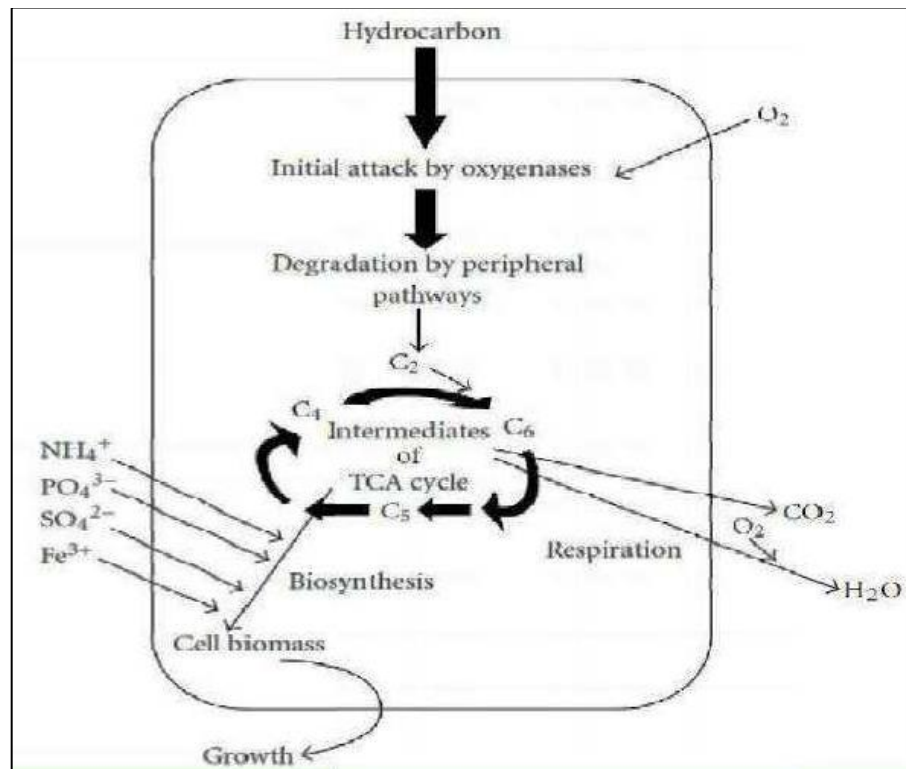
DAS et *al* , (2011) ont proposé un schéma général (Figure 4) de la dégradation des hydrocarbures par les microorganismes en condition aérobie, condition prépondérante en milieu pélagique. L'attaque initiale intracellulaire est un processus oxydatif et l'activation ainsi que l'incorporation d'oxygène est la clé de la réaction enzymatique catalysée par les oxygénases et les peroxydases. Les voies périphériques de dégradation convertissent les hydrocarbures étape par étape en intermédiaires du catabolisme, à l'aide par exemple du cycle des acides tricarboxyliques (T CA ou cycle de Krebs). La biosynthèse de molécules pour la biomasse de la cellule se fait à partir de métabolites précurseurs comme l'acétyl-CoA, le succinate ou le pyruvate ( DAS et *al*, 2011).

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

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



Activité microbienne ( DAS *et al*, 2011).

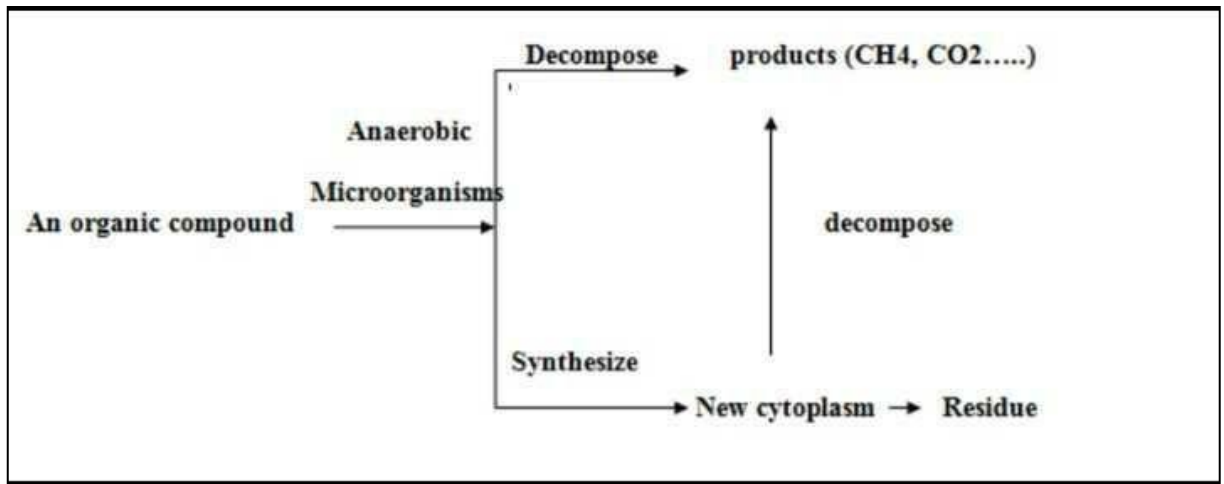


**Figure N° 4:** Mécanisme général de dégradation aérobie des hydrocarbures par les microorganismes ( DAS *et al*, 2011).

#### IV.2.2. Biodégradation anaérobie

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

L'activité métabolique des microorganismes produit des substances organiques simples non complètement oxydées telles que des acides organiques et d'autres composés comme le méthane et l'hydrogène gazeux ( ALEKSANDRA, 2010) . Le schéma suivant (Figure 5) illustre parfaitement les processus anaérobies que subi la matière organique ( HONGWAY *et al* , 2003 et BEGBEG, 2008).

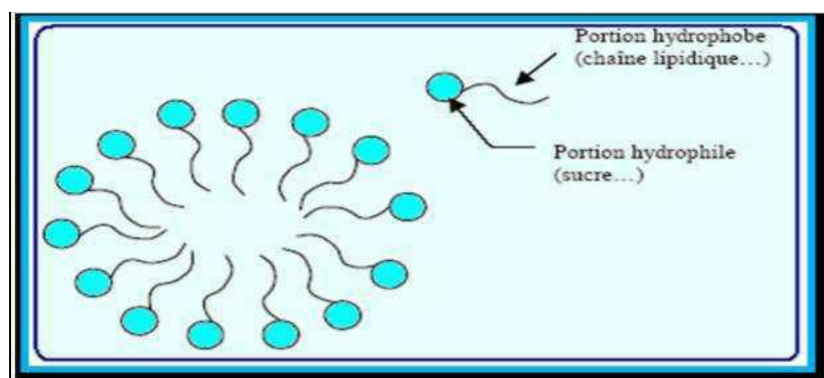


**Figure N° 5 :** Dégradation anaérobie de matière organique ( **HONGWAY et al, 2003** et **BEGBEG, 2008** ).

## V. Bio surfactants

### V.1. Définition

Les surfactants ( SURFase ACTIVE Age NTS) sont des agents à activité de surface (tensioactifs), synthétisés chimiquement ou par voie biologique (biosurfactants). Ces molécules de haute énergie se répartissent à l'interface entre liquides non miscibles réduisant ainsi l'énergie libre du système et formant des microémulsions des solutions aqueuses ou des mélanges d'hydrocarbures. Les biosurfactants sont des composés amphiphiles, c'est-à-dire qu'ils contiennent à la fois une partie hydrophile (tête) et une partie hydrophobe (queue) . Ils ont pour propriété de diminuer la tension interfaciale en s'adsorbant à l'interface entre deux composés immiscibles, solide-liquide, liquide-liquide ou gaz-liquide immiscibles ( **LAHA et al. 2009**. **LUNA et al. 2013**. **VOLKERING et al . 1997**).



**Figure N° 6:** Représentation schématique d'une micelle de biosurfactant ( **GABET. 2004**).

### V.2. Biosynthèse et rôle physiologique

La production de bio-surfactants est un phénomène communément observé lors de la croissance d'un microorganisme sur des substrats insolubles dans l'eau et la réduction de la tension superficielle du milieu ainsi que la formation d'une émulsion stable indiquent une production efficiente ( **PRUTHI et CAMEOTRA. 1995**). Selon Adamson (1990), la présence de surfactant est nécessaire pour obtenir une émulsion stable entre deux liquides purs non miscibles ( **KREPSKY et al . 2007**). En effet, ces bactéries synthétisent les biosurfactants (Tableau3) qui sont soit des molécules intracellulaires, extracellulaires ou localisées à la surface de la cellule ( **PRABHU et al . 2003**)pour faciliter la diffusion des hydrocarbures ou leurs dérivés à l'intérieur de la cellule bactérienne à fin de les dégrader ( **AL-ARAJIL et al . 2007** ). Cependant, les biosurfactants peuvent avoir d'autres rôles aussi importants que l'émulsification, par exemple : l'adhésion aux surfaces solides et la formation de biofilms (Alasan d'Acinetobacter), la régulation du niveau énergétique cellulaire (sophorose de T.bombicola), l'activité bactéricide (gramicidine, polymexine, surfactine), la pathogénicité de certaines bactéries (rhamnolipides de *Pseudomonas*), ainsi que le piégeage des métaux lourds ( **VANDECASTEELE J. P., 2008** ).

**Tableau N° 3 :** Quelques biosurfactants et les micro-organismes qui les produisent.

<input type="checkbox"/>	Biosurfactants	<input type="checkbox"/>	Micro-organismes
<input type="checkbox"/>	Sophorolipides	<input type="checkbox"/>	<i>Toru/opsis bombicola</i>
<input type="checkbox"/>	Trehalose mycolates	<input type="checkbox"/>	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
<input type="checkbox"/>	Rhamnolipides	<input type="checkbox"/>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<input type="checkbox"/>	Rubiwettines	<input type="checkbox"/>	<i>Serratia rubidaea</i>
<input type="checkbox"/>	Glycolipides	<input type="checkbox"/>	<i>Torulopsis apicola</i>
<input type="checkbox"/>	Glycolipides	<input type="checkbox"/>	<i>Rhodococcus aurantiacus</i>
<input type="checkbox"/>	Mannosyléthrithol lipides	<input type="checkbox"/>	<i>Candida antartica</i>
<input type="checkbox"/>	Surfactine	<input type="checkbox"/>	<i>Bacillus subtilis</i>
<input type="checkbox"/>	Viscosine	<input type="checkbox"/>	<i>Pseudomonas nuorescens</i>
<input type="checkbox"/>	Lipopeptides	<input type="checkbox"/>	<i>Bacillus licheniformis</i>
<input type="checkbox"/>	Serrawettine	<input type="checkbox"/>	<i>Serratia marcescens</i>
<input type="checkbox"/>	Acides gras	<input type="checkbox"/>	<i>Corynebacterium lepus</i>
<input type="checkbox"/>	Phosphatidyléthanolamine	<input type="checkbox"/>	<i>Rhodococcus erythropolis</i>

### V.3. Principales méthodes utilisées dans la bioremédiation

#### a) Bioaugmentation

Cette technique consiste à introduire des cultures de microorganismes dans la zone polluée afin d'augmenter le taux de biodégradation des contaminants. La culture peut comprendre une ou plusieurs espèces de microorganismes capable de dégrader et de décontaminer les sites contenant des hydrocarbures et peuvent être soit autochtones ou bien allochtones( **AZROUG et HARRAT., 2019** ).

**b) Biostimulation**

Cette technique consiste à stimuler l'activité des populations microbiennes indigènes (Présente dans le sol ou dans les eaux souterraines) par apport de nutriments et par ajustement des conditions du milieu (potentiel d'oxydo-réduction, humidité) ( **ABEDELLY. 2007** ) .

**V.4. Facteurs influençant la biodégradation des hydrocarbures**

Il existe plusieurs facteurs influençant sur le taux de biodégradabilité des polluants hydrocarbonés parmi les quels:

**a) Structure et nature du sol**

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

**b) Composition chimique des hydrocarbures**

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

**c) Humidité**

L'humidité est un paramètre important dans les processus de dégradation des composés organiques simples ou complexes. Des teneurs trop élevées vont influencer sur la perméabilité des sols aux gaz et générer des conditions de limitations de transfert d'oxygène et donc de limitation de métabolisme microbien aérobie ( **BALLERINI. 1999**).

**d) Température**

Tous les micro-organismes ont une température optimale de croissance caractéristique à laquelle ils ont leur plus fort taux de reproduction et de croissance. Ils ont aussi des températures minimales de croissance en-dessous desquelles ils sont métaboliquement inactifs et ne croissent pas, ainsi que des limites supérieures de température au-delà desquelles ils ne réussissent pas à croître. La température optimale de croissance et la gamme des températures qu'un micro-organisme peut tolérer déterminent la survie d'un micro-organisme et le rôle qu'il va jouer dans un écosystème donné ( **BOUDOUNE et BOUALEM ,2018**).

**e) Salinité**

La salinité exerce un effet osmotique (qui dépend de la variation d'amplitude de la concentration en sel imposée à la salinité de l'habitat des microorganismes) sur les micro-organismes, qui ont aussi des besoins en sels comme NaCl, KCl et MgCl<sub>2</sub> .Les fortes concentrations ont tendance à dénaturer les protéines, c'est-à-dire à casser la structure tertiaire des protéines qui est essentielle à l'activité enzymatique ( **BOUDOUNE et BOUALEM , 2018**

).

**f) Potentiel d'hydrogène (pH)**

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

**g) Taux d'oxygène**

Le processus biologique aérobie est souhaitable pour la bio remédiation de sol pollué par le diesel ( **BLIEFERT et PERRAUD. 2008**). Ainsi, la respiration aérobie semble être le mécanisme primaire pour la biodégradation des hydrocarbures ( **GREER et al. 2003**). Plusieurs auteurs montrent que la biodégradation anaérobie est plus lente que la biodégradation aérobie ( **BLIEFERT et PERRAUD. 2008**).

**h) Contenu en nutriments**

Les nutriments sont indispensables à l'activité et au développement des micro-organismes. Ce sont des corps simples qui peuvent être assimilés. Sans transformation digestive par les organismes et favoriser la croissance des populations de bactéries. Les plus importants sont l'azote et le phosphore ( **BLIEFERT et PERRAUD. 2008**).

## **Chapitre II : Méthodologie**

## **Chapitre II : Méthodologie**

L'objectif principale de notre étude est de rechercher un moyen biologique efficace, facile et ne présentant aucun danger pour l'environnement, afin de procéder à la bioremédiation des fluides de forage pollués par les hydrocarbures pétroliers.

Les expériences de notre recherche sont réalisées au niveau de laboratoire de microbiologie de la faculté de S.N.V. de l'université KASDI MERBEH Ouargla, laboratoire de hôpital mère et enfant Touggourt et laboratoire SH/DP Centre Industriel Sud Hassi Messaoud.

La réalisation du travail est effectuée en suivant deux grands axes : la recherche des souches bactériennes compétentes dans la dégradation des hydrocarbures et le bio-traitement des échantillons des fluides de forage pétrolier pollués.

### **I. Matériel biologique**

Pour la réalisation de nos expériences, nous avons utilisé d'échantillon de fluide de forage (OBM) prélevé du borbier pollué par des rejets de forage au niveau des champs de HASSI MASSAOUD ENAFOR chantier 25, des prélèvements d'échantillons de fluides de forage est effectué dans un seul site.

#### **I.1 Méthodes**

##### **I.1.1. Echantillonnage**

L'échantillonnage est effectué à l'entrée, au centre et à la sortie de site. Les prélèvements ont été réalisés à l'aide d'une spatule stérile à une profondeur de 20 cm, une quantité de fluide de forage prélevé est mis dans des flacons en verre stériles. La quantité prélevé est 1,5L à la date de 15 /02/ 2022( photos1).

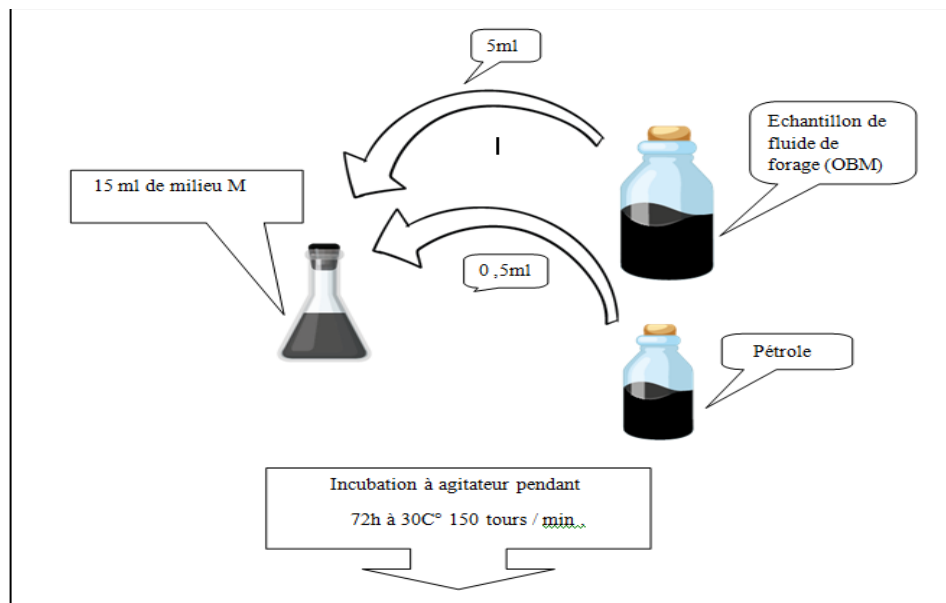


**Photo N° 1:** Boubrier de ENAFOR chantier 25 (site de prélèvement).

## I.1.2. Isolement des bactéries dégradant le pétrole

### I.1.2.1. Enrichissement (cultures liquides)

La réalisation d'une culture à partir d'un échantillon de fluide de forage pollué par les hydrocarbures pétroliers. Elle est préparée en prélevant 5ml de fluide de forage et en ensemençant dans un Erlenmeyer de 50ml contenant 15ml de milieu M (milieu minéral) et 0,5ml de pétrole brut, ces derniers sont incubés à 30°C dans un incubateur agitateur avec agitation de 150tr/min pendant 72heures( Figure N°7). (BOUDERHEM. 2011).



**Figure N° 7:** Schéma de réalisation de la culture liquide.

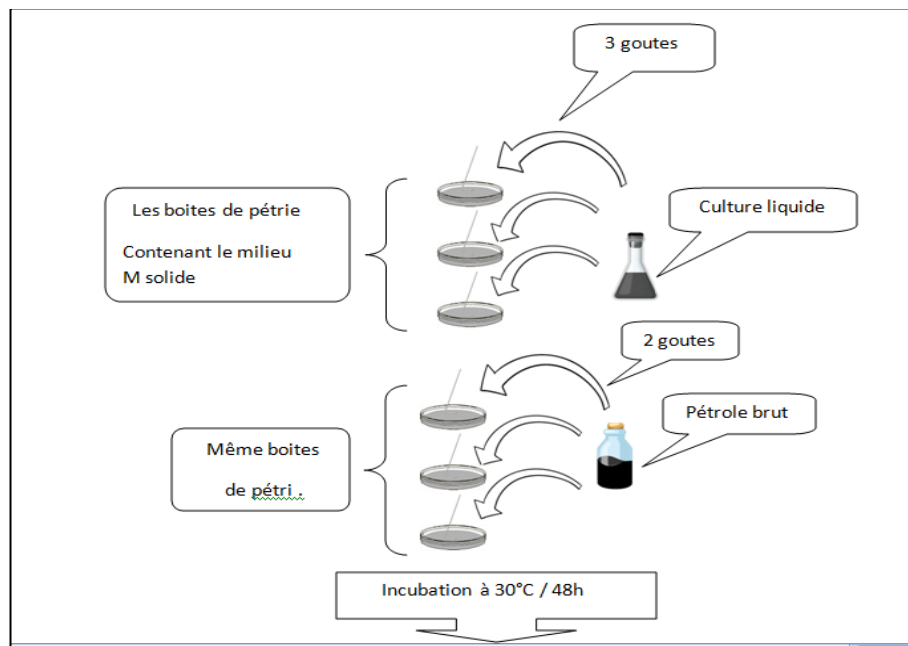
### I.1.2.2. Isolement sur milieu M solide

Cette étape nous permet de mettre en évidence la microflore bactérienne dégradante les hydrocarbures dans d'échantillon des fluides de forages par les hydrocarbures pétroliers.



Après l'étape de pré enrichissement, nous avons procédé à l'ensemencement des bactéries, à partir le mélange on prélève 3 gouttes qu'on ensemence par étalement sur les boites de pétri contenant de la milieu M solide à l'aide d'un râteau, dans la même boites de pétri on ajout 2 gouttes de pétrole et ensemence par étalement.

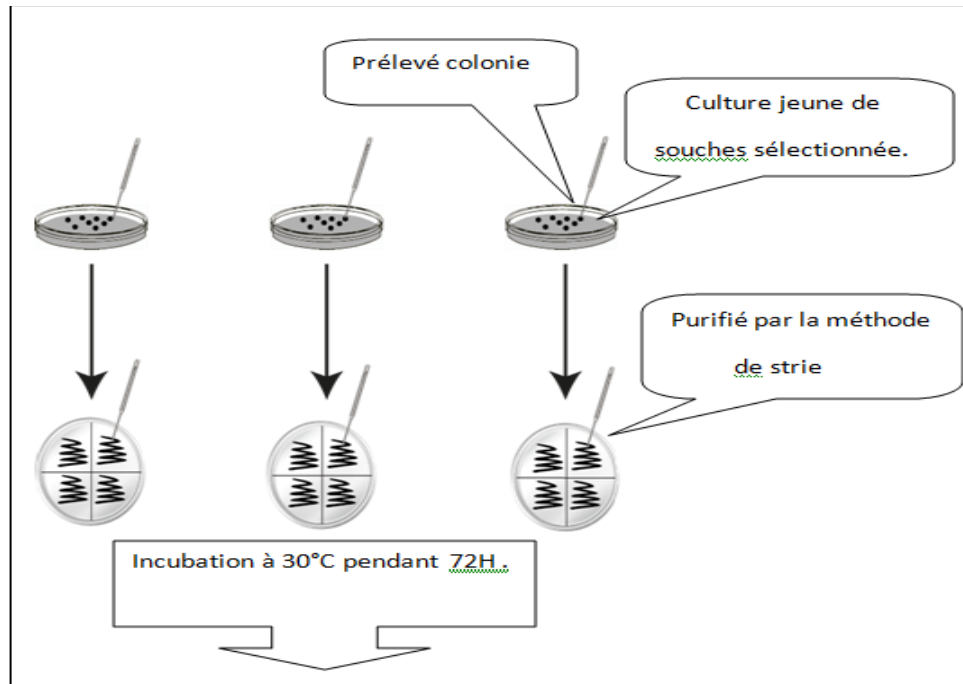
L'incubation se fait à 30°C pour une durée 48heures ( Figure N°8 ). ( BOUDERHEM. 2011).



**Figure N° 8:** Schéma d'isolement des bactéries hydrocarbonoclastes.

### I.1.2.3. Purification des bactéries

Après 48 h d'incubation, nous passons à l'étape de purification des cultures. Celle-ci nous permet d'obtenir des cultures pures à partir des différentes colonies isolées. La sélection des colonies est basée sur l'aspect macroscopique des colonies à savoir la couleur, la forme, le diamètre, l'opacité. Un échantillon de chaque type de colonie est prélevé et ensuite purifié par repiquages successifs selon la méthode de stries. L'incubation des boites se fait à 30°C pendant 72h ( Figure N° 9 ). ( BOUDERHEM. 2011 ).



**Figure N° 9:** Schéma de purification des bactéries hydrocarbonoclastes .

### I.1.3 Conservation des souches purifiées :

Les isolats sont conservés dans des tubes eppendorf contenant le milieu bouillon nutritif additionné de glycérol (4:1, v/v / UFC) à -4 °C (MARCHAL et BOURDON, 1982).

### I.1.4. Pré identification des souches purifiées :

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

#### **α. Etude de caractères morphologique:**

##### **α1. Aspect macroscopique**

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première Caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification.

D'après JOFFIN et LEYRAL (2006), les éléments d'identifications macroscopiques Sont :

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

##### **α2. Aspect microscopique**

- **Mobilité à l'état frais** : Il s'agit de déterminer si la bactérie est mobile ou non. Ce test permet également de Déterminer la forme, l'arrangement et la mobilité des bactéries. Il consiste en l'observation d'une goutte de suspension bactérienne, préparée avec de l'eau physiologique et placée entre lame et lamelle. L'observation se fait au microscope optique de type Bently laboscop 200 au grossissement x100 ( **DELARRAS . 2008** ) .
- **Coloration de Gram** C'est une double coloration qui nous permet de connaître la forme, l'arrangement, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées. Cette coloration est réalisée systématiquement sur les différentes colonies purifiées pour préciser le caractère Gram+ ou Gram-. Avec cette coloration double, les bactéries Gram positive apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries Gram négatives sont colorées en rose ou en rouge (**DELARRAS C., 2008**).

### β. Analyses biochimiques

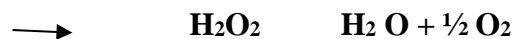
Les épreuves biochimiques permettent en général de distinguer les espèces, même étroitement apparentées entre elles . Cette approche nous oriente sur le métabolisme suivit par les bactéries et les enzymes qu'elles possèdent. Certains tests ont été réalisés en utilisant la galerie API 20E .

#### β1. Études des enzymes respiratoires

##### □ **Recherche de la catalase**

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

**catalase**



Sur une lame et à l'aide d'une pipette Pasteur, on dépose une colonie bactérienne à laquelle on ajoute de l'eau oxygénée (à 10 volumes) . La présence d'une catalase est révélée immédiatement par des bulles de gaz qui correspondent à l'oxygène dégagé ( **MARCHAL et BOURDON. 1982**).

##### □ **Recherche de l'oxydase**

Le terme exact est « recherche du cytochrome oxydase ». Les cytochromes sont des protéines qui appartiennent à la chaîne respiratoire, composée d'une succession de transporteurs d'électrons, en particulier les cytochromes. En fait, ce test recherche le cytochrome c-oxydase. Ce test consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée à oxyder la forme réduite

incolore de dérivés N-méthylé du paraphénylène diamine en leurs formes oxydées semi-quinoniques rose-violacées. Une réaction positive se traduit par un virage rapide du réactif de l'incolore au violet. Sinon il reste incolore (**DELARRAS , 2008**).

## **β2. Métabolisme des glucides**

### **□ Utilisation des sucres (D.Glc, D.Sac, D.Ara)**

L'utilisation d'un glucide (ose, diholoside, polyoside) se traduit par une acidification du milieu par le CO<sub>2</sub> ou par les acides organiques produits. En règle générale, c'est un indicateur de pH qui permettra la visualisation de l'acidification par l'apparition de chromogène jaune ( **JOFFIN et LEYRAL. 2006**).

### **□ Recherche de la β-galactosidase ou ONPG - hydrolase**

Pour dégrader activement le lactose, les microorganismes doivent posséder deux enzymes ; la perméase et la β-galactosidase. L'ONPG soit β- galactoside possède une structure analogue au lactose. Le lactose est formé de molécules de glucose et de galactose, tandis que l'ONPG est composée d'une molécule d'orthonitrophényl liée à un galactose. L'hydrolyse de l'ONPG (composé incolore) libère l'orthonitrophényl qui est responsable de la coloration jaunâtre du milieu ( **JOFFIN et LEYRAL. 2006**).

### **□ Recherche de Citrate perméase**

Le milieu utilisé est le citrate de Simmons (de couleur verte), qui ne contient que le citrate (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>) comme seule source de carbone qui est le citrate de sodium. Seules les bactéries possédant une enzyme citrate perméase seront donc capables de se développer sur ce milieu. L'utilisation de citrate provoque l'alcalinisation du milieu selon la réaction suivante (**MARCHAL et BOURDON, 1982**)



### **Citrate perméase**

### **Réaction de Voges- Proskauerb (VP)**

La réaction de Voges-Proskauerb est une réaction utilisée pour mettre en évidence la voie de fermentation de 2-3butyléneglycolique. Cette réaction permet l'oxydation de l'acétoine en diacétyle qui donne une coloration rouge au milieu oxygéné. Le diacétyle formé réagit avec le groupement guanidine de l'α- naphтол pour donner un composé rouge (**JOFFIN et LYERAL, 2006**).

### **□ Test Mannitol mobilité**

Le Mannitol est un produit de réduction de D-Mannose. Sa dégradation conduit à la formation du fructose dont l'attaque aboutit à la formation des acides à chaînes très courtes

(acide acétique, Acide formique). Le milieu Mannitol mobilité permet la recherche simultanément de la fermentation du Mannitol et la mobilité des bactéries .

- La fermentation du Mannitol entraîne le virage du milieu au jaune.
- Les souches mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement ( **MARCHAL et BOURDON., 1982**).

### β3. Étude du métabolisme protéique

#### □ Recherche des décarboxylases (ODC, LDC, ADH)

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

#### Décarboxylase

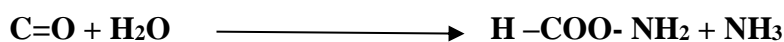


Il s'agit d'enzymes induites dont la synthèse est favorisée par un pH acide ( pH entre 3.5 et 5.5 ) et des conditions d'anaérobiose ( **MARCHAL et BOURDON., 1982** ) . Les décarboxylases sont :

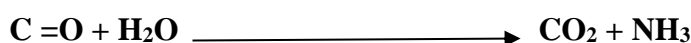
- **Lysine décarboxylase (LDC):** Lysine → Cadavérine + CO<sub>2</sub>.
- **Ornithine decarboxylase (ODC):** Ornithine → Putricine + CO<sub>2</sub>.
- **Argénine dihydrolase (ADH):** Argénine → Agmatine + CO<sub>2</sub>.

#### □ Recherche de l'uréase

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



NH<sub>2</sub>Seule, une uréase très active aboutit finalement à la réaction :



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



#### □ Production de H<sub>2</sub>S

La production d'H<sub>2</sub>S est révélée par les ions Fe<sup>3+</sup> qui forme avec le sulfure d'hydrogène un précipité noir de sulfure de fer. Le précipité peut être redissous en milieu acide ( **JOFFIN et LYERAL. 2006**).

#### □ Production d'indole

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

□ **Recherche de la tryptophane-désaminase (TDA)**

La désaminase agit sur le L- tryptophane en donnant l'acide indol-pyruvique. Ce dernier donne avec le perchlorure de fer une coloration brune (**MARCHAL et BOURDON,1982**) selon la réaction :



□ **Recherche de gélatinas (Collagénase)**

La gélatine peut être incorporé dans un milieu de culture afin mettre en évidence sa dégradation par certaines bactéries possédants une gélatinas : c'est le test gélatinas. Cette enzyme hydrolyse le collagène en acides aminés ou en peptides ( **JOFFIN et LYERAL., 2006** ) .

### **I.1.5 Bioremédiation**

Le traitement biologique des fluides de forage pétrolier consiste à utiliser des microorganismes pour transformer des substances chimiques toxiques en substances non toxiques .

#### **I.1.5.1. Essai de traitement des échantillons de fluide de forage**

Pour effectuer la bio remédiation de l'échantillon, nous avons utilise une quantité précise de fluide de forage ( 500ml).

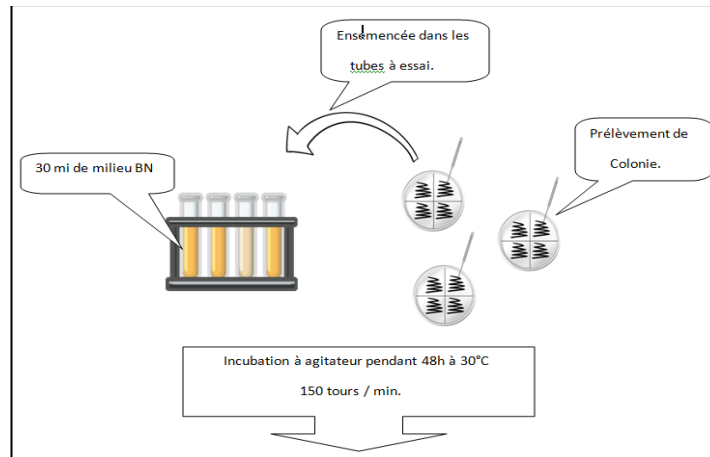
#### **I.1.5.2. Bio augmentation**

La bio augmentation consiste à ajouter des micro-organismes dans la zone polluée afin d'augmenter le taux de biodégradation des contaminants. Les micro-organismes ajoutés peuvent être étrangers au fluide ou indigènes ( **VOGEL et BALLERINI . 2001** )

L'inoculum bactérien est constitué par une biomasse bactérienne préparée à partir de la 7 souches . isolées. Il est utilisé pour bio augmenter la microflore indigène du fluide.

#### **I.1.5.3. Préparation de l'inoculum**

- La préparation de l'inoculum consiste en la réalisation d'une culture bactérienne. Elle est préparée en prélevant une colonie à partir d'une culture jeune et en l'ensemencant dans un tube a essai contenant 3 ml de milieu BN à 30°C dans un incubateur à agitateur (150 tr/min) pendant 48 heures pour obtenir biomasse bactériennes considérable( Figure N°10). ( **BOUDERHEM. 2011** ) .



**Figure N° 10:** Préparation d'inoculum bactérienne.

### I.1.6. Biostimulation

La stimulation de la microflore de notre fluide est réalisée par le moyen soit de 200ml de solutions contient soit 2% de la solution de bio surfactant, soit solution d'urée.

**A-Biosurfactant:** le bio surfactant est utilisé pour bio stimuler la microflore bactérienne. Ce bio surfactant provenant d'une boîte de commercialisation ;

**B- Solution d'urée:** sur la base de la concentration en urée dans le milieu de production de bio-surfactant cité par BENINCASA *et al.*, (2008) et afin d'améliorer les conditions de dégradation des hydrocarbures par des bactéries (bio stimulation), nous nous sommes proposé de préparer une solution d'urée 2g/l .

### I.1.7. Test de dégradation

100 ml de fluide de forage pétrolier utilisés pour le test de dégradation dans des cultures liquides bio augmenter par les souches sélectionnées ( BOUDERHEM. 2011) ;

#### Traitement :

- **Témoin 1** : 100 ml Fluide + 100 ml d'eau du robinet stérile
- **Erlenmeyer 2** : contenant un 100 ml fluide + 100 ml d'eau du robinet stérile + bactéries en consortium
- **Erlenmeyer 3:** contenant 100 ml fluide + 100 ml d'eau du robinet stérile + bactéries en consortium + 2 ml de bio surfactant
- **Erlenmeyer 4** : contenant 100 ml fluide + 100 ml d'eau du robinet stérile + bactéries en consortium + 2 g d'urée

les erlenmeyers sont agités 120tr / min a 30C pendant 5 semaines( Figure N°11).

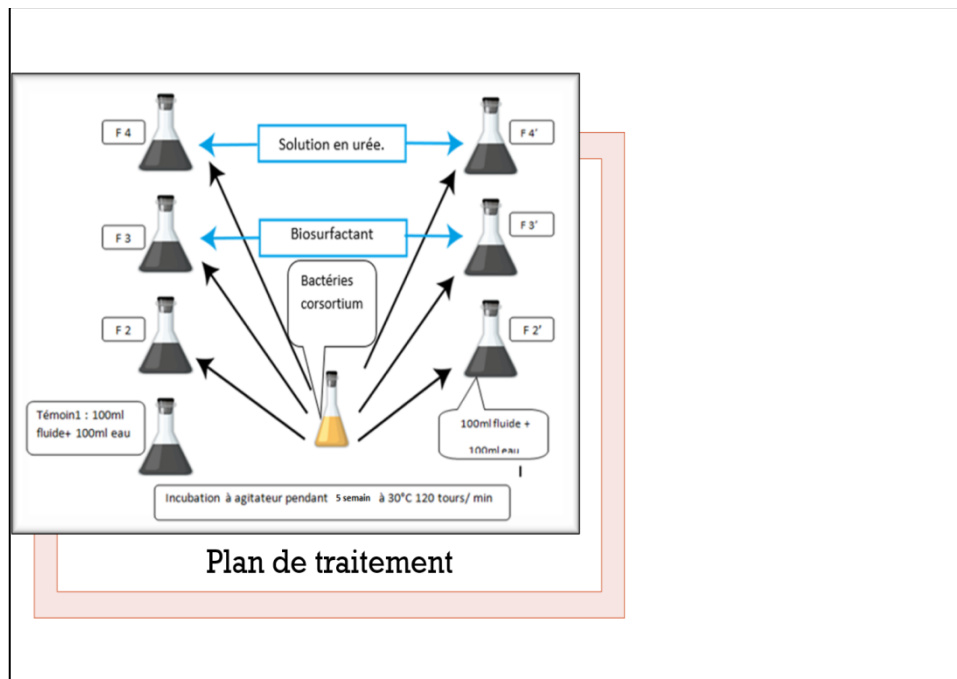


Figure N° 11: Stratégie de bio remédiation

### I.1.8. Evaluation des hydrocarbures résiduels

Pour évaluer les hydrocarbures dans les échantillons traités, on a appliqué la méthode de D 4006 ( API MPMS ) ce test est basé sur la détermination en laboratoire de l'eau, de huile et des sédiments dans le fluide de forage par procédure de centrifugation à 160° F ( Photo N 2). ( **Standard Test Method for Water and Sédiment in Crude Oil by the Centrifuge Method, 2006**).





**Photo N° 2 :** Procédure de lecture de l'eau et des sédiments lors de l'utilisation d'un tube à centrifuger en forme de cône ASTM de 100mm.

**Chapitre III :**  
**Résultats et Discussion**

## Chapitre III : Résultats et Discussion

### I.1. Analyse microbiologique

#### I.1.1. Caractéristiques des bactéries hydrocarbonoclastes isolées

Les résultats obtenus de notre isolement et purification montrent une croissance des 7 souches sur le milieu M contenant le pétrole comme seule source de carbone ce que indique la capacité des souches à métaboliser ce dernier ainsi que ces derives

Certaines bactéries ont besoin de la présence d'un autre composé organique pour un métabolisme efficient ( **BELMENAL et BENHAFED, 2015**).

#### 1) Caractéristiques morphologiques :

##### A. Etude macroscopique

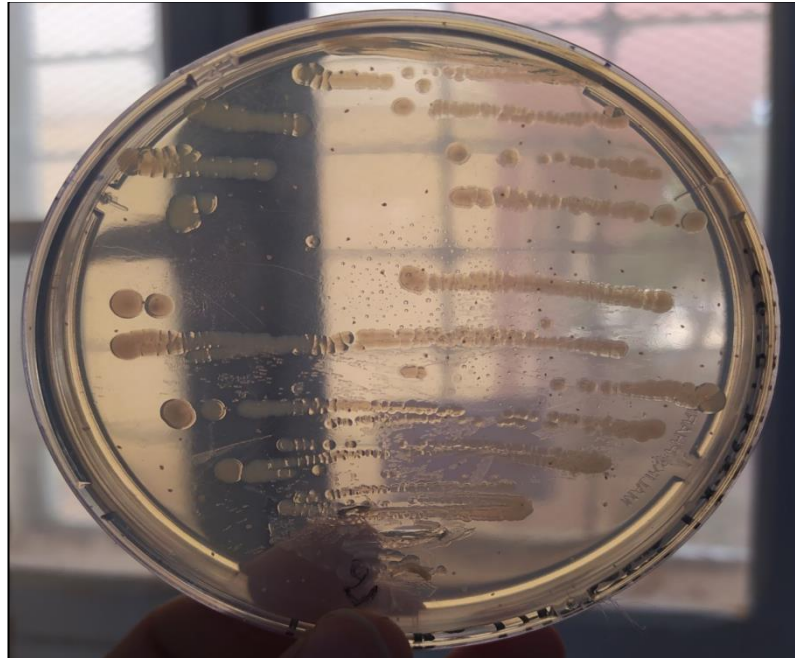
L'ensemencement sur milieu GN nous a permis d'isoler 7 colonies distinctes par leur aspect, leur taille et leur couleur. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 4.

**Tableau N° 4 : Aspect macroscopique des colonies bactériennes isolées.**

Souches	Diamètre ( mm)	Forme	Couleur	Elévation	Opacité	Surface	Consistance
S1	2	Irrégulière	Jaune claire	Convexe	Translucide	Lisse	visqueuse
S2	1	irrégulière	Jaune claire	Convexe	Translucide	Lisse	visqueuse
S3	1	Ronde	Jaune claire	Convexe	Translucide	Lisse	Visqueuse
S4	1	Ronde	Jaune claire	Convexe	Translucide	Lisse	Visqueuse
S5	1	Ronde	Jaune claire	Convexe	Opaque	Rigoureuse	Visqueuse
S6	2	irrégulière	Jaune claire	Convexe	Opaque	Rigoureuse	Crémeuse
S7	1	Irrégulière	Jaune claire	Convexe	Opaque	Rigoureuse	Crémeuse

L'observation macroscopique montre des colonies bien séparées avec des caractères spécifiques qui différencient les souches. Les colonies des bactéries sont généralement lisses

Jaune claire et visqueuses et ont un diamètre de plus de 1 mm, les souches S1 , S2, S6, S7 ont une forme irrégulière et les souches S3, S4, S5 ont une forme ronde(photoN° 3).



**Photo N° 3:** Aspects macroscopiques.

### B. Etude microscopique

L'observation microscopique a été réalisée suivant deux étapes : après une observation à l'état frais et après coloration de Gram, Les résultats obtenus se résument dans le tableau 5.

**Tableau N° 5: Aspects microscopiques des souches isolées**

Souche	Arrangement	Mobilité	Forme des cellules	Gram
S1	I/C	+	Bacille	+
S2	I/C	+	Bacille	+
S3	A	-	Coque	+
S4	A	-	Coque	+
S5	P/A	+	Bacille	+
S6	I	+	Bacille	-
S7	P	+	Bacille	-

**+**: positif : mobile.

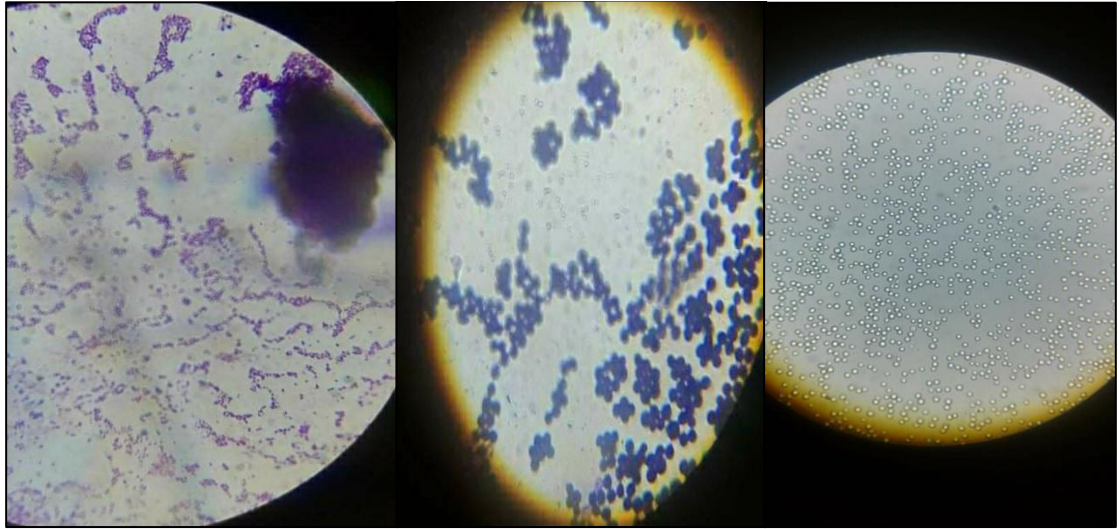
**-** : négatif/ absence/ immobile

**I** : isolée.

**A** : en Amas

**P** : en paire

**C** : en chênnette



**Photo N° 4:** Aspects microscopiques après coloration de GRAM( GX 100) .

D'après nos observations, il ressort qu'il y a deux groupes de bactéries avec des formes différentes, Les bactéries isolées présentent différentes formes : bacille, coque.

Elle sont soit isolées ou bien assemblées en paire, en chaînette, en amas irrégulier, Les bactéries sont généralement mobiles (5 /7), il ressort que les souches isolées sont de gram et de forme différents. Les souches (3) , (4) sont des Coque à Gram positif, et les souches (6), (7) sont des bacille à Gram négatif , les souches (1), (2), (5) sont bacille à Gram positif(PhotoN°4).

Le caractère mobile des bactéries isolées peut être expliqué par le phénomène de Chimiotactisme, il est important dans la dégradation de nombreuses classes d'hydrocarbures.

Il donne en effet aux bactéries mobiles l'avantage de pouvoir localiser des composés comme le toluène (VANDECASTEEL, 2005).

Les souches les plus fréquemment décrites dans la biodégradation des hydrocarbures appartiennent aux genres de Gram positif. D'autres souches Gram négatives ont la capacité de dégradation des hydrocarbures assez large (VANDERCASTEELE, 2005).

## 2) Caractéristique biochimique :

### A. Recherche des enzymes respiratoires :

#### a. Test de catalase

En présence d'oxygène moléculaire, certaines réactions métaboliques conduisent à la formation d'eau oxygénée. La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée en eau et en oxygène ( tableauN° 6). ( BELMENAI et BENHAFED , 2015) .

**Tableau N° 6 : Résultats de la présence de enzyme respiratoire (catalase)**

Souches	Catalase
S1	+
S2	+
S3	+
S4	+
S5	+
S6	+
S7	+

**B . Tests biochimiques :**

Le principe de l'identification biochimique est le même que celui de la méthode enzyme / substrat. Chaque tube contient un substrat différent avec lequel chaque enzyme bactérienne réagit, Les résultats de l'identification biochimique des souches bactériennes obtenus à l'aide du catalogue analytique sont consignés dans le tableau7.

**Tableau N° 7: Résultats des tests biochimiques des souches bactériennes isolées.**

	Souche 1/2	Souche 4/6
Catalase	+	+
Oxydase	-	-
Glu	+	+
Sac	/	+
Ara	+	+
Man	/	+
( ONGP)	+	-
CIT	+	-
VP	/	+
H <sub>2</sub> S	-	-
Indol	+	+
LDC	-	-
ADH	/	+
ODC	+	+
TDA	-	-
GEL	/	+

+ : Test positif      - : Test négatif

Grace aux tests biochimiques représentés dans tableau 7, il est possible de connaitre certaines caractéristiques du métabolisme des bactéries analysées.

Pour le test de l'oxydase nous avons testé que deux souches (souche1 et la souche2).

Les résultats obtenus montrent une oxydase négatif pour la souche 1 et 2.

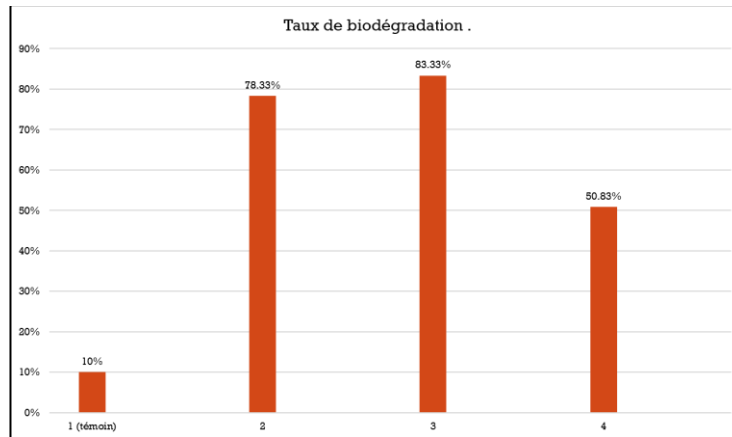
Les résultats des caractérisations morphologiques et biochimiques laissent apparaitre que les souches isolées à partir des différents échantillons de fluide de forage se rapprochent de genres bactériens différents tels que *Citrobacter*, *Serratia*.

Les souches de genre *Citrobacter* aussi ont capacité de produire du biosurfactant ( glycoprotéique ) lui permettant de solubiliser les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). L'émulsifiant est le biosurfactant sécrété par cette souches le plus connu ( ADEGOKE , 2019).

Le genre bactérien *Serratia* suscite un intérêt international, car les biosurfactants produits par ce genre sont devenus une source prometteuse de composés antimicrobiens, antiallergiques et antitumoraux qui possèdent une activité d'émulsification et de surface. Diverses espèces de *Serratia* ont été identifiées comme productrices de biosurfactants, notamment *Serratia marcescens*, *Serratia rubidaea* et *Serratia surfactantifaciens*. Il a été rapporté que les membres du genre *Serratia* produisaient principalement deux classes de biosurfactants, à savoir les lipopeptides et les glycolipides. Les lipopeptides produits par les espèces de *Serratia* comprennent les serrawettins et les stephensiolides, tandis que les glycolipides identifiés comprennent les rubiwettins et les rhamnolipides ( CLEMENT et al ., 2019).

### 3) Résultats de test de biodégradation

La mesure des taux de biodégradation des hydrocarbures dans les échantillons de fluide de forage et bio augmentés par les souches étudiées sont illustrés dans le Figure 12.



**Figure N° 12:** Taux de dégradation dans les échantillons traités

Après 5 semaines de traitement, nous pouvons constater que les taux de biodégradation des hydrocarbures dans les échantillons de fluide de forage traités varient de 10% à 83.33% dont on enregistre un maximum de dégradation du polluant dans l'échantillon bio augmenté par le consortium bactérien et bio stimule par les bio surfactants (83.33%) et on remarque une bonne dégradation dans l'échantillon bioaugmenté par le consorsium (78.33%), et dans et dans l' échantillon bio stimule par urée (50.83%). Dans l'échantillon témoin , non bio augmenté et seulement stimulé, on assiste à la diminution du polluant de l'ordre de seulement 10% .

L'utilisation des cultures bactérienne mixte pour la dégradation du pétrole brut dans le fluide de forage est efficace par rapport aux cultures individuelles. .Il est généralement admis qu'un seul microorganisme n'est pas capable de dégrader tous les composés de ce mélange complexe et les cultures mixtes ont non seulement un large choix de substrat, mais aussi la dégradation a pu être réalisée dans un système de co-oxydation et de commensalisme (**Chikere et al., 2011**).

Lorsqu'il ya plusieurs bactéries impliquées en consortium, chaque microorganisme peut fournir les enzymes impliquées dans une certaine étape de la dégradation. Les métabolites intermédiaires de la dégradation des composés peuvent alors être utilisés comme source de carbone par les autres bactéries (**Marcoux, 1998**), Selon Das et Chandran (2011), il est souvent difficile de trouver des organismes dégradants individuellement toutes les fractions de pétrole brut. Plusieurs hydrocarbures complexes, ramifiés, cycliques et aromatiques ne sont pas biodégradables individuellement, ils ne peuvent être oxydés que par co-métabolisme (**Mao-cheng et al., 2014**).

La biodégradation maximale de fluide de forage pétrolier n'est donc possible que grâce à la mise en place d'un consortium bactérien comprenant des groupes fonctionnels



dont les équipements enzymatiques complémentaires permettent la biodégradation quasi-totale d'une gamme plus large d'hydrocarbures (**Head et al., 2006**).

Une biodégradation efficace dépend donc de divers paramètres, notamment la composition du pétrole, le potentiel des bactéries à dégrader les hydrocarbures et la nature de la matrice solide (**Warne et al., 2010**).

Les conditions d'aération et de température peuvent également expliquer les bons résultats de biodégradations du contaminant par les souches testées séparément ou en consortium (**Díaz et al., 2013**).

La dissipation des contaminants organiques dans les échantillons de fluide de forages pétrolier traités englobe plusieurs mécanismes de disparition. Pour les polluants organiques, il comprend la photooxydation, la volatilisation et la biodégradation (**Head et al., 2006**). Dans notre étude, les échantillons pollués contenant une biomasse bactérienne originale, qui est à prendre en compte pour expliquer les pertes au niveau du témoin. De même, la biotransformation ou la biodégradation pourraient alors expliquer la dissipation maximale des hydrocarbures observée dans les échantillons bio augmentés par les souches étudiées.

Les bio-surfactants jouent un rôle très important pour bio-stimuler la biodisponibilité des bactéries du fluide de forage afin d'améliorer les performances de bio-remédiation.

Ces composés tensioactifs produits par des micro-organismes sont capables d'améliorer la solubilisation, la mobilisation et l'émulsification de contaminants organiques hydrophobes ou insolubles (**ALEKSANDRA K. 2018**).

L'utilisation d'urée comme source d'azote ne donne pas un bon effet sur le taux de dégradation malgré que d'après des études (**BOUDERHEM. 2011**). Ce produit stimule les bactéries à sécréter des biosurfactants qui à leur tour contribuent à la dégradation des hydrocarbures. Ce résultat peut être expliqué par l'absence de l'uréase chez notre souches.



Photo N° 5 : Résultat de test de biodégradation .

# **Conclusion & perspectives**

L'objectif de notre travail est d'évaluer le pouvoir des souches bactériennes hydrocarbonoclastes à dégrader les hydrocarbures pétroliers afin de traiter des milieux contaminés par ces polluants.

En effet, Les résultats d'isolement bactériens de fluide de forage contaminés, nous ont permis d'isoler sept souches bactériennes hydrocarbonoclastes.. La tolérance des bactéries exprimée par leur croissance en présence du pétrole brut, pouvant être due à leur potentialité adaptative naturelle suggère que ces bactéries possèdent la machinerie enzymatique et moléculaire nécessaires à la dégradation du polluant hydrocarboné.

La pré identification de 4 souches bactériennes telluriques hydrocarbonoclastes isolées de notre échantillon a révélé leur affiliation à 2 genres *Serratia* et *Citrobacter*

L'application du bioprocédé pour la bioremédiation des échantillons de fluide de forage permis l'élimination de 78.33 % de ces échantillons par le consortium bactérien constitué de 7 souches et l'élimination de 83.33 % en présence de 2% de biosurfactant. La présence de 2g d'urée a conduit à une élimination évalué à 50.83% en 5 semaines d'expérimentation. Ces données confirment que ces bactéries ont le pouvoir de dégrader les HC et son importance dans la préservation de l'environnement naturel en réduisant la quantité de contaminants liés au pétrole. L'association de ces isolats en consortium a conduit à une meilleure dégradation du polluant pouvant être expliquée par une complémentarité métabolique entre elle.

Dans le domaine de la bioremédiation, le choix d'une méthode de biodégradation dépend en grande partie sur les capacités de dégradation naturelle de la microflore locale. À cet égard, cette étude fournit un aperçu d'une meilleure compréhension de l'adaptation des bactéries vivant dans des environnements pollués et d'élaborer une solution de mettre en œuvre des bio-stratégies adéquates à l'avenir pour intervenir, contribuer et améliorer le bon fonctionnement au niveau des sites.

En perspective, il serait souhaitable de compléter cette étude par des approches plus approfondies, permettant :

- L'identification moléculaire des souches étudiées;
- de mieux comprendre les aspects physiologique, enzymatique et moléculaire des souches sélectionnées;
- de caractériser les métabolites sécrétés par les bactéries hydrocarbonoclastes (biosurfactants), et les impliquer dans le procédé de bioremédiation ;
- l'application du bioprocédé adopté à grande échelle

**Références  
Bibliographiques**

- 1) **ABEDELLY CHEDLY. (2007).** Bioremédiation / Phytoremédiation. Thèse .  
Département des sciences naturelles. Institut supérieur de la formation continue.  
Université de Tunis.
- 2) **ADEGOKE Isiaka Adetunji and ADEMOLA Olufolahan Olaniran, (2019).** Production and characterization of bioemulsifiers from Citrobacter strains isolated from lipid-rich Wastewater 3Biotechnology. 9 (4): 151.
- 3) **AL-ARAJIL, ABD RAHMAN R. N.Z.R., BASRI , SALLEH M. A. B., 2007.** Mini review :  
Microbial Surfactant. ( AsPac) J
- 4) **ALEKSANDRA KASPRZYK, (2018).** Feasibility of Biosurfactant Enhanced Bioremediation of Residual Petroleum Hydrocarbon Fractions in Contaminated Soils from Lac Mégantic. McGill University ( Canada).
- 5) **ALEKSANDRA WLODARCZYK, (2010).** Recherche de signaux moléculaires végétaux impliqués dans l'induction de gènes chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi* ( *Dickeyadantii*). Docteur. Microbiologie environnementale. Université Lyon, p. 85.
- 6) **ASTM., D 4007 \_ 02 (2006).** Standard Test Method for Water and Sediment in Crude Oil by the Centrifuge Method ( Laboratory Procedure ). (MPMS) Chapter 10.3.
- 7) **AZROUG NEBIA, HARRAT MARWA. 2019.** Etude de l'activité HYDROCARBONOCCLASTE chez *PSEUDOMONAS* sp ( isolement et pré-identification). Mémoire de master. Université Abdelhamid Ibn BADID – Mostaganem.
- 8) **BAKER HUGHES.** HPHT Drilling Fluids. TEXAS . USA : s.n. 2001.
- 9) **BALLERINI DANIEL. (1999).** Traitement biologique des sols. Technique de l'ingénieur, traité Environnement, G2 620 : 1-6 .

- 10) **BEGBEG AMEL, (2008)**. Importance des considérations environnementales dans l'étude des performances des additifs utilisés dans les fluides de forage. Mémoire de magister en traitement des effluents industriels.
- 11) **BENKACIMI N. (2013)**. Traitement de la pollution engendrée par les fluides de forage. Mémoire de master. Université SAADDAHLAB de Blida.
- 12) **BLIEFERT CLAUS et ROBERT PERRAUD, 2008**. Chimie de l'environnement Air, eau, sols, déchets. De Boeck université.
- 13) **BOUDERHEM. AMEL. 2011**. Utilisation des souches bactériennes telluriques autochtones dans la bio détection et la bio ré médiation des sols pollués par les hydrocarbures. Mémoire de magister. Université KASDI MERBAH- OUARGLA .
- 14) **BOUDOUNE MERIEM RAYEN. Et BOUALEM YASMINE. (2018)**. Etude de la production de bio surfactants par des bactéries HYDROCARBONOCLASTES. Mémoire de master. Université des Frères MENTOURI CONSTANTINE .
- 15) **BRAIK ABDELHAMID. SAIDI ABDELBASET. (2017)**. Les boues de forage à base d'huile, l'impact sur la santé et sur l'environnement et technique de traitement. Mémoire de licence. Université KASDI MERBAH- Ouargla.
- 16) **Callaghan A., Davidova I., Savage-Ashlock K., Parisi V., Gieg L., Suflita J. (2010)**. Diversity of benzyl- and alkylsuccinate synthase genes in hydrocarbon impacted environments and enrichment cultures. *Environmental Science and Technology*. 44, 7287-7294.
- 17) **Callaghan A., Gieg L., Kropp K., Suflita J., Young L.( 2006)**. Comparison of mechanisms of alkane metabolism under sulfate-reducing conditions among two bacterial isolates and a bacterial consortium. *Applied and Environmental Microbiology*. 72,pp: 4274-4282
- 18) **CLEMENTS, NDLOVU, KHAN, KHAN, (2019)**. Biosurfactants produced by *Serratia* species: Classification, biosynthesis, production and application , *appl microbiol biotechnol* . 103 (2) : 589-602.
- 19) **DADA MOHAMED ABDERRAHMAN. (2011)**. Optimisation d'un procédé de traitement des Boues de forage. Mémoire de magister. Université M'HAMED BOUGARA , BOUMERDAS.
- 20) **DAS NILANJANA, CHANDRAN P., (2011)**. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants : An Overview. *Biotechnology research international* 2011.



- 21) **DELLARRAS CAMILLE ,(2008).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Technique et documentation France. Lavoisier. 32, 33.
- 22) **ERIKSON M , SODERSTEN E , YU Z, DALHAMMARG, MOHN W, W. (2003).** Dégradation of polycyclic Aromatic Hydrocarbons at Low Temperature under Aerobic and Nitrate Reducing Conditions in Enrichment Cultures from Northern Soils. *Appl Environ. Microbiol.* 69 (1) : 275-284 .
- 23) **FAKRUDDIN MD . ( 2012).** Bio surfactant : Production and Application . Review Article. *Petroleum & Environmental. Biotechnology.* North South University .
- 24) **GABET SOPHIE , (2004).** Remobilisation d'hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. Thèse de doctorat. Université de Limoges, spécialité Chimie et Microbiologie de l'eau. P177.
- 25) **GAREER C.W, FORTIN N., ROY R., WHYTE L. G, LEE K., (2003).** Indigenous Sediment Microbial Activity in Response to Nutrient Enrichment and Plant Growth Following a Controlled Oil Spill on Freshwater Wetland . *Bioremediation Journal.* 7 (1) : 69-80.
- 26) **Grossi V., Cravo C., Guyoneaud R., Ranchou-Peyruse A., Hirschler-Réa A., (2008).** Metabolism of n-alkanes and n-alkenes by anaerobic bacteria: a summary. *Organic Geochemistry .* 39, 1197–1203.
- 27) **GUERMOUCHE M'RASSI . AMEL. 2014.** Caractérisation moléculaire des bactéries impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures. Thèse doctorat. Université d'Oran.
- 28) **HADA , H.S.& SIZEMORE, R.K. (1981).** Incidence of plasmids in marine *Vibrio* spp. Isolated from an oil field in the northwestern Gulf of Mexico. *Applied and environmental microbiology* 41(1) : 199-209.
- 29) **HONGWEI YANG et al. (2003).** Anaerobic biodegradability of aliphatic compound and their quantitative structure biodegradability relationship, Tsinghua University, Beijing, PR. CHINA.
- 30) **JOFFIN J, et NET LEYRAL G., (2006).** Microbiologie technique . Tome 1. Dictionnaire des techniques . 4<sup>ème</sup> édition . Bordeaux : CRDP d' Aquitaine . ISBN : 2-86617-515-8 . 363.
- 31) **JUHASZ ALBERT L. REVENRA NAIDU 29 MARCH 2000).** Bio remediation of high molecular weight polycyclic aromatic Hydrocarbons : a review of the microbial of

- benzo (apyrene. International biodeterioration and Biodégradation. 45 (2000) :57-88.
- 32) **KHODJA. MOHAMED . 2008.** Les fluides de forage : Etude des performances et considération environnementales. Thèse de doctorat. Toulouse. France : Institut national polytechnique de Toulouse. Février 2008.
- 33) **LAHA, SHONALI, BERRIN, TANSEL, ACHARA, USSAWARUJI, KULCHAI, (2009).** Surfactant- soil Interactions During Surfactant-amended Remediation of Contaminated oils by Hydrophobic Organic Compounds : A REVIEW. " Journal of Environmental Management 90 (1) : 95-100
- 34) **LEAHY, J. G., and R. R. COLWELL. ( 1990).** Microbial degradation of hydrocarbons in the environment, Microbiological Review, 54 (3), 305-315. Review on the hydrocarbon fate within combined sewers.
- 35) **LECOMTE PAUL, (1995).** Les sites pollués, traitement des sols et des eaux souterraines. Edition Lavoisier, TEC & DOC. P. 198.
- 36) **LUNA JULIANA M, RAQUEL D. RUFINO, LEONIE A. SARUBBO, GALBA MARIA CAMPOS TAKAKI, (2013).** Characterisation, Surface Properties and Biological Activity of a Biosurfactant Produced from Industrial Waste by Candida Sphaerica UCP0995 for Application in the Petroleumindustry. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces 102 : 202-209.
- 37) **MAIER R. PEPPER M. I. L. GERBA C. P (2009).** Environmental Microbiology, 2<sup>nd</sup> Edition, p 598.
- 38) **MARCHAL R., et J. L. BOURDON, (1982) .** Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries . Ed. DOIN , Paris.
- 39) **MendelsohnI. A., Andersen G. L., BaltzD. M., CaffeyR. H., CarmanK. R., FleegerJ. W., JoyeS. B., LinQ., MaltbyE., OvertonE. B. (2012).** Oil Impacts on Coastal Wetlands: Implications for the Mississippi River Delta Ecosystem after the Deepwater Horizon Oil Spill. BioScience, 62, 562–574.
- 40) **MISWACO.** Drilling Fluid Manual. 2001.
- 41) **NGUYEN J. P. 1993.** Le forage, Technique d'exploitation pétrolière, le Forage Technip.
- 42) **PELMONT J. (1995).** Bactéries et environnement- adaptation biologique, Tome I. OPU. P. 875.

- 43) PEYSSON Y. 2004. Solid / Liquid Dispersions in Drilling and Production. Oil and Gas Science.
- 44) PRABHU Y. PHALE P. 2003. SB PP2 Novel Metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. APPL. Microbiol, biotechnol.
- 45) PRIEFERT, H., X. M. & O'Brien, XM. (2004). Indene bioconversion by a toluene inducible dioxygénase of RHODOCOCCLUS sp. 124. Applied microbiology and biotechnology 65 (2) : 168-176. Products with antimicrobial activity : a review of the literature. Journal of ethnopharmacology 23, 127-149.
- 46) PRINCE. RC, (2005). The microbiology of marine oils spill bioremediation. Petroleum microbiology : 317-336.
- 47) SAURET. C. (2011). Ecologies des communautés bactériennes marines soumises à une pollution pétrolière Influence des facteurs environnementaux, de la prédation et de la récurrence des pollutions. Thèse de doctorat de l'université pierre et marie curie. Spécialité Microbiologie environnementale Ecole Doctorale Sciences de l'Environnement d'Ile de France. P. 129, 287.
- 48) So C., Phelps, C., Young L. (2003). Anaerobic transformation of alkanes to fatty acids by a sulfate-reducing bacterium, strain Hxd3. Appl Environ. 69, 3899.
- 49) Solano-Serena F., Marchal R and Vandecasteele J.P. (2001) Biodégradabilité de l'essence dans l'environnement: de l'évaluation globale au cas des hydrocarbures récalcitrants. Oil Gas Sci. Technol. 56, 479-498.
- 50) SOLTANI MOHAMED. (2004). Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram négatives HYDROCARBONOCLESTES : Variation en fonction de la source de carbone . Thèse de doctorat de l'université Paris 6, spécialité Chimie analytique, p 248.
- 51) SUZUKI, K., N. OGAWA, N. & MIYASHITA K. (2001). Expression of 2- halobenzoate dioxygenase genes ( CBDSABC) involved in the degradation of benzoate and 2- halobenzoate in BURKHOLDERIA sp. TH2. Gene 262 (1-2) : 137-145.
- 52) TARAYRE Cédric. (06-07-2012). Bioremédiation de sols pollués aux hydrocarbures. Editions Universitaires Européennes. P116.
- 53) VANDECASTEELE JEAN-PAUL. ( AOUT 2008). Petroleum Microbiology . Editions TECHNIP, Paris , 816p.
- 54) VIKAS PRUTHI, SWARANJIT SINGH CAMEOTRA ( APRIL 1995). Rapid method for monitoring maximum biosurfactant production obtained by acetone precipitation. ARTICLE , Resources : 2, 202, 205.

- 55) **VOGEL T. et BALLERINI D. , ( 2001).** Biorestauration des sols et des aquifères contaminés par des hydrocarbures et des composés halogénés. Bull . Soc . Fr . Microbiol, 16, 204 - 209.
- 56) **VOLKERING FRANK, ANTON M BREURE, RULKENS WIM H. (1997).** Microbiological Aspects of Surfactant Use for Biological Soil Remediation. Biodegradation 8 (6) : 401-417.
- 57) **Widdel F., Grundmann O. (2010).** Biochemistry of the anaerobic degradation of non-methane alkanes. in Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology eds Timmis K, Mcgenity T., Van Der Meer J., De Lorenzo V. (Berlin: SpringerVerlag; ), 908–909.

**Annexe**

**Annexe :****Annexe N° 1: les composants de milieu de culture**

Milieu M ( milieu minérale ) :

L'eau distillé .....	1L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	1g
$\text{FO SO}_4$ .....	0,02g
$\text{Mg SO}_4$ .....	1g
Agar .....	15g

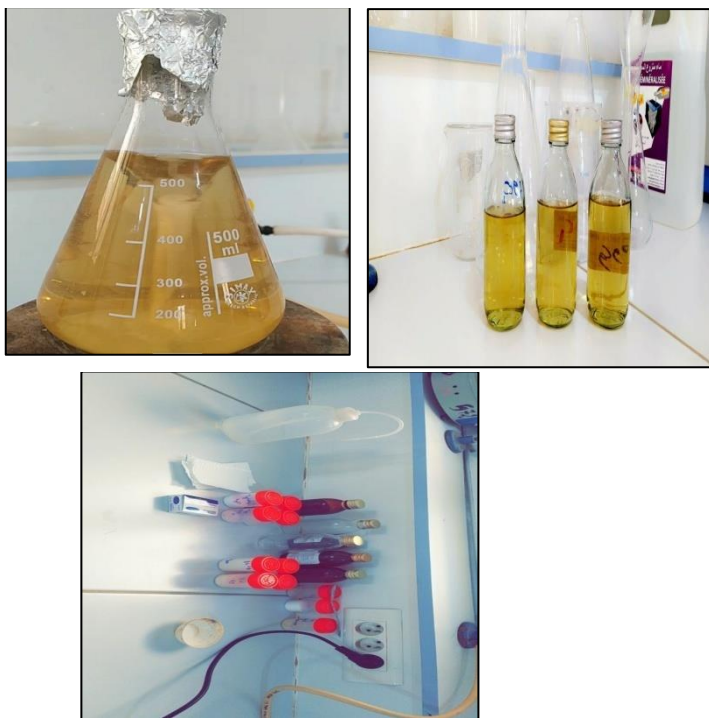


Milieu gélose nutritive (GN) :

L'eau distillée .....	1L
Peptone .....	5g
Extrait de viande .....	1g
Extrait de levure.....	2g
Chlorure de sodium .....	5g
Agar.....	15g

Milieu bouillon nutritif (BN) :

L'eau distillée.....	1L
Peptone.....	5g
Extrait de viande.....	1g
Extrait de levure.....	2g
Chlorure de sodium.....	5g



Annexe N° 2: Incubateur a agitateur.



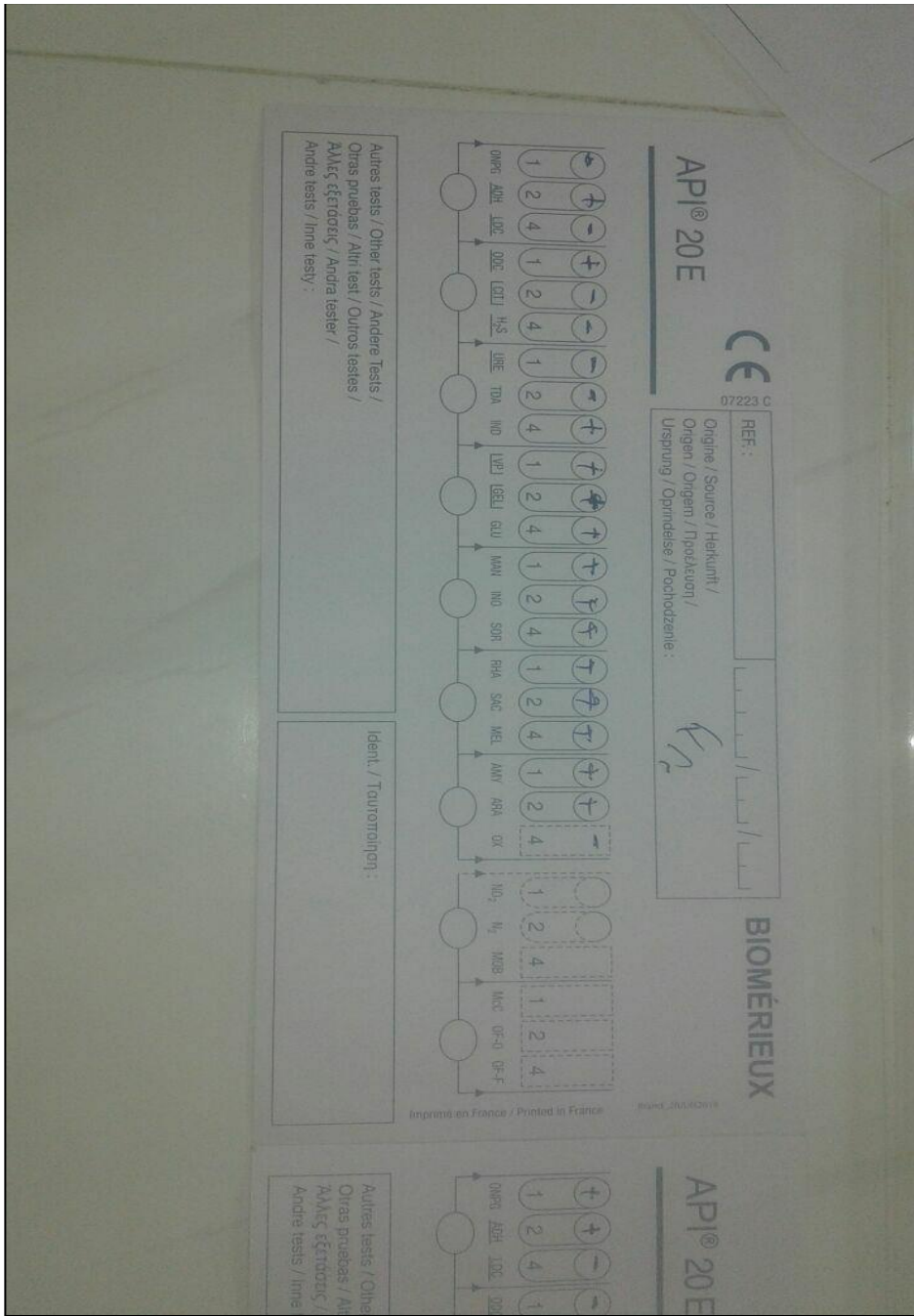
Annexe N° 3: coloration de Gram.



Annexe N° 4: Galerie ABI 20<sup>E</sup>.







### Résumé :

L'économie algérienne est totalement dépendant des ressources pétrolières, et malgré sa richesse en points positifs, il a de nombreux effets négatifs sur l'environnement en rejets de fluides de forage.

L'objectif de notre travail est d'évaluer le pouvoir des souches bactériennes hydrocarbonoclastes à dégrader les hydrocarbures pétroliers afin de traiter des fluides de forage pétrolier. La méthode d'isolement et d'identification de cette bactéries, elle repose sur un isolement sur milieu de culture (M) contenant le pétrole brut, ce qui nous a permis d'isoler 7 souches à partir d'échantillon de fluide de forage pollué par les hydrocarbures. quatre souches pré identifiés sont appartenant au genre *Serratia et Citrobacter*.

L'application du bioprocédé pour la bioremédiation des échantillons de fluide de forage permis l'élimination de 78.33% par le consortium bactérien constitué 7 souches. La présence de 2% de biosurfactant a aboutit au plus fort rendement d'élimination évalué à 83.33%. La présence de 2g d'urée a conduit à une élimination évalué à 50.83% en 5 semaines d'expérimentation.

L'association de ces isolats en consortium a conduit à une meilleure dégradation du polluant pouvant être expliquée par une complémentarité métabolique entre elle.

**Mots clés :** hydrocarbures pétroliers, souches bactériennes hydrocarbonoclastes, bio surfactants, fluide de forage.

Corriger en arabe et en anglais le modifications apportées sur ce paragraphe

### ملخص:

إن الإقتصاد الجزائري يعتمد كلياً على الموارد البترولية، ورغم مالها من إيجابيات فهناك بعض الآثار السلبية على البيئة بسبب نفايات سوائل الحفر.

فالهدف من موضوعنا هو إيجاد وتقييم قدرة السلالات البكتيرية الهيدروكاربونية على إزالة الهيدروكربونات البترولية وذلك لإستعمالها في معالجة سوائل الحفر البترولي.

حيث أن طريقة العزل والتعرف على البكتيريا التي اتبعناها تعتمد على عزل البكتيريا من عينة من بقايا سائل الحفر الملوث مما سمح لنا بعزل (07) سلالات منها تم تحديدهم ينتمون إلى جنس *Serratia* و *Citrobacter*.

حيث كانت نتائج عملية المعالجة لعينات سائل الحفر الملوث لمدة 5 أسابيع كالتالي: إزالة 78.33% من الهيدروكربونات بواسطة 7 سلالات مجتمعة وإضافة 2% من طحالب الحيوية كانت مرتفعة وبلغت 83.33% وإضافة 2غ من اليوري كانت الإزالة 50.83% فقط.

الجمع بين هذه السلالات أدى إلى تحلل أفضل لهذه المواد يمكن تفسيره بوجود تكامل أبيض بينها. **الكلمات المفتاحية:** الهيدروكربونات البترولية، السلالات البكتيرية للطبقة الهيدروكاربونية، الخافضات الحيوية، سائل الحفر.

### Abstract:

The Algerian economy is completely dependent on petroleum resources, and despite its advantages, there are some negative effects on the environment due to waste drilling fluids.

The objective of our topic is to find and evaluate the ability of hydrocarbon bacterial strains to remove petroleum hydrocarbons for use in the treatment of petroleum drilling fluids.

As the method of isolation and identification of bacteria that we followed depends on isolating bacteria from a sample of contaminated drilling fluid residues, which allowed us to isolate (07) strains, four of which were identified belonging to the genus *Serratia* and *Citrobacter*.

Where the results of the treatment process for contaminated drilling fluid samples for 5 weeks were as follows: Removal of 78.33% of hydrocarbons by 7 combined strains, adding 2% of bio-algae was high and amounting to 83.33%, and adding 2 g of urea, the removal was only 50.83%.

The combination of these strains led to a better decomposition of these substances, which could be explained by the presence of metabolic integration between them.

**Keywords:** petroleum hydrocarbons, hydrocarbonoclast bacterial strains, biosurfactants, drilling fluid.