République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE KASDI MERBAH-OUARGLA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Biologiques

Année : 2017/ 2018

N° d'enregistrement :
……

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences

Spécialité : Biologie

Présentée Par :

Melle BOUDERHEM Amel

Utilisation des souches bactériennes telluriques sahariennes dans la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures pétroliers

Soutenue publiquement

Le 13 /05 / 2018

Devant le jury :

OULD EL HADJ Mohammed Didi	**Professeur Univ. Ouargla**	**Présédent**
OULD EL HADJ-KHELIL Aminata	**Professeur Univ. Ouargla**	**Directrice de thèse**
BLANCO Carlos Javier	**Professeur Univ. Rennes1**	**Co-encadreur**
BENALLAOUA Said	**Professeur Univ. Béjaïa**	**Examinateur**
HAMDI AISSA Baelhadj	**Professeur Univ. Ouargla**	**Examinateur**
BOURAS Noureddine	**Professeur Univ. Ghardaïa**	**Examinateur**

Remerciements

Mes remerciements les plus profonds et inexprimables, s'adressent avant tout à ALLAH le tout puissant, de m'avoir accordé la force, la santé et le courage afin de pouvoir accomplir ce modeste travail. Le présent travail a été réalisé au laboratoire de Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi-arides de l'Université KASDI Merbah- Ouargla, laboratoires pédagogiques de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'Université KASDI Merbah-Ouargla, laboratoire de Biologie Moléculaire de l'Université de Rennes 1(France) et laboratoire de la Société Nouvelle des Produits Chimiques (Tunisie).

Je remercie les responsables de ces laboratoires de m'avoir accordé d'y accéder afin de réaliser mes expérimentations. Mes très profondes reconnaissances et mes sentiments les plus sincères vont à ma Directrice de thèse, Madame OULD EL HADJ- KHELIL Aminata, Professeur 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 m'a fait en acceptant d'encadrer ce travail, de le diriger avec tant de compétence et de gentillesse. Ses conseils et ses orientations éclairées m'ont permis de mener à terme ce travail.

Je tiens à remercier Mensieur Blanco Carlos-Javier professeur à l'Université de Rennes 1 pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de Biologie Moléculaire de l'Université de Rennes I (France) . Je la remercie pour son intérêt à mon travail, pour ses conseils scientifiques, ses précieuses aides et l'encadrement de haut niveau qui ont permis M d'atteindre les objectifs visés. Sans oublier Madame Marie-Andree Esnault et Madame Gwennola Ermel qui m'a initié aux techniques de biologie molécualire et qui étaient toujours disponibles. Qu'elles trouvent ici mes sincères remerciements.

J'exprime également mes plus vifs remerciements à Monsieur OULD EL HADJ Mohamed Didi, Professeur 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'il me fait en acceptant de présider ce Jury de thèse.

Je le remercie aussi pour ses encouragements et son soutien moral et ses qualités humaines. Mes remerciements les plus sincères s'adressent également aux Professeurs BENALLAOUA Said, HAMDI AISSA Baelhadj et BOURAS Noureddine pour m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail afin de m'aider à avancer encore vers d'autres horizons.

Je remercie tous mes enseignants, depuis le primaire, qui ont contribué et influencé ma forte personnalité, tous mes amis, mes étudiants, mes collègues de travail et tous ceux et celles qui ont apporté aide et soutien, de près ou de loin tout au long de mes études.

Finalement, un grand merci du fond du cœur, plein d'amour et de tendresse aux membres de ma famille Bouderhem sans oublier mes oncles Belhadj Ali et Chenine Bachir qui m'ont fait toujours confiance et qui m'ont beaucoup encouragé pour y arriver, je leurs dis «un grand merci ».

BOUDERHEM Amel

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFNOR : Association Française de Normalisation.

BTEX : Benzène, Toluène, Ethyl-benzène et Xylène

CE: Conductivité électrique

GN : Gélose Nutritive

HAP: Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

HC: Hydrocarbures

ISO: Organisation international standard

MATH : Test d'Adhésion Microbienne aux Hydrocarbures

NF ISO : les internationales éditées par l'AFNOR

pH : potentiel d'hydrogène

UFC: Unités Formants Colonies.

USEPA: Agence américaine de protection de l'environnement

VP : Voges Proskauer.

Liste des tableaux

Tableau I: Conditions d'incubation des isolats.....24

Tableau II: Supports testés.....28

Tableau III: Caractéristiques physico-chimiques des sols étudiés.....32

Tableau IV: Aspect macroscopique des colonies bactériennes isolées 39

Tableau V: Aspects microscopiques des souches isolées.....40

Tableau VI: Résultats des tests biochimiques.....41

Tableau VII: Résultats de l'identification moléculaire des isolats 43

Tableau VIII : Répartitions des isolats hydrocarbonoclastes.....45

Tableau IX: Souches développées à différents conditions expérimentales 52

Tableau X: Interactions entre les souches sélectionnées 55

Tableau XI: Pourcentage des composés détectés par GC-MS dans les échantillons de sols....76

Liste des figures

Figure 1: Localisation des sites d'étude (google maps).....13

Figure 2: Modèle de recombinaisons bactériennes.....25

Figure 3: Triangle des textures de sol.....33

Figure 4: Concentration des hydrocarbures dans les échantillons de sols étudiés.....35

Figure 5: Biomasse bactérienne des différents échantillons de sols étudiés.....36

Figure 6: Effets du pH sur la croissance des souches (A: 30°C ; B: 40°C).....48

Figure 7: Effet de la salinité sur la croissance des souches (A: 30°C ; B: 40°C).....49

Figure 8 : Effets du pH et de la salinité sur la croissance des souches (A: 30°C ; B: 40°C)....50

Figure 9: Cinétique de croissance des souches étudiées.....57

Figure 10: Taux de biodégradation de pétrole brut.....58

Figure 11: Variation du pH des cultures en fonction de temps 60

Figure 12 : Evolution de l'index d'émulsion E_{24} des cultures bactériennes 61

Figure 13:Evolution de l' hydrophobicité des surfaces cellulaires des souches étudiées 63

Figure 14: Evolution des biomasses des souches testées.....66

Figure 15: Taux de biodégradations du pétrole brut.....68

Figure 16: Evolution du carbone organique total dans les échantillons de sol traités 70

Figure 17: Taux de biodégradation des hydrocarbures par les bactéries sélectionnées.....71

Figure 18:Chromatogramme des hydrocarbures détectés dans l'échantillon témoin.....73

Figure 19:Chromatogramme des hydrocarbures détectés dans l'échantillon de sol bioaugmenté par la population bactérienne mixte.....73

Figure 20: Chromatogramme des hydrocarbures détectés dans l'échantillon de sol 74

Figure 21: Chromatogramme des hydrocarbures détectés dans l'échantillon de sol 74

Figure 22: Chromatogramme des hydrocarbures détectés dans l'échantillon de sol bioaugmenté par *R.equi* 74

Figure 23: Chromatogramme des hydrocarbures détectés dans l'échantillon de sol bioaugmenté par *A.calcoaceticus* 75

Figure 24:Taux de dégradation des n-alcanes dans les échantillons traités.....79

Figure 25: Taux de dégradation des HAP dans les échantillons de sol bioaugmentés.....81

Sommaire

Remerciements I

Liste des abréviations III

Liste des tableaux IV

Liste des figures V

Résumé VIII

الملخص IX

Abstract X

Introduction 01

Patie I: Méthodologie

I. Méthodologie 12

I.1. Echantillonnage 12

I.2.Caractérisation des sols étudiés 13

I.2.1.Analyses physico-chimiques 13

I.2.2. Diagnostique microbiologique 15

I.3. Isolement et purification des bactéries hydrocarbonoclastes 15

I.4. Identification des isolats 16

I.4.1. Caractérisation morphologique 16

I.4.2. Caractérisation biochimique 17

I.4.3. Caractérisation moléculaire 20

I.6. Sélection des isolats 24

I.6.1. Effet des conditions physico-chimiques sur la dégradation des différentes fractions pétrolières 24

I.6.2. Interactions entre les isolats 24

I.7. Caractérisation des isolats sélectionnés 25

I.7.1. Détermination du potentiel dégradant 25

I.7.2. Mesure du pouvoir émulsifiant (E_{24}) 26

I.7.3. Détermination de l'hydrophobicité des parois cellulaires 27

I.8.1. Immobilisation des cellules bactériennes sur différents supports 28

I.8.2. Biodépollution des échantillons de sols pollués par les hydrocarbures pétroliers ...29

Patie II: Résultats et discussion

II. Résultats et discussion.....32

II.1.Caractéristiques des sols étudiés 32

II.1.1. Caractéristiques physico-chimiques des sols étudiés.....32

II.2. Caractéristiques des bactéries hydrocarbonoclastes isolées 39

II.2.1. Caractéristiques morphologiques.....39

II.2.2.Caractéristiques biochimiques 41

II.2.3. Identification moléculaire des isolats 42

II.2.4. Distribution des isolats.....45

II.3. Sélection des isolats compétents 47

II.3.1. Effets du pH et de la température sur la croissance des isolats 47

II.3.3. Effets du pH et de la salinité sur la croissance des isolats bactériens.....49

II.3.5. Interactions entre les souches sélectionnées 55

II.4. Potentiel dégradant des souches sélectionnées.....56

II.4.2. Taux de biodégradation du pétrole 58

II.4.3. Evolution du Potentiel d'hydrogène (pH).....60

II.4.4. Evolution de l'index d'émulsion E_{24} 61

II.4.5. Evolution de l'hydrophobicité cellulaire 63

II.5. Effets de l'immobilisation des isolats.....66

II.5.1. Effet de la nature du support d'immobilisation sur la biomasse bactérienne 66

II.5.2. Taux de dégradation du pétrole par les souches bactériennes immobilisées.....68

II.6. Biodégradation des hydrocarbures contminant le sol par les bactéries 69

Conclusion 32

Références bibliographiques 32

Annexes 32

Utilisation des souches bactériennes telluriques dans la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures pétroliers

Résumé

L'objectif de notre étude est d'évaluer le pouvoir des souches bactériennes hydrocarbonoclastes à dégrader les hydrocarbures pétroliers afin de traiter des milieux contaminés par ces polluants. Le séquençage de l'ADNr 16S a révélé que les 13 souches bactériennes isolées des sols sahariens pollués ou non par les hydrocarbures appartiennent à 9 genres présentent des potentialités de dégradation différentes. Leur distribution qualitative et quantitative dépend des conditions physico-chimiques des sites de prélèvement. Parmi les souches isolées, quatre ont été sélectionnées et testées séparément ou en consortium pour leur aptitude à dégrader le pétrole brut et à supporter les conditions expérimentales les plus difficiles. Ces souches sont toutes productrices de biosurfactants permettant l'assimilation des hydrocarbures. En milieu liquide, plus de 78.23% des hydrocarbures sont dégradés par *B.licheniformis* après 10jours de culture à 30°C en présence de 2% de pétrole suivie de *P.putida, A.calcoaceticus et R.equi* avec des taux de dégradation de 71.56%, 68.56% et 61.82% respectivement. De son coté, le consortium bactérien constitué de ces quatre souches a permis l'élimination de73.06% de pétrole. L'immobilisation des souches *A.calcoaceticus* et *R.equi* sur l'alginate a conduit à une meilleur élimination des polluants que celle des cultures libres. L'application du bioprocédé pour la bioremédiation des échantillons de sols contaminés par 30% de pétrole, en présence de consortium a aboutit au plus fort rendement d'élimination évalué à 68.17% en 8 semaines d'expérimentation, suivi de celui de *B.licheniformis* (63.85%), *P.putida* (61.71%), *A. calcoaceticus* (58.9%) et *R. equi* (53.22%). Les alcanes de courtes ou de longues chaines sont les plus rapidement dégradés suivis des HAP légers, des alcanes à chaines moyennes et des HAP lourds. Les souches testées montrent un effet dépolluant grâce à leurs potentialités métaboliques adaptatives *vis-à vis* des polluants hydrocarbonés. L'association de ces isolats en consortium a conduit à une meilleure dégradation du polluant pouvant être expliquée par une complémentarité métabolique entre elles.

Mots clés : bioremédiation, hydrocarbures pétroliers, ADNr 16S, souches bactériennes hydrocarbonoclastes, biosurfactants, alcanes, HAP.

الملخص

الهدف من دراستنا هو تقييم قدرة السلالات البكتيرية على تحلل المحروقات من أجل معالجة البيئات الملوثة بهذه المواد. كشف تحليل الجيني ADNr 16S أن 13 سلالة بكتيرية معزولة من التربة الصحراوية الملوثة أو لا بالهيدروكربونات البتروليه تنتمي إلى 9 اجناس لها إمكانات مختلفة لتحلل هذه الملوثات. يعتمد توزيعها النوعي والكمي على الظروف الفيزيائية والكيميائية لمواقع أخذ العينات. اربعة من بين هذه السلالات تم اختيارها و اختبار كفاءتها مفردة او مجتمعة لتحلل المحروقات . تنتج هذه السلالات جزيئات السطح تسهل استعمال الهيدروكربونات. في الوسط السائل فإن أكثر من 78.23٪ من الهيدروكربونات قد تحللت ب *B.licheniformis* بعد 10 أيام من التفاعل عند 30 درجة حرارة مئوية بوجود 2٪ من البترول متبوعة ب *P.putida* و *A.calcoaceticus* و *R.equi* بمعدلات تحلل لتقدر ب 71.56٪، و 68.56٪، و 61.82٪ على التوالي. ومن جانب اخر، فإن المجموع البكتيري الذي يتألف من هذه السلالات الأربع يسمح بنزع 73.06 ٪ من البترول. تثبيت السلالات البكتيريه *A.calcoaceticus* و *R.equi* على مادة alginate أدى إلى تحلل الملوثات بشكل أفضل من تلك التي تم الحصول عليها باستعمال الخلايا الحرة. تطبيق المعالجة الحيوية لعينات لتربة ملوثة بنسبة 30٪ من البترول الخام في وجود مجموع البكتيري بلعلى كفاءة لإزالة تقدر ب 68.17٪ بعد 8 أسابيع من التجربة، تليها (63.8) *B.licheniformis*، و *P.putida* (61.71٪) و *A.calcoaceticus* (58.9٪) و *R.equi* (53.22٪). بحيث ان سلاسل الألكان القصيرة أو الطويلة هي الأسرع تحللا تلي ها الهيدروكربونات العطرية البسيطه وا لألكانات ذات السلسلة المتوسطة ثم الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات، وتظهر السلالات المختبرة تأثيرا محللا بفضل قدراتها الأيضية التكيفية فيما يتعلق بالملوثات الهيدروكربونية. الجمع بين هذه السلالات أدى إلى تحلل أفضل لهذه المواد يمكن تفسيره بوجود تكامل أيضي بينها.

الكلمات المفتاحية : المعالجة الحيوية، محروقات، ADNr 16S ، سلالات بكتيرية ، جزيئات السطح ، ألكانات،محلله للمحروقات، هيدروكربونات عطرية متعددة الحلقات

Use of telluric bacterial strains in the bioremediation of soils polluted by petroleum hydrocarbons

Abstract

The objective of our study is to evaluate the ability of bacterial hydrocarbonoclast strains to degrade petroleum hydrocarbons in order to treat environments contaminated by these pollutants.The sequencing of 16S rDNA revealed that the 13 bacterial strains isolated from Saharan soils polluted or not by hydrocarbons belong to 9 genus have different potential for degradation. Their qualitative and quantitative distribution depends on the physicochemical conditions of the sampling sites. These strains produce biosurfactants for the assimilation of hydrocarbons. In liquid medium, more than 78.23% of the hydrocarbons are degraded by *B. licheniformis* after 10 days of culture at 30 °C in the presence of 2% of petroleum followed by *P. putida*, *A. calcoaceticus* and *R. equi* with degradation rates of 71.56%, 68.56% and 61.82% respectively. For its part, the bacterial consortium consisting of these four strains allowed the elimination of 73.06% of oil. The immobilization of *A.calcoaceticus* and *R. equi* strains on alginate led to a better elimination of pollutants than that of free cultures. The application of the bioprocess for the bioremediation of soil samples contaminated with 30% of oil, in the presence of a consortium, resulted in the highest removal efficiency estimated at 68.17% in 8 weeks of experimentation, followed by *B. licheniformis* (63.85%), *P. putida* (61.71%), *A. calcoaceticus* (58.9%) and *R. equi* (53.22%). Short or long chains alkanes are the most rapidly degraded followed by light PAHs, medium chains alkanes and heavy PAHs. The strains tested show a depolluting effect due to their adaptive metabolic potentialities to hydrocarbon pollutants. The combination of these strains in consortium led to a better degradation of the pollutant that can be explained by a metabolic complementarity between them.

Key words: bioremediation, petroleum hydrocarbons, 16S rDNA, bacterial hydrocarbonoclast strains, biosurfactants, alkanes, PAHs.

Introduction générale

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 (Mendelssohn *et al.*, 2012 ; Gabet, 2004).

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 immunotoxicants, cancérogènes, mutagènes et classés comme priorité environnementale par l'USEPA (Environmental Protection Agency des États-Unis) (Widdel et Grundmann, 2010).

Ces polluants persistants, répondent à différents critères: bioaccumulation (liposolubilité), persistance et toxicité. La liposolubilité des hydrocarbures entraîne une perméabilisation non spécifique des membranes biologiques, et donc un disfonctionnement des cellules, pouvant aller jusqu'à leur lyse (Heipieper et Martinez, 2010). Leur toxicité est bien connue, notamment du fait de leur incidence dans l'atmosphère et l'alimentation et de leurs conséquences sur la santé humaine (Mao-cheng *et al*., 2014).

Les sols contaminés par les hydrocarbures présentent un danger lors d'un contact direct avec l'Homme ou l'animal ou lors de leur transfert dans les chaines alimentaires. C'est le phénomène de bioaccumulation avec le piégeage par les végétaux et les animaux des polluants ou de leurs produits de dégradation jusqu'à des teneurs atteignant les seuils de toxicité (Scriban, 1999).

Les écosystèmes détruits et les risques pour la santé sont à l'origine de l'accent mis sur la nécessité de nettoyer et de remédier le sol et l'eau, ce qui a incité de nombreux chercheurs à développer des stratégies de dépollution de l'environnement (Boll et Heider, 2010 ; Tierney et Young, 2010).

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-Serena, 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'écrémage 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).

Le principe de bioremédiation microbienne repose sur l'utilisation des capacités intrinsèques des microorganismes à métaboliser les polluants organiques (Gan *et al.*, 2009). Elle peut se faire *in-situ* en introduisant dans le sol les éléments nécessaires au développement

de la biomasse, *ex-situ* en traitant le sol excavé ou *hors site* nécessitant une excavation et le transport des terres vers un centre de dépollution (Christian, 2006).

Il existe aujourd'hui plusieurs approches de bioremédiation, celles qui utilisent directement les capacités métaboliques des microorganismes présents dans les environnements pollués, et qui correspondent à l'atténuation naturelle et à la biostimulation et celles qui reposent sur l'introduction dans ces sols de microorganismes présentant les capacités métaboliques nécessaires à la dégradation des polluants présents, que l'on nomme la bioaugmentation (Andreoni et Gianfreda, 2007).

Parmi les techniques biologiques innovantes, certaines sont commercialisées tout en faisant l'objet de travaux de recherche et développement en vue d'améliorer les conditions d'utilisation et d'optimiser les performances, d'autres n'ont pas dépassé le stade expérimental et sont étudiées soit en laboratoire, soit dans des serres, ou font l'objet d'essais sur le terrain (chantiers expérimentaux, sites pilotes) (Kuony, 2005).

La microbiologie de la dégradation des hydrocarbures qui entraine la conversion d'une substance organique en dérivés ultimes organiques et inorganiques chimiquement distincts de la substance initiale est un domaine de recherche en plein développement. C'est à la fois le devenir dans l'environnement de ces composés ubiquistes, génotoxiques et persistants et l'utilisation de procédés microbiologiques de dépollution qui motivent cet intérêt.

La biodégradation primaire ou biotransformation a été définie comme la perte de l'identité chimique du produit initial et la biodégradation ultime (minéralisation) comme la formation de biomasse microbienne et de produits finaux inorganiques à partir d'une substance chimique (Forbes et Forbes, 1997). Les produits de dégradation primaire peuvent persister longtemps dans l'environnement. Ces derniers peuvent être inoffensifs ou parfois plus toxiques que le polluant initial (Kaufmann, 2004).

Le processus de bioremédiation, approprié aux microorganismes est essentiel pour la biotransformation et la biodégradation du polluant. Différentes espèces microbiennes possèdent différentes voies de dégradation (Raden *et al*., 2015). Dans l'environnement, la bactérie joue un rôle important dans la dégradation des polluants organiques, surtout

certaines espèces appartenant aux genres: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Archrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Actinomycetes*, *Nocardia*, *Aureobasidium*, *Rhodotorula* et *Sporobolomyces* (Soltani, 2004). En outre, certaines espèces fongiques telles que celles appartenant aux genres *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium* , *Penicilium* et *Candida* sont également des micro-organismes dégradants les hydrocarbures (Abioye *et al*., 2012 ; Sharon *et al*., 2014). Ils se retrouvent dans différents environnements ayant habituellement connu un épisode de contamination des eaux, des sols, des boues activées, des déchets industriels…etc. Ils ont même été rencontrés dans les écosystèmes extrêmes comme les régions polaires (et Piquet *et al*., 2010) , ainsi que les régions tempérées (Elshafie, 2007), les déserts (Abed *et al*., 2010 ; Andrew *et al*., 2012), les environnements hypersalins (Schneider et *al*., 2013) ou les sources chaudes (Liu et *al*., 2006 ; Zeng et *al*., 2013).

Les bactéries restent qualitativement et quantitativement prépondérantes pour métaboliser les hydrocarbures (MacNaughton *et al*., 1999). Lorsque l'on nomme les bactéries hydrocarbonoclastes, presque tous les clades phylogénétiques sont représentés. Ainsi, on retrouve aussi bien des bactéries à Gram négatif que des bactéries à Gram positif (Techer, 2011) qui agissent en aérobiose et en anaérobiose (Roger et Jacq, 2000).

La biodégradation des composés pétroliers passe par trois processus. Après l'adsorption des composés du pétrole à la surface de la paroi microbienne, ils vont être transférés à travers la membrane cellulaire et vont ensuite pénétrer dans la cellule microbienne où ils seront dégradés en divers petites molécules (Dahalan *et al*., 2013). Cependant, la croissance des microorganismes sur ces polluants pose un problème, car la plupart des hydrocarbures sont immiscibles dans l'eau. Beaucoup de bactéries sont capables d'émulsifier les hydrocarbures en solution en produisant des agents tensio-actifs tels que les biosurfactants qui augmentent l'adhésion des cellules au substrat (Pérez-Pantoja *et al*., 2010 ; Yadav *et al*., 2016).

Les biosurfactants sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe non polaire. Généralement, le groupement hydrophile est constitué d'acides aminés, peptides ou de polysaccharides (mono ou di) ; le groupement hydrophobe est constituée d'acides gras saturés ou non saturés (Das *et al.*, 2009). Les principales classes de biosurfactants à faible poids moléculaire sont : les glycolipides, les

lipopeptides et les phospholipides, tandis que ceux à poids moléculaire élevé comprennent les polymériques (Banat *et al.*, 2000).

La plupart des biosurfactants issus de diverses sources microbiennes sont soit anionique, cationique ou neutre et la fraction hydrophobe est basée sur une longue chaîne d'acides gras ou dérivés d'acides gras, tandis que la portion hydrophile peut être un glucide, un acide aminé, un phosphate ou un peptide cyclique (Nitschke et Coast, 2007; Geys *et al.*, 2014). Ils réduisent la tension superficielle en s'accumulant à l'interface des fluides immiscibles conduisant à l'augmentation de la surface des composés insolubles, à une biodisponibilité accrue et à une biodégradation ultérieure des hydrocarbures (Samaei *et al*., 2012).

Les biosurfactants possèdent d'autres rôles aussi importants que l'émulsification telle que l'adhésion aux surfaces solides et la formation de biofilms (Kim *et al*., 2006). L'activité bactéricide (gramicidine, polymexine, surfactine), la pathogénicité de certaines bactéries (rhamnolipides) ainsi que le piégeage des métaux lourds ont aussi été attribués à ces molécules (Vandecasteele, 2008).

Ces tensioactifs sont reconnus pour être non toxiques, biodégradables et peuvent être utilisés dans des conditions extrêmes (Banat *et al.*, 2000). C'est pourquoi ils peuvent être utilisés dans de nombreux domaines. Ils sont principalement utilisés par l'industrie pétrochimique et dans le domaine de la protection de l'environnement, en les impliquant dans la dépollution marine et des sols contaminés par les hydrocarbures (Lang et Wallbrant, 1999 ; Christofi et Ivshina, 2002).

Plusieurs familles d'hydrocarbures regroupent des composés pétroliers, parmi lesquels, des alcanes linéaires, ramifiés, cycliques et des composés mono- et poly-aromatiques. D'un point de vue chimique, les hydrocarbures sont des molécules relativement stables, énergétiquement riches et représentent des sources potentielles de carbone et d'énergie importantes pour les microorganismes (Widdel et Musat, 2010).

Callaghan *et al*., (2010) ont montré que la manière de dégradation de toutes sortes de composés pétroliers est un processus d'oxydation. Les voies de dégradation de ces composés sont différentes, en raison de leurs différentes structures (Boll et Heider, 2010 ; Tierney et

Young, 2010). L'étape initiale fait intervenir une grande diversité d'enzymes qui diminuent la barrière énergétique de la réaction. L'oxydation aérobie des hydrocarbures avec le dioxygène comme accepteur d'électron et co-substrat d'activation, fournit la plus grande quantité d'énergie d'un point de vue biochimique (Widdel et Musat, 2010).

Le pétrole brut, étant un mélange très complexe d'hydrocarbures et d'autres molécules, génère des stress très disparates dépendant des propriétés physico-chimiques diverses de ces composés ayant également des potentiels de dégradabilité variés. Leur structure moléculaire varie et influe sur les propriétés de ces hydrocarbures (Tarayre, 2012). Il est admis de façon générale que l'augmentation du nombre de carbone, rend les hydrocarbures moins bio- disponibles, moins volatiles et moins solubles (plus hydrophobes) ayant tendance à s'adsorber plus facilement, bien que le degré d'aromaticité, la position des cycles et des branchements peuvent modifier cette règle générale (Harms *et al.,* 2010).

Selon Parales *et al*.(2000), la biodégradation des hydrocarbures saturés est essentiellement un processus aérobie réalisé par des bactéries. Les alcanes à chaînes moyennes sont utilisés notamment par des espèces de bactéries du genre *Pseudomonas* telle que *P. putida* qui a été particulièrement étudiée (Vandecasteele, 2005). Les alcanes à chaînes longues sont très bien utilisés par les microorganismes, plus rapidement que les alcanes moyens (Head et *al*., 2006). Les bactéries remplissant ce rôle appartiennent en particulier aux groupes des *Corynebacterium, Mycobacteruim* et *Nocardia*, notamment au genre *Rhodococcus,* c'est le cas de la souche *Rhodococcus* Q15 capable d'utiliser une large gamme des alcanes (C_{10} à C_{21}) et à des températures allant de 0°C à 30°C, (Whyte *et al*., 1998). De plus, les alcanes à très longue chaîne ($>C_{20}$) sont également dégradés par les microorganismes (Ballerini et Vandecasteele, 1999). En revanche, les alcanes de plus courtes chaînes sont toxiques et plus difficilement biodégradables (Watkinson et Morgan, 1990).

Le processus de dégradation de l'alcane par les microorganismes peut être classé en trois formes: L'oxydation sous-terminale, les hydroperoxydes d'alkyle et la dégradation de cyclohexane (Rodriguez-Blanco *et al*., 2010). Fondamentalement, l'alcane est catalysé par certaines enzymes (oxydases, déshydrogénases…etc.). Les microorganismes hydrocarbonoclastes les transforment en acides gras qui seront métabolisés progressivement en cycle acyl-COA et interviennent dans le cycle de Krebs du métabolisme microbien et

donnent éventuellement du CO_2 et de l'H_2O (Teli *et al*., 2013). Dans ce processus, les enzymes comme l'alcane mono-oxygénase, l'alcool déshydrogénase, l'aldéhyde déshydrogénase ...etc jouent un rôle important dans la catalyse du processus de dégradation.

Comme pour l'alcane, le principe de la dégradation biologique du cycloalcane est également une oxydation sous-terminale. Au début, le cycloalcane est oxydé en alcools par différents types d'enzymes oxydantes. Ensuite, les alcools sont transformés en cétones par déshydrogénation. Plus tard, la cétone est oxydée par estérase en acide gras (Mallick et *al*., 2007).

Les souches aérobies dégradant les alcanes et les cycloalcanes appartiennent à divers genres de bactéries à Gram positif, à savoir *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* (Sharma et Pant, 2000) et à Gram négatif, tels que *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Burkholderia* et *Paracoccus* (Wentzel *et al.*, 2007).

En aérobiose, la plupart des voies cataboliques des hydrocarbures aromatiques convergent vers des intermédiaires hydroxylés tels que les catéchols ou leurs dérivés (protocatéchuate, gentisate) (Rodriguez-Blanco *et al*., 2010). La dégradation des HAP est rendue possible par deux étapes clés qui consistent en l'incorporation d'oxygène dans le noyau aromatique, permettant l'activation et le clivage du cycle aromatique. Ces deux opérations sont catalysées par des enzymes de type dioxygénase catalysant l'incorporation de deux atomes d'O_2 dans une molécule d'HAP. Il existe deux type de dioxygénases : celles qui hydroxylent le noyau aromatique et celles qui clivent le noyau aromatique (Kuony, 2005).

En absence d'oxygène, les bactéries métabolisent les HAP par voie anaérobie, mais beaucoup plus lentement qu'en aérobiose. Peu d'études décrivent les voies métaboliques impliquées dans cette dégradation. Les microorganismes utilisent majoritairement le nitrate et le sulfate comme accepteurs d'électrons (Gibson and Harwood, 2002; Meckenstock *et al.*, 2004).

Généralement, en raison de la structure complexe des composés du pétrole, le taux d'efficacité de dégradation est faible. Ce taux pourrait être amélioré avec d'autres composés du co-métabolisme (Head *et al.*, 2006; Dash *et al*., 2013).

La biodégradation totale d'un hydrocarbure pétrolier n'est possible que grâce à la mise en place d'un consortium bactérien (Mazzeo *et al*., 2010). Ce consortium comprend des groupes dont les équipements enzymatiques complémentaires permettent la dégradation quasi-totale de ces différents types d'hydrocarbures (Head *et al.*, 2006). Un consortium est constitué d'une collection de différentes populations occupant le même habitat et interagissant positivement ou négativement (Vandecasteele, 2008).

Les microorganismes peuvent seulement faire les choses pour lesquelles ils ont une « programmation » génétique. Ils ne peuvent pas tout faire et l'environnement demeure un facteur déterminant de la réaction pouvant être effectuée par un organisme apte à le faire. Par conséquence, il n'est pas garanti qu'un composé soit dégradé dans un environnement particulier (Lucas, 2007). Un organisme susceptible de dégrader doit d'abord être présent, ensuite une opportunité doit exister pour que les enzymes nécessaires soient synthétisées et enfin, les conditions environnementales doivent être appropriées pour que les réactions enzymatiques s'effectuent à une vitesse significative (Gaudu, 2014).

Le recrutement des voies métaboliques, présentes dans le génome mais non exprimées, peut se faire par des évènements de mutation ponctuelle, de réarrangement génétique ou de transposition . Les microorganismes peuvent aussi acquérir des clusters de gènes cataboliques *via* des éléments mobiles transférés d'un hôte donneur à un hôte receveur (Florence, 2011).

Les gènes codant les arènes dioxygènases peuvent être portés sur le chromosome bactérien ou sur des plasmides (Kasai *et al.*, 2003). Ceux présents sur les chromosomes peuvent résulter de la recombinaison des plasmides qui sont dits des plasmides d'incompatibilité. Chaque plasmide porte l'ensemble des gènes codant les voies de dégradation d'un composé aromatique. Il existe de nombreux plasmides possédant des gènes codant pour des enzymes de dégradation, comme *pDTG1*, *Nah7* ou *pWW0*. Ces derniers présentent de fortes similarités au niveau de l'organisation (Dennis et Zylstra, 2004 ; Louvel, 2010). Les plasmides possédant les gènes de dégradation peuvent être échangés entre les bactéries par des transferts horizontaux (Ni et *al.*, 2006). Cette capacité d'échange suggère que sous la pression de sélection de l'environnement, comme dans le cas d'une contamination aux hydrocarbures, les bactéries sont capables d'acquérir du matériel génétique puis d'initier

l'ouverture des cycles aromatiques. Les mécanismes de conjugaison sont supposés être à l'origine de l'ubiquité des gènes de dégradation dans les écosystèmes (Wilson et *al*., 2003).

Le gène alcane monooxygénase *AlkB* et le gène naphtalène dioxygénase *Nah* sont les gènes prédominants correspondant aux hydroxylases impliquées dans la première étape de métabolisme des alcanes et des hydrocarbures aromatiques respectivement (Lui *et al.*, 2015). Des études antérieures ont rapporté que des micro-organismes indigènes exprimant ces gènes cataboliques sont capables de dégrader le pétrole dans les sols contaminés, même dans des conditions environnementales extrêmes (Jesus *et al*., 2015 ; Lui *et al.*, 2017). Il a été montré que les gènes des dioxygénases sont positivement corrélés avec le nombre de micro-organismes pouvant dégrader les HAP et à la dégradation l'hexadécane et le naphtalène (Yang *et al*., 2015).

La compréhension des relations existantes entre l'expression des gènes et la biodégradation des hydrocarbures est importante pour prédire les effets potentiels de contamination des écosystèmes par le pétrole et la capacité métabolique des microorganismes aérobies du sol à les éliminer.

La biodégradation microbienne joue donc un rôle majeur dans la détermination du devenir du pétrole dans les écosystèmes pollués (Lovley, 2003). Le développement des connaissances de l'écologie des micro-organismes hydrocarbonoclastes des écosystèmes complexes, notamment par la compréhension des facteurs qui influent sur leur dynamique et leur rôle dans la dégradation des hydrocarbures est primordiale afin d'évaluer le devenir de ces contaminants et pour la préservation de ces écosystèmes (Callaghan *et al*., 2006).

L'atténuation des hydrocarbures dépend de plusieurs facteurs physico-chimiques. Ces facteurs semblent contrôler les besoins énergétiques et nutritionnelles des communautés microbiennes et en même temps la disponibilité des polluants aux microorganismes du sol (Erickson *et al.*, 2006). Les bactéries inoculées aux sols sont souvent incapables de dégrader les polluants suite à une utilisation préférentielle d'autres composés organiques et surtout à une inaccessibilité physique de ces polluants (Devare et Alexander, 1995).

La protection physique de ces polluants au sein des agrégats du sol rend les bio-traitements *in situ* souvent inefficaces même après l'amélioration des conditions physico-

chimiques tels l'addition d'oxygène, des nutriments et de l'eau pour stimuler l'activité microbienne (Morgan et Watkinson, 1992). La structure du sol contrôle à la fois la distribution des microorganismes et des matières organiques et xénobiotiques, et par conséquent, les processus de biodisponibilité des polluants dans le sol (JocteurKukkonen et Landrum, 1996). Ainsi, le succès de la bioremédiation va dépendre de la nature des hydrocarbures et de la nature du sol. Les propriétés du sol telles que la concentration en matière organique et son degré de maturation, la structure ou bien la taille des particules (texture) influencent aussi le taux de dégradation (Gabet, 2004).

D'autre part, la biodégradation dépend également de la présence de microorganismes indigènes susceptibles de métaboliser les hydrocarbures. Les facteurs environnementaux sont également à considérer lors d'un traitement de bioremédiation. Pour cela, certaines conditions du milieu comme la température, l'humidité relative et les conditions d'oxygénation sont souvent optimisés lors des traitements *in situ* afin de stimuler la microflore endogène ou la microflore inoculée (Song et Bartha, 1990 ; Johnson et Scow, 1999). En effet, la présence et l'activité de ces microorganismes compétents sont contrôlés par les conditions de leur environnement mais aussi par la disponibilité du substrat (Horinouchi *et al.*, 2000). La différence dans l'activité de ces bactéries dépend également de leur distribution au sein des agrégats et de leur localisation dans le sol (Lee et Foster, 1991).

Dans ce contexte et devant le manque de travaux sur l'aptitude des microorganismes telluriques sahariens à dégrader les polluants hydrocarbonés, nous avons entrepris cette étude sur des bactéries isolées des sols sahariens pollués ou non afin de rechercher leur caractère hydrocarbonoclaste dans des conditions de température, de salinité et de pH variables. L'implication de ces bactéries dans un procédé de biodépollution et la recherche d'éventuelles synergies établies dans un consortium bactérien, permettant l'optimisation de la biodégradation des contaminants ont aussi fait l'objet de notre travail.

Pour une meilleure compréhension de nos isolats, des analyses physicochimiques et microbiologiques des échantillons de sols ont été effectuées pour avoir des données préliminaires sur l'état des microenvironnements des communautés microbiennes telluriques et de déterminer les relations pouvant exister entre celles-ci et le polluant.

La sélection des souches bactériennes ayant présenté une bonne croissance en présence du pétrole brut a fait l'objet de la seconde partie de notre travail. Les isolats ayant été préalablement caractérisés par des études morphologique, biochimique et moléculaire.

Parmi les isolats bactériens caractérisés, ceux ayant montré leur tolérance aux conditions de température, de salinité et de pH fixés par l'étude ont été sélectionnés pour être impliqués individuellement ou en consortium dans les bioprocédés de dépollution.

L'évaluation de l'aptitude des souches bactériennes sélectionnées à métaboliser les hydrocarbures pétroliers est rendue possible par la quantification du carbone organique total et l'analyse chromatographiques (GC-MS et GC-FID) des fractions résiduelles et de métabolites retrouvés dans les échantillons bioaugmentés.

Toutes ces étapes sont réalisées afin de répondre à la question suivante :

La bioaugmentation des sols pollués par les hydrocarbures pétroliers avec des souches bactériennes sahariennes hydrocarbonoclastes et leur biostimulation peuvent elles présenter une bonne alternative pour leur restauration ?

Partie I:

Méthodologie

L'objectif principal 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 sols pollués par les hydrocarbures pétroliers. Le principe étant basé sur la dégradation ou l'oxydation partielle ou totale des polluants hydrocarbonés en des molécules moins toxiques par l'intervention de cellules bactériennes comportant le matériel nécessaire pour cette fonction.

I. Méthodologie

Les expériences de notre recherche sont réalisées au niveau du laboratoire de Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi Arides et des laboratoires pédagogiques de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla, du laboratoire de Biologie Moléculaire de l'Université de Rennes I (France) et du laboratoire de la Société Nouvelle des Produits Chimiques (Tunisie).

La réalisation du travail est effectuée suivant deux grands axes ; la recherche des souches bactériennes compétentes dans la dégradation des hydrocarbures et le bio-traitement des échantillons de sols pollués par les souches sélectionnées.

I.1. Echantillonnage

Les échantillons de sols utilisés pour notre expérimentation sont prélevés de plusieurs sites contaminés ou non par les polluants pétroliers. Il s'agit du bourbier de Hassi Messaoud (sol I) dont l'âge de contamination est de 2 ans, le bourbier de Haoud Berkaoui (sol II) datant de 7 mois, du sol de Bamendil (sol III) accidentellement pollué depuis 6 ans et des échantillons non pollués provenant de Bamendil (sol IV) et de l'exploitation agricole de la Faculté SNV (sol V) (Figure 1).

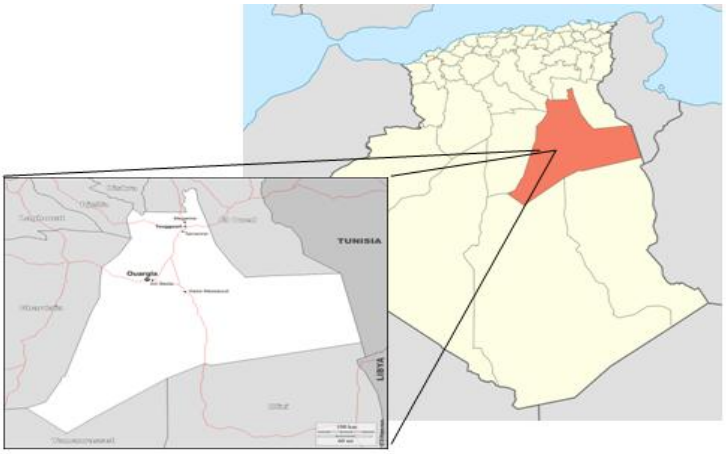


Figure 1: Localisation des sites d'étude (google maps)

L'échantillonnage est effectué de façon aléatoire à l'aide d'une spatule stérile à une profondeur de 20 cm. Chaque échantillon de sol prélevé est conservé dans des flacons en verre stériles à 4°C (Fardoux *et al*, 2000).

I.2.Caractérisation des sols étudiés

Dans le but de déterminer les conditions des microenvironnements des communautés microbiennes des sols étudiés des analyses physico-chimiques et un diagnostique microbiologique ont été effectués.

I.2.1.Analyses physico-chimiques

I.2.1.1.Analyse granulométrique

La texture d'un sol est révélée par son analyse granulométrique dont le principe est basé sur la vitesse de sédimentation des particules séparées et dispersées après destruction de la matière organique par une attaque à l'eau oxygénée. Le fractionnement de ces particules se fait par l'intermédiaire de la pipette de Robinson qui permet la détermination des fractions argileuses et limoneuses fines. Ensuite, les sables fins et les sables grossiers sont mesurés par tamisage (Baize, 2000).

I.2.1.2.Humidité

L'humidité est déterminée par la méthode gravimétrique selon la norme NF ISO 1146. Elle est exprimée en % c'est-à-dire en gramme d'eau pour 100 g de sol déshydraté à 105°C.

I.2.1.3.Potentiel d'hydrogène (pH)

Le pH est déterminé selon la norme AFNOR X 31-103 (AFNOR, 1994) par la mesure du pH d'une suspension de sol dans l'eau à 2/5 (rapport masse/volume) après 1 heure d'agitation puis décantation. Le pH mètre utilisé est de type Inolab MLM.

I.2.1.4.Conductivité électrique (CE)

La conductivité électrique est mesurée à l'aide d'un conductimètre sur une suspension de sol dans l'eau à 1/5 (rapport masse/volume). Elle doit être exprimée en dicisiemens par mètre (ds/m) (Baize, 2000).

La conductivité électrique est traduite par la concentration des sels dissous dans l'eau. Elle est souvent utilisée pour le contrôle de la qualité du sol (Satin, 1999).

I.2.1.5. Teneurs des échantillons en hydrocarbures totaux

La quantité des hydrocarbures pétroliers présents dans les échantillons de sols étudiés est évaluée après leur extraction. Dans un flacon de 60 ml, une masse de 20 g de sol et 20ml de solvant d'extraction (le dichlorométhane) sont mélangés. Les flacons sont agités pendant 20 minutes et décantés pendant 1 heure. Le surnageant est ensuite prélevé et filtré à travers un filtre de 4 cm de diamètre et de 2µm de porosité. Le filtrat obtenu est analysé par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) de type PERKIN ELMER modèle CLARUS 580, équipé d'une régulation électronique des pressions ; d'un passeur d'échantillons (Autosampler) ; d'un injecteur split/splitless programmable en température ; d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) ; d'une Colonne PE 5MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 micron. Le Pilotage et le traitement des données se font par le logiciel TotalChrom.

I.2.2. Diagnostique microbiologique

Le diagnostique microbiologique nous permet de mettre en évidence la microflore bactérienne tolérant les hydrocarbures existante dans les échantillons de sols étudiés contaminés ou non et de sélectionner des bactéries présentant un bon pouvoir dégradant les polluants hydrocarbonés.

I.2.2.1. Dénombrement de la flore bactérienne tolérant les hydrocarbures

Afin de dénombrer la microflore bactérienne aérobie mésophile tolérant les hydrocarbures existante dans les différents échantillons de sols, nous avons procédé à une culture sur milieu M63 solide auquel sont additionnés 60µl de pétrole brut dans chaque boite de Pétri. Pour se faire, une série de dilutions de la suspension de sol allant de 10^{-1} à 10^{-6} a été préparée. Le dénombrement après culture, concerne évidement les cellules viables de l'échantillon, autrement dit, les cellules capables de croitre et de donner des colonies visibles à l'œil nu. Parmi ces bactéries, celles ayant la capacité de dégrader les hydrocarbures sont recherchées. Ainsi, la la charge microbienne est déterminée par comptage des colonies et les résultats sont exprimés en UFC (nombre d'Unités Formant Colonies)/ g de sol selon la formule ci-dessous. Seules les boîtes contenant entre 15 et 150 colonies au niveau de deux dilutions successives sont retenues pour le dénombrement (Dutruc-Rosset, 2003).

$$\mathbf{N = \Sigma\ colonies\ /\ Vml\ x\ (n1\ x\ 0{,}1n2)\ xd_1}$$

Où **N** correspond au nombre d'UFC par millilitre d'eau ; **Σcolonies** est la somme des colonies des boîtes interprétables; **V**: Volume de la solution déposée (ml); **n1** : nombre de boîtes considérées à la première dilution retenue; **n2**: nombre de boîtes considérées à la seconde dilution retenue et **d1** : Facteur de la première dilution retenue.

I.3. Isolement et purification des bactéries hydrocarbonoclastes

Afin d'isoler des souches bactériennes hydrocarbonclastes à partir des échantillons de sols étudiés, nous avons effectué un enrichissement en ajoutant à 5 g de sol contenu dans 45 ml de milieu liquide M63 un volume de 5 ml de pétrole. Ces cultures sont incubées pendant une semaine sous agitation à 150 tr/min à 30°C. Après la période d'incubation, l'isolement est effectué sur boites de Pétri, chacune contenant 20 ml de milieu M63 solide plus 60µl de

pétrole brut. Les boites sont incubées pendant une semaine à 30°C. Les colonies apparues sont purifiées plusieurs fois sous les mêmes conditions.

I.4. Identification des isolats

Les souches isolées et purifiées ont été repiquées sur un milieu solide LB (Luria-Bertani) et incubées pendant 1 ou 2 jours à 30°C. L'identification des souches isolées est réalisée en tenant compte des caractéristiques morphologiques, biochimiques et moléculaires.

I.4.1. Caractérisation morphologique

I.4.1.1. 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), l'identification macroscopique concerne :

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

I.4.1.2. Aspect microscopique

a- Mobilité à l'état frais

L'état frais permet de déterminer la mobilité éventuelle des cellules. À partir d'une culture en début de phase stationnaire, un prélèvement de 10 µl de la suspension bactérienne est déposé entre lame et lamelle puis directement observé au microscope optique au grossissement 400. Les bactéries sont considérés comme mobiles lorsque des trajets très différent sont observés (déplacement dans toutes les directions) (Delarras, 2008).

b- Coloration de Gram

La coloration de Gram est une double coloration qui nous permet de connaître la forme, l'arrangement, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées. Cette coloration est réalisée systématiquement sur les différentes colonies purifiées pour préciser le caractère Gram+ ou Gram-. Avec cette coloration double, les bactéries Gram positif apparaissent en violet foncé tandis que celles de Gram négatif sont colorées en rose ou en rouge (Delarras, 2008).

I.4.2. Caractérisation biochimique

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

La galerie API E comprend 20 microtubes contenant des substrats déshydratés auxquels sont ajoutées des suspensions bactériennes. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique (Delarras, 2008).

I.4.2.1. Étude des enzymes respiratoires

a- Recherche de la catalase

La catalase a la propriété de décomposer l'eau oxygénée avec dégagement d'oxygène. C'est l'action directe de l'enzyme qui est mise en évidence dans la masse bactérienne. On prend une goutte d'eau oxygénée (H_2O_2) à 10 volumes qu'on dépose sur une lame avec une colonie bien distincte de culture jeune de 24 h. Le dégagement immédiat de bulles d'oxygène exprime la présence d'une catalase (Garnier et Denis, 2007).

b- 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).

I.4.2.2. Métabolisme des glucides

a- Utilisation des sucres (D.Glu, D.Sac, D.Ara)

L'utilisation d'un glucide (ose, diholoside, polyoside) par une cellule bactérienne se traduit par une acidification du milieu par le CO_2 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).

b- Recherche de la β-galactosidase ou de l'ONPG - hydrolase

Pour dégrader activement le lactose, le microorganisme doit posséder deux enzymes ; la perméase et la β-galactosidase. L'ONPG (orthonitrophényl-*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).

c- Recherche de la Citrate perméase

Pour la mise en évidence de la citrate perméase, le milieu utilisé est le citrate de Simmons (de couleur verte), qui ne contient comme seule source de carbone que le citrate de sodium. Seules les bactéries possédant une enzyme citrate perméase seront donc capables de se développer sur ce milieu. L'utilisation du citrate provoque l'alcalinisation du milieu selon la réaction suivante (Marchal et Bourdon, 1982) :

$$\textbf{Citrate} + 3H_2O \xrightarrow[\textbf{Citrate perméase}]{} \textbf{Acide citrique} + 3OH^-$$

d- 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- naphtol pour donner un composé rouge (Joffin et Leyral, 2006).

e- Test de 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 de la mobilité des bactéries. La fermentation du Mannitol entraîne le virage du milieu au jaune et les souches mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement (Marchal et Bourdon, 1982).

I.4.2.3. Étude du métabolisme protéique

a- Recherche des décarboxylases (ODC, LDC, ADH)

Les décarboxylases scindent les acides aminés entraînant la formation de l'amine correspondant avec la libération de CO_2. Il s'agit d'enzymes induites dont la synthèse est favorisée par un pH acide compris entre 3.5 et 5.5 en conditions d'anaérobiose (Marchal et Bourdon. ,1982). Les décarboxylases recherchées sont:

- **Lysine décarboxylase (LDC)** dont la présence est mise en évidence par la décarboxylation de la lysine et sa transformation en cadavérine.

- **Ornithine décarboxylase (ODC)** dont la présence est mise en évidence par la décarboxylation de l'ornithine et sa transformation en putrescine.

- **Argenine dihydrolase (ADH)** dont la présence est mise en évidence par la décarboxylation de l'arginine et sa transformation en ornithine.

b- Production de sulfure d'hydrogène (H_2S)

Ce test est utilisé pour détecter la production de gaz de H_2S lors de fermentation chez certains microorganismes. Elle est révélée par les ions F^{3+} qui forment avec le sulfure d'hydrogène un précipité noire de sulfure de fer (Joffin et Lyeral, 2006).

c- Production d'indole

Le test d'indole est recherché pour déterminer la capacité des microorganismes de convertir le tryptophane à 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).

d- Recherche de la tryptophane-désaminase (TDA)

La tryptophane- désaminase (TDA) agit sur le L- tryptophane en donnant l'acide indol-pyruvique. Ce dernier donne, avec le perchlorure de fer une coloration brune (Joffin et Lyeral, 2006).

e- Recherche de la gélatinase (Collagénase)

La gélatine peut être incorporée dans un milieu de culture afin de mettre en évidence sa dégradation par certaines bactéries possédant une gélatinase ; c'est le test de gélatinase. Cette enzyme hydrolyse le collagène en acides aminés ou en peptides (Joffin et Lyeral, 2006).

I.4.3. Caractérisation moléculaire

L'analyse de l'ADNr 16S a été effectuée pour la caractérisation taxonomique des souches bactériennes hydrocarbonoclastes isolées des échantillons de sols étudiés.

II.4.3.1.Extraction de l'ADN totale

L'extraction de l'ADN est effectuée selon la méthode de par Gevers et *al*. (2001). Les colonies isolées ont été reprises dans 1 ml d'eau distillée stérile, centrifugées et congelées pendant 1 heure à - 20°C. Le culot est lavé par 1 ml de tampon TES (6,7% (p/v) de

saccharose, 50 mM Tris - Hcl (pH 8,0), EDTA 1 mM) et remis en suspension dans 300µl de tampon STET (8% (p/v) de saccharose, 5% de Triton X - 100, 50 mM Tris - HCl (pH 8,0), 50 mM EDTA). La lyse est effectuée en ajoutant au milieu réactionnel 75µl de tampon de lyse (TES contenant 1330 U/ml mutanolysine et 40 mg/ ml de lysozyme) et l'ensemble est incubé à 37°C. Après addition de 40µl de solution de SDS 20% préchauffé (37°C) dans le tampon TE (10 mM Tris- HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) et de billes de verre, les cellules sont agitées au vortex pendant 60s et incubées à 37°C pendant 10 min, puis à 65°C pendant 10 minutes. Un volume de 100µl de tampon TE est ajouté et le lysat est extrait avec 1 volume du mélange phénol/chloroforme/alcoolisoamylique. Les phases sont séparées par centrifugation (12.000 g, 10 min). La phase aqueuse est soigneusement mélangée avec 70 µl de NaCl 5 M et 1 ml d'isopropanol. L'ADN est précipité dans la glace pendant au moins 15 min et recueilli par centrifugation (12.000 g, 10 min) et le culot est lavé à l'éthanol 70% à froid. Le culot d'ADN est finalement dissout dans 50 µl d'eau distillée et stocké à -20° C.

I.4.3.2.Amplification du gène ADNr16S

L'amplification du gène ciblé (ADNr16S) est réalisée dans un volume total de 50µl (50ng d'ADN génomique, 5µl de tampon 10X, 0,5µl de Taq Polymérase, 2,5µl de chaque amorce à 10µM et 2µl de dNTP. Ce gène a été amplifié en suivant la méthode décrite par Lane,(1991) en utilisant les amorces spécifiques au domaine avant, Bac27_F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et l'amorce inverse universelle Uni_1492R (5'-TACGYTACCTTGTTACGACTT-3'). Le programme de PCR suit plusieurs étapes :

- Dans un premier temps, la matrice d'ADN et tout le mélange réactionnel est à température ambiante, à ce moment l'ADN bicaténaire est sous sa conformation en double hélice.

- Avant de commencer les cycles de PCR proprement dit, une étape de chauffage à 94 ou 95 °C dite, étape de dénaturation initiale, qui dure généralement 10 à 15 minutes est réalisée. A cette température, les liaisons hydrogène, qui maintiennent l'ADN double brin, sont rompues. A la fin de cette étape, on obtient de l'ADN simple brin, prêt pour l'hybridation avec les amorces d'oligonucléotides. A partir de ce moment, les *n* cycles de PCR sont lancés. Chaque cycle est composé de 3 étapes qui se déroulent successivement en boucle jusqu'à atteindre le nombre *n* des cycles programmés.

- La première phase est une phase de dénaturation à 95 °C d'une durée comprise entre 0 à 1 minute, cette étape permet de déshybrider les ADN, de «décrocher» les polymérases qui seraient encore liées à une matrice et d'homogénéiser le milieu réactionnel. Cette phase est suivie, par celle d'hybridation ou d'appariement des amorces; cette étape dure généralement 2 à 60 secondes à une température qui leur est thermodynamiquement favorable, car elle est fonction de la composition en désoxyribonucléotides (dATP, dTTP, dGTP, et dCTP) des amorces. Cette température permet aux amorces sens et anti-sens de s'hybrider aux ADN matrices. Les amorces reconnaissent et se fixent à leurs séquences complémentaires en reformant des liaisons hydrogène.

- Par la suite, la Phase d'élongation ou de polymérisation rentre en jeux. Cette étape se fait à la température de 72 °C et dure généralement 1min pour 1000 pb à synthétiser. Elle permet aux polymérases de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice. Ce brin est fabriqué à partir des dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel.

- A la fin des *n* cycles de PCR, une étape d'élongation est ajoutée a la fin du programme pour laisser d'avantage le temps aux polymérases d'achever la polymérisation totale des molécules d'ADN en cours de synthèse.

A terme du programme de la PCR, l'amplicon obtenu ou l'ADN synthétisé est conservé à 4°C jusqu'à utilisation.

L'électrophorèse des produits d'amplification par PCR est effectuée sur gel horizontal d'agarose 15%.

Les gels sont préparés dans le tampon TBE 0,5X (Tris base 0.89 M, Acide borique 0.89 M, acide éthylène diamine tétracétique (EDTA) (pH 8,0] 0,02 M), ils sont colorés avec une solution de bromure d'éthidium (BET) de l'ordre de 10 µg/mL et la migration est effectuée sous 90 V.

L'ADN migre dans le gel dans la cellule électrophorétique pendant une heure et la visualisation de l'ADN est faite sous UV (Holtfreter *et al*., 2007).

I.4.3.3. Séquençage des gènes amplifiés

Le séquençage d'un ADN consiste à déterminer la succession des nucléotides qui le composent est effectué selon la méthode de Sanger qui exploite une stratégie de synthèse enzymatique. Le principe repose sur l'utilisation de nucléotides particuliers appelés didésoxyribonucléotides triphosphates (ddNTPs), marqués chacun par un fluorophore différent (Sanger *et al*., 1992).

La réaction d'élongation est catalysée par une ADN polymérase, qui requiert la présence des quatre désoxyribonucléotides triphosphates (dATP, dTTP, dCTP et dGTP) comme substrats. La méthode dépend également de la présence de didéoxyribonucléotides (ddNTP) qui sont incorporés durant la réaction d'élongation à la place des désoxyribonucléotides conventionnels. Les ddNTP diffèrent des dNTP par l'absence du groupe 3'-OH nécessaire à la continuité de l'élongation. Quand le ddNTP est incorporé à la nouvelle molécule d'ADN simple brin, l'absence du groupe hydroxyle empêche la formation de liaison phospho-diester avec le nucléotide suivant. La réaction d'élongation est stoppée. L'incorporation du ddNTP étant effectuée au hasard, génère ainsi toute une série de fragments de différentes longueurs (Sanger *et al.*, 1992).

Les séquences obtenues avec les amorces forward et les amorces reverse sont alors assemblées afin de former une séquence consensus. Cette séquence d'ADN est comparée aux séquences des bases de données en ligne, notamment en utilisant l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/), faisant appel à la base de données du NCBI (National Center for Biotechnology Information), afin de permettre la caractérisation des souches auxquelles appartiennent les ADN extraits et ainsi, de leur désigner une assignation taxonomique. En dessous de 95%, il est possible de lui affilier un nom de genre, voir même d'espèce, si ce taux monte à au moins 98%. En deçà, le niveau taxonomique généralement gardé s'arrête au phylum ou à la classe (Lacroix, 2008).

I.5.Conservation des isolats

Les souches bactériennes sont cultivées dans des tubes contenant un milieu LB additionné de glycérol (20%). Après croissance à 30°C, elles sont conservées à -20ºC. Le repiquage des souches conservées a lieu touts les 6 mois.

I.6. Sélection des isolats

Pour rechercher les isolats les plus efficaces pouvant être impliqués dans le processus de bioremédiation, une étape de sélection des souches dépendant de leur pouvoir dégradant et de leur capacité adaptative aux différentes conditions environnementales a été effectuée.

I.6.1. Effet des conditions physico-chimiques sur la dégradation des différentes fractions pétrolières

La résistance à l'effet des conditions environnementales tels que la température, la salinité et le pH est un paramètre important dans la sélection des isolats.

Les effets du pH et de la salinité sur la croissance des souches bactériennes dégradant les hydrocarbures ont été évalués sur des cultures réalisées sur un milieu solide M63 auquel sont ajoutés 60µl de pétrole, 60µl de gasoil, 1ml de benzène, 1ml de xylène ou 1ml de toluène dans différentes conditions de salinité (0M et 0.4M de NaCl) ,de pH (5,5, 7 et 8,5) et de température (30°C et 40 °C) pendant 72 h (Tableau I).

Tableau I: Conditions d'incubation des isolats

Conditions	Milieu M63 solide + (60µl pétrole ,60 µl gasoil, 1ml benzène, 1ml xylène, 1ml toluène)					
Salinité (NaCl)	0 M			0.4M		
pH	5.50	7.00	8.50	5.50	7.00	8.50
Température d'incubation	40 °C / 30 °C					

I.6.2. Interactions entre les isolats

Les interactions entre les espèces microbiennes impliquées dans la dépollution d'un milieu pollué est un facteur important qui influe sur le taux de dégradation.

Les souches bactériennes sont sélectionnées en fonction de leur bonne croissance en présence des différentes fractions et de différentes conditions de pH et de salinité à 30°C. Par ailleurs, sur un milieu solide M63 additionné de 60µl de pétrole, une culture pure d'une des souches sélectionnées est réalisée au contact de laquelle les autres souches

testées sont déposées. L'ensemble est incubé à 30°C pendant 72h. Il est ainsi possible d'évaluer d'éventuels synergies ou antagonismes pouvant survenir lors du processus de biodégradabilité des polluants étudiés (Figure 2).

Selon le mode de croissance des souches mises en contact, le type d'interactions implémenté est déterminé. Lorsque la souche inoculée et la propagation de la souche développent une biomasse bactérienne sans l'apparition de zone d'inhibition simultanément, nous parlons de "synergie" et lorsqu'une seule souche sur les deux se développe, avec l'apparition d'une zone d'inhibition, nous parlerons dans ce cas d'antagonisme. Afin de situer le niveau d'antagonisme, les cultures bactériennes sont inversées. Ainsi, la souche déposée est étalée et celle étalée est déposée sous forme d'un disque.

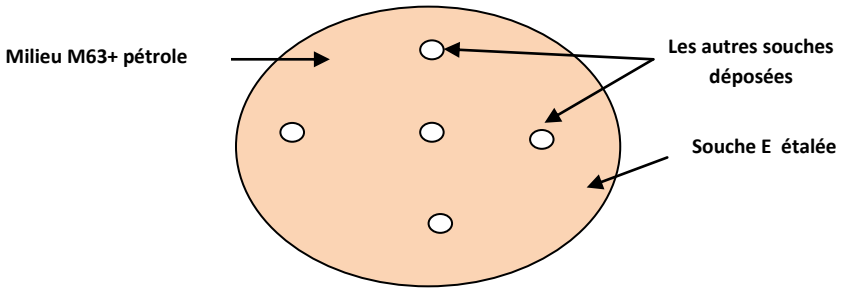


Figure 2: Modèle de recombinaisons bactériennes

I.7. Caractérisation des isolats sélectionnés

Dans le deuxième contexte on a concentré l'étude sur les quatre isolats sélectionnés pour avoir d'amples informations sur leur pouvoir dégradant les polluants hydrocarbonés ainsi que leur physiologie lors de la dégradation.

I.7.1. Détermination du potentiel dégradant

Le potentiel des quatre souches sélectionnées à dégrader les hydrocarbures pétroliers est évalué à partir de pré- cultures de colonies prélevées à partir de cultures jeunes sur milieu solide (24 heures) qu'on ensemence dans des tubes à essai contenant 5 ml de milieu BN, ces derniers sont incubés à 30°C avec une agitation de150 tr/min pendant 24h. Les contenus des tubes sont versés dans des Erlenmeyers de100ml contenant 50 ml de milieu de culture BN puis incubés à 30 °C sous agitation de 150 tr/min pendant 48h. Les quatre cultures sont centrifugées à 4000 tr/ min pendant 10 min à 4 °Cet lavées deux fois par 10ml de milieu

M63. Le culot, constitué d'inoculum bactérien est repris dans 100ml de milieu M63 additionné de 2%de pétrole dont la densité optique initiale est de 0.5. L'ensemble est incubé à 30°C sous agitation de 150 tr/min pendant 10 jours.

Pour évaluer la dégradation des hydrocarbures par les souches étudiées, l'évolution de la biomasse est suivie quotidiennement par la mesure de la densité optique (DO) à 600 nm, du pouvoir émulsifiant (E_{24}), de l'hydrophobicité cellulaire et du pH du milieu réactionnel.

Le taux de biodégradabilité des hydrocarbures est évalué à la fin de l'expérimentation par l'extraction des hydrocarbures résiduels au chloroforme, puis la séparation de la phase organique et le lavage de celle-ci deux fois avec de l'eau saturée en sulfate de magnésium. Les hydrocarbures sont ensuite analysés par GC-FID (PERKIN ELMER modèle CLARUS 580).

I.7.2. Mesure du pouvoir émulsifiant (E_{24})

Selon Gherbal (2010**)**, les molécules de surfactants tendent à s'accumuler aux interfaces de deux phases de polarités différentes. Par ces propriétés, les agents tensioactifs peuvent donc augmenter la solubilité apparente des composés hydrophobes.

L'indexe d'émulsion permet de vérifier la capacité des souches à émulsionner une phase hydrophobe (hydrocarbures) dans une phase hydrophile (milieu de fermentation).

Selon Bodour *et al.*(2004), le test d'émulsification consiste à mélanger 3 ml de milieu de culture (de fermentation) avec 3 ml de pétrole brut dans des tubes stériles qui sont agités au vortex pendant 3min, après homogénéisation des deux phases, on procède au calcul de E_{24} selon la relation ci après. Les tubes sont laissés au repos pendant 24 heures à température ambiante, puis le calcul de E_{24} est refait une deuxième fois pour vérifier la stabilité de l'émulsion.

$$E_{24} = (he / ht) \times 100$$

he: hauteur de l'émulsion.
ht: hauteur total.

I.7.3. Détermination de l'hydrophobicité des parois cellulaires

La détermination du degré d'hydrophobicité des parois des cellules bactériennes par le test MATH est un caractère important pour comprendre la physiologie adaptative des isolats (Krepsky *et al*., 2003).

Selon ce test, l'hydrophobicité de surface des isolats bactériens est évaluée avec le pétrole brut. Un volume de 1ml de suspension bactérienne dans une solution de phosphate de sodium 150 mM dont la densité optique à 600 nm est d'environ 0,8 (soit 10^9 UFC/ml) (A_0) est mélangé à 0,5 ml de pétrole brut et l'ensemble est vortexé pendant 2 minutes afin d'obtenir une émulsion. Après 15 minutes de décantation pour assurer la séparation complète de la phase solvant et de la phase aqueuse, la densité optique de la phase aqueuse (A_1) est mesurée à 600 nm (Gallardo *et al*., 2002). Le degré d'hydrophobicité est calculé selon la formule suivante :

$$\textbf{Hydophobicité (\%)} = 1 - (A_1 / A_0) \times 100$$

Le test MATH est fréquemment utilisé pour évaluer l'hydrophobicité de la paroi cellulaire bactérienne, ainsi son adhérence. Dans ce test, la suspension bactérienne est mélangée avec un liquide d'hydrocarbure sous des conditions bien contrôlées. Après mélange, si les cellules sont hydrophobes, elles adhèrent à la phase apolaire et montent avec cette dernière. Si les cellules sont hydrophiles, elles restent dans la phase aqueuse polaire. La mesure de l'hydrophobicité (relative) de la paroi bactérienne est la proportion des cellules liées à la phase organique, déterminée par la mesure de la diminution de l'absorbance de la phase aqueuse (Skvarla *et al*., 2002). Lorsque le pourcentage d'adhérence est supérieur à 50%, la bactérie est dite hydrophobe. Si ce pourcentage est inférieur à 20%, la bactérie est dite hydrophile. Si le pourcentage est compris entre ces deux valeurs, la bactérie est moyennement hydrophobe (Krepsky *et al.*, 2003)

I.8. Implication des souches bactériennes sélectionnées dans la biodégradation du pétrole brut

I.8.1. Immobilisation des cellules bactériennes sur différents supports

L'immobilisation des cellules consiste à retenir et localiser des cellules microbiennes dans un espace précis du système de fermentation afin d'obtenir de hautes densités de biomasse active. Il y a plusieurs moyens d'immobilisation cellulaire comprenant l'attachement à des surfaces, l'inclusion dans des matrices poreuses, la rétention derrière des barrières (membranes), la floculation et l'encapsulation (Banerjee1 et Ghoshal, 2016).

I.8.1.1.Choix du support

Selon les résultats du test d'hydrophobicité, l'immobilisation de deux souches sélectionnées se fait à l'aide des supports d'alginate de calcium, d'agar ou de coton.

Afin de sélectionner le meilleur support adopté pour l'immobilisation des cellules des isolats étudiés, des pré-cultures des souches testées sont préparées par prélèvement des colonies à partir des cultures jeunes puis sont ensemencées dans des tubes à essai contenant 5 ml de milieu BN et incubées à 30°C avec une agitation de150 tr/min pendant 24 h. Les deux pré cultures sont alors transvasées dans deux erlenmeyers de 100 ml contenant 45 ml de milieu de culture BN et incubées à 30°C sous agitation de150 tr/min pendant 24 h.

Des erlenmeyers de 100 ml contenant 50 ml de BN sont inoculés par des cellules provenant de la deuxième culture en fixant la densité optique initiale à 0.5. Les souches sont cultivées en présence des différents supports (Tableau II), en veillant à garder un erlenmeyer comme témoin pour chaque souche. Les cultures sont incubées à 30°C avec une agitation de 150tr/min pendant 72 heures.

Tableau II: supports testés

Support	Quantité
Alginate de calcium	1.3 g
Coton	0.25g
Agar	2.4 g

Pour estimer la biomasse bactérienne libre, une mesure de la densité optique (DO) est effectuée toutes les 24h à une longueur d'onde de 600 nm.

I.8.1.2. Test de dégradation

Afin de comparer l'effet de l'immobilisation des souches sélectionnées sur le degré de dégradation des hydrocarbures pétroliers, nous avons effectué un test de biodégradation microbienne de pétrole brut par des souches sélectionnées à l'état immobiles ou libres.

Des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de milieu de culture minérale M63 enrichi de 2% de pétrole brut sont inoculés avec les deux souches puis incubés à 30 °C sous agitation de 150 tr /min pendant 7 jours. L'essai se fait selon le protocole suivant :

- **Culture 1**(témoin): 100 ml de M63+ 2% de pétrole brut+1g d'alginate
- **Culture 2** : 100 ml de M63+ 2% de pétrole brut + souche S1
- **Culture 3** : 100 ml de M63+ 2% de pétrole brut + souche S1 +1g d'alginate
- **Culture 4** : 100 ml de M63+2% de pétrole brut + souche S2
- **Culture 5** : 100 ml de M63 +2% de pétrole brut + souche S2 + 1g d'alginate

Pour évaluer la dégradation des hydrocarbures dans ces cultures, Les hydrocarbures résiduels après leur extraction sont analysés par GC-FID (PERKIN ELMER modèle CLARUS 580).

I.8.2. Biodépollution des échantillons de sols pollués par les hydrocarbures pétroliers

Le présent essai est effectué afin d'évaluer la capacité des cultures bactériennes individuelles ou d'un consortium bactérien à dégrader les polluants pétroliers contaminant des échantillons de sol. Les conditions expérimentales ont été optimisées pour aboutir à une meilleure bioredmédiation des sols contaminés.

I.8.2.1.Pollution artificielle des échantillons de sol

Pour atteindre notre objectif, des échantillons de sable sont d'abord stérilisés, pour supprimer toute activité biologique intrinsèque, puis pollués par le pétrole brut à raison de 300ml de pétrole/kg de sol.

Le sol artificiellement pollué est conservé à 4°C à l'obscurité durant le temps nécessaire à la mise en œuvre du test de remédiation.

I.8.2.1.Préparation de l'inoculum

La bioaugmentation, caractérisée par l'ajout de micro-organismes d'intérêt dans le sol, a pour but de stimuler la dégradation des polluants organiques (Raden *et al.*, 2015)

Les inoculums des isolats sélectionnés sont préparés individuellement ou en culture mixte (consortium). Des pré- cultures des quatre souches sont réalisées par prélèvement de colonies à partir de cultures jeunes (24 heures) ensemencées dans des tubes à essai contenant 10 ml de milieu BN. Ces derniers sont incubés à 30°C avec une agitation de 150 tr/min pendant 24 à 48h. Les contenus des tubes sont ensuite transvasés dans des Erlenmeyers de 250ml, contenant 150 ml de milieu de culture BN. L'ensemble des cultures sont incubées à 30°C sous agitation de 150 tr/min pendant 48 h, avant d'être centrifugées à 4000 tr/ min pendant 10 min à 4 °C puis lavées deux fois à l'eau physiologique stérile. Les culots sont ensuite dissous dans une solution minérale pour ajuster la biomasse cellulaire.

I.8.2.2. Plan de traitement

Les échantillons de sol artificiellement contaminés par le pétrole brut sont mis dans six bacs en plastique dont les dimensions sont de15cmx20cmx15cm, à raison de 1kg de sol par bac. Ces échantillons sont stimulés par l'ajout d'un volume de 250 ml d'eau stérile, tous les deux jours et l'aération journalière et bioaugmentés par les quatre souches sélectionnées séparément ou en consortium.

La stimulation consiste à ajouter des nutriments organiques ou/et inorganiques aux environnements pollués par les hydrocarbures de manière à éliminer le problème de la limitation de ressources nutritives. Ces derniers stimulent la croissance et l'activité bactérienne, permettant ainsi une meilleure biodégradation des hydrocarbures (Sauret, 2011).

Le protocole de traitement adopté pendant huit (08) semaines est le suivant:

- **B1 :** (témoin): sable stérile + pétrole stimulé
- **B2**: Sable stérile + pétrole, stimulé et bioaugmenté par $3{,}10.10^{8}$UFC de la souche 1

- **B3** : Sable stérile + pétrole, stimulé et bioaugmenté par $2,81.10^8$UFC de la souche 2
- **B4** : Sable stérile + pétrole, stimulé et bioaugmenté par $2,85.10^8$ UFC de la souche 3
- **B5** : Sable stérile + pétrole, stimulé et bioaugmenté par $3,11.10^8$ UFC de la souche 4
- **B6** : Sable stérile + pétrole, stimulé et bioaugmenté par $2,92.10^8$ UFC du consortium des quatre souches.

I.8.2.3. Suivi du contenu en carbone organique total (COT) des échantillons contaminés

La méthode de détermination du carbone organique est basée sur l'oxydation de ce dernier par le bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) en milieu acide sulfurique à 135°C. Le chrome (Cr^{6+}) est réduit par le carbone organique en chrome (Cr^{3+}). On admet alors que la quantité d'ions chromiques ($Cr^{3+)}$ formés est proportionnelle à la quantité de carbone organique contenu dans la prise d'essai. Les ions chromiques ($Cr^{3+)}$ sont dosés par spectrophotomètre à 585 nm (Clement et Francoise, 2003).

I.8.2.4.Dosage des hydrocarbures résiduels

Après 8 semaines de traitement, les hydrocarbures totaux des échantillons traités sont quantifiés par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) de type PERKIN ELMER modèle CLARUS 580. L'analyse qualitative est réalisée en utilisant un analyseur AGILENT Modèle 5977B GC/MSD Single Quadrupole. La colonne utilisée est une colonne capillaire Restek Rxi®-PAH référence 49317 (60 m x0.25 mm x 0.10 µm) avec un diamètre interne de 0.25 mm pour une capacité d'injection supérieure, une meilleure séparation des HAP critiques et un temps d'analyse plus long. L'hélium est utilisé comme gaz porteur à un débit de 1ml/min. La température de l'injecteur et du détecteur est fixée à 300°C.

Partie II :

Résultats et discussion

II. Résultats et discussion

II.1.Caractéristiques des sols étudiés

Trois sols provenant de sites pollués par les hydrocarbures pétroliers et deux sols non pollués ont été retenus pour cette étude, il s'agit de :

Sol I : sol du bourbier de Hassi Messaoud
Sol II : sol du bourbier de Haoud Berkaoui
Sol III : sol de Bamendil accidentellement pollué
Sol IV : sol de Bamendil non pollué
Sol V : sol de l'exploitation agricole de la Faculté SNV

II.1.1. Caractéristiques physico-chimiques des sols étudiés

Les résultats des analyses de certains paramètres physico-chimiques des sols étudiés sont consignés dans le tableau II.

Tableau III: Caractéristiques physico-chimiques des sols étudiés

Paramètres / Sols		I	II	III	IV	V
Texture	SG (%)	42	43	39	44	41
	SF (%)	22	23	25	22	25
	A (%)	7	9	7	7	8
	LG (%)	14	12	14	15	13
	LF (%)	15	13	15	12	13
pH		7.6	8.1	7.7	7.6	7.8
Humidité (%)		6.1	19.3	12.2	6.3	8.3
CE (dS/m)		3.85	4.23	1.55	1.96	6.52

- SG et SF : sables grossiers (200<d<2000 µm) et fins (50<d<200 µm)
- LG et LF : limons grossiers (20<d<50 µm) et fins (2<d<20 µm)
- Argile : d < 2 µm

D'après le tableau III, l'analyse granulométrique des sols étudiés montre que la fraction prédominante dans tous les échantillons est le sable. Selon le triangle des textures, déterminant les limites des classes granulométriques utilisées dans le système USDA/FAO, les sols étudiés sont sableux-limineux (Figure 3).

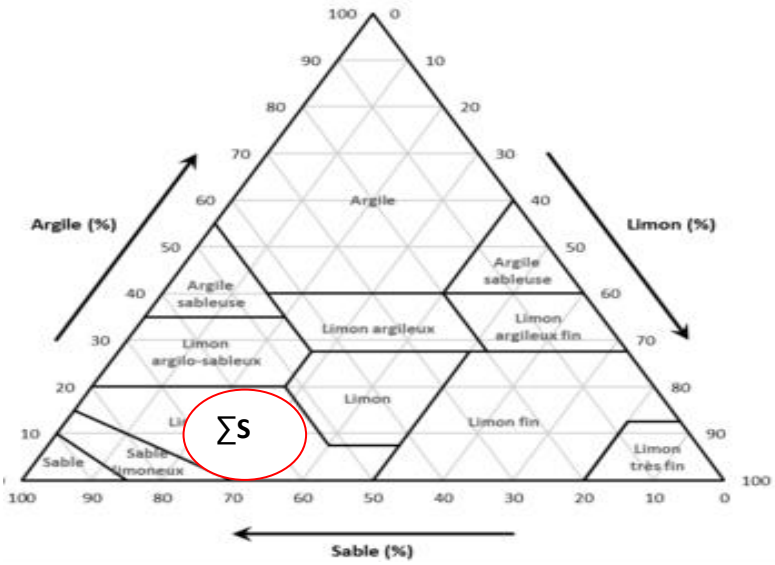


Figure 3: Triangle des textures de sol.

Les échantillons de sols étudiés sont aussi caractérisés par une humidité relative variant entre 6.1 et 19.3% (Tableau III). Les valeurs les plus élevées sont celles de l'échantillon du sol II (19.3%), l'échantillon du sol I et du sol V présentent la valeur d'humidité la plus faible, soit 6.1% (Tableau III).

Les valeurs de la conductivité électrique sont variables d'un site à l'autre (Tableau III). Ces valeurs sont comprises entre 1.55 et 6.52 ds/m. La majorité des échantillons présentent une CE comprise entre 1.55 et 4.23 ds/m. La CE la plus élevée (6.52 ds/m) a été relevée au niveau du sol IV (Tableau III).

Les sols étudiés sont caractérisés par leur pH basique avec des valeurs variant entre 7.6 et 8.1 (Tableau III). Cette basicité du pH est plus remarquable dans l'échantillon du sol II où le pH atteint la valeur de 8.1.

L'évaluation des paramètres physico-chimiques a permis d'établir un diagnostic préliminaire de l'état des conditions du micro-environnement de la communauté bactérienne tellurique des différents sols étudiés, sachant que la texture du sol et sa structure peuvent modifier l'activité, le développement et la survie des microorganismes (Bonneau et Souchier, 1994). Erikson *et al.* (2001) ont signalé l'influence de la structure du sol sur le transport de

l'oxygène dans ce dernier. Ces auteurs indiquent que plus un sol n'est dense, moins les nutriments et l'O_2 sont transportés vers la flore indigène du milieu.

La faible teneur des échantillons en eau (humidité) peut être expliquée d'une part par leur texture et d'autre part, par leur faible capacité de rétention d'eau (Monod, 1999). Par conséquent, cette faible humidité rend possible l'activité des microorganismes. Cependant, un taux d'humidité très bas ou très élevé limiterait la croissance microbienne et ralentirait le processus de dégradation (Berthe *et al.*, 2007).

Le pH basique des sols étudiés pourrait avoir une influence positive sur la capacité des microorganismes à dégrader les hydrocarbures. Straube *et al*. (2003), ont trouvé que la dégradation des hydrocarbures est plus élevée dans des conditions légèrement basiques.

La salinité exerce un effet osmotique sur les micro-organismes, qui ont aussi des besoins en sels comme NaCI, KCI et $MgCI_2$. 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 (Atlas et Bartha, 1993), conduisant au ralentissement des processus de dégradation des matières organiques, constituant donc une barrière naturelle pour la biodégradation (Bertrand *et al.*, 1993).

II.1.1.1. Teneurs des échantillons de sol en hydrocarbures totaux

Les teneurs en hydrocarbures totaux des échantillons de sols étudiés sont représentés dans la figure 4:

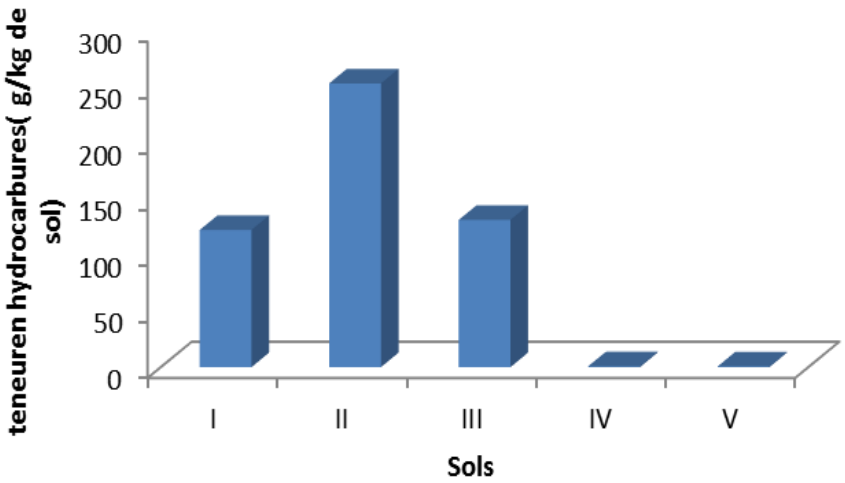


Figure 4: Concentration des hydrocarbures dans les échantillons de sols étudiés

La figure 4 laisse apparaitre des teneurs variables d'hydrocarbures dans les différents échantillons de sols analysés. L'échantillon du sol II est le plus chargé en ces polluants avec une teneur de 253.15g/kg de sol, comparé aux échantillons du sol I et du sol III dont les concentrations en hydrocarbures sont de 165. 2g/kg de sol et 131.4g/kg de sol respectivement. Les échantillons des sols IV et V n'ont révélé que des traces de polluants (Figure 4).

Les résultats obtenus, ont ainsi mis en évidence la concentration la plus élevée de polluant dans le sol le plus récemment pollué (sol II). Par ailleurs, les teneurs en hydrocarbures des sols I et III, plus anciennement contaminés, plus faibles que celles du sol II dépassent de loin les valeurs limites fixées par la réglementation mondiale (Gabet, 2004). Les teneurs en hydrocarbures inferieures à 0,1g/kg de sol indiquent que les échantillons IV et V ne sont pas pollués.

II.1.2. Importance des bactéries tolérant les hydrocarbures dans les différents échantillons de sols

Les résultats du dénombrement des bactéries provenant des différents échantillons de sols et ayant poussé sur le milieu M63 additionné de pétrole brut sont représentés dans la figure 5:

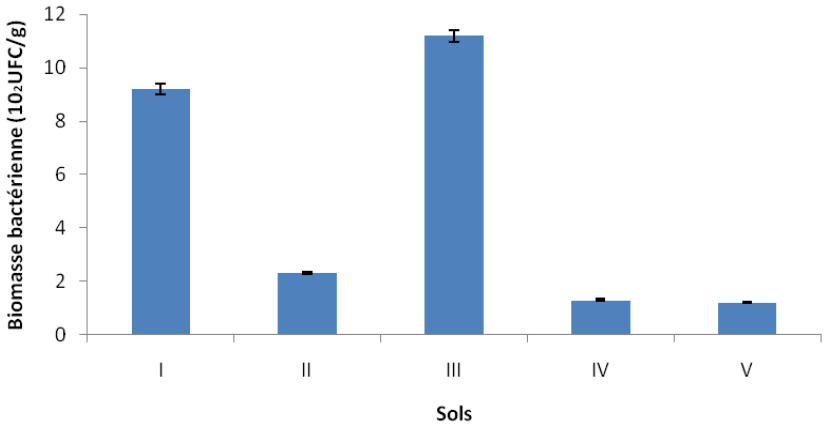


Figure 5: Biomasse bactérienne des différents échantillons de sols étudiés

Parmi les sols contaminés, la plus faible biomasse bactérienne de 2,3 .10^2 UFC/g de sol est enregistrée dans l'échantillon du sol le plus récemment contaminé et dont la teneur en hydrocarbures totaux est la plus élevée (sol II). Le sol III, plus anciennement pollué mais moins pourvu en hydrocarbures totaux présente la charge bactérienne tolérant les hydrocarbures pétroliers la plus importante, elle s'élève à 11,2 .10^2 UFC/g de sol. C'est aussi le cas du sol I, anciennement pollué, dont la teneur en hydrocarbures est comparable à celle du sol III et dont la biomasse bactérienne est de 9,41.10^2 UFC/g de sol (Figure 5).

Les biomasses des échantillons de sols non pollués (sol IV et sol V) ne sont que de 1,3.10^2 UFC/g de sol et 0, 7. 10^2 UFC/g de sol respectivement (Figure 5).

Il ressort des résultats obtenus deux cas de figure :

Le premier cas concerne l'échantillon du sol III, accidentellement pollué et dont la biomasse des bactéries tolérant les hydrocarbures est très importante, comparée à celle du sol IV non pollué, provenant du même site. Cette différence peut être expliquée par la forte disponibilité d'une nouvelle source de carbone et son utilisation par la communauté bactérienne tellurique indigène, conduisant à l'augmentation remarquable de sa biomasse.

Les bactéries ont été depuis longtemps considérées comme agents prédominants dans les environnements pollués par des hydrocarbures. Les bactéries hydrocarbonoclastes sont capables d'utiliser les hydrocarbures comme seule source de carbone et d'énergie. Elles sont ubiquistes, diversifiées, spécifiques de leur substrat et plus nombreuses dans les milieux

pollués (Leahy et Colwell, 1990 et Sauret, 2011). Elles représentent moins de 0,1% de la communauté microbienne indigène en milieu non pollué, mais peuvent représenter près de 100% dans les milieux pollués par des déversements d'hydrocarbures (Yakimov *et al*., 2003 ; Yang et *al*., 2009). Ceci pourrait être attribué à leur ubiquité, du fait qu'elles sont capables de coloniser des milieux différents. Leur adaptation au polluant les incite à développer la machinerie enzymatique nécessaire à la dégradation du polluant (Labreque, 2003).

Le deuxième cas, concerne l'échantillon du sol I dont la biomasse bactérienne est beaucoup plus importante que celle du sol II. La charge bactérienne de ces deux échantillons provenant de deux bourbiers est inversement proportionnelle à leurs teneurs en hydrocarbures et est plus importante dans l'échantillon le plus anciennement contaminé (sol I), suggérant ainsi l'implication plus importante de la communauté bactérienne de cet échantillon dans la dégradation du pétrole, d'où l'augmentation remarquable de leur biomasse.

Dans le sol II, récemment contaminé, la faible biomasse bactérienne peut être expliquée par le fait que le contact avec les hydrocarbures pourraient ainsi constituer un stress pour ces bactéries ne présentant pas de capacités de biodégradation spécifiques (Head *et al*., 2006), ou par le fait que le polluant modifie la composition et la richesse de la microflore. Le faible nombre des cellules bactériennes met en évidence la toxicité du milieu pour les espèces les plus sensibles. Cependant, quelques espèces, en nombre réduit, sont favorisées par la présence du polluant (Gillet et Ponge 2002).

L'importance des biomasses bactériennes des sols dont la contamination par les hydrocarbures est plus ancienne (sol I et sol III) suggère que la communauté microbienne du sol présente de fortes capacités de résistance et/ou d'adaptation : elle supporte souvent l'arrivée de polluants toxiques sans que l'on puisse mesurer de réduction dans l'ensemble des fonctions métaboliques (Giller *et al*., 1998 ; Thompson *et al*.,1999). En effet, les communautés microbiennes peuvent être soit naturellement pré- adaptées (Vitte et *al.*, 2011; Vitte *et al*., 2013) à la pollution des hydrocarbures soit pré-exposés (Vieira *et al.*, 2009), ceci ayant permis d'observer une réponse rapide aux hydrocarbures et des capacités de dégradation élevées accompagnées d'une augmentation de la biomasse.

L'historique de la pollution d'un sol contribue à une meilleure adaptation de la microflore bactérienne au polluant organique, traduite par l'augmentation de la biomasse bactérienne due à l'utilisation du polluant comme source de carbone.

De nombreuses études ont en effet pu démontrer que les capacités de dégradation des communautés microbiennes de sites contaminés étaient dépendantes de l'historique de la pollution de l'écosystème considéré (Roling *et al*., 2002) et donc des capacités d'adaptation des communautés.

La croissance des bactéries isolées à partir des échantillons des sols étudiés, en présence du pétrole comme seule source de carbone, suggère leur capacité à dégrader ce polluant. Par ailleurs, la tolérance des bactéries isolées à partir des sols non pollués, exprimée par leur croissance en présence du pétrole brut, pourrait être expliquée par leur potentialité naturelle à métaboliser les hydrocarbures, pouvant être acquise par leur présence dans un milieu extrême.

Les sols qui n'ont jamais été exposés à des pollutions organiques contiennent en général, au moins en faibles quantités, des microorganismes indigènes capables de dégrader des polluants récalcitrants. De plus, la communauté microbienne du sol semble présenter de fortes capacités de résistance et/ou d'adaptation : elle supporte souvent l'arrivée de polluants toxiques sans que l'on puisse mesurer de réduction dans l'ensemble des fonctions métaboliques (Giller *et al*., 1998), même si la composition des espèces peut être modifiée (Frostegard *et al.,* 1993). Ces microorganismes ne possèdent pas initialement la capacité de les métaboliser. Cependant, lorsqu'ils sont exposés à de tels composés, ils sont souvent capables de s'adapter, c'est à dire d'acquérir le potentiel métabolique de dégradation de ces polluants par recrutements de gènes spécifiques pour la dégradation (George et Hay, 2011).

L'effet des hydrocarbures sur les communautés microbiennes fait intervenir des mécanismes complexes dépendant de leurs capacités métaboliques, influencées par les paramètres environnementaux et la durée d'exposition aux polluants (Roling et *al*., 2002 et Yakimov et *al*., 2004). En effet, dans les sols des déserts, les bactéries sont sous l'influence des paramètres environnementaux extrêmes qui se caractérisent par des fluctuations importantes de température, des radiations UV élevées, une faible teneur en nutriments et une faible teneur en eau (Andrew *et al.,* 2012).

Les bactéries telluriques peuvent dégrader les polluants organiques dans le sol tels que les hydrocarbures et leurs produits de dégradation. Ces derniers deviennent de nouvelles sources de carbone dans le sol. Ces microorganismes s'en nourrissent et les transforment en eau et en CO2. Cependant, tous les composés organiques ne seront pas dégradés de la même façon (Chaineau *et al*., 1995).

II.2. Caractéristiques des bactéries hydrocarbonoclastes isolées

Après une série de purification des souches bactériennes isolées des sols étudiées, 13 souches ayant maintenu leur fort potentiel à dégrader le pétrole ont fait l'objet de caractérisations morphologique, biochimique et moléculaire. Ces souches bactériennes représentant les populations prédominantes des différents sols étudiés sont phénotypiquement différentes.

II.2.1. Caractéristiques morphologiques

Les 13 types de colonies isolées sont distincts par leur aspect, leur taille et leur couleur. Les résultats obtenus sont regroupés dans les tableaux IV et V.

Tableau IV: Aspect macroscopique des colonies bactériennes isolées

	Diamètre (mm)	Couleur	Forme	Elévation	Contour	Consistance	Opacité	Surface
S1	1	Blanche	irrégulière	Convexe	irrégulière	visqueuse	Translucide	Lisse
S2	2	Blanche	Ronde	Convexe	régulière	visqueuse	Translucide	Lisse
S3	1	Blanche	Ronde	Convexe	régulière	visqueuse	Translucide	Lisse
S4	1	Beige	Ronde	Convexe	régulière	crémeuse	Translucide	Rigoureuse
S5	1	Blanche	irrégulière	Convexe	irrégulière	visqueuse	Translucide	Sèche
S6	1	Jaune	irrégulière	Convexe	irrégulière	crémeuse	Opaque	Lisse
S7	2	Blanche	irrégulière	Convexe	irrégulière	visqueuse	Translucide	Lisse
S8	1.5	Blanche	irrégulière	Convexe	irrégulière	visqueuse	Translucide	Lisse
S9	1	Jaune	irrégulière	Convexe	régulière	visqueuse	Opaque	Rigoureuse
S10	1	Jaune	Ronde	Convexe	régulière	visqueuse	Opaque	Lisse
S11	2	Blanche	Ronde	Convexe	régulière	crémeuse	Translucide	Rigoureuse
S12	1	Beige	irrégulière	Convexe	irrégulière	crémeuse	Opaque	Lisse
S13	2	Jaune	irrégulière	Convexe	irrégulière	crémeuse	Translucide	Lisse

Les caractères macroscopiques des bactéries présentés dans le tableau VI montrent une diversité d'aspect, de couleur et de taille de leurs colonies, cette diversité a été étudiée

minutieusement afin de différencier les souches entre elles avant de passer à des tests plus approfondies.

Tableau V: Aspects microscopiques des souches isolées

Souches	Forme	Gram	Mobilité	Arrangement
S1	B	-	-	P
S2	B	-	-	A/p
S3	C	+	-	Ch
S4	B	-	-	I
S5	B	-	+	P/A
S6	B	-	-	A
S7	C	-	-	A
S8	C	+	+	A
S9	B	-	+	P
S10	B	-	+	I
S11	B	-	+	P/A
S12	B	+	+	P
S13	B	-	-	P

+:positif : mobile.
C : cocci
I:isolée.
P:en paire.

-: négatif/ absence/ immobile
B : bacille
A: en amas.
Ch: en chênette

Les résultats consignés dans le tableau V montrent une variété de types bactériens. Les bactéries isolées sont généralement immobiles, de différentes formes cellulaires (bacille, ou cocci) dont la majorité présente une paroi Gram négatif (10/13 souches) et seulement 3/13 souches ont une paroi Gram positif.

Les souches aérobies dégradant les alcanes appartiennent à divers genres de bactéries Gram positif (Churchill *et al.*, 1999; Sharma and Pant, 2000) ou Gram négatif (Yuste *et al.*, 2000; Van-Beilen *et al.*, 2002; Wentzel *et al.*, 2007). La plupart du temps, une exposition aux hydrocarbures sélectionne préférentiellement des organismes à Gram négatif et en particulier des Protéobactéries dont un grand nombre de genres a été décrit pour leurs capacités à dégrader les hydrocarbures (Yakimov *et al.*, 2005).

La texture du sol et le manque d'eau seraient à l'origine de la faible mobilité des bactéries telluriques et leur fixation sur toutes sortes de supports où elles se développent en

micro colonies de manière à rester en contact avec leurs ressources en eau et en nutriments (Boussboua, 2002).

II.2.2.Caractéristiques 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 tableau VI.

Tableau VI: Résultats des tests biochimiques

Tests/ Souches	**S1**	**S2**	**S3**	**S4**	**S5**	**S6**	**S7**	**S8**	**S9**	**S10**	**S11**	**S12**	**S13**
catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
oxydase	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
Glu	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
Sac	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
Ara	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Man	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
(ONPG)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Cit	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
VP	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+
H_2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
indol	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-
LDC	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ADH	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-
ODC	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
TDA	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+
GEL	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-

- : Test négatif
+ : Test positif

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

D'après le tableau VI, toutes les souches sont catalase positives, ne produisent pas le soufre et ne dégradent pas le mannitol. De même, elles ne produisent pas d'indole, à l'exception de S5, S9, S10 et S12.

Les souches isolées sont également dépourvues d'une b-galactosidase, à l'exception de quatre souches S1, S2, S12 et S13 (Tableau VI).

Les souches S5, S8, S9 et S10 sont VP négatif, alors que les autres souches ont donné un résultat positif (Tableau VI).

La majorité des isolats sont capables de métaboliser les sucres simples et de se développer sur du citrate comme seule source de carbone, à l'exception de S2, S6 et S13. De plus, la majorité des souches n'hydrolysent pas la gélatine (Tableau VI).

D'après le tableau VI, les décarboxylases (LDC, ODC et ADH) ont pu être mises en évidence seulement chez la souche S4.

Les résultats des caractérisations morphologiques et biochimiques laissent apparaitre que les souches isolées à partir des différents échantillons de sols se rapprochent de genres bactériens différents tels que *Bacillus*(S12), *Pseudomnas* (S5, S9, S10) et *Acenitobacter* (S6) (Bergey, 1994 ; Leyral et Joffin, 1998 et Leyral et Joffin, 2007).

L'identification phénotypique des bactéries retenues permet d'avancer qu'il existe une biodiversité intéressante. Cependant, la caractérisation phénotypique, bien qu'elle constitue une étape fondamentale et préliminaire, elle reste sommaire et imprécise. Aussi et afin d'attribuer des profils acceptables et fiables aux souches sélectionnées, une identification moléculaire s'avère indispensable et obligatoire.

II.2.3. Identification moléculaire des isolats

Le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S et l'analyse comparative des séquences par le logiciel Nucleotide BLAST du NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov) avec un seuil $\geq 97\ \%$ a permis de classer les souches isolées en différentes espèces (Tableau VII).

Tableau VII: Résultats de l'identification moléculaire des isolats

N° Souche	Genre ou espèce déterminé par séquençage du gène codant l'ARNr16S
S1	*Klebsiella sp*
S2	*Klebsiella pneumonai*
S3	*Staphylococcus haemolyticus*
S4	*Acinetobacter calcoaceticus*
S5	*Pseudomonas putida*
S6	*Acinetobacter radioresistans*
S7	*Stenotrophomonas maltophila*
S8	*Rhodococcus equi*
S9	*Pseudomonas parfulva*
S10	*Pseudomonas fulva*
S11	*Enterobacter hormaechi*
S12	*Bacillus licheniformis*
S13	*Ochrobactrum cicerti*

L'identification moléculaire de l'ADNr 16S codant l'ARNr 16S a permis d'affilier les isolats à différents genres tels que *Bacillus, Rhodococcus, Ochrobactrum, Stenotrophomonas, Enterobacter, Acinetobacter, Klebsiella. Staphylococcus* et *Pseudomonas* (Tableau VII). L'existence de ces genres bactériens dans les sols pollués par le pétrole a déjà été signalée (Wang *et al.*, 2010, Kumar et Khanna, 2010).

La capacité des bactéries appartenant au genre *Bacillus* à dégradé les hydrocarbures est attribuée à un système enzymatique approprié (Ijah et Ukpe, 1992). La souche *B. licheniformis*, isolée à partir de sols contaminés par des hydrocarbures a le potentiel de dégrader le benzène, le brut, le décanol, l'éthylbenzène, le n-tétradécanol et le xylène (Ghazali *et al.*, 2004). Yulani *et al.*(2012) ont isolé la souche *B. licheniformis* qui a la capacité de dégrader le pyrène et le phénanthrène comme elle possède des gènes dioxyrenese *nidA* et nahAc responsables de l'attaque initiale des HAP. D'autre part, cette souche est capable d'excréter les biosurfactants tels que la surfactine, la polymyxine et les lipopeptides (Ron et Rosenberg, 2011).

Le genre *Enterobacter* est le plus abondant dans les sols pollués. Il a été reconnu dans la littérature en tant qu'agent de dégradation aérobie des hydrocarbures (Bach *et al.*, 2003).

Les espèces du genre *Pseudomonas* isolées ont montré leur efficacité dans la bioremédiation par une bonne dégradation des hydrocarbures pétroliers (Weinel *et al.*, 2002) .

Il a été démontré que ces bactéries peuvent dégrader jusqu'à 90% du polluant pétrolier (Afifi *et al.*, 2015).

Les caractéristiques génomiques de *P. putida* mettent en évidence une efficacité métabolique, elle possède un équipement génétique qui lui permet l'assimilation et la biodégradations des composés aromatiques (Jiminez *et al.*, 2002; Nelson *et al.*, 2002).

Les souches du genre *Ochrobactrum* pourraient métaboliser les n-alcanes linéaires allant de C_{12} à C_{28}, mais leur efficacité de dégradation diminue à mesure que la longueur de la chaîne d'alcane augmente comme l'ont signalé Wang *et al.* (2011) et Zhang *et al.*(2011).

Les isolats de *Klebsiella* ont démontré un degré important de plasticité catabolique pour la dégradation des hydrocarbures. La souche *Klebsiella pneumoniae* a pu utiliser quatre types différents d'HAP tels que le phénanthrène, le fluoranthène, le pyrène et le benzène (Abd Al-Hadi et Al-Mayaly, 2015).

Rhodococcus equi présente un bon potentiel de biodégradation du pétrole pouvant dépasser 40% après 3 semaines (Silva *et al*., 2010). Un comportement inhabituel de cette souche a été observé lorsqu'elle a consommé le naphtalène comme seule source de carbone (Dominguez *et al*., 2002).

De nombreuses espèces d'*Acinetobacter* se sont révélées sécréter des bio-tensioactifs (Rocha *et al*., 2007) . Ces organismes ont le potentiel d'être mis en œuvre dans les pratiques de bioremédiation et la production de biosurfactants à grande échelle (Margaret *et al*., 2017).

Plusieurs souches appartenant au genre *Stenotrophomonas* ont été associées à la dégradation du pétrole et des hydrocarbures dans beaucoup d'autres études (Lu *et al.*, 2003; Zhuang *et al*., 2003).

La souche *Staphylococcus haemolyticus* est déjà isolée à partir de sol contaminé par du pétrole brut provenant de la raffinerie (Karina *et al*., 2015). La souche s'est révélée efficace pour dégrader le n-hexane, le n-hexadécane, le gasoil et le pétrole brut. Par conséquent, le génome de cet organisme a été séquencé pour obtenir de meilleures

informations sur la versatilité métabolique et l'adaptabilité de cette souche (Mukherjee *et al*., 2016).

Il ressort des résultats de séquençage des souches bactériennes isolées des sols étudiés une diversité spécifique présentant des activités, similaires pour certaines et différentes pour d'autres. Cette diversité peut constituer un avantage dans le processus de biodégradation des hydrocarbures pétroliers.

II.2.4. Distribution des isolats

La distribution des espèces et les facteurs qui les contrôlent sont centraux pour la compréhension et l'appréhension du fonctionnement des écosystèmes et de la réponse à la pollution. Un principe central de l'écologie des communautés est que de fortes tendances spatiales et temporelles de la distribution et l'abondance des taxons sont régies par des processus environnementaux (abiotique, biotique ou autres), et que ces processus lient le fonctionnement de l'écosystème à la diversité biologique. L'étude des changements de la structure des communautés nous aide à comprendre les facteurs qui contrôlent les communautés (Fuhrman, 2009).

La répartition des isolats bactériens hydrocarbonoclastes identifiés dans les différents échantillons est représentée dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Répartitions des isolats hydrocarbonoclastes

Echantillons	HC (g/kg de sol)	Souches hydrocarbonoclastes isolées
Sol I	122.43	*B. licheniformis ; K. sp; O.cicerti ; P. putida ; K.pneumonai*
Sol II	253.22	*R.equi ; S. maltophila*
Sol III	131.4	*P. fulva ; E. hormaechi ; A. calcoaceticus*
Sol IV	0.72	*P.parfulva ; S. haemolyticus*
Sol V	0.83	*A.radioresistans*

Les différents isolats identifiés appartiennent à 9 genres bactériens, il s'agit de : *Bacillus, Rhodococcus, Ochrobactrum, Stenotrophomonas, Enterobacter, Klebsiella, Staphylococcus, Pseudomonas* et *Acinetobacter* (TableauVIII).

D'après le tableau VIII, les espèces bactériennes isolées sont distribués de façon aléatoire, leur nombre est inversement proportionnel au taux de contamination et proportionnel à l'âge de la contamination. En effet, l'échantillon du sol I, le plus anciennement pollué, présentant le plus faible taux de contamination de 122.43g d'HC/kg de sol, montre la plus grande diversité bactérienne (05souches). Cette diversité n'est représentée que par 03 souches dans le sol III, légèrement plus contaminé que le premier (131.4g d'HC/kg de sol). Le sol le plus récemment et le plus fortement contaminé (sol II) contenant 253.22g d'HC/kg ne renferme que 2 souches hydrocarbonoclastes, tout comme le sol non contaminé IV. Le sol V (non contaminé) présente la plus faible diversité (1souche) (Tableau VIII).

La modification des communautés bactériennes telluriques dans les sites les plus anciennement pollués a souvent lieu suite à la prolifération de taxons bactériens spécialisés dans la dégradation des hydrocarbures (Beazley *et al.*, 2012). Par ailleurs, on peut assister à une diminution de la diversité bactérienne dans les sites les plus contaminés (Mahmoudi *et al.*, 2013 ; Atlas *et al.*, 2015). En effet, à de fortes concentrations, les polluants peuvent présenter une toxicité importante pour l'environnement et pour certains microorganismes comme les bactéries, même celles capables de les biodégrader. Les effets d'une toxicité sont toujours liés à une concentration qui reflète aussi leur capacité à détruire les membranes bactériennes (Vandecasteele, 2005).

Les bactéries capables de dégrader les hydrocarbures peuvent soit les utiliser comme source unique de carbone, on parle alors de bactéries hydrocarbonoclastes, soit comme source facultative de carbone (Prince *et al*., 2010). Ainsi, la dynamique des communautés bactériennes soumises à une pollution par des hydrocarbures est dépendante de la nature des contaminants et de la complexité des molécules, ainsi que de l'évolution quantitative et qualitative de ces composés (Head *et al.*, 2006). En général, cette contamination provoque l'inhibition de la croissance de certains membres de la communauté au profit d'organismes hydrocarbonoclastes plus adaptés aux nouvelles conditions environnementales (Yakimov *et al.*, 2005 ; McGenity *et al.*, 2012). Il y a donc une sélection des micro-organismes capables d'utiliser la nouvelle source de carbone et d'énergie et restructuration de la communauté d'origine.

Cette sélection peut être due a trois facteurs : l'induction ou la de-répression d'enzymes spécifiques, absentes ou présentes en faible quantité chez certaines

populations, la sélection de nouvelles capacités métaboliques découlant des changements génétiques ou l'augmentation du nombre d'organismes capables de catalyser une réaction spécifique liée au substrat (Yakimov *et al.*, 2005).

La plupart du temps, une exposition aux hydrocarbures sélectionne préférentiellement des organismes à Gram négatif dont un grand nombre de genres a été décrit pour leurs capacités à dégrader les hydrocarbures (Chao et Hsu, 2004 ; Yakimov *et al.*, 2005). Ces organismes sont souvent capables de s'adapter par recrutement vertical ou horizontal de gènes spécifiques (Jora, 2009).

Le recrutement des voies métaboliques, présentes dans le génome mais non exprimées peut se faire par des évènements de mutation ponctuelle, de réarrangement génétique ou de transposition. Les microorganismes peuvent aussi acquérir des clusters de gènes cataboliques *via* des éléments mobiles transférés d'un hôte donneur à un hôte receveur (les plus connus sont la conjugaison *via* des plasmides) (Pradeep Ram *et al.*, 2008).

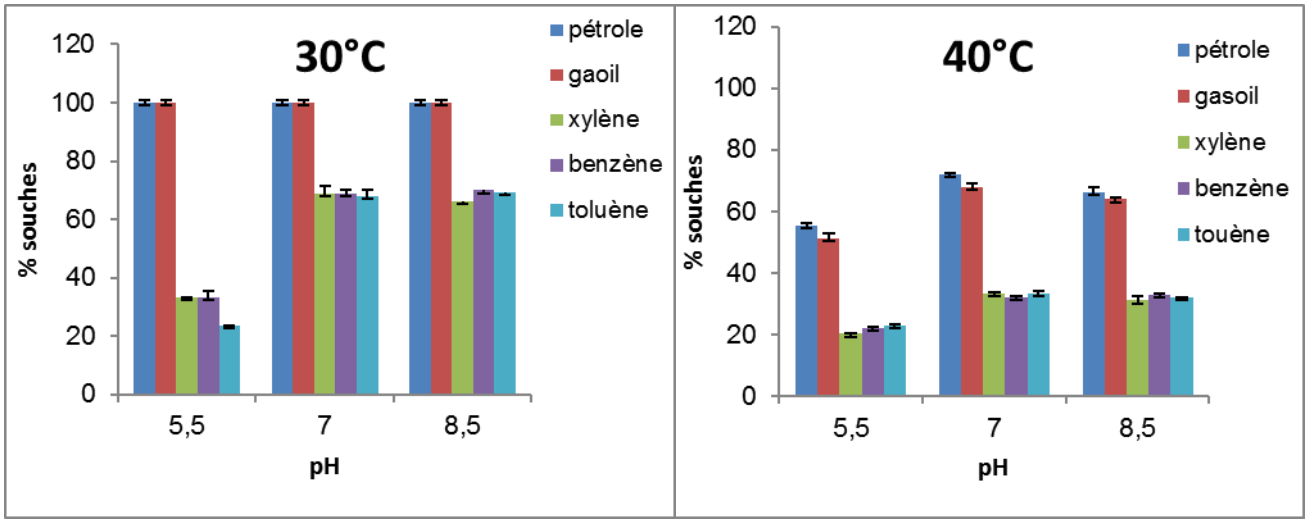
Les micro-organismes hydrocarbonoclastes ont en général une capacité de dégradation spécifique d'un groupe d'hydrocarbures (alcanes, aromatiques). La capacité de certaines espèces à dégrader les aromatiques n'implique pas automatiquement que ces espèces puissent dégrader les alcanes et inversement (Berthe-Corti et Hopner, 2005). Dans une première phase la communauté est dominée par des bactéries qui vont dégrader les hydrocarbures aliphatiques. Au fur et à mesure que les hydrocarbures aromatiques deviennent plus abondants dans le mélange (due à la « disparition » des aliphatiques), la communauté se modifie et les bactéries dégradant les hydrocarbures aromatiques prédominent à leur tour (Yakimov *et al.*, 2005).

II.3. Sélection des isolats compétents

Pour sélectionner les souches les plus compétentes à dégrader les hydrocarbures pétroliers, certains tests sont effectués sous différentes conditions physicochimiques.

II.3.1. Effets du pH et de la température sur la croissance des isolats

L'effet du pH et de la température sur la croissance des isolats est représenté par la figure 6:



A **B**

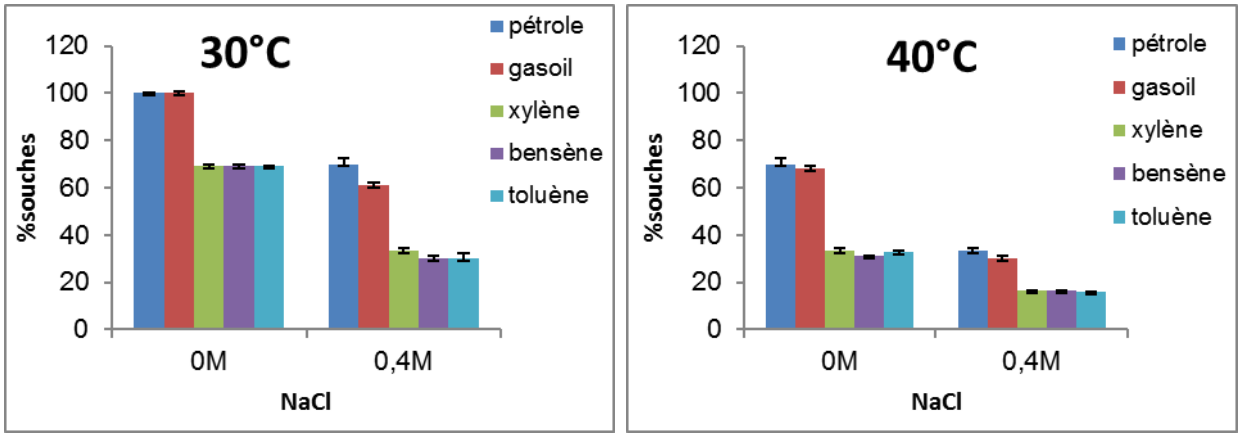
Figure 6: Effets du pH sur la croissance des souches (A: 30°C ; B: 40°C)

Le changement du pH n'a pas d'effet apparent sur la croissance des souches bactériennes testés à 30°C en présence de pétrole brut ou de gasoil. En effet, nous avons enregistré la croissance de toutes les souches ensemencées (100%) après 72 heures d'incubation à 30°C. Le xylène et le benzène n'ont permis la croissance que de 69.6% des souches lorsque le pH est ajusté à 7 ou 8,5. Ces mêmes pH, ont permis la croissance de 68.13% des souches incubées en présence du toluène. A pH 5,5, seules 23.4 % des souches ont pu croitre en présence de benzène ou de xylène (Figure 6A).

Lorsque la température d'incubation s'élève à 40°C, la variation du pH conduit à la diminution des isolats plus prononcée que celle observée à 30°C et ce, quel que soit la source de carbone. A pH 7, seules 72% et 68.8% des souches incubées ont pu croître en présence de pétrole ou de gasoil respectivement. Ces taux diminuent dans le cas où le pH est de 5.5 en présences de ces mêmes substrats pour atteindre 66.2% et 64.01 %. En présence des fractions monoaromatiques, à pH 7 ou pH 8.5, seules 33% des souches cultivées ont pu croitre. Ce taux n'est que de 23.4% en présence du toluène lorsque le pH du milieu est ajusté à 5.5 (Figure 6B).

II.3.2. Effets de la salinité et de la température sur la croissance des isolats

L'influence des modifications de la salinité et de la température sur la croissance des souches bactériennes isolées des différents échantillons est représentée dans la figure 7:



A **B**

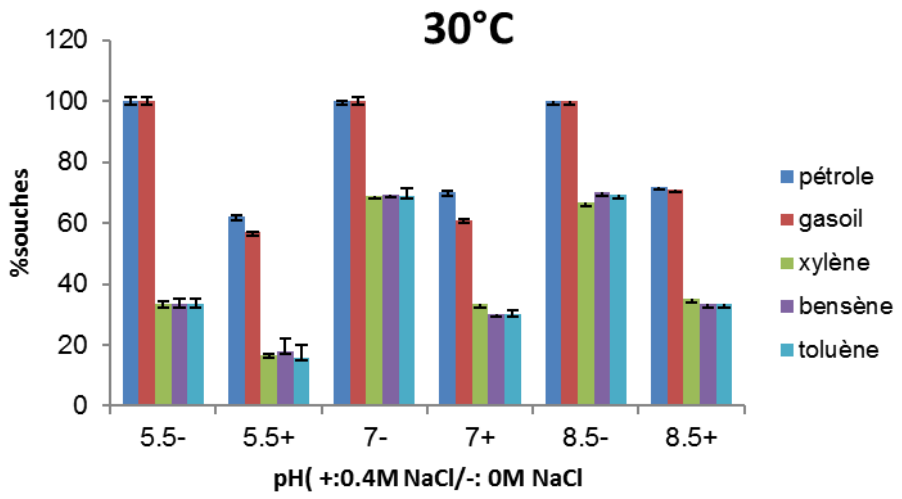
Figure 7: Effet de la salinité sur la croissance des souches (A: 30°C ; B: 40°C)

La figure 7A révèle que l'addition de NaCl 0,4 M dans le milieu de culture affecte la croissance des bactéries étudiées à 30°C. Nous assistons à la croissance de 71.1 % des souches incubées dans ces conditions en présence du pétrole à pH 7 et seulement de 33.3% lorsque la température est de 40°C.

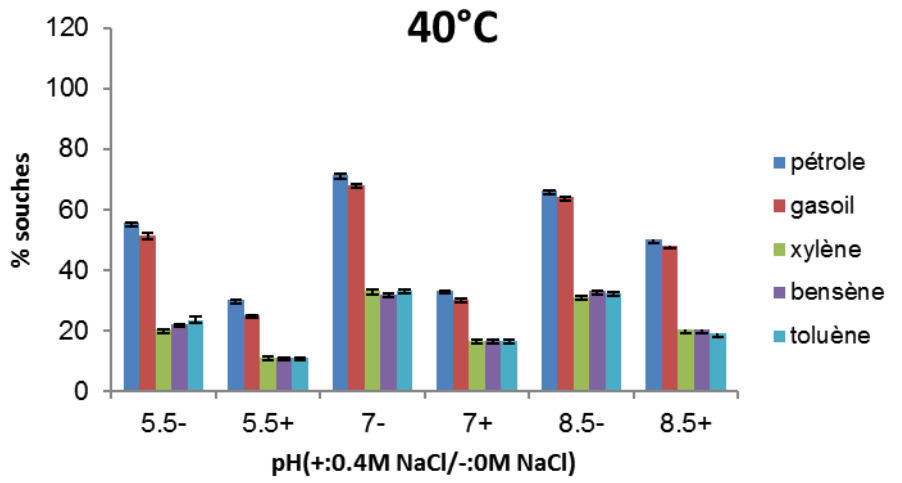
L'addition de NaCl 0,4M au milieu d'incubation semble affecter négativement la croissance bactérienne lorsqu'il est ajouté en présence des autres fractions d'hydrocarbures (Figure 7). L'incubation des souches à pH 7 en présence de gasoil a conduit à la croissance de 61.2% de ces souches à 30°C et seulement 30.01% à 40°C. En présence des autres fractions on enregistre une croissance de 33.1% et de 30.21% des souches étudiés en présence du xylène et du toluène à 30°C. A 40°C, seules 16.2% des bactéries ont pu se développer en présences des fractions monoaromatiques (Figure 7).

II.3.3. Effets du pH et de la salinité sur la croissance des isolats bactériens

La figure 8 représente l'influence des paramètres physico-chimiques étudiés sur la croissance des souches testées :



A



B

Figure 8 : Effets du pH et de la salinité sur la croissance des souches (A: 30°C ; B: 40°C)

La figure 8 montre les résultats de l'action du pH et de la salinité sur la croissance des souches étudiés à deux températures en présence de différentes fractions d'hydrocarbures.

La variation du pH en présence de NaCl 0,4 M semble avoir un effet sur la croissance des souches étudiées.

Les effets du pH et de la salinité sont variables. En effet, dans un milieu salin, le pH 5,5 a entraîné la diminution du nombre de souches ayant pu croitre dans ces conditions. En

présence de pétrole, seulement 62% des souches ont pu se développer à 30°C, 57.3% en présence de gasoil et 16% en présence du toluène ou du xylène.

A pH 7, en présence de pétrole, on assiste à la croissance de 70.1% des souches testées et seules 30.02 % en présence des fractions monoaromatiques (Figure 8.A).

En présence du benzène ou du toluène, l'addition du NaCl 0.4M à pH 8,5 et à 30°C ne permet la croissance que de 33.33% des bactéries testées, alors qu'en présence du pétrole ou du gasoil, 71% des souches ensemencées poussent dans les mêmes conditions expérimentales (Figure 8A).

D'après la figure 8B, l'apport de NaCl 0.4M et de pétrole ou de gasoil dans le milieu d'incubation à 40°C et à pH 5,5 ne permet la croissance que de 30.6% et 26.6% des souches étudiées respectivement, alors que le sel associé aux fractions monoaromatiques ne conduit à la croissance que de 11% des souches.

L'incubation des souches sur un milieu salin à pH 7 et à 40°C en présence de pétrole ou de gasoil a conduit à la croissance de 71.2% et de 68.% des souches respectivement. Les fractions monoaromatiques associées au NaCl au même pH et à la même température, ne permettent la croissance que de 16.6 % des souches (Figure 8B).

La salinisation du milieu de culture à pH 8,5 et à 40°C a conduit à la réduction du nombre de souches qui n'est que de 50.3% en présence de pétrole, de 48.9% en présence de gasoil et de 21% en présence de benzène, de xylène ou de toluène (Figure 8B).

Les souches développées dans les différentes conditions expérimentales sont mentionnées dans le tableau IX:

Tableau IX: Souches développées à différents conditions expérimentales

Source de carbone		pétrole	Gasoil	Xylène	Toluène	Benzène	pH
Températures d'incubations	30 °C	++++	+++	S_5, S_8, S_{12}, S_4	S_5, S_8, S_{12}, S_4	S_4, S_5, S_8, S_{12}	5.5⁻
	40°C	S_4, S_6, S_5, S_8, S_{10}, S_{11}, S_{12}	S_4, S_6, S_5, S_8, S_{10} S_{11}, S_{12}	S_5, S_8	S_5, S_{12}	S_5, S_8	
	30°C	S_4, S_5, S_6 S_8, S_9, S_{11}, S_{12}, S_{13}	S_4, S_5, S_8, S_9,S_{11}, S_{12}, S_{13}	S_5, S_8	S_5, S_{12}	S_5, S_8	5.5+
	40°C	S_5, S_8, S_{12}, S_{11}	S_5, S_8, S_{12}	S_5	S_5	S_5	
	30°C	+++	+++	S_4, S_5, S_6, S_8, S_9, S_{10}, S_{11} S_{12}, S_{13}	S_4, S_5, S_6, S_8, S_9 S_{10}, S_{11} S_{12}, S_{13}	S_4, S_5, S_6, S_8, S_9 S_{10}, S_{11} S_{12}, S_{13}	7
	40°C	S_6, S_8, S_5, S_{12}, S_{11} S_4, S_{10}, S_9 ,S_{13}	S_6, S_8, S_5, S_{12}, S_{11} S_4, S_{10} S_9 ,S_{13}	S_4, S_5, S_8, S_{12}	S_4, S_5, S_{11}, S_{12}	S_4, S_5, S_8, S_{12}	
	30°C	S_6, S_8, S_5, S_{12}, S_{11} S_4, S_{10} S_9, S_{13}	S_6, S_8, S_5, S_{12}, S_{11} S_4, S_{10} S_9,	S_4, S_5, S_8, S_{12}	S_4, S_5, S_{11}, S_{12}	S_4, S_5, S_8, S_{12}	7+
	40°C	S_5, S_8, S_{11}, S_{12}	S_5, S_8, S_{11}, S_{12}	S_5, S_8	S_5, S_{12}	S_5, S_8	
	30°C	+++	+++	S_4, S_8, S_5, S_{12}, S_{11} S_6, S_{10} S_9	S_4, S_8, S_5, S_{12}, S_{11} S_6, S_{10} S_9, S_{13}	S_4, S_8, S_5, S_{12}, S_{11} S_6, S_{10} S_9, S_{13}	8.5
	40°C	S_4, S_8, S_5, S_{12}, S_{11} S_4, S_{10} S_9	S_4, S_8, S_5, S_{12}, S_{11} S_4, S_{10} S_9	S_4, S_8, S_5, S_{12}, S_{11}	S_8, S_5, S_{12}, S_{11}	S_8, S_5, S_{12}, S_{11}	
	30°C	S_4, S_8, S_5, S_{12}, S_{11} S_{13} S_9, S_{10}	S_4, S_8, S_5, S_{12}, S_{11}, S_{13}, S_9, S_{10}	S_5, S_8, S_{11}, S_4	S_5, S_8 S_{11}, S_{12}	S_5, S_8, S_{11},S_{12}	8.5⁺
	40°C	S_4, S_8, S_5, S_{12}, S_{11}	S_8, S_5, S_{12}, S_{11}	S_5, S_8	S_5, S_{12}	S_5, S_8	

S_1 : *K.sp* S_4: *A.calcoaceticus* S_7: *S.maltophila* S_{10}: *P.fulva* S_{13}: *O.cicerti*

S_2 : *K. pneumonai* S_5: *P.putida* S_8: *R.equi* S_{11}: *E.hormaechi* +++ :tous les souches

S_3: *S.haemolyticus* S_6:*A.radioresistans* S_9: *P.parfulva* S_{12}: *B.licheniformis* **pH⁺ :** + 0.4M de NaCl

D'après le tableau IX, Les souches présentant une grande capacité de dégrader les hydrocarbures sont : *Pseudomonas putida*, *Bacillus licheniformis* , *Enterobacter hormaechi*, *Rhodococcus equi* et *Acinetobacter calcoaceticus*.

Ces bactéries ont montré une préférence spécifique aux différentes fractions testées et par conséquent, une capacité différentielle d'utiliser les hydrocarbures pétroliers. Parmi ces souches *Pseudomonas putida* présente un meilleur pouvoir dégradant de toutes les fractions d'hydrocarbures dans les différentes conditions expérimentales. Elle est décrite

comme l'un des seuls microorganismes capable d'utiliser le benzène, le toluène, l'ethylbenzène, le phénol et d'autres composés aromatiques comme seule source de carbone et d'énergie (Mazzeo *et al*., 2010).

La biodégradation des hydrocarbures est l'un des premiers mécanismes conduisant à la transformation de ces polluants en produits moins toxiques. Les travaux de recherche sur l'oxydation des hydrocarbures par les microorganismes ont montré que ce processus dépend de la structure chimique des hydrocarbures et des conditions environnementales. Les facteurs physico-chimiques influant sur la vitesse de biodégradation microbienne sont: la température, le pH et la salinité (Leahy et Colwell, 1990).

La dégradation du pétrole ou du gasoil par les souches testées est facile par rapport à celle des hydrocarbures aromatiques. En effet, ces composés sont différents par leur susceptibilité à l'attaque microbienne. Ainsi, la vitesse de biodégradation est plus élevée pour les aliphatiques qui présentent plus de 60% de pétrole ou de gasoil (Soltani, 2004), viennent ensuite les aromatiques légers (Mesbaiah et Badis, 2013). Une grande variété de bactéries peuvent assimiler les hydrocarbures aliphatiques. Cependant, les composés aromatiques peuvent être oxydés mais sont assimilés par quelques bactéries seulement (Widdel et Rabus, 2001), généralement de Gram-négatif, telle que les espèces du genre *Pseudomonas* (Chablain *et al.,* 2001 ;Suenaga *et al.,* 2001).

Das et Mukerjee (2007) signalent que les n-alcanes sont préférentiellement dégradés par rapport aux hydrocarbures aromatiques. Les n-alcanes sont généralement les plus rapidement biodégradés suivent des alcanes ramifiés (Borresen *et al.,* 2003), alors que les cyclanes et les aromatiques sont plus résistants aux attaques bactériennes (Asia, 2012). Cependant, la richesse du gasoil en hydrocarbures aliphatiques lourds généralement autour du cétane (C_{16}) qui représente des fractions récalcitrantes peut expliquer dans certaines conditions expérimentales la différence entre le nombre de souches dégradant le pétrole et celles dégradant le gasoil.

La croissance de toutes nos souches a été observée à 30°C, suggérant qu'elles sont mésophiles. L'augmentation de la température à 40°C conduit à l'inhibition de certaines souches testées dans toutes les conditions de pH et de salinité. Les souches ayant poussé à 40°C sont thermotolérantes.

La température joue un rôle essentiel dans la biodégradation des hydrocarbures en affectant, non seulement la nature physico-chimique de ceux-ci, mais aussi en modifiant leur taux de biodégradation qui décroit généralement avec la température en raison de la diminution de l'activité enzymatique des microorganismes présents. Ce taux atteint généralement son maximum à des températures de l'ordre de 30°C. En deçà de ces températures, l'efficacité de la biodégradation microbienne est limitée. (Head *et al*., 2006).

La tolérance des souches isolées à la salinité et à variation du pH est conforme aux conditions prévalant dans le site où les sols d'origine ont été recueillis. Le changement de biodégradabilité de ces hydrocarbures peut être dû à ses natures et leur assimilation (Terry *et al*., 2012).

Le pH peut affecter l'activité microbienne. La plupart des bactéries sont capables de se développer dans un intervalle de pH allant de 5 à 9 avec un optimum se situant aux alentours de 7 Selon Ballerini (1999).

La biodégradation aérobie des hydrocarbures débute par une oxydation qui permet l'activation des composés, qu'ils soient aromatiques ou aliphatiques. Pour les alcanes, le système enzymatique dépend de la taille de la chaîne carbonée. L'alcool formé par l'oxydation d'un alcane est à son tour oxydé par une déshydrogénase et donne finalement un acide (Philippe, 2014). Cette acidification du milieu se produisant après dégradation partielle de ces composés s'avère préjudiciable aux microorganismes qui se dégradent, d'où l'intérêt d'un pH légèrement basique (8,5) qui aurait un effet positif sur la dégradation des hydrocarbures.

La salinité est un facteur influençant négativement la croissance des microorganismes. Une forte concentration de NaCl peut dénaturer les protéines et par conséquent abaisser l'activité enzymatique conduisant au ralentissement des processus de dégradation des hydrocarbures (Atlas et Bartha, 1993). La croissance de certaines souches bactériennes étudiées en présence de sel, suggère qu'elles sont halotolérantes.

L'importance du nombre de souches ayant poussé en présence de NaCl (0,4 M) à pH 8,5 confirme la nécessité du pH basique et de la salinité dans le processus de biodégradation des hydrocarbures. En effet, l'importance du NaCl dans la perméabilité ionique de la

membrane cellulaire et la régulation de la pression osmotique à l'intérieur de la cellule a souvent été évoquée (Marti et Balcázar, 2014).

II.3.5. Interactions entre les souches sélectionnées

Les interactions entre les souches sélectionnées pour leur capacité à dégrader les différents types d'hydrocarbures sont consignées dans le tableau X:

Pour faciliter la lecture des résultats, les noms des souches sont remplacés par des lettres comme suite : *A.calcoaceticus*(**A**), *P.putida*(**B**), *B.licheniformis* (**C**), *E.hormaechi* (**D**) et *R.equi* (**E**).

Tableau X: Interactions entre les souches sélectionnées

Souches	A_e	B_e	C_e	D_e	E_e
A_d		+	+	-	+
B_d	+		+	-	+
C_d	+	+		+	+
D_d	-	-	+		-
E_d	+	+	-	-	

e : étalée
d : déposée

Une interaction positive (Synergie) est révélée entre les souches *A.calcoaceticus*, *P.putida*, *B.licheniformis* *et R.equi* (Tableau X). En effet, on assiste au développement simultané de chacune de ces souches assemblées sans apparition de zone d'inhibition. Cependant, inverser la situation ne conduit pas toujours aux mêmes résultats. C'est le cas de l'association entre *B.licheniformis*(C_e) et *R.equi* (E_d).

La souche *E.hormaechi* est inhibée par la plupart des souches testées. On parle dans ce cas d'une interaction négative (antagonisme) (Tableau X).

Les interactions entre les microorganismes les mieux connues sont des interactions de compétition ou de coopération. Les capacités de biodégradation de ces différents microorganismes hydrocarbonoclastes sont bien connues lorsqu'ils sont cultivés, mais dans l'environnement, la biodégradation des hydrocarbures serait impossible sans les interactions interspécifiques entre ces micro-organismes. Au vu de la grande diversité de molécules

organiques dans l'environnement, ces dégradeurs se sont adaptés, spécialisés et présentent donc une grande diversité. Ils ont ainsi pour la plupart, des préférences pour la dégradation de certains types d'hydrocarbures, ce qui implique dans le cas de la biodégradation du pétrole une succession de dégradeurs spécialisés à différentes étapes de dégradation. D'autre part, cette spécialisation se traduit aussi par le partage de métabolites d'une voie de dégradation entre plusieurs espèces (cométabolisme) (Kanaly and Harayama, 2000).

Le synergisme qui traduit le résultat bénéfique de l''association de deux ou plusieurs espèces de micro-organismes, lors de la synthèse d'un produit ou lors de la réalisation complète d'une voie métabolique, comme dans le cas du cyclohexane qui peut être totalement dégradé par une culture mixte de *Nocardia* et de *Pseudomonas* alors que chacune des espèces prise isolément ne peut le faire. *Nocardia* a la capacité de métaboliser le cyclohexane en formant des produits qu'utilise ensuite *Pseudomonas,* qui génère à son tour de la biotine et d'autres facteurs de croissance nécessaires au développement de *Nocardia* (Vogel, 2001)

Le phénomène d'antagonisme remarqué entre la souche *E.hormaechi* et les autres souches peut être expliqué par la production de métabolites inhibiteurs par ces dernières contre cette souche qui ne pourra ainsi venir coloniser le milieu. Ces substances peuvent être des acides, des alcools, des antibiotiques et même des métabolites issus de la biodégradation des polluants (exemple : crésol qui est un métabolite de la dégradation et une substance inhibitrice de nombreux micro-organismes (Vogel, 2001).

II.4. Potentiel dégradant des souches sélectionnées

Afin d'évaluer le potentiel des souches sélectionnées à dégrader les hydrocarbures, des tests biologiques sont effectués en cultures pures ou mixtes en présence de 2% de pétrole brut.

II.4.1. Evolution de la biomasse

Les résultats du suivi des biomasses des cultures bactériennes sont représentés dans la figure 9:

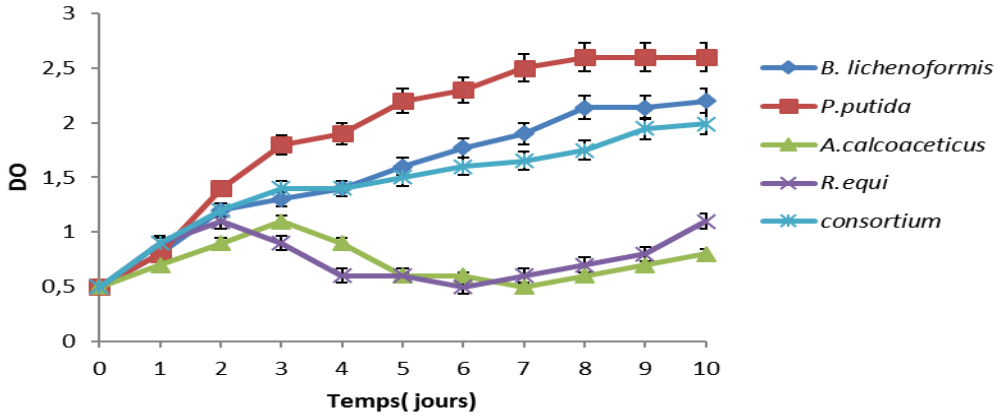


Figure 9: Cinétique de croissance des souches étudiées

L'incubation des quatre souches étudiées, séparément ou en consortium, en présence de 2% de pétrole brut pendant 10 jours conduit, pendant les deux premiers jours à l'augmentation de leurs biomasses traduite par l'augmentation de la densité optique du milieu réactionnel. En effet, les DO, initialement de 0.5 évoluent pour atteindre les valeurs de 0.9, 1.3, 1.22, 1.2 et 1.3 pour *A.calcoaceticus* ,*P.putida*, *B.licheniformis*, *R.equi*et le consortium respectivement (Figure 9).Au-delà du 2ème jour, les biomasses de *P.putid*, *B.licheniformis* et du consortium continuent à augmenter jusqu'à la fin de l'expérimentation pour atteindre des DO de 2.6, 2.32 et 1.82 respectivement. A l'opposé, les souches *R.equi* et *A.calcoaceticus* voient leurs biomasses diminuer jusqu'à atteindre les valeurs initiales le 6ème jour, avant d'assister à une reprise de croissance traduite par l'augmentation de la DO atteignant à la fin de l'expérimentation les valeurs de 1.17 et 0.9 respectivement (Figure 9).

L'évolution de la biomasse dans le milieu liquide en présence des hydrocarbures suggère leur capacité à les dégrader et les utiliser comme une source de carbone et d'énergie (Guermouche, 2014).

Parmi les microorganismes aptes à se développer sur les hydrocarbures, les bactéries restent qualitativement et quantitativement prépondérantes pour métaboliser ces substrats (Zairi *et al*., 2002 ; Ould-boudia et Hammadi, 2011).

L'absence de phases de latence dans toutes les cultures peut être expliquée par leur adaptation naturelle vis-à-vis du pétrole brut comme source de carbone utilisée (Akmousi, 2009).Par ailleurs, l'augmentation de la biomasse microbienne correspondrait à la phase

exponentielle, phase durant laquelle la dissolution du substrat « pétrole brut » suffit aux besoins métaboliques des souches (Karina *et al.*, 2015).

La diminution des biomasses des souches *R.equi* et *A.calcoaceticus* constatée après le 2ème et le 3ème jour d'incubation peut être expliquée par le niveau des exigences nutritionnelles qui surpasse la vitesse de dissolution du substrat, la biodisponibilité devient alors limitante (Rocha *et al*., 2007). Durant cette phase, les fractions les plus complexes du pétrole sont dégradées (Khelil-radji, 2015). Cependant, cette diminution peut aussi être due à la distribution différente de ces bactéries entre les deux phases de nos cultures (liquide / huile)(Karina *et al.*, 2015).

II.4.2. Taux de biodégradation du pétrole

Les taux de biodégradation des hydrocarbures par les souches sélectionnées ont été déterminés à partir des cultures bactériennes sur une période de 240 heures. Les pourcentages de biodégradation sont montrés par la figure 10:

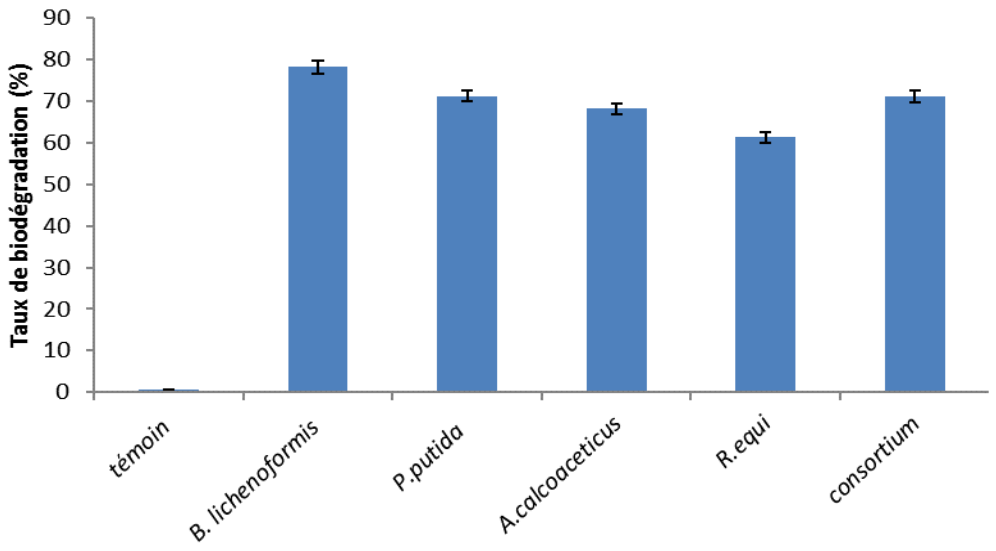


Figure 10: Taux de biodégradation de pétrole brut

D'après la figure10, le pétrole brut semble être facilement biodégradable par les souches testées. En effet, le taux de minéralisation de ce polluant par toutes les souches testées et leur consortium dépasse les 50%. Le taux le plus élevé de 78.23% est enregistré en

présence de *B.licheniformis* suivi de celui enregistré en présence de *P.putida (*71.56%), *A.calcoaceticus (*68.56%) et enfin *R.equi* ayant conduit à un taux de dégradation de 61.82%.Le consortium bactérien ayant un taux de biodégradation des hydrocarbures de 73.06% met en évidence une bonne synergie entre les quatre souches testées. Par ailleurs, un taux de minéralisation de 0.57 %de pétrole brut est enregistré dans le témoin (Figure10).

La dynamique des communautés microbiennes dépend de la nature des hydrocarbures et de leurs concentrations (Head *et al*., 2006). L'aptitude à métaboliser le pétrole est donnée à de nombreux types de microbes, mais certains sont plus polyvalents que d'autres. Les cinétiques de croissances obtenues sont très variables car les vitesses de dégradation des hydrocarbures sont très différentes selon que les composés soient fournis individuellement ou en mélange (Solano-Serena *et al*., 2001).

Les hydrocarbures sont des molécules inertes du point de vue chimique et doivent être activées par les bactéries en conditions aérobie (Soltani, 2004). Les bactéries sont capables de dégrader une large gamme de composés allant des alcanes aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (Rodrigues *et al.,* 2013). Les réactions initiales de transformation des hydrocarbures font intervenir une grande diversité d'enzymes spécifiques des bactéries hydrocarbonoclastes. Ces enzymes sont codées par différents gènes dont la localisation, l'organisation et la régulation apparaissent également diversifiées (Bertrand *et al.,* 2011).

La culture mixte montre un avantage de dégradation comme la majorité des monocultures, ce qui peut être expliqué par la stabilité du consortium avec une importante adaptation de ces bactéries dans des combinaisons synergétiques.

La plupart des études rapportées dans la littérature sur la biodégradation du pétrole brut ont été réalisées avec des cultures de bactéries simples ou mixtes .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).

II.4.3. Evolution du Potentiel d'hydrogène (pH)

La figure 11 représente l'évolution des valeurs de pH des cultures bactériennes en fonction du temps.

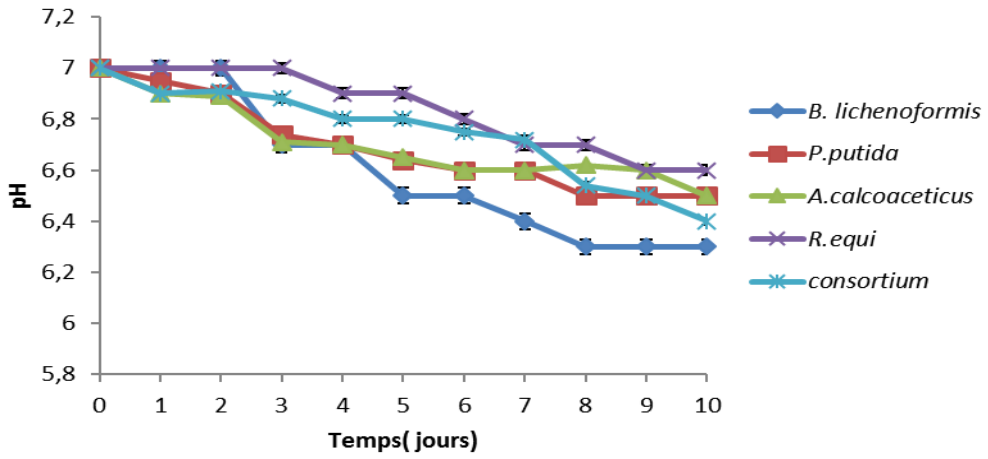


Figure 11: Variation du pH des cultures en fonction de temps

L'évolution du pH dans le temps (pendant 10 jours) est représentée par la figure11

Au temps initial de la croissance (T_0), le pH est ajusté à 7. Durant le premier jour de l'expérience, le pH diminue légèrement pour toutes les souches. À partir du3^{ème} jour jusqu'à la fin de l'expérience, les valeurs du pH diminuent progressivement pour la plupart des cultures jusqu'à atteindre des valeurs minimales de 6.67, 6.51 et 6,4 pour les cultures inoculées par *R.equi* , consortium et *B.licheniformis* respectivement (Figure11).

L'acidification du milieu réactionnel par les bactéries hydrocarbonoclastes due à l'abaissement de son pH a souvent été signalé (David, 2008 ; Vanessa *et al*., 2011).Cephénomène peut être du aux différentes réactions biochimiques qui entraînent l'assimilation des composés de pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie par ces bactéries et la synthèse des acides gras porteurs de groupement COOH (Khelil-Radji, 2015)et de différents acides (formique, acétique, butyrique et lactique), produits par oxydation de la matière organique ou sa fermentation (Díaz *et al*., 2013).Ces groupements représentent

des métabolites intermédiaires de biodégradation des hydrocarbures avant leur minéralisation complète par les micro-organismes hydrocarbonoclastes (Sarai *et al*., 2015).

II.4.4. Evolution de l'index d'émulsion E_{24}

L'indice E_{24} permet une estimation quantitative du taux d'émulsification par les différents isolats. Les résultats obtenus dans cette étude sont représentés sous forme des courbes exprimant l'évolution de l'index d'émulsion E_{24}dans les cultures bactériennes durant 10 jours (figure 12).

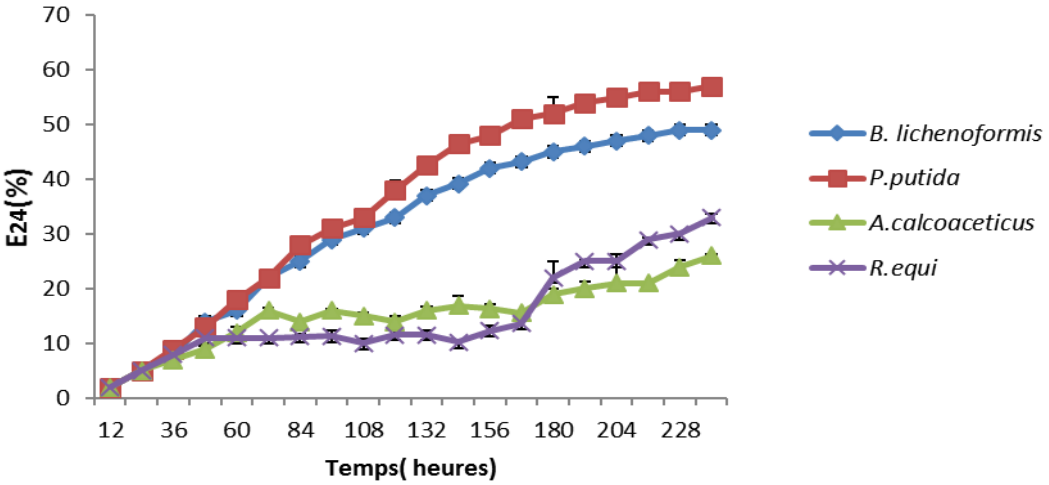


Figure 12 : Evolution de l'index d'émulsion E_{24} des cultures bactériennes

L'index d'émulsion des milieux de culture des quatre souches testées tend à augmenter dès les premières heures d'incubation de manière comparable. Au delà la 60ème heure, on assiste à l'augmentation exponentielle du E_{24} des milieux de *P.putida*et de *B.licheniformis,*plus prononcée que celle des milieux de *A.calcoaceticus* et de *R.equi*. Cet index atteint 57.68 % et 49.54 % respectivement au bout de 240 heures de fermentation des deux premières souches alors qu'il est caractérisé par une stabilité, ne dépassant pas 11.2% et 16.6% entre la 60ème et la 180ème heure, avant de tendre à augmenter de nouveau pour atteindre des valeurs de 33.2% chez *R.equi* et 29.6% chez *A.calcoaceticus* à la fin de l'expérimentation (Figure12).

Il apparait clairement, d'après les résultats obtenus que les quatre souches bactériennes ont la capacité d'émulsionner le pétrole brut. Cependant, la vitesse et la période

de production des biosurfactants, à l'origine de l'augmentation du E_{24} des milieux de culture diffèrent d'une souche à l'autre, avec un net avantage de *P.putida* et *B.licheniformis* sur *A.calcoaceticus* et *R.equi*.

Les microorganismes qui dégradent les hydrocarbures produisent des substances tensioactives permettant la stabilité de la phase hydrophobe dans l'émulsion. Ces biosurfactants sont principalement produits par des micro-organismes aérobies dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone comme les hydrocarbures. Ils sont des métabolites microbiens qui peuvent être excrétés dans les milieux extracellulaires ou incorporés principalement dans la paroi cellulaire facilitant ainsi la diffusion d'un substrat hydrophobe dans la cellule (Al-arajil *et al*., 2007).

Selon Yadav *et al*. (2016), les molécules de surfactants tendent à s'accumuler aux interfaces de deux phases de polarités différentes. Par ces propriétés, les agents tensioactifs peuvent donc augmenter la solubilité apparente des composés hydrophobes, ce qui explique l'augmentation de l'indice d'émulsion (E_{24}) (Deschene, 1995).

La différence de l'évolution de l'indice E_{24} constatée dans les milieux de culture des souches étudiées s'expliquerait par la diversité des bio-émulsifiants produits par ces souches (Raza *et al.*, 2007).

La relation existant entre l'augmentation de la biomasse, l'index d'émulsion et la production de biosurfactantpeut être expliquée par la phase prolongée de la croissance microbienne (Das *et al.*, 2009). En effet, le principal rôle physiologique du biosurfactant est de permettre aux microorganismesde se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension interfaciale entre l'eau et le substrat, rendant ainsi ce dernier plus facilement accessible (Sandoval *et al.*, 2000). Ceci confirme que la production de biosurfactant s'effectue pendant la phase exponentielle de croissance, suggérant qu'il est produit comme métabolite primaire (Amiriyan *et al*., 2004).

La production de biosurfactants par les souches bactériennes étudiées a été signalée par plusieurs auteurs (Bayoudh *et al*., 2006). Ces composés présentent une grande variété de structures chimiques tels les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les acides gras ou les lipides neutres (Gudiña *et al.*, 2013; Geys *et al.*, 2014). Parmi les biosurfactants les

mieux étudiés,les rhamnolipides qui appartiennent à la classe des glycolipides. Ce type de biosurfactant a été identifié principalement chez *P.putida* (Zhang et Miller, 1995; Beal et Betts, 2000). Ainsi, en présence des hydrocarbures dans un milieu pollué, les espèces du genre *Rodococcus* produisent généralement des biosurfactant glycolipidiques (Bayoudh *et al*., 2006).

La souche bactérienne *A.calcoaceticus* a aussi la capacité de produire du biosurfactant lui permettant de solubiliser les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). L'emulsan est le biosurfactant sécrété par cette souche le plus connu (Bayoudh *et al*., 2006).

Les espèces de *Bacillus* produisent un large spectre de biosurfactants lipopeptidiques, qui sont des molécules cycliques constituée d'un acide gras de longueur variable (fragment hydrophobe) lié à une chaîne peptidique courte (fraction hydrophile) de sept ou dix acides aminés. Parmi eux, la surfactine, un lipoheptapeptide produit par la souche *B.licheniformis* est l'un des biosurfactants les plus efficaces connus jusqu'à présent (Gudiña *et al*., 2013).

II.4.5. Evolution de l'hydrophobicité cellulaire

Les résultats du test MATH mettant en évidence l'évolution de l'hydrophobicité cellulaire traduite par le pourcentage d'adhésion des cellules bactériennes au pétrole sont consignés dans la figure 13 :

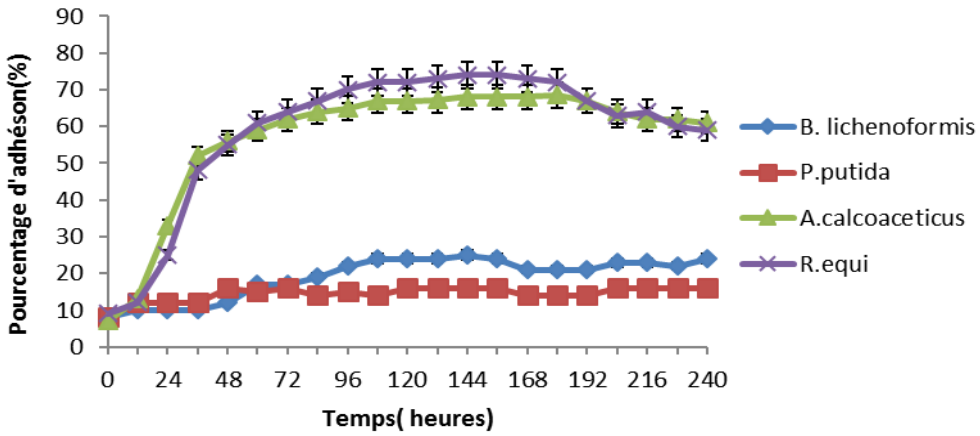


Figure 13:Evolution de l' hydrophobicité des surfaces cellulaires des souches étudiées

La figure 13 laisse apparaitre deux cas de figures. Une forte augmentation de l'hydrophobicité des surfaces cellulaires des souches *R. equi* et *A. calcoaceticus,* dont les valeurs passent de 10% à plus de 50% au bout de 48 heures de fermentation. Pendant ce temps, ce paramètre n'évolue presque pas chez *B .licheniformis* et *P.putida*.

Entre 48h et 168h de fermentation, l'augmentation de l'hydrophobicité continue, mais lentement jusqu'à atteindre les valeurs maximales de 73.3% pour *R.equi* et de 68.24% pour *A.calcoaceticus* (Figure13). Ces souches ayant un pourcentage d'adhésion supérieur à 50% sont donc hydrophobes.

L'hydrophobicité des surfaces cellulaires de *B.licheniformis* ne commence à augmenter timidement qu'après 48 heures de fermentation au contact du pétrole brut. Sa valeur exprimée en pourcentage d'adhésion passe de 10% à 12% (Figure13). Elle continue d'augmenter pour atteindre un maximum de 24% au bout de 108 heures et reste constante jusqu'à la fin de l'expérience. Cette souche bactérienne dont l'hydrophobicité est comprise entre 20 et 50% est donc moyennement hydrophobe.

Parallèlement, le pourcentage d'adhésion des cellules de *P.putida* au pétrole ayant atteint un maximum de 16% après 48 heures de fermentation, ne dépasse plus cette valeur jusqu'à la fin de l'expérimentation. Notons que les parois des cellules de cette dernière souche hydrophile, présentent le pourcentage d'adhésion le plus faible, inférieur à 20% (Figure13).

L'augmentation de l'hydrophobicité des souches *R.equi* et *A.calcoaceticus* jusqu'à atteindre des valeurs supérieurs à 50% résulterait de l'augmentation de leur affinité au pétrole (Olivier *et al*., 2007).

Par ailleurs, l'évaluation des biomasses bactériennes de *R.equi* et *A.calcoaceticus* semble être influencée par le degré d'hydrophobicité des parois cellulaires de ces deux souches. En effet, l'augmentation du pourcentage d'adhésion des parois de ces souches, conduisant à leur adhésion à la phase hydrophobe (polluant), les rend moins disponibles dans la phase aqueuse conduisant ainsi à une sous estimation de leurs biomasses.

Le niveau d'hydrophobicité le plus élevé, correspondrait à la forte adhésion des cellules bactériennes à la phase hydrophobe du pétrole, permettant l'oxydation et l'utilisation directe des alcanes par ces dernières. Cette hydrophobicité est due, en grande partie à la

présence des composés de surface de la bactérie utiles à l‘adhésion (Fadhile, 2014). Ce paramètre tend à diminuer à la fin de l’expérience, traduisant la disponibilité à nouveau des fractions simples dans la phase aqueuse et par conséquent, la détection d’une plus forte biomasse. Cela montre que ces cellules ont la capacité de réguler l'hydrophobicité de leurs surfaces cellulaires en fonction des conditions environnementales (Bayoudh *et al*., 2006 ; Liesse, 2012).

En outre, Whyte *et al*. (1999) ont rapporté que les souches du genre *Acinetobacter* et *Rodoccoocus* produisent des substances polymères extracellulaires (EPS), morphologiquement différentes selon le substrat utilisé. Ces molécules sont responsables de la capacité de ces souches à adhérer à des substrats hydrophobes.

L‘étude de Boutaleb (2007) a montré que l‘adhésion des bactéries hydrophobes est généralement supérieure à celle des bactéries hydrophiles. Ce constat peut expliquer la diminution de la concentration des cellules libres dans les milieu de culture inoculées par *R.equi* et *A.calcoaceticus* associée à la production de biosurfactant qui pourrait faciliter l’adhérence des cellules bactériennes aux molécules de substrats hydrophobes et les métaboliser, permettant ainsi la stabilité de la phase hydrophobe dans l’émulsion (Joo-hyun *et al*., 2015).

Les interactions hydrophobes entre le substrat et la cellule microbienne sont d'ailleurs complexes car les biosurfactants produits sont susceptibles d'affecter l'hydrophobicité cellulaire. En effet, le rôle physiologique des biosurfactants est multiple. Ils interviennent dans la formation de biofilms, facilitent l’association en surface des bactéries et de part ce fait, la formation d’agrégats et peuvent donc s’associer aux gouttelettes d’hydrocarbure ou même entrer dans la phase organique pendant la culture(Pamp et Tolker-Nielsen, 2007).Ces bactéries synthétisent les biosurfactants qui sont soit des molécules intracellulaires, extracellulaires ou localisées à la surface de la cellule pour faciliter la diffusion des hydrocarbures ou leurs dérivés à l’intérieur de la cellule bactérienne afin de les dégrader (Prabhu *et al*., 2003).

Une relation entre les mécanismes d’accessibilité, les bactéries et le substrat hydrophobe est mise en évidence. En effet, dans le cas de *B.licheniformis* et *P.putida*, l'intervention de biosurfactants produits par ces souches accélère le transfert des

hydrocarbures en augmentant l'aire interfaciale entre la phase hydrophobe et la phase hydrophile. On parle de transfert interfacial assisté. L'action des biosurfactants est souvent complexe. Ils participent à la pseudosolubilisation des alcanes nécessaires à la croissance, ce qui provoque une augmentation de leur biomasse cellulaire dans la phase aqueuse, tandis que les *R.equi* et *A.calcoaceticus* présentent la capacité à dégrader les hydrocarbures en phase hydrophobe. L'hydrophobicité élevée de leurs enveloppes permet l'adhésion du microorganisme aux gouttelettes de substrat présentes dans le milieu aqueux, souvent de taille supérieure à celle des bactéries. Le substrat pénètre directement dans la cellule par diffusion ou transport actif sans dissolution préalable dans la phase aqueuse (accession interfaciale) (Perfumo *et al*., 2010). Leurs biosurfactants restent associés aux cellules bactériennes pendant la croissance, puis sont libérés massivement lorsque le microorganisme a cessé toute croissance (Joo-hyun *et al*., 2015).

II.5. Effets de l'immobilisation des isolats

Cette étude est effectuée afin d'évaluer l'effet de l'immobilisation des cellules bactériennes sur le taux de dégradation des hydrocarbures pétroliers.

II.5.1. Effet de la nature du support d'immobilisation sur la biomasse bactérienne

La figure 14 représente l'effet des différents supports choisis sur l'évolution des biomasses des souches testées, traduit par le changement de la DO du milieu réactionnel.

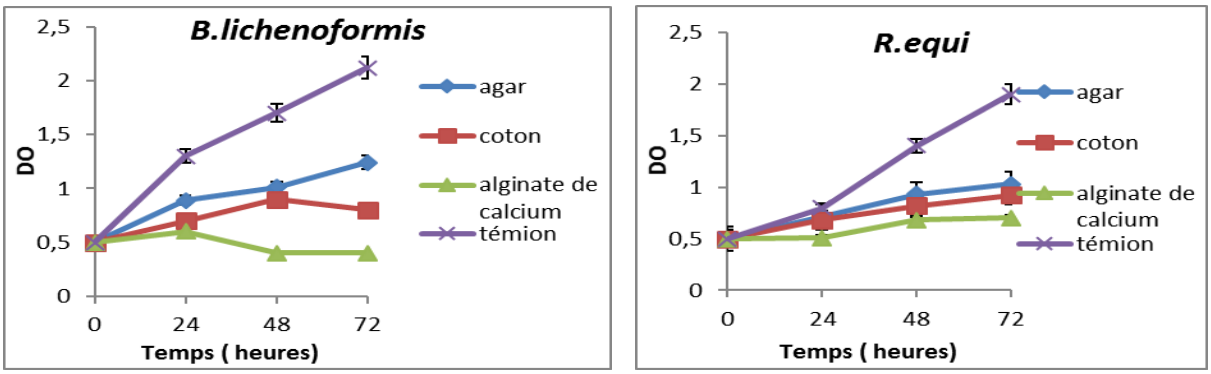


Figure 14: Evolution des biomasses des souches testées

La figure 14 illustre l'évolution de la densité optique (DO) des cultures bactériennes en fonction de la nature du support d'immobilisation pendant 72 heures de cultures liquides.

En absence de supports d'immobilisation, on assiste à une augmentation exponentielle de la densité optique des milieux de culture des deux souches testées, traduisant l'augmentation de leurs biomasses depuis les premières heures de fermentation jusqu'à la fin de l'expérience (Figure 14).

L'addition de supports d'immobilisation dans les milieux d'incubation est accompagnée de la réduction des biomasses bactériennes libres, traduite par la diminution de la DO de ces milieux. Cette diminution varie en fonction de la nature du support. En effet, l'alginate de calcium est le support ayant le plus fort pouvoir fixateur des cellules des deux souches dont les DO des milieux réactionnels ne dépassent pas 0.7 pour *R. equi* et 0.6 pour *A.calcoaceticus*, alors que les DO maximales des milieux contenant de l'agar ou du coton sont respectivement de 1.03 et 0.92 en présence de *R.equi* et 1.24 et 0.9 en présence de *A. calcoaceticus*, traduisant leur plus faible pouvoir d'immobilisation (Figure 14).

La diminution des valeurs des biomasses dans les cultures en présence des différents matériaux comparées aux témoins est reportée à l'attachement des cellules microbiennes sur ces supports conduisant à une diminution de la quantité de cellules libres (Phillips *et al*., 2010).

L'adhérence de ces micro-organismes à une surface est effectuée par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice qui les lie fortement à cette surface (Phillips *et al*., 2010). D'autre part, pour une surface donnée, l'adhésion est en fonction de la souche bactérienne utilisée et des caractéristiques physicochimiques des différents supports. Toute modification des caractéristiques de surface des microorganismes peut entraîner une augmentation ou une diminution de l'adhésion bactérienne (Baillif *et al*., 2010).

Les micro-organismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées (Bendinger, 2003). La rugosité superficielle élevée des fibres de coton a été considérée comme un facteur important pour l'immobilisation des cellules (HSU *et al*., 2014).

La diminution maximale des biomasses des bactéries en présence de l'alginate de calcium peut être due à l'affinité des cellules bactériennes à ce support par rapport à d'autres matériaux. Ce qui montre que c'est le meilleur support utilisé. Il est le polymère de choix dans

la plupart des systèmes d'immobilisation car il est facile à manipuler, non toxique pour l'environnement et pour les micro-organismes piégés, disponible en grande quantité et peu coûteux (Wang *et al*., 2011). D'un point de vue physiologique, un grand avantage de l'alginate est que les cellules immobilisées ne souffrent pas des changements extrêmes de l'état physicochimique au cours de la procédure d'immobilisation (Bendinger, 2003).

L'adhérence des cellules bactériennes aux matériaux de support est due à la synthèse d'exopolysaccharides (EPS) par les bactéries lors de l'incubation (Obuekwe *et al*., 2001). Hazaimeh *et al.* (2014) ont aussi montré le rôle de la sécrétion d'EPS par les cellules bactériennes qui accélère la formation de biofilm bactérien sur la surface inerte. Ces fibres sont responsables de la formation d'une monocouche de cellules et certaines cellules ont même été encapsulées dans ces fibres (Donlan, 2002).

II.5.2. Taux de dégradation du pétrole par les souches bactériennes immobilisées

Les taux de biodégradation des hydrocarbures par les cultures bactériennes de deux souches immobilisés et libres après 7 jours sont illustrés dans la figure 15:

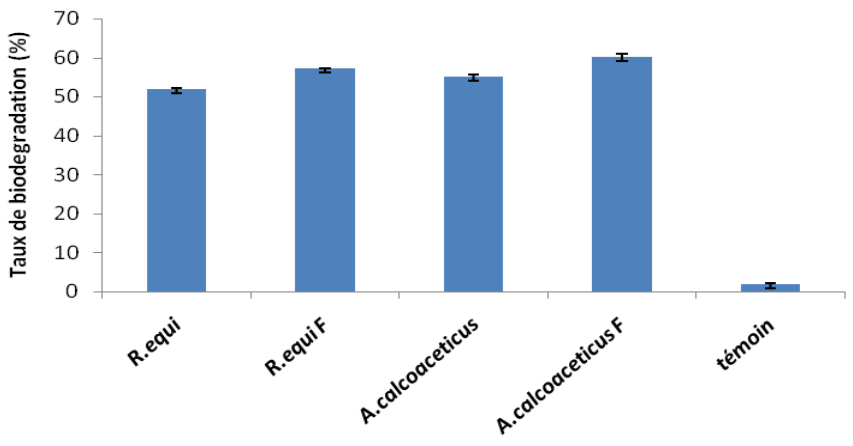


Figure 15: Taux de biodégradations du pétrole brut

D'après les résultats obtenus, la dégradation des hydrocarbures par les cellules fixées est meilleure que celle des cultures libres. La souche *A.calcoaceticus* immobile a pu éliminer 60.21% des hydrocarbures alors qu'à l'état libre, le taux de biodégradation de pétrole par cette même souche n'est que de 56.1%. L'effet de l'immobilisation est moins remarquable pour

R.equi dont les cellules ont dégradé 57.3 % du polluant lorsqu'elles sont immobiles et 52.21% lorsqu'elles sont à l'état libre (Figure15).

La différence de biodégradabilité dans les cultures bactériennes immobilisées et les cultures libres peut être expliquée par l'adsorption cellulaire qui fournit un contact direct entre les éléments nutritifs et les cellules immobilisées (Klein et Ziehr, 2014).

D'autre part, plusieurs études rapportent que les cellules immobilisées ont montré un taux de dégradation plus rapide que celui des cellules libres (Manohar *et al.,* 2001; Diaz *et al.,* 2002). Ceci est très probablement du à la forte efficacité de l'immobilisation des cellules et la forte affinité entre le support et le substrat, conduisant à une disponibilité accrue des substrats pour les cellules et une meilleure interaction entre le substrat et les cellules immobilisées, améliorant le taux de dégradation (Diaz *et al.,* 2002). L'adhésion est un moyen efficace pour augmenter la biodisponibilité et donc la biodégradation d'un composé hydrophobe (Obuekwe *et al.,* 2008).

II.6. Biodégradation des hydrocarbures contminant le sol par les bactéries sélectionnées

Parmi les souches bactériennes telluriques hydrocarbonoclastes isolées, *P.putida, B.licheniformis, A.calcoaceticus* et *R.equi* ont été retenues pour évaluer leur potentiel à dégrader les hydrocarbures pétroliers contaminant des échantillons de sol pendant une période de traitement de 60 jours. Ces espèces ont été signalées comme étant les plus rencontrées dans les sites pollués par les hydrocarbures (Wongsa *et al*., 2004 ; Bordenave *et al.,* 2007 et Maddela *et al.,* 2015).

II.6.1. Evolution du carbone organique totale

La figure 16 représente l'évolution dans le temps du carbone organique total dans les échantillons de sol traités.

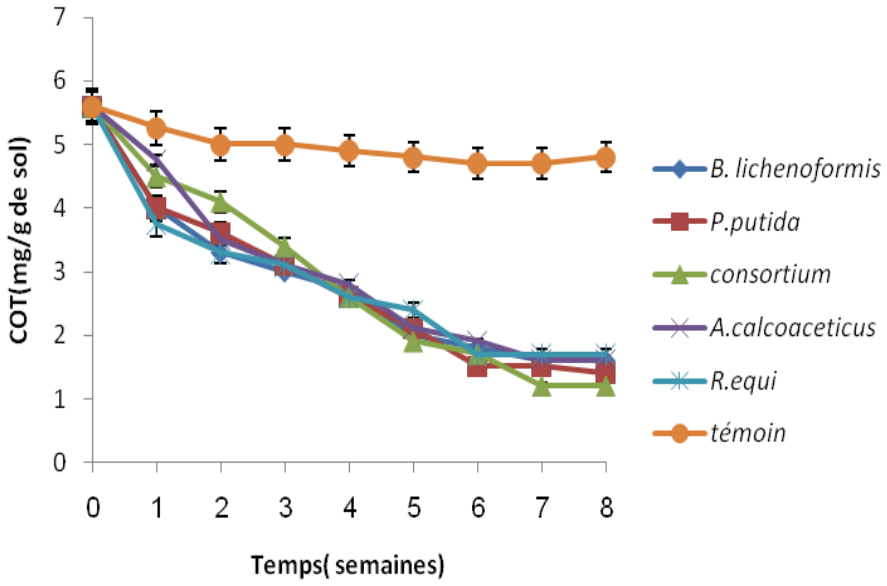


Figure 16: Evolution du carbone organique total dans les échantillons de sol traités

Des variations de concentration de carbone organique totale sont observées dans tous les échantillons pendant les huit semaines de traitement. Le COT est initialement évalué à 5.52mg/g de sol. Au cours de l'expérimentation, cette concentration diminue dans tous les échantillons bioaugmentés de façon significative, pour atteindre, après 6 semaines, des valeurs comprises entre 1.5 et 1.7 mg/g de sol dans les échantillons bioaugmentés par les différentes souches et seulement 1.2 mg/g de sol en présence du consortium des quatre souches. Ces valeurs restent inchangées jusqu'à la fin de l'expérimentation (Figure 16). La teneur en COT de l'échantillon de sol témoin ne diminue que légèrement, on enregistre à la fin de l'expérimentation une valeur de 5.07mg /g de sol (Figure16).

Il ressort des résultats obtenus que le consortium bactérien a conduit au plus fort taux de biodégradation, traduit par la teneur la plus faible en COT de l'échantillon de sol traité par ce consortium (Figure16).

Selon Elzbieta *et al.* (2009), la diminution de COT dans le sol est due à la diminution de la teneur des hydrocarbures, ce qui peut être expliqué par la biodégradation de ces polluants par les bactéries en utilisant ces derniers comme substrat de croissance où le carbone est converti en CO_2 et en biomasse.

La faible diminution de la quantité de COT au niveau de l'échantillon de sol pollué

et non bioaugmenté (témoin) est probablement due à l'évaporation des hydrocarbures.

II.6.2. Taux de biodégradation des hydrocarbures dans les échantillons de sol traités

Les taux de biodégradation des hydrocarbures dans les échantillons de sol artificiellement pollués par le pétrole brut et bioaugmentés par les souches étudiées sont illustrés dans la figure 17.

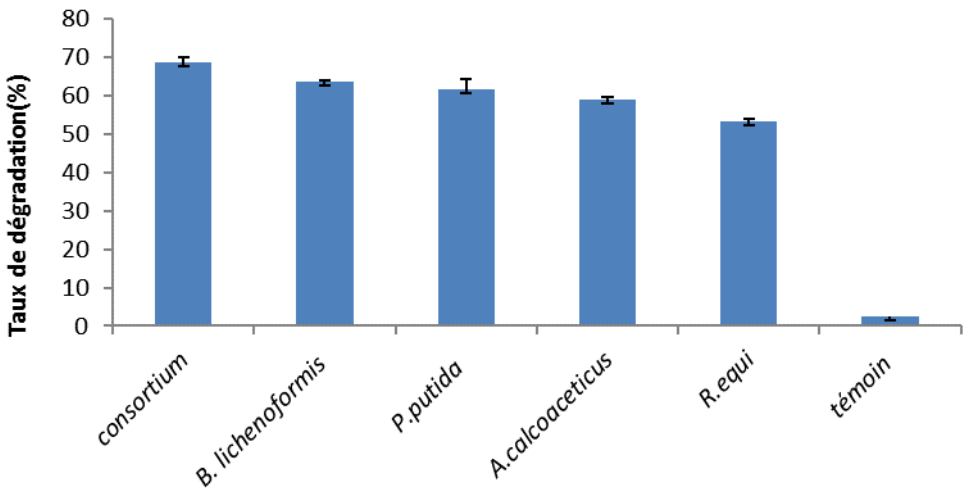


Figure 17: Taux de biodégradation des hydrocarbures par les bactéries sélectionnées

Après 8 semaines de traitement, on enregistre un maximum de dégradation du polluant dans l'échantillon bioaugmenté par le consortium bactérien (68.17%) et des taux de dégradation estimés à 63.85%, 61.71%, 58.9 et 53.22% dans les échantillons de sol bioaugmentés par les souches *B.licheniformis*, *P.putida*, *A.calcoaceticus* et *R.equi* respectivement(Figure17).

Dans l'échantillon témoin, non bioaugmenté et seulement stimulé, on assiste à la diminution du polluant de l'ordre de seulement 2.34% (Figure17).

La dissipation des contaminants organiques dans les échantillons de sol traités englobe plusieurs mécanismes de disparition. Pour les polluants organiques, il comprend la photo-oxydation, la volatilisation et la biodégradation (Head *et al.*, 2006). Dans notre étude, les échantillons de sol étant incubés à température ambiante et à l'ombre, c'est surtout le mécanisme de volatilisation qui est à prendre en compte pour expliquer les pertes au niveau

du témoin, la photo-oxydation étant minimisée. De même, la biotransformation ou la biodégradation pourraient alors expliquer la dissipation maximale des hydrocarbures observée dans les échantillons bioaugmentés par les souches étudiées.

L'utilisation d'une culture bactérienne mixte pour la dégradation du pétrole brut dans le sol est efficace par rapport aux cultures individuelles. En effet, chaque espèce bactérienne n'est capable de dégrader qu'un nombre restreint d'hydrocarbures (Sauret, 2011), alors que le pétrole est composé de centaines, voire de milliers de molécules de structure, de solubilité et de susceptibilité à être dégradé, totalement différentes et les enzymes nécessaires pour leur dégradation ne peuvent pas être trouvées chez un seul organisme (Rabus *et al*., 2016). Bordenave *et al.*(2007) et Al-Saleh *et al.*(2009) reportent qu'un micro-organisme métabolise seulement une gamme limitée de substrats hydrocarbonés. Selon Das et Chandran (2011), il est souvent difficile de trouver des organismes dégradant 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 du pétrole 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 (sol) (Warne *et al*., 2010).

Les conditions optimales d'humidité, 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).

II.6.3. Bilan de biodégradation des hydrocarbures

Les chromatogrammes de la GC-MS représentent des pics qui renseignent sur les hydrocarbures résiduels dans les échantillons de sols traités par les différentes souches individuellement ou en consortium.

Les figures 18,19, 20, 21, 22 et 23 mettent en évidence les différentes fractions du pétrole ainsi que ses produits de dégradation biotiques et abiotiques, représentés par des pics majeurs apparents.

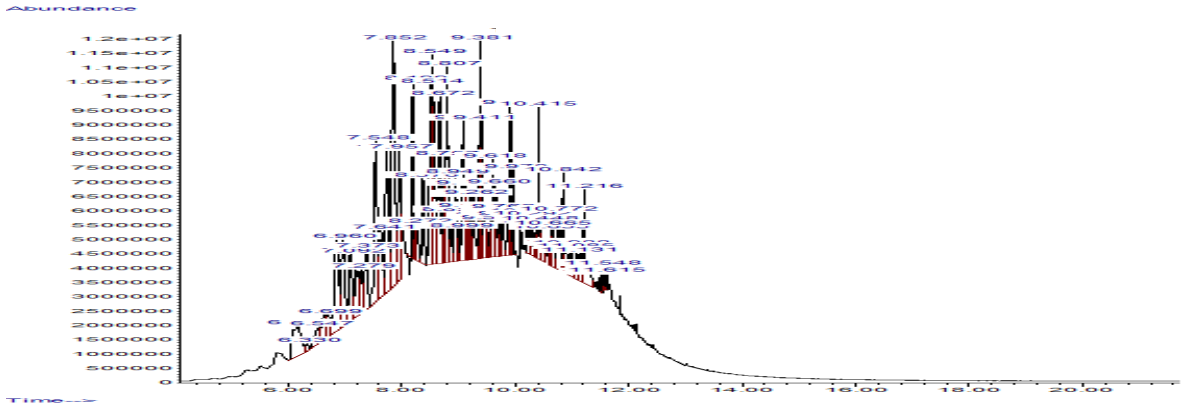


Figure 18: Chromatogramme des hydrocarbures détectés dans l'échantillon témoin

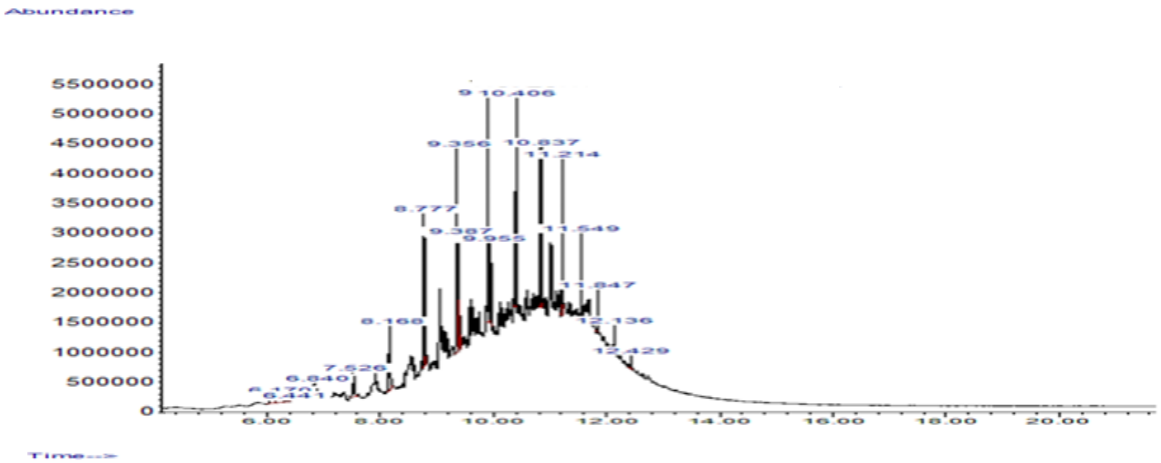


Figure 19: Chromatogramme des hydrocarbures détectés dans l'échantillon de sol bioaugmenté par la population bactérienne mixte

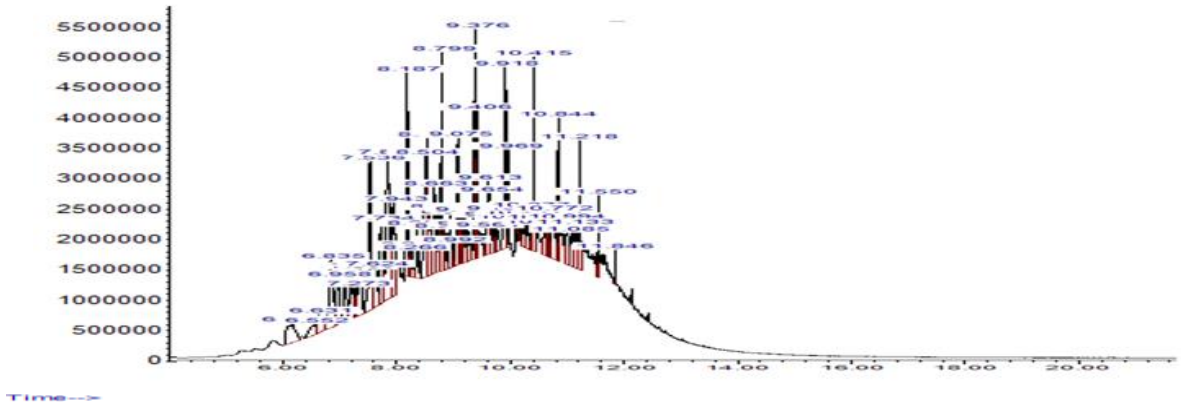


Figure 20: Chromatogramme des hydrocarbures détectés dans l'échantillon de sol bioaugmenté par *P .putida*

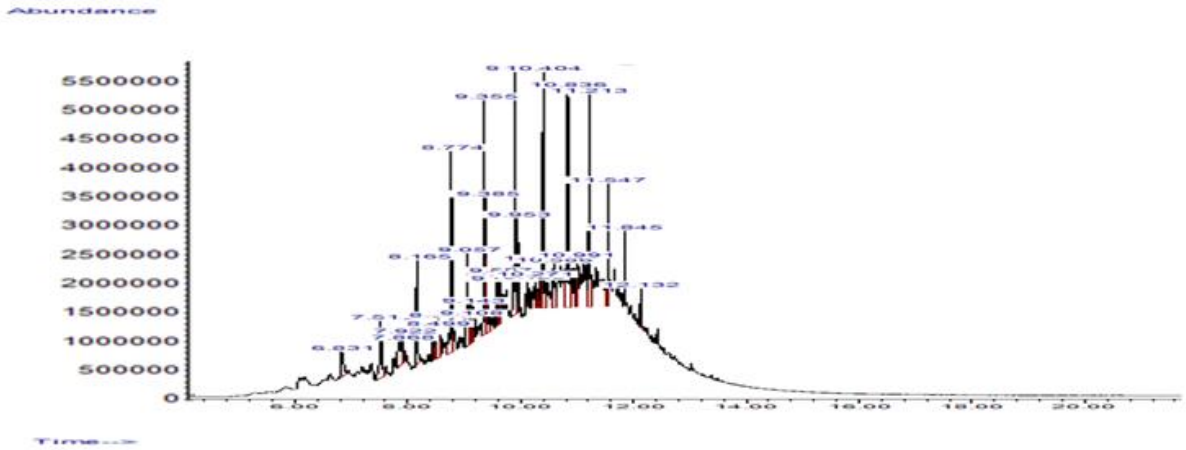


Figure 21: Chromatogramme des hydrocarbures détectés dans l'échantillon de sol bioaugmenté par *B.licheniformis*

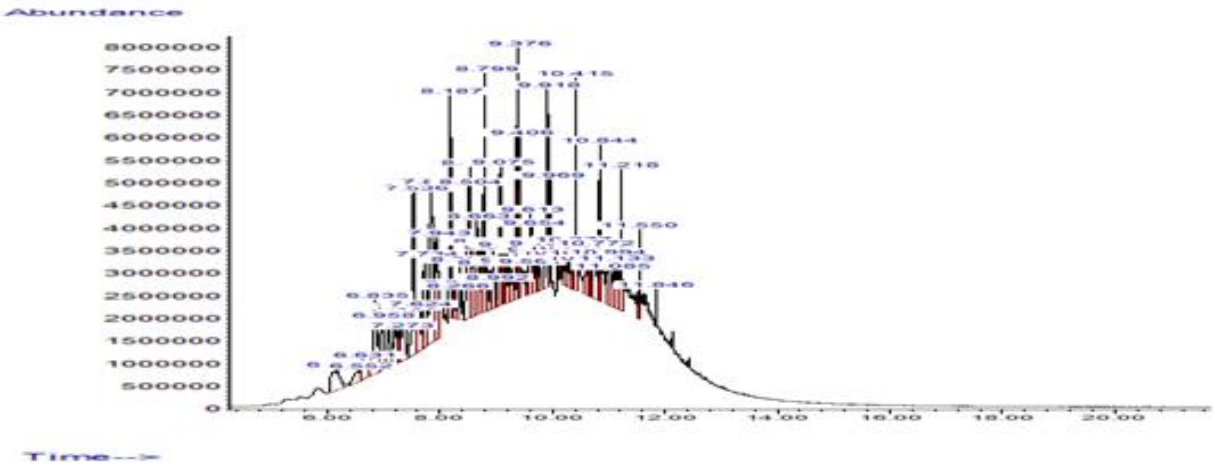


Figure 22: Chromatogramme des hydrocarbures détectés dans l'échantillon de sol bioaugmenté par *R.equi*

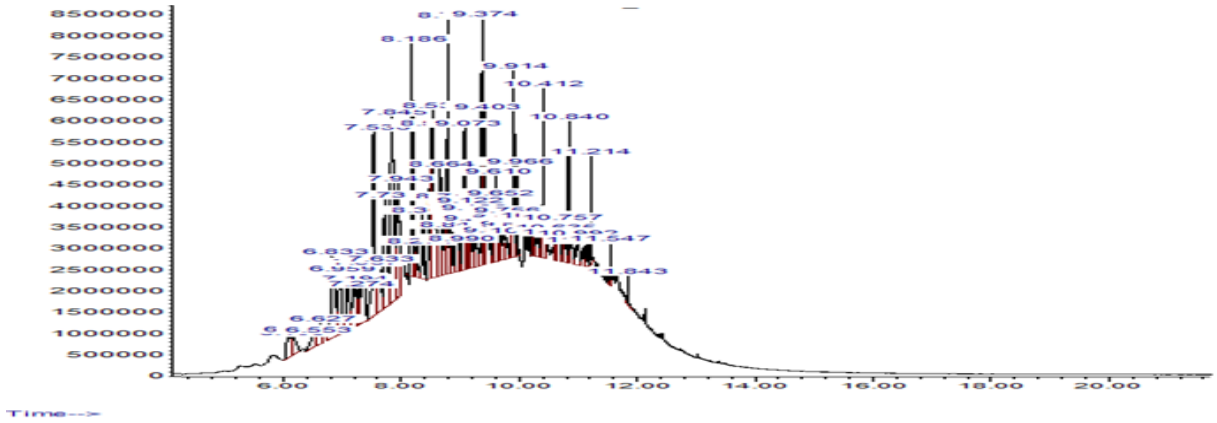


Figure 23: Chromatogramme des hydrocarbures détectés dans l'échantillon de sol bioaugmenté par *A.calcoaceticus*

Les composés présents dans les différents échantillons de sols, analysés par GC-MS sont consignés dans le tableau XI.

Tableau XI: Pourcentage des composés détectés par GC-MS dans les échantillons de sols

Composés détectés (%)	***P***	***B***	***A***	***R***	***C***	**Témoin**
Alcanes						
Undécane (n-11)	-	-	0.23	-	-	1.02
Dodécane (n-12)	0.1	-	-	0.19	-	2.4
Tridécane (n-13)	-	-	0.03	0	0.19	0.96
Tétradécane (n-14)	0.03	0.14	0.11	0.19	-	0.68
Pentadécane(n-15)	0.26	0.3	0.25	0.16	-	1.02
Hexadecane (n-16)	1.89	2.02	1.82	1.25	1.61	3.06
Heptadecanes(n-17)	1.8	1.9	1.93	2.08	2.02	3.11
Octadecane(n-18)	2.47	2.7	2.61	2.61	2.33	4.02
Nonadécane(n-19)	1.33	1.42	1.31	1.19	1.28	2.25
Eicosane(n-20)	2.06	1.78	1.69	1.52	1.72	3.12
Heneicosane(n-21)	1.12	1.23	1.31	1.45	1.22	2.2
Docosane (n-22)	2.09	2.20	2.3	2.12	1.96	3.6
Tricosane (n-23)	0.52	0.46	0.34	0.52	0.5	1.03
Etracosane (n-24)	0.14	0.44	0.57	-	-	1.68
Pentacosane (n-25)	0.11	0.19	0.37	0.56	-	1.36
Hexacosane (n-26)	0.32	0.16	-	0.04	-	1.02
Heptacosane (n-27)	0.06	0.92	0.13	0.29	-	1.03
2,6-Dimethyl1-Chloroheptacosane	0.33	-	0.39	0.42	0.23	1.02
3-Ethyl-5-(2-ethylbutyl) octadecane	0.71	-	0.87	0.92	0.63	1.33
3-Bromo-decane	0.19	-	0.23	0.36	-	0.63
Pentadecane, 2,6,10,14-tetramethyl	0.41	-	0.62	.0.67	0.4	1.2
Dodecane, 4,6-dimethyl	0.51	0.44	0.63	0.54	0.33	1.06
Alcènes						
7-Tetradecene	-	0.23	0.32	0.53	-	2.2
17-Pentatriacontene	1.20	1.22	1.42	1.23	-	3.02
Cétone						
2,3-Dihydro-4H-1-Benzopyran-4-one	0.23	0.35	-	-	0.23	0.46
Pregna-1,4-diene-3,20-dione						
7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione	0.12	0.47	0.51	0.41	-	-
B-Homo-A-nor-5.alpha.-cholestan-6-one	0.59	0.83	1.62	1.5	1.52	-
2,5-Cyclohexadiene-1,4-dione	1.2	0.68	1.1	0.9	-	0.64
2,3-Dihydro-4H-1-Benzopyran-4-one	0.58	-	-	0.6	0.54	0.7
HAP						
Naphtalène	0.72	0.55	0.92	0.94	0.94	1.96
Phénanthrène	0.42	0.4	0.48	0.56	0.44	0.94
2,6-Dimethylnaphthalene	1.08	1.06	1.04	1.26	1.01	2.3
9-n-dodecylphenanthrene	0.64	0.57	0.52	0.66	0.56	1.03
Diméthyldibenzothiophène	1.55	1.8	1.73	1.81	1.62	2.7
4,5-Dimethylphenanthrene	1.42	1.52	1.62	1.64	1.62	2.38
Anthracène	1.58	1.68	1.71	1.7	1.6	2.03
Fluoranthène	1.22	1.18	1.13	1.18	1.25	1.42
Benzo[c]phenanthrène	1.62	1.66	1.72	1.66	1.71	2.01
5-Methoxy7methylbenz(a)anthracène	2.08	1.96	2.08	2.02	2.02	2.35
Benzo(a)anthracène	1.01	1.07	0.96	1.0.8	0.93	1.23
Benzo(b)fluorine	1.79	1.67	1.57	1.83	1.79	2.01
Pyrène	0.81	0.8	0.78	0.81	0.68	1.02
Chrysène	0.75	0.8	0.86	0.92	0.89	1.62
Benzo(k)fluoranthène	1.78	1.75	1.87	1.79	1.8	1.92
Dibenzo(a)anthracène	1.88	1.62	1.89	1.71	1.86.	2.06
Benzo-pyrène	1.42	151	1.49	1.52	1.41	1.65
Alcooles						
2-Hexadecanol	0.15	0.23	0.52	0.62	0.95	-
2-Butyl-1-Octanol	0.23	-	0.23	0.36	0.62	-
2-Ethyl-1-dodecanol	0.9	-	0.3	0.73	0.47	0.36
Acides						
acide dicarboxylique	0.82	0.32	0.36	0.23	0.4	-

acide calcone carboxylique	0.47	0.23	0.42	0.33	0.36	-
acide acétique	-	0.1	-	-	0.63	-
acide hexadecanoique	0.32	0.42	0.36	0.41	0.20	-
acide benzenepropanoique	-	0.26	-	0.23	0.12	-
acide dodecanoique	-	-	0.4	0.63	0.45	-
Acide 2,2-binapthalène - 8,8-dicarboxylique	0.6	-	0.36	0.32	0.33	-
Autres composés organiques						
furane	1.05	0.93	1.02	0.83	0.97	0.64
2,6-Bis(4-azidobenzylidene)-4-methylcyclohexanone	-	0.12	-	0.22	0.63	0.67
9,10-Anthracenedione	0.53	-	-	0.46	0.43	-
7-Hydroxy-6-methoxy-3,4-dihydroisoquinoline	0.36	0.51	-	-	-	-
2-Methyl-Z-4-tetradecone	0.52	-	0.89	-	0.45	-
4-hydroxy-2-methoxy- 3,5,6-trimethyl-, methyl ester	0.32	-	0.32	0.43	0.36	-
Phenanthrene, 9,10-dihydro-1-methyl	0.6	0.54	-	0.63	-	-
Benzaldéhyde 4-diméthylaminobenzaldéhyde	0.41	0.54	-	-	-	-

B: *B.licheniformis*, **P:** *P.putida*, **A***: A.calcoaceticus*, **R**: *R.equi*, **C:** consortium

Parmi les composés détectés, on rencontre des mélanges complexes d'HAP, alcanes, alcènes, amines, cétones, alcools et des acides (Tableau XI). Hormis ces constituants, l'échantillon témoin contient également quelques fractions de mélanges complexes non résolus.

L'analyse par GC-MS a confirmé la formation de métabolites produits principalement à base de composés carbonylés tels que les cétones et les acides dicarboxyliques, plus facilement transformés en produits finis à travers les voies de dégradation microbienne (Moody et *al.*, 2005).

D'après le tableau XI, l'accumulation des dérivés du furane est corrélée avec le rapport précédent qui justifie la formation de furanes comme produits d'oxydation de première génération d'hydrocarbures aromatiques (Calvert *et al.*, 2002). La biodégradation des HAP à haut poids moléculaire comme le benz [a] anthracène a entraîné la formation de dérivés du furane (Kunihiro *et al.*, 2013).

Après la période de traitement, des quantités considérables d'HAP à 2 cycles sont presque entièrement minéralisées par les souches étudiées (Tableau XI). Le clivage ultérieur de chacun des anneaux aromatiques de ces HAP conduit à l'accumulation de leurs métabolites de dégradation dans le sol, tels que 2-Methyl-Z-4-tetradecone et 4-hydroxy-2-methoxy- 3,5,6-trimethyl-methyl ester (Zhang *et al.*, 2013).

Un autre métabolite majeur, identique à 9-10 antracenedione a aussi été détecté.

L'accumulation de cette molécule élucide le démarrage de la dégradation oxydative de l'anthracène et ses dérivés (Tableau XI). Les résultats du métabolisme des HAP dépendent principalement de l'efficacité des réactions catalysées des substrats par les microorganismes (Rodgers-Vieira *et al*., 2015).

Le tableau XI laisse apparaitre deux métabolites, l'acide 2,2-binapthalène-8,8-dicarboxylique et l'acide calcone carboxylique. Il s'agit des produits de dégradation du naphtalène et ses dérivés (Gansh-kumar, 2014).

Il est aussi intéressant de savoir que les produits intermédiaires d'oxydation des hydrocarbures ne persistent pas dans le sol comme polluants, mais seront potentiellement réabsorbés et métabolisés par les même microorganismes (Dashti *et al.*, 2008).

D'après les résultats obtenus, le chromatogramme des hydrocarbures détectés dans l'échantillon témoin est constitué d'un nombre très important de pics, ce qui exprime la diversité des composants chimiques du pétrole brut (Karina *et al*., 2015).

Par ailleurs, la diminution du nombre de pics dans certains chromatogrammes des échantillons bioaugmentés peut être expliquée par la disparition de certains constituants et l'apparition de nouveaux pics dans certains chromatogrammes peut être liée à l'apparition de nouvelles molécules.

II.6.3.1. Biodégradation des n-alcanes

La figure 24 représente les pourcentages de dégradation de certains alcanes linéaires par les bactéries au cours du traitement des échantillons de sol pollués par le pétrole brut.

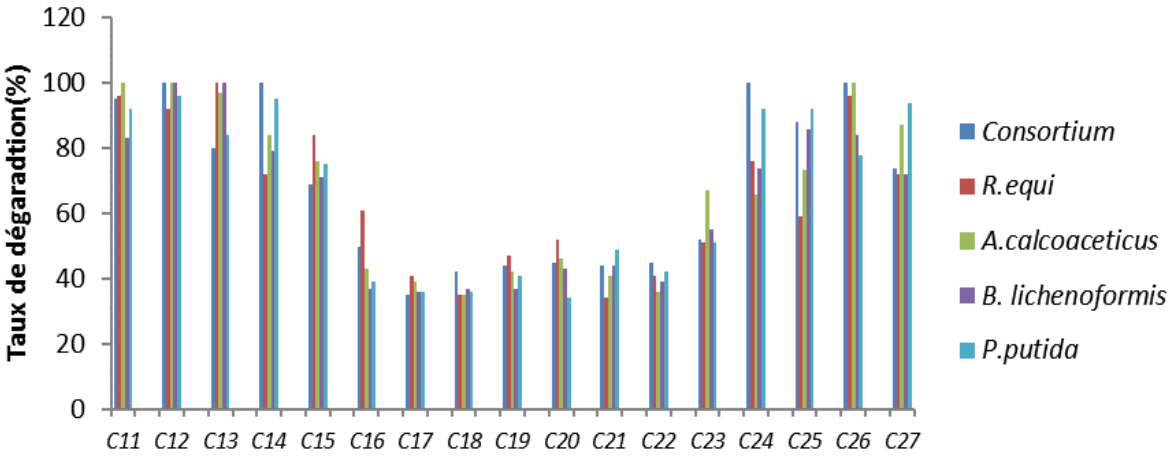


Figure 24: Taux de dégradation des n-alcanes dans les échantillons traités

La figure 24 montre que les hydrocarbures aliphatiques du pétrole sont facilement dégradés par toutes les souches étudiées. Les n-alcanes $\leq$ n-C_{15} ou $\geq$ n-C_{23} sont les plus concernés par le processus de dégradation dont plus de 70% sont généralement éliminés dans tous les échantillons bioaugmentés. Les résultats indiquent aussi que sur une période de 8 semaines de traitement, la dégradation minimale des alcanes est estimée à 39.23 % pour l'hexadécane (C_{16}) par *P.putida*, 37.04% par *B.licheniformis* et environ 36 % de l'heptadécane(C_{17}) et l'octadécane (C_{18}) sont dégradés par ces souches. Les souches *A.calcoaceticus* et *R.equi* ont la capacité de dégrader 39.91% et 41.12% de l'heptadécane respectivement et 34.5% d'octadécane (Figure24).

Des taux estimés à 49.33 % d'hexadécane, 35.92% d'heptadécane et 42.1 % d'octadécane sont minéralisés par le consortium bactérien (Figure 24).

Les résultats obtenus laissent apparaitre que la biodégradation des n-alcanes (n-C_{16} à n- C_{22}) dans tous les échantillons de sols pollués par le pétrole brut est moins importante que celle de la plupart des autres chaînes. Ceci peut être expliqué soit par l'utilisation préférentielle des chaînes courtes (<n-C_{16}) par les bactéries testées, soit par la biodégradation des fractions d'hydrocarbures de plus haut poids moléculaire ($\geq$n-C_{22}) conduisant à l'accumulation des chaînes moyennes (n-C_{16} à n- C_{22}) (Figure24).

Les résultats montrent aussi une dégradation quasi-totale de certaines fractions aliphatiques dans les échantillons bioaugmentés. Cela peut être dû aux faibles concentrations

de ces fractions dans le pétrole brut et leur métabolisation rapide par les souches étudiées.

Les alcanes à chaîne longue sont très bien utilisés par les microorganismes (Warr *et al*., 2008). Nos résultats laissent apparaitre que les souches testées ont une préférence aux alcanes de chaines courtes (<n-C_{16}) et de chaines longues (≥n-C_{22}). Cependant, Ward *et al*, (2003) ont signalé que la dégradation des composés carbonés dans le pétrole brut était inversement liée à la longueur de la chaîne carbonée.

La biodégradation des n-alcanes est non seulement liée à la longueur de leurs chaînes mais leurs propriétés physico-chimiques, les caractéristiques des bactéries et leur accessibilité aux attaques microbiennes ont un effet sur leur taux de dégradation (Mao-cheng *et al*., 2014).

Les souches utilisées appartiennent aux genres microbiens capables de pousser sur les alcanes grâce à l'implication des gènes de dégradation tel que le gène *AlkB* identifié chez ces genres bactériens (Wang *et* Shao, 2013; Cavaco, 2017).Wongsa *et al.* (2004) indiquent que la souche *P.putida* est un bon candidat pour la biorestauration des milieux pollués par les hydrocarbures pétroliers.

Dans une étude *in vitro* réalisé par Maddela *et al.*(2015), une dégradation de 58,34% des n-alcanes totaux a été enregistrée par cet isolat après 30 jours de traitement. Récemment, Zhang *et al.*(2017) ont signalé que *B.licheniformis* a conduit à l'élimination de 79.15% des alcanes contaminant un sol. Fondi *et al*. (2016) ont rapporté que le taux de dégradation des alcanes de pétrole brut par *A.calcoaceticus* était de 18 à 43% en 15 jours. La culture de *R.equi* présente un taux de dégradation élevé pour les n-alcanes (C_8-C_{20}) (Pattanathu *et al*., 2016).

II.6.3.2. Biodégradation des HAP

Les taux d'HAP dégradés par les bactéries au cours du traitement des échantillons de sol pollués par le pétrole brut sont illustrés par la figure 25.

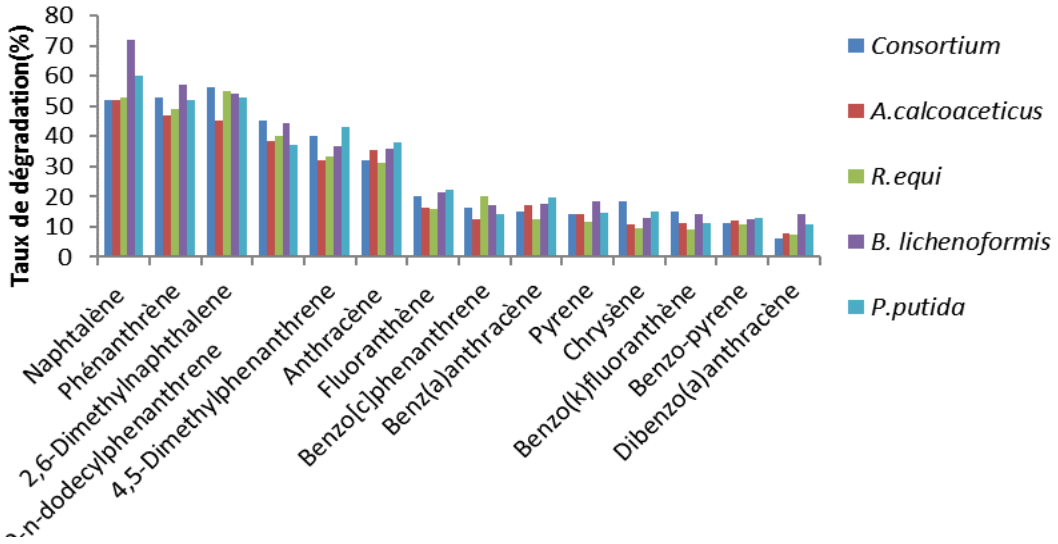


Figure 25: Taux de dégradation des HAP dans les échantillons de sol bioaugmentés

Les souches étudiées dégradent les composés aromatiques de 2 et 3cycles benzéniques et possèdent des capacités métaboliques non négligeables face à des composés à 4 et 5 cycles benzéniques. Généralement, les différentes bactéries hydrocarbonoclastes utilisées ont toutes la capacité de dégradation des HAPs avec un maximum de 72.12% pour le naphtalène par *B.licheniformis* et de 57.03% pour le phénanthrène, 38.2% d'anthracène et 13.2% de Benzopyrène par *P.putida*, alors que le maximum d'élimination de Benzo[k]fluorantrine, estimé à 14.9%, de pyrène (14.68%) et de Chrysène (18.3%) est assuré par le consortium bactérien (Figure 25).

Les souches testées ont généralement de bonnes capacités à dégrader les substances ayant 2 et 3 cycles benzéniques et une efficience moindre *vis à vis* des produits contenant 4 et 5 cycles aromatiques (Figure 25).

La diminution de la concentration des fractions aromatiques dans les échantillons de sols traités peut s'expliquer par leur transformation par les bactéries, malgré leur résistance à la biodégradation (Guermouche, 2014). Cette résistance augmente avec le nombre de cycles aromatiques condensés (Liste et Prutz, 2011).

D'après les résultats obtenus, les souches étudiées possèdent des machineries enzymatiques contribuant à la dégradation des composés les plus complexes tels que les HAP de plus de trois cycles qui sont beaucoup moins répandues (Santina *et al*., 2015).

Le pouvoir de *A.calcoaceticus* à se développer dans un milieu riche en HAP tel que le naphtalène a été signalé par PAZ *et al*.(2005). Yu *et al.*(2005) ont aussi signalé que cette souche a pu croître et dégrader le mélange des HAP constitués de fluorène, de phénanthrène et de pyrène.

L'implication de *P.putida* dans la biodégradation des HAP dans les sols est bien établie après son étude en présence du naphtalène, du phénanthrène et du pyrène (Cui *et al*., 2008).

La dégradation des composés phénoliques, hétérocycliques et les HAP par *B.licheniformis* a été observée par Guiying *et al*.(2012). Des souches *Rhodococcus* ont été sélectionnées pour leurs capacités à utiliser comme seule source de carbone et d'énergie un des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) suivants: naphtalène, phénanthrène, anthracène et fluoranthène (Boucher, 1995).

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

Les HAP sont généralement divisés en composés à faible poids moléculaire (contenant 2 à 3 cycles aromatiques) et composés à haut poids moléculaire (contenant 4 cycles aromatiques et plus). Leur hydrophobicité, leur récalcitrance à la biodégradation et leur toxicité augmentent avec le nombre de cycles aromatiques. Les HAP à faible poids moléculaire sont plus solubles et volatils et présentent moins d'affinités avec les surfaces que ceux à haut poids moléculaire, qui ont une tendance à s'accumuler dans les environnements (Seo *et al.,* 2009).

La capacité des souches bactériennes à dégrader des HAP de bas poids moléculaire, tels que le naphtalène et le phénanthrène, est très répandue (Hassaine, 2016). Lu *et al.* (2011) et Santina *et al*. (2015) ont signalé que ces bactéries sont capables d'utiliser ces composés pour leur croissance. Grace à sa structure simple et sa grande solubilité, le naphtalène peut être oxydé par les souches avant de nombreux composés saturés (Stolz, 2009). Ces deux substrats sont catalysés par les mêmes enzymes (Parales, 2003).

Les composés aromatiques ont été efficacement dégradés et les voies de dégradation ont été élucidées par l'accumulation du métabolite benzaldéhyde 4-diméthylaminobenzaldéhyde (Tsai *et al.,* 2009). Des souches appartenant au genre *Acinetobacter* ont également été jugées efficaces dans la dégradation des dérivés de naphtène par hydroxylation et transformation en acide dicarboxylique (Ghosal *et al.,* 2013).

Les HAP à 5 cycles tels que le fluoranthène et le benz(a)anthracène apparaissent aussi à des quantités importantes dans les échantillons traités (par rapport à la concentration initiale) et semblent donc aussi relativement moins biodégradables. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques de haut poids moléculaire sont généralement difficilement dégradés par les souches étudiées. Xia *et al*. (2006) signalent une croissance microbienne très limité sur des HAP contenant cinq et quatre cycles aromatiques tels que le benzo (b) fluorène, le benzo (a) anthracène et le benzo [c] phénanthrène. Peu d'isolats bactériens terrestres ont la capacité de dégrader les HAP à cinq cycles par un processus de co métabolisme (Simarro *et al*., 2013).

Les voies de dégradation des hydrocarbures polyaromatiques de gros poids moléculaire tels que le fluoranthène, le pyrène, le benzo[k]anthracène, le chrysène, le benzo[a]pyrène ressemblent à celles du naphtalène avec incorporation initiale d'une molécule de dioxygène suivie d'une dégradation en chaîne des cycles benzéniques (Pérez-Pantoja *et al*., 2010).

Les voies de biodégradation des composés aromatiques et la transformation des métabolites ont été bien décrits par Seo *et al.*(2009). Il est bien documenté que l'étape initiale dans le catabolisme aérobie d'un HAP par les microbes se produit par oxydation des molécules aromatiques. Les enzymes en jeu sont les mono-oxygénases ou di-oxygénases. La première étape de la biodégradation des hydrocarbures poly-aromatiques est en effet la formation de catéchols**.** La formation de gentisate à partir d'acide salicylique est aussi possible, ce qui interprète l'apparition de nouveaux pics dans les chromatogrammes (Gaudu, 2014).

Il est intéressant de noter que la biodégradation d'un mélange de composés chimiques tels les HAP est aussi très complexe en raison des interactions entre les constituants du sol et les métabolites provenant des molécules mères qui peuvent entraîner soit une augmentation de

la dégradation par cométabolisme soit une inhibition de la dégradation d'un HAP par d'autres HAP ou par leurs produits d'oxydation (Kelley et Cerniglia, 1995).

Les bactéries dans les sols contaminés sont réparties sous forme des biofilm enrobées par une matrice polysaccharidique qui les protège probablement et/ou leur facilite la dégradation des HAP. En effet, de nombreuses bactéries produisent des biosurfactants (polymères bactériens) pour augmenter la solubilité des HAP (Jouanneau, 2006).Ces micro-colonies paraissent piégées au sein de composés organiques dans les agrégats de la taille des limons fins de sol. Ceci pourrait expliquer la présence simultanée de bactéries et la faible, voire l'absence de biodégradation des HAP dans certains cas. Dans cette situation, une action physique et/ou physico-chimique affecterait l'accessibilité et la biodégradation des HAP (Morgan et Watkinson, 1992).

Conclusion et perspectives

L'objectif de notre travail est de rechercher la possibilité d'utilisation des bactéries telluriques hydrocarbonoclastes sahariennes dans la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures pétroliers.

Les sols pollués ou non, échantillonnés dans la région de Ouargla, révèlent que l'impact des hydrocarbures sur les communautés bactériennes hydrocarbonoclastes fait intervenir des mécanismes complexes dépendant de leurs capacités métaboliques, influencées par les paramètres environnementaux et la concentration de ces polluants dans le milieu. En effet, les résultats obtenus laissent apparaitre que la biomasse bactérienne tellurique est inversement proportionnelle à la concentration du polluant dans les sols contaminés.

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.

Le séquençage de l'ADN16S des 13 espèces bactériennes telluriques hydrocarbonoclastes isolées des différents échantillons de sols pollués ou non a révélé leur affiliation à 9 genres, à savoir *Bacillus, Rhodococcus, Ochrobactrum, Stenotrophomonas, Enterobacter, Klebsiella. Staphylococcus* et *Pseudomonas.*

L'ancienneté de la pollution d'un sol contribue à une meilleure adaptation de la microflore bactérienne au polluant organique. Ce qui peut être expliqué par la disponibilité d'une nouvelle source de carbone et son utilisation par cette communauté bactérienne tellurique indigène, conduisant à l'augmentation remarquable de sa biomasse et sa diversité dans les sites anciennement contaminés.

Les souches isolées ont montré une préférence spécifique aux différentes fractions aliphatiques et aromatiques dans les différentes conditions de température, de salinité et de pH et par conséquent, une capacité à utiliser les hydrocarbures pétroliers. Parmi ces souches *Pseudomonas putida* présente le meilleur pouvoir dégradant de toutes les fractions hydrocarbonées dans les différentes conditions expérimentales.

Les souches *B.licheniformis, P.putida, A. calcoaceticus* et *R. equi* sont sélectionnées

pour leur large capacité à dégrader les différents constituants du pétrole. Ces isolats présentent un potentiel dégradant très important conduisant à l'élimination de plus de 60% du pétrole dans des cultures liquide pendant 10 jours. Le consortium constitué de ces souches a montré un taux de dégradation comparable à ceux des monocultures, ce qui peut être expliqué par la stabilité du consortium avec une importante adaptation de ces bactéries dans des combinaisons synergiques.

Les souches sélectionnées possèdent aussi un pouvoir émulsifiant, traduit par la production des biosurfactants ayant deux modes d'action permettant l'assimilation des hydrocarbures. En effet, ces molécules tensio-actives produites par les souches *B. licheniformis* et *P. putida* libérées dans le milieu réactionnel accélèrent le transfert des hydrocarbures en augmentant l'aire interfaciale entre la phase hydrophobe et la phase hydrophile, conduisant à l'augmentation des biomasses libres. Par ailleurs, les biosurfactants produits par *A.calcoaceticus* et *R.equi* sont maintenus à la surface des cellules et modifient leur polarité et facilite par conséquent leur association au substrat hydrocarboné présent dans le milieu de culture. Ce constat nous permet de mettre en évidence une relation entre l'évolution de la biomasse libre et le substrat hydrophobe utilisé.

L'immobilisation des souches *A. calcoaceticus* et *R. equi* sur l'alginate conduit à une meilleure biodégradation du polluant que les cultures libres. En effet, l'utilisation de cellules immobilisées est un processus offrant une protection aux cellules bactériennes contre les conditions environnementales et permettant la réutilisation de ces cellules, réduisant ainsi le cout de la manipulation.

Le dosage du carbone organique totale des échantillons de sols dont le contenu initial était de 5.52mg/g de sol a révélé des variations de son contenu dans tous les échantillons pendant les huit semaines de traitement. La concentration du COT diminue dans tous les échantillons bioaugmentés de façon significative, pour atteindre, après 6 semaines, des valeurs comprises entre 1.5 et 1.7mg/g de sol dans les échantillons bioaugmentés par les différentes souches et seulement 1.2 mg/g de sol en présence du consortium des quatre souches. Le consortium bactérien a donc conduit au plus fort taux de biodégradation, traduit par la teneur la plus faible en COT.

La diminution du COT dans les échantillons bioaugmentés peut être expliquée par

la biodégradation de ces polluants par les bactéries en utilisant ces derniers comme substrat de croissance où le carbone est converti en CO_2 et en biomasse.

L'application du bioprocédé pour la bioremédiation des échantillons de sols contaminés par 30% de pétrole brut, en présence de consortium a aboutit au plus fort rendement d'élimination évalué à 68.17% en 8 semaines d'expérimentation. Les rendements de dégradation du pétrole brut par les souches impliquées individuellement dans ce bioprocédé sont respectivement de 63.85% en présence de *B.licheniformis*, 61.71% pour *P.putida*, 58.9% en présence de *A. calcoaceticus* et 53.22% pour *R.equi*. La biotransformation ou la biodégradation pourraient expliquer la dissipation maximale des hydrocarbures observée dans les échantillons bioaugmentés par les souches étudiées. Cependant, chaque espèce bactérienne n'est capable de dégrader qu'un nombre restreint d'hydrocarbures, d'où l'intérêt de l'utilisation 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.

Les conditions optimales d'humidité, d'aération et de température peuvent également expliquer les bons résultats de biodégradations du contaminant par les souches testées séparément ou en consortium.

Les hydrocarbures aliphatiques du pétrole sont facilement dégradés par toutes les souches étudiées. Les n-alcanes $\leq$ n-C_{15} ou $\geq$ n-C_{23} sont les plus concernés par le processus de dégradation dont plus de 70% sont généralement éliminés dans tous les échantillons bioaugmentés. Les souches utilisées appartiennent aux genres microbiens capables de pousser sur les alcanes grâce à l'implication des gènes de dégradation.

Des quantités considérables d'HAP à 2 cycles sont presque entièrement minéralisées par les souches étudiées. Le clivage ultérieur de chacun des anneaux aromatiques de ces HAP conduit à l'accumulation de leurs métabolites de dégradation dans le sol. Les produits intermédiaires d'oxydation des hydrocarbures ne persistent pas dans le sol comme polluants, mais seront potentiellement réabsorbés et métabolisés par les même microorganismes.

Les souches étudiées dégradent aussi les composés aromatiques de 3, 4 ou 5 cycles benzéniques. La diminution de la concentration de ces fractions dans les échantillons de sols

traités peut s'expliquer par leur transformation par les bactéries, malgré leur résistance à la biodégradation. Cette résistance augmente avec le nombre de cycles aromatiques condensés.

Les hydrocarbures pétroliers sont différents par leur susceptibilité aux attaques microbiennes. Ainsi, la vitesse de biodégradation est plus élevée pour les hydrocarbures saturés que les aromatiques légers et les aromatiques à haut poids moléculaire.

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

- 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. **Abed R. (2010).** Interaction between cyanobacteria and aerobic heterotrophic bacteria in the degradation of hydrocarbons. Int Biodeterior Biodegrad. 64, 58–64.
2. **AbioveO.P.,Agamuthu P.,and AbdulAziz A.R.(2012).**Biodegradation of Used Motoro oil in Soil Using Arganic waste Amendements ., Biotechnology Research International.58,,8.
3. **Afifi F. U ., Kasabri V., Beltra N .S., Abuhammad A., Abaza F.,Ismail,Ganado O and Al-Gabbiesh A. H.(2017).** Comparison of different methods in determination of essential oil composition of origaum syriacum l. From jordan and its modulation of pancreatic enzymes., Rev. Roum. Chim., 62, 15-21**.**
4. **Akmouci-Toumi S(2009).** Contribution to the study of drilling muds: Isolation and evaluation of the ability of some microbial strains to degrade diesel. Memory magister. University M'Hamed Bougara Boumerdes,86.
5. **Al-Araji L., Raja N., Zaliha A. R., Mahiran B., AbuBaker S. (2007).** Minireview Microbial Surfactant.Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology. 15, 99.
6. **AL-Salah E.S et Obuekwe C.(2009).**Effect of nickel on the mineralization of hydrocarbones by indigenous micobiota in Kuwait soils.,Journal of Basis Microbiology .49, 256-263.
7. **Amiriyan A., Mazaheri A.M., Saggadian V. A., NoohiIranian A. (2004).** Bioemulsan Production by Iranian Oil ReservoirsMicroorganisms. Env. Health Sci. Eng. 1, 28-35.
8. **Andreoni V., Cavalca L., Rao M.A., Nocerino G., Bernasconi S., Dell Amico E., Colombo M., Gianfreda L. (2004).** Bacterialcommunities and enzyme activities of PAHspollutedsoils. Chemosphere. 57, 401–412.
9. **Andrew D.R., Fitak R.R., Munguia-Vega A., Racolta A., Martinson V. G., Dontsova K. (2012).** AbioticFactors Shape MicrobialDiversity in SonoranDesertSoils. Applied and EnvironmentalMicrobiology. 78, 7527.
10. **Arai H., Akahira S., Ohishi T., Maeda M., Kudo T. (1998**). Adaptation of Comamonastestosterone TA441 to utilizephenol:organization and regulation of the genesinvolved in phenoldegradation. Microbiol. 144, 2903.
11. **Arfsten D. P., Schaeffer D. J., Mulveny D. C. (1996**). The effects of near ultraviolet radiation on the toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in animals and plants: a review. Ecotoxicology and Environmental Safety. 33, 24.
12. **Atlas R. M. et Bartha R. (1992).** Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. Adv. Microb. Ecol. 12,287–338.
13. **Bach H., Berdichevsky Y. and Gutnick D. (2003).** An exocellular protein from the oil-degrading microbe Acinetobacte venetianus RAG-1 enhances the emulsifying activity of the polymeric bioemulsifier emulsan. Appl Environ Microbiol .69, 2608–2615.
14. **Baise D. (2000).** Guide des analyses en pédologie. Chois. Expression Présentation. interprétation.2èmeEd. INRA, Paris,266.
15. **Ball W. P., Paul R. V. (1991).** Long-term sorption of halogenated organic chemicals by aquifer material. 2. Intraparticle diffusion**.** Environ. Sci. Technol. 251237-1249.
16. **Ballerini D. et Vandecasteele J. P., (1999).** La restauration par voie microbiologique des sols contaminés par les polluants organiques. In :

Biotechnologie, coordinateur R. Scriban, 5ème édition, Edition Tech et Doc,835-865.

17. **Banat M., Makkar R et Cameotra S. (2000).** Potential commercial applications of microbial surfactants, *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 53, 495-508.
18. **Banerjee A et Ghoshal A.K.(2016).**Biodegradation of phenol by calcuim –alginate immobilized : *Bacillus cereus* in a packed bed reactor and determination of the mass transfer corellation.Journal of Environnemental Chemical Engineering.4, 1523-1529.
19. **Bayoudh S., Othmane A., Bettaieb F., Bakhrouf A., BenOuada H., Ponsonnet L. (2006).** Quantification of the adhesion free energy between bacteria and hydrophobic and hydrophilic substrata.Materials Science and Engineering: C. 26, 300-305.
20. **Beal R et Betts W B.(2000).**Role of rhamnolipide biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*.vol 89,issue(1), 158-159.
21. **Beasley-Green A. (2012).** A proteomics performance standard to support measurement quality in proteomics. Proteomics, 12, 923-31.
22. **Beilen J.B., V. (2003).** Diversity of Alkane Hydroxylase Systems in the Environment. Oil and gaz science and technology. 58,427-440.
23. **Bendinger B., Rijnaarts H H., Altendorf K., Zehnder A J.(2003).** Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Applied and environmental microbiology*. 59, 3973-3977.
24. **Berthe L., Bezaeva N., Gattacceca J., Boustie M., Rochette P., (2007).** Mechanical characterization of basalt using shock wave induced by laser, Application to planetary hypervelocity impact effect. ICALEO 2007 proceedings, Orlando (USA), 528-534.
25. **Berthe-Corti L. et Höpner T. (2005).** Geo-biological aspects of coastal oil pollution. Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol.219, 171–189.
26. **Bertrand R., Keïta B. et Ndiaye M. K. (1993).** La dégradation des sols des périmètres irrigués des grandes vallées sud-sahariennes (cas de l'Office du Niger au Mali)." Cahiers Agricultures. 2, 318-329.
27. **Boboye B., Olukunle O.F.,Adetuy F.C. (2010).** Degradative activity of bacteriaisolated from hydrocarbon polluted site in Ilaje, Ondo state , Nigeria African Journal of Microbiology Research, 4, 2484-2491.
28. **Bodour A., Gerrero-Barajas C., Maier M. (2004).** Structure and characterization of Flavolipids, a novel class of Biosurfactants produced by *Flavolipid* sp. Strain MTN11. *App and Env Microbiol.* 10, 1114-20.
29. **Boll M. et Heider J. (2010).** Anaerobic degradation of hydrocarbons: mechanisms of C–H bond activation in the absence of oxygen," in *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, eds. K. Timmis, T. Mcgenity.
30. **Boll M., Heider J.(2010).** Anaerobic Degradation of Hydrocarbons :Mecanisms of C-H-Bond Activation in the Absence of Oxygene.Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, 1011-1014.
31. **Bonneau M. et Souchier B.(1994).** Constituants et propriétés du sol. 2éme édition, Ed. Masson. Paris. 460**.**
32. **Bordenave S.(2007).** Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. Applied and Environmental Microbiology. 73, 6089–6097.

33. **Bordenave S., Gon˜i-UrrizaM S. ,Gaumette.,Pand Duran R.(2007).** Effects of Heavy Fuel Oil on the Bacterial Community Structure of a Pristine Microbial Mat. Applied And Environmental Microbiology.73, 6089-6097.
34. **Bouchez M., Blanchet D., Vandecasteele J. P. (1995).** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena andcometabolism. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43, 156.
35. **Bouchez N.M., Rakatozafy H., Marchal R. ,leveau J.,LeveauY., Vandecasteele J.P .(1999).** Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake.Journal of appied microbiology. 86, 421-428.
36. **Bousseboua H. (2002),** Eléments de microbiologie générale, Ed.Université Mentouri, Constantine, 88.
37. **BoutalebN.(2007).** Etude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisation d'eau potable.Thèse,pp :85.
38. **Bruinsma G.M, Rustema-Abbing M., van der Mei HC., Busscher H.J. (2001):** Effects of cell surface damage on surface properties and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. J Microbiol Methods, 45, 95.
39. **Brusseau ML., et Miller.R.M.(1997).**Biosurefactant-enchanced removal of residu al Bai hydrocarbon from soil.Hydrol.25, 157-170.
40. **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.
41. **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.
42. **Carol R.J et Kate M.S .(1999).**Effects of nitrogen and phosphorus addition on phenanthrene biodegradation in four soils .Biodegradation.10, 43-50.
43. **Chaineau C. H., Morel J. L., et Oudot, J. (1995**). Microbial degradation in soil microcosms of fuel oil hydrocarbons from drilling cuttings, Environmental Science & Technology, 29. 1615-1621.
44. **Chao M., Jiefeng L., Tian Z., Chun I. (2013).** Isolation and Identification of Marine Oil-degraded yeasts and their degradation characteristics for crude oil.Journal of Green Science and Technology, 1, 71-78.
45. **Chikere C., Okpokwasili G., Chikere B.(2011)**. Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. 3Biotech. 3, 117 - 138.
46. **Chikere C., Surridge K., Okpokwasili G., Cloete T.(2012).** Dynamics of indigenous bacterial communities associated with crude oil degradation in soil microcsosms during nutrient enhanced bioremediation. Waste Manag. Res. 30, 225-36.
47. **Christensen B., Torsvik T., Lien T.(1992).** Immunomagnetically captured thermophilic sulfate-reducing bacteria from North Sea oil ®eld waters. Appl Environ Microbiol, 58, 1244-1245.
48. **Christofi N and Ivshina I.B. (2002).** Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. Journal of Applied Microbiology. 96, 915-917.
49. **Churchill C. W., Mellon R. R., Charlton J. C., Jannuzi B.T., Kirhakos S., Steidel C. C and Schneider D. P. (1999).** The C IV Absorption-Mg II Kinematics

Connection in $\langle z \rangle$ ~ 0.7 Galaxies, The American Astronomical Societ. The Astrophysical Journal Letters, 19, 43-45.

50. **Churchill S.A., Harper J.P and Churchill P.F.(1999)** :Isolation and characterization of a Mycobacterium species capable of degrading three- and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons. Appl Environ Microbiol, 65, 549–552.
51. **Clement M et François P. (2003)**.Analyse chimique des sols –TEC et DOC édition .388.
52. **CuiL.,KharmovD.M.,BielwskiC.W. ,HunterD.L. ,Yoon.P.J. ,andPaul.D.R.(2008).** Effect of organoclay purity and degradation on nanocomposite performance .Surfactant degradation . 49, 3751-3761.
53. **Das K and Mukherjee A.K.(2007).**Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: Some industrial applications of biosurfactants. Pro Biochem. 42, 1196.
54. **Das N et Chandran P.(2011).**Biotechnologie Research International**.** Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview,13 .
55. **Dash H.R., Mangwani N., Chakraborty J., Kumari S and Das S.(2013):** Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation, Applied Microbiology and Biotechnology.97, 561–563.
56. **Dashti N.,El-Nemr K.,Radwan A.(2009).** The potential of oil-utilizing bacterial consortia associated with legume root nodules for cleaning oily soils. Chemosphere.74, 1354-1355.
57. **David C.(2008).**contamination des fluides de coupe aqueux et prévention des risques biologiques .INRS- Hygiène et sécurité du travail- Cahiers de notes documentaires – 2ème trimestre, 30.
58. **Dellarras C.(2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Technique et documentation France. Lavoisier. 32, 33.
59. **Deng M.C., Li J., Liang F.R., Yi M., Xu X.M., Yuan J.P., Peng J., Wu C.F., Wang J. H.(2014):** Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading bacterium Achromobacter sp. HZ01 from the crude oil-contaminated seawater at the Daya Bay, southern China
60. **Dennis J. J et Zylstra G. J.(2004).**Complete Sequence and Genetic Organization of pDTG1, the 83 Kilobase Naphthalene Degradation Plasmid from *Pseudomonas putida* strain NCIB 9816-4. Journal of MolecularBiology**.**341, 753.
61. **Desai J. D. et BANAT I. M. (1997).**Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential.Microbiology and Molecular Biology Reviews,47.
62. **Devare M and Alexander M.(1994).** Bacterial Transport and Phenanthrene Biodegradation in Soil and Aquifer Sand.,Soil science society of America Journal Abstrat.59, 1316-1320.
63. **Díaz M.P., Boyd K.G., Grigson S. J. W., Burgess J.G. (2002):** Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M, immobilized onto polypropylene fibers biotechnology and bioengennering, 79, 145–153.
64. **Díaz R., Erika E.E., Randy A.S. , Reyna F.M et Hugo R.S. (2013)**. Hydrocarbon Biodegradation Potential of Native and Exogenous Microbial Inocula in Mexican Tropical Soils **.**licensee INTECH, 178.
65. **Díaz E., Jiménez J.I., Nogales J. (2013).** Aerobic degradation of aromatic compounds salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M, immobilized onto polypropylene fibers.24, 431-442.

66. **Domínguez F., Moreno J., Cejudo F. J. (2012).** The scutellum of germinated wheat grains undergoes programmed cell death: identification of an acidic nuclease involved in nucleus dismantling. *J. Exp. Bot.* 63, 5475–5485.
67. **Donlan R. M et Costerton J. W. (2002**). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. Clinical Microbiology Reviews, 15, 167–193.
68. **Dutruc-Rosset G. (2003).** Techniques analytiques et de contrôle (Codex oenologique). Partie microbiologique. Office International de la Vigne et du Vin. Paris, 23.
69. **Dutta T. K. et HarayamaS.** (**2001**). Analysis of Long-Side-Chain Alkylaromatics in Crude Oil for Evaluation of Their Fate in the Environment. *Environ. Sci. Technol.* 35, 102–107.
70. **Elshafie· A., AlKindi Y .A., Busaidi· S., Bakhei C and Albahry. S. N. (2007).** Biodegradation of crude oil and *n*-alkanes by fungi isolated from Oman. Marine Pollution Bulletin**.** 1692.
71. **Elzbieta S., Krystyna C., Conrad B., Blanca A.(2009).** Biological treatment of transformer oil using commercial mixtures of microorganisms International Biodeterioration & Biodegradation. 63, 328–333.
72. **Eman A.D. (2008),** Phytoremediation of oil contaminated desert soil using the Rhizosphere effects. Global Journal of Environmental Research,. 2,66-69.
73. **Eriksson M., Sodersten E., Yu Z., Dalhammar G., Mohn W.(2003).** Degradation of Polycyclic Aromatic at low temperature under aerobic and nitrate-reducing conditions in enrichment cultures from Northern soils. *Appl. Environ. Microbiol*. 69, 275-284.
74. **Fardoux J., Fernandes P., Niane-Badiane A., Chotte J.L. (2000).** Effet du séchage d'échantillons d'un sol ferrugineux tropical sur la détermination de la biomasse microbienne Comparaison de deux méthodes biocidales de référence. Étude et gestion des sols, 4, 385-394.
75. **Floodgate G.D. (1995).** Some environmental aspects of marine hydrocarbon bacteriology. Aquatic Microbial Ecology. 9, 3-11.
76. **Fondi M., Perrin M .,Orlandini V., Torre L .(2016).** Genomic and phenotypic characterization of the species *Acinetobacter venetianus*. Scientific Reports . 6, 86.
77. **Forbes V., Forbes T.(1997).** *Écotoxicologie : théorie et application.* Institut national de la recherche agronomique, Paris, France, 256.
78. **Fuhrman J.A.(2009).** Microbial community structure and its functional implications. Journal Nature , 459, 193–199.
79. **Gabet S.(2004).** Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) presents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. Thèse de doctorat de l'Université de Limoges, spécialité Chimie et Microbiologie de l'Eau,177.
80. **Gallardo M.E., Ferrandez A., Lorenzo V De., Garcia J.L., Diaz E. (1997)**: Designing recombinant Pseudomonas strains to enhance biodesulfurization. J Bacteriol, 179, 7156–7160
81. **Gallardo L., Olivares G., Langner J., Aarhus B.(2002).** Coastal lows and sulfur air pollution in Central Chile. Atmospheric Environment. 36, 3829–3841.
82. **Gan S., Lau E.V .,and Ng H.K.(2009).** Remedation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs).Journal of Hazardous Materiales. 172, 532-533.

83. **Ganesh-Kumar A., Vijayakumar L., Joshi G., Magesh Peter D., Dharani G., Kirubagaran R. (2014).** Biodegradation of complex hydrocarbons in spent engine oil by novel bacterial consortium isolated from deep sea sediment, Bioresource Technology,170, 556-564.
84. **Gannon J. T., Manilal V. B., Alexander M. (1991).** Relationship between Cell Surface Properties and Transport of Bacteria through Soil.Applied and Environmental Microbiology, 57, 190-193.
85. **Garnier F., Denis F. (2007).** Bactériologie médical : Techniques usuelles : Cocci à Gram positif. Masson. 29, 251- 254.
86. **Gaudu F. (2014).**Bio-remediation des sols pollués aux hydrocarbures. Les hydrocarbures aromatiques et les alcanes. Biologie gestion marketing .Universite de RENNES 1, UFR SVE. 5.
87. **George K.W., Hay A.G. (2011).** Bacterial strategies for growth on aromatic compounds. Adv. Appl. Microbiol. 74, 3.
88. **Gevers D., Huys G. and Swings J. (2001).** Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. FEMS Microbiology Letters. 205, 31-36.
89. **Ghazali F.M, Rahman R.N.Z.A., Salleh A.B., Basri M. (2004).**Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium Int Biodeterior Biodegrad, 54, 61-67.
90. **Giller K.E., Witter E., McGrath S.P. (1998).**Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils. Soil Biol Biochem., 30, 1389.
91. **Gillet S., Ponge J.F. (2002).** Humus forms and metal pollution in soil. European Journal of Soil Science . 53, 529.
92. **Grady C. P. L. (1985).** Biodegradation: Its measurement and microbiological basis. Biotechnol. Bioeng. 27, 660-674.
93. **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.
94. **Guaimacuto PJ. López., Fuentes J. L. (2015**).Microbiologia del petroleo. *Geominas*, 43, 139.
95. **Gudiña E. J., Pereira J. F. B., Costa R., Coutinho J. A. P., Teixeira J. A., Rodrigues L. R. (2013).** Biosurfactant-producing and oil-degrading *Bacillus subtilis*strains enhance oil recovery in laboratory sand-pack columns.Journal of Hazardous Materials**.** 113.
96. **Guermouche M., Rassi A. (2014).** Caractérisation moléculaire des bactéries impliquées dans la biodegradation des hydrocarbures. Thèse de doctorat en microbiologie. Université d'Oran.
97. **Hamadi F., Latrache H., Zahir H., Elghmari A., Timinouni M., Ellouali M (2011).** The relation between Escherichia coli surface functional groups' composition and their physicochemical properties. Braz J Microbiol, 39, 10–11.
98. **Harald B., Kjell J., Arild V., Per B., Kjell E. (1998).** Emulsification of crude oil by an alkane-oxidizing *Rhodococcus* species isolated from seawate**.** *Canadian Journal of Microbiology.* 44, 340.
99. **Harmsen M¨, Yang L., Pamp S. J., Tolker-Nielsen T. (2010).**An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunology Medical Microbiology*, 59, 3, 253–268.

100. **Hassanshahian M ., Ahmedinejat M.,Tabyanian H and Kariminik A. (2013**). Isolation and characterization of alkane degrading bacteria from petroleum reservoire waster water in Iran. Mar.PoIIut Bull. 73, 300–305.
101. **Hazaimeh M., Sahilah A., Sannasi P., Abdullah., Kok W., Surif K. S. (2014).** Enhanced crude oil hydrocarbon degradation by self-immobilized bacterial consortium culture on sawdust and oil palm empty fruit bunch. Annals of microbiology. 64, 1769-1777.
102. **Head I., Larter S.R., Gray N.D., Sherry A., Adams J.J. (2010).** Hydrocarbon activation under sulfate reducing and methanogenic conditions proceeds by different mechanisms. Geophysical Research Abstracts. 12,336.
103. **Head I.M., Jones D.M. et Roling W.F.M. (2006).** Marine microorganisms make a meal of oil. Nat Rev Microbiol. 4, 173.
104. **Heipieper H., Martínez P.(2010).** Toxicity of Hydrocarbons toMicroorganisms. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**.** 1563-1573.
105. **Holtfreter S., Grumann D., Schmudde M., Nguyen H. T., Eichler P., Strommenger B. (2007).** Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus*isolates. J. Clin. Microbiol. 45,2669–2680.
106. **Honna T., Yamamoto S., et Matsui K., (1988).** A simple procedure to determine Melanic Index that is useful for differentiating Melanie from Fulvic Andisols. Pedologist, 32, 69-78 and also in ICOMAND Circular Letter, 10, 76–77.
107. **Hsu C. H., Lo Y. M (2014):**Characterization of xanthan gum biosynthesis in a centrifugal, packedebed reactor using metabolic flux analysis. Process Biochem. 38, 1617-1625.
108. **Ijah U.J.J, Antai S.P.(2003).** Removal of Nigerian light crude oil in soil over a 12–month period. Int Biodeterio Biodeg. 51,93.
109. **Ijah U.J.J. et Ukpe L.I. (1992).** Biodegradation of crude oil by *Bacillus* strains 28A and 61B isolated from oil spilled soil. Waste management, 12, 55.
110. **Jesus E., Peixoto R., Rosado A.(2015).** Bioremediation in Antarctic Soils .Environ Biotechnol .6,6.
111. **Jimenez G., Gonzalez-Reyes A., Casanova J. (2002).** Cell surface proteins Nasrat and Polehole stabilize the Torso-like extracellular determinant in Drosophila oogenesis. Genes Dev. 16, 913-914.
112. **JocteurMonrozier L. ,LaddR J.N., Fitzpatrick R.C.W and Rapauch R.(1991).** Foster.M. Componement and microbial biomass content of size fraction in soils of contrasting aggregation.Geoderma. 50, 37-62.
113. **Joffin J. Net Leyrol G. (2006).** Microbiologie technique. Tome1. Dictionnaire des techniques. 4éme édition. Bordeaux : CRDP d'aquitaine. ISBN : 2-86617-515-8. 363.
114. **Johnsen A.R. ; Wich L. Harms H.(2005).**Principales of microbial PAH-degradation in soil. Environmental Pollution. 133, 71-84.
115. **Joo-Hyun S., Joong-Su L., et Jae-Gu S., (2015):** Assessment of cell adhesion, cell surface hydrophobicity, autoaggregation, and lipopolysaccharide-binding properties of live and heat-killed Lactobacillus acidophilus CBT LA1. Korean Journal of Microbiology. 51, 241-248
116. **Jouanneau Y.(2010):** Oxidative inactivation of ring-cleavage extradiol dioxygenases: mechanism and ferredoxin-mediated reactivation. In:Timmis KN (ed). Microbiology of hydrocarbons, oils, lipids, and derived compounds. Springer: New York,10.

117. **JU P.H. ,Ki J.H., Kwon P.Y. ,Heong Y.J. , Ki J. H. , Park.J. , Ryu.C ., and Soo k.S.(2010).** Clean bio-oil production from fast pyrolysis of sewage sludge :Effects of reaction condition and metal oxide catalysts.,Bioresource Technology.101, 83-85.
118. **Juhasz A.L., Britz M.L., Stanley G.A. (1997).** Degradation of fluoranthene, pyrene, benz [*a*] anthracene and dibenz [*a, h*] anthracene by *Burkholderiacepacia.* Journal of applied of microbiology. 83, 189.
119. **Jyothi K., Surendra Babu K., Nancy Clar K., Kashyap A. (2012).** Identification and isolation of hydrocarbon degrading bacteria by molecular characterization. Helix, 2, 105-111.
120. **Kanaly R.A., Harayama S. (2000).** Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. J Bacteriol.;vol.18, 2059-2060.
121. **Karina S., Ewa K., Urszula G., Agnieszka Z.G. (2015)**: Bacterial properties changing under Triton X-100 presence in the diesel oil biodegradation systems: from surface and cellular changes to mono- and dioxygenases activities. Environ Sci Pollut Res.22, 4313.
122. **Karine L. et Isabelle D., (2015).** Revue des connaissances sur les capacités potentielles de dégradation des hydrocarbures dans l'estuaire maritime et le golfe du saintlaurent par les communautés bactériennes indigènes. UQARISMER. Rapport GEN, 32, 6.
123. **Kasai Y., Kishira H., Sasaki T., Syutsubo K., Harayama S. (2002**). Predominant growth of *Alcanivorax* strains in oil-contaminated and nutrientsupplemented sea water. Environ microbial, 141-147.
124. **Kästner M., Breuer-Jammali M., Mahro B.(1994).**Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH).Applied Microbiology and Biotechnology. 41, 273.
125. **Kaufmann K., Christophersen M., Buttler A., Harms H., Höhener P. (2004).** Microbial community response to petroleum hydrocarbon contamination in the unsaturated zone at the experimental field site Værløse, Denmark. *FEMS Microbiology Ecology*. 48, 387–399.
126. **Kelley I., Cerniglia C. E. (1995).** Degradation of a mixture of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Mycobacterium* strain PYR-1. Journal of soil contamination. 4, 6.
127. **Khelil-radji, F. (2015).** Evaluation du potentiel hydrocarbonoclaste des bactéries marines isolées de la côte oranaise. Doctorat en Biologie. Sciences de l'Environnement. Faculté des Sciences de la nature et de la vie. Université d'Oran, 207.
128. **Kim S., Kweon O., Freeman J., Jones R., Adjei M., Jhoo J., Edmondson R., Cerniglia C. (2006).** Molecular Cloning and Expression of Genes Encoding a Novel Dioxygenase Involved in Low-and High-Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Applied and Environmenta Microbiology.* 72, 1045-1054.
129. **Klein J., Ziehr H. (2014):** Immobilization of microbial cells by adsorption. J. Biotechnol.16, 1-3.
130. **Krebs M., Brehm A., Krssak M. (2003).** Direct and indirect effects of amino acids on hepatic glucose metabolism in humans. Diabetologia. 46, 917–925.

131. **Krepsky N., Ferreira R.B.,Nunes A.,Lins U.,Filho l., Netto-dosSantos K.(2003).** Cell Surface Hydrophobicity and Slime Production of *Staphylococcus epidermidis* Brazilian Isolates.Current Microbiology. 46, 280.
132. **Kukkonen J., Landrum P. F.(1996).** Distribution of organic carbon and organic xenobiotics among different particle-size fractions in sediments. Chemosphere. 32,1063-1076.
133. **Kumar M., Khanna S. (2010).** Diversity of 16S rRNA and dioxygenase genes detected in coal tar-contaminated site undergoing active bioremediation. J Appl Microbiol.108, 1262.
134. **Kunihiro T., Veuger B., Vasquez-Cardenas. D., Pozzato L., Guitton A. M., Moriya K., Kuwae M., Omori K (2014).** Phospholipid-derived fatty acids and quinones as markers for bacterial biomass and community structure in marine sediments. PLoS ONE. 9, 96219.
135. **Kuony S, (2005)** : caracterisation d'arene dioxygenases impliquees dans la biodegradation des hydrocarbures aromatiques Polycycliques chez *mycobacterium* sp. 6py1. Thèse de docteur de l'université joseph fourier-grenoble i. Discipline : Virologie, Microbiologie, Immunologie. 15.
136. **Labrecque M. H. (2003).** Etude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène. Maîtrise en microbiologie agricole, Université de Laval.Canada.79.
137. **Lacroix S., (2008).** Étude des mécanismes physiologiques et moléculaires de la filamentation de Sphaerotilus natans, bactérie modèle du foisonnement invasif en boues actives., thèse doctorat., L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech).303.
138. **Lane D. J. (1991).** 16S/23S rRNA sequencing. In Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. New York: Wiley. 115.
139. **Lang S and Wallbrant D. (1999**). Ramnose lipide biosynthytisis- microbial production and application potentiel. App biotechnol biochhimical.51, 22.
140. **Leahy J.G et Colwell R.R. (1990).** Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiological Reviews. 54, 305.
141. **Leahy J. G., Somerville C. C., Cunningham K. A., Adamantiades G. A., Byrd J. Jet Colwell R. R. (1990).** Hydrocarbon mineralization in sediments and plasmid incidence in sediment bacteria from the Campeche Bank. Appl. Environ. Microbiol. 56, 1570.
142. **Lee K. E. et Foster R. C. *(*1991).**Soil fauna and soil structure**.** *Australian Journal of Soil Research.* 29, 745 - 775.
143. **Leyral G., Joffin J.N. (1998).** Microbiologie technique. 2. Documentation technique. Biologie Technique. 2èm édition CRDP. Bordeaux, France. 37-42 ; 61-73 ; 137-145 ; 183-193.
144. **Liesse I.(2012).**Etude de l'interaction des souches cliniques de Staphylococcus aureus avec une surface abiotique**. These university Bruxelles,26**
145. **Lion T., Oskar A., Haas A. (1990):** Nonradioactive labeling of probe with digoxigenin by polymerase chain reaction Analytical Biochemistry,188, 335-337
146. **Liste. H.H., Prutz. I. (2006)**. Plant performance, dioxygenase-expressing rhizosphere bacteria, and biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soil. Chemosphere. 62, 1411.

147. **Liu Q .,Tang J Bai Z .,Hecker M.(2015).** Distribution of petroleum degrading genes and factor analysis of petroleum contaminated soil from the Dagang Oilfield, China Scientific Reports .5, 68.
148. **Liu Q.,Tang J., Bai Z .,Hecker M.(2017).** Geographic microbial response to petroleum Response of microbial community and catabolic genes to simulated petroleum hydrocarbon spills in soils/sediments from different geographic locations.2,231.
149. **Liu Y., Hodson M., Hall B. (2006).** Loss of the flagellum happened only once in the fungal lineage: phylogenetic structure of Kingdom Fungi inferred from RNA polymerase II subunit genes. *BMC Evolutionary Biology*. 6, 74-87.
150. **Liu H., Yao J., Yaun Z., Shang Y., Chen H., Wang F., Masakorala K., Yu C., Cai M., Blake E., Choi M.M. (2014)**. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from oil-water mixture in Dagang oil field, China. Int. Biodeterior. Biodegrad, 87: 52–59.
151. **Liu H .,Yao J.,Yuan Z.,Shang Y., Chen H. ,Wan .F and Masakorala K .(2003).** Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste.Owen Ward ajay Singh J.Van Hamme.Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.30, 260-270
152. **Long H .,Wang Y., Chang S., Liu .,G Chen T., Huo G. (2017).** Diversity of crude oil-degrading bacteria and alkane hydroxylase (*alkB*) genes from the qinghai-Tibet Plateau.Environmental Monitoring and Assessment.189, 198.
153. **Louvel B(2010).** Étude en microcosmes de l'effet du ray-grass et de ses exsudats racinaires sur la dissipation des HAP et les communautés bactériennes dégradantes these doctorat de l'Université de Nancy.30.
154. **Lovely D.R. (2003)**: Cleaning up with genomics: applying molecular biology of self-bioremediation. Nat Rev Microbiol. 1, 35–44.
155. **Lu L. (2003).** Rsf1p, a protein required for respiratory growth of Saccharomyces cerevisiae. Curr Genet, 43,263.
156. **Lu C., Napier J. A., Clemente T. E.,CahoonE. B. (2011).**New frontiers in oilseed biotechnology: meeting the global demand for vegetable oils for food, feed, biofuel, and industrial applications. Current Opinion in Biotechnology.22, 2252-259.
157. **MacNaughto S.J., Stephen J.R., Venosa A.D., Davis G.A., Chang Y.J., White D.C., (1999).** Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. Applied and Environmental Microbiology 65, 3566-3574.
158. **Maddela N.R. , Masabanda M., and Leiva-Mora M.(2015).**Novel diesel –oil-degrading bacteria and fungi from the Ecuadorian rainforest. 71, 1554-1561.
159. **Mahmoudi N., Fulthorpe R.R., Burns L., Mancini S et Slater G. F. (2013).** Assessing microbial carbon sources and potential PAH degradation using natural abundance 14C analysis Environ. Pollut. 175.
160. **Mallick S., Chatterjee S., Dutta T.K. (2007):** A novel degradation pathway in the assimilation of phenanthrene by *Staphylococcus* sp. strain PN/Y via meta-cleavage of 2-hydroxy-1-naphthoic acid: formation of trans-2,3-dioxo-5-(29-hydroxyphenyl)-pent-4-enoic acid. Microbiology.53, 2104–2115.
161. **Manohar S. ,Kim C.K and Karegoudar T.B.(2001).**Enhanced degradation of naphthalene by immobilization of Pseudomonas sp.strain NGK1 in polyurethane foam .Appl Microbiol Biotechnol.vol55,issue(55),pp :311-316.

162. **Mao X-Y., Cheng X., Wang X., Wu S-J. (2001).** Free-radical-scavenging and anti-inflammatory effect of yak milk casein before and after enzymatic hydrolysis Food Chemistry, 490.
163. **Mao-Cheng D., Jing L., Fu-Rui L., Meisheng Y., Xiao-Ming X., Jian-Ping Y., Juan P., Chou-Fei W., Jiang-Hai W., (2014)**: Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading bacterium Achromobacter sp. HZ01 from the crude oil-contaminated seawater at the Daya Bay, southern China. Contents lists available at ScienceDirect . Marine Pollution Bulletin . journal homepage
164. **Marchal N. et Bourdon J. L., (1982)**. Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed. Doin, Paris.482.
165. **Mata-Sandoval J., Karns J et Torrents A. (1999):** High-performance liquid chromatography method for the characterization ofrhamnolipids mixture produced by Pseudomonas aeruginosaUG2 on corn oil. J. Chromatogr. 864, 211–220
166. **Mazzeo D. E., Carlos E. L., Dejanira F .A., Marin-Morales M. A. (2010).** BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery, Science of the total environment, 408, 4334-4340.
167. **Mazzeo N., Iglesias C., Teixeira-De Mello F., Borthagaray A., Fosalba C., Ballabio R., Larrea D., Vilches J., García S., Pacheco J.P. et Jeppesen E. (2010).** Trophic cascade effects of Hoplias malabaricus (Characiformes, Erythrinidae) in subtropical lakes food webs: a mesocosm approach. Hydrobiologia, 644, 325.
168. **McGenity T.J., Gramain A.(2012).** Cutivation of halophilic hydrocarbon degraders. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Edited by: Timmis KN, McGenity TJ, Meer JR, Lorenzo V., Springer, Berlin Heidelberg, 3847.
169. **MendelssohnI. 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.
170. **Mesbaiaha F. Z., Mansoura F., Eddouaouda K., Badis A. (2016).** Surfactant effects on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Desalination and Water Treatment. 57, 5999–6000.
171. **Metzker M.L. (2010)**. Applications of next-generation sequencing. Sequencing technologies -the next generation. *Nat. Rev. Genet.* 31-36.
172. **Militon C., Jezequel R., Gilbert F., Corsellis Y., Sylvi L., Cravo-Laureau C., Duran R., Cuny P. (2015).** Dynamics of bacterial assemblages and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in oil-contaminated coastal marine sediments subjected to contrasted oxygen regimes. Environmental Science and Pollution Research, Springer Verlag.15260-15272.
173. **Moody J.D, Freeman J.P., Cerniglia C.E. (2005).** Degradation of benz[*a*]anthracene by *Mycobacterium vanbaalenii* strain PYR-1. Biodegradation. 16, 513–526.
174. **Morgan P. R., Watkinson J. (1992).** Factors limiting the supply and efficiency of nutrient and oxygen supplements for the *in situ* biotreatment of contaminated soil and groundwater. Water Research. 26, 73-78.
175. **Mueller L. A.A., Hinz U., Uzé. M., Sautter C., Zryd J.P. (1997**). Biochemical complementation of the betalain biosynthetic pathway in *Portulaca grandiflora* by a fungal 3, 4-dihydroxyphenylalanine dioxygenase dihydroxyphenylalanine dioxygenase. 203, 3-4.

176. **Mukherjee A., Patel B., Koga H., Cuervo A.M., Jenny A. (2016).** Selective endosomal microautophagy is starvation-inducible in Drosophila. Autophagy 12, 1984-1999.
177. **Naughton M. S. J., Stephen J. R., Venosa A. D., Davis G. A., Chang Y., White D. C. (1999)**. Microbial Population Changes during Bioremediation of an Experimental Oil Spill. Applied and environmental microbiology. 65, 3566-3574.
178. **Ní C. S. M', Schaefer J. K., Crane S., Zylstra G. J., Barkay T. (2006).**Analysis of mercuricreductase (*merA*) gene diversity in an anaerobic mercury-contaminated sediment enrichment. **Environmental Microbiology.** 8, 1749.
179. **Nitschke M., Coast S.G. (2007)**: Biosurfactants in food industry.Trends Food Sci. Technol. 18, 252-259.
180. **Norziani D.,Mastura J.,Siti A., Mohd R. (2013**). Local Community Readiness in Entrepreneurship: Do Gender Differ in Searching Business Opportunity. Procedia - Social and Behavioral Sciences.91, 403-410.
181. **Obuekwe C.O., Al-JadiZ K., Al-Saleh E.S. (2008).** Comparative hydrocarbonutilization by hydrophobic and hydrophilicvariants of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of AppliedMicrobiology. 105, 1876–1887.
182. **Obuekwer C.O et Al-Muttawa E. M. (2001).** Self-immobilized bacterial cultures with potential for application as ready-to-use seeds for petroleum bioremediation. Biotechnology Letters. 23, 1025–1032.
183. **Oliver R., May E., Williams J. (2007):** Microcosm investigations of phthalate behaviour in sewage treatment biofilms. Sci Total Environ, 372, 605-614.
184. **Parales R. E. (2003).** The role of active-site residues in naphthalene dioxygenase. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 30, 271–278.
185. **Pattanathu K. S. M., Kamaljeet K., Sekhon. R. (2016).** Oil degradation and biosurfactant production by the deep sea bacterium. Front Microbiol.
186. **Paul F.(2008).**pollutions des cotes par les hydrocarbures. édition Press universitaires de Renne. Leroy, 89.
187. **Perfumo A., Smyth T., Marchant R., Banat I. (2010).** Production and Roles of Biosurfactants and Bioemulsifiers in Accessing Hydrophobic Substrates. In: Timmis K.N. (eds) Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, Berlin, Heidelberg. 1501-1512.
188. **Philippe T.D. (2014):** Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques: Cinétiques de dégradation en milieux synthétiques et en bioréacteurs semi-solides, Editions universitaires europeennes,108.
189. **Pignatello J. J. (1999).** The Measurement and Interpretation of Sorption and Desorption Rates for Organic Compounds in Soil Media Advances in Agronomy. 69, 73.
190. **PhillipsT.M., Lui D. ,lee .H Trevore J.T. (2000).**Monitoring bioremediation in creosote –contaminated soils using chemical analysis and toxicity tests.Ind.J., Microbiol Biotechnol. 24, 132-139.
191. **Piquet A. M. T., Bolhuis H., Meredith M. P and Buma A. G. J. (2011):** Shifts in coastal Antarctic marine microbial communities during and after melt water-related surface stratification. *FEMS Microbiol. Ecol.* 76, 413–427
192. **Pleshakova E. V., Muratova A. Y and Turkovskaya O. V. (2001).** Degradation of mineral oil with a strain of Acinetobacter calcoaceticus, Applied Biochemistry and Microbiology, 37, 342–347.

193. **Pradeep Ram A. S., Sime-Ngando T. (2008)**. Functional responses of prokaryotes and viruses to grazer effects and nutrient additions in freshwater microcosms. *ISME J.* 2, 498–509 .
194. **Prince R.C., Gramain A., McGenity T.J. (2012).** Prokaryotic hydrocarbon degraders. In: Timmis KN, editor. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Berlin: Springer,1672–1692.
195. **Raad A. N., Ithar K.A. A. (2015):** Biodegradation of Aromatic and Alkanes Compounds in Contamination Soils with Gasoline by Klebsiella pneumonia, Iraqi Journal of Science, , 56, 2574-2575**.**
196. **Rabus R., Boll M., Heider J. (2016).** Anaerobic microbial degradation of hydrocarbons: from enzymatic reactions to the environment. J Mol Microb Biot. 26, 5–28.
197. **Radwan S.S., Al-Awadhi H., Sorkhoh N.A., El-NemrI.M. (1998).** Rhizospherichydrocarbon-utilizingmicroorganisms as potential contributors to phytoremediation for the oil Kuwaiti desert. Microbiological Research. 153, , 247-251.
198. **Record Z. (2007).** Etat des connaissances sur le devenir de polluants dans les sols lors de la biodégradation naturelle et après biotraitements : Identification des composés « métabolites » et des cinétiques, 50.
199. **Rocha G. N., Gallegos E. I., Gonzáles J. A. L., Ramos R. F. G., Rodriguez M. M., Reynoso M. E. C., Rocha R. U., and Roque R. M. (2007).** Antioxidant effect of oregano (Lippia berlandieri v. Shauer) essential oil and mother liquors. Food Chem. 102, 330.
200. **Rocha S.(2007).** Gene regulation under low oxygen :Holding your breath for transcription. Biochemical sciences . 32 : pp212-213.
201. **Rodgers-Vieira E .A., Zhang Adrion C. A., Gold A., Aitken D. Ml.(2015).** Identification of Anthraquinone-Degrading Bacteria in SoilContaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Applied and Environmental Microbiology.81 , 3775.
202. **Rodriguer-Blanco A ., Antoine V.,Pelletier E .,Dellil Dand Ghiglione J-F.(2010).**Effect of temperature and fertilization on total vs.Active bacterial communites exposed to crude and diesel oil pollution in kw Mediterraneanse.Environmental Pollution. 158, 663-673.
203. **Roling W. F Milner M.G., Jones D.M., Lee K., Daniel F., Swannell R.J., Head I.M. (2002).** Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. Appl Environ Microbiol. 68, 5537–5548.
204. **Romine M.F., Fredrickson J.K., Li S.M.W.(1999):** Induction of aromatic catabolic activity in *Sphingomonas aromaticivorans* F199. J Ind Microbiol Biotechnol, 23, 303–313.
205. **Ron E.Z., Rosenberg E. (2011).** Natural roles in biosurfactants. Environ Microbiol. 3, 229.
206. **Rosenberg E. (1986).** Microbial surfactants. Crit Rev Biotechnol. 3, 129-132.
207. **Saada *A*., Nowak C et Coquereau N. (2005).** Etat des connaissances sur l'atténuation naturelle des hydrocarbures – Rapport intermédiaire : résultat de la phase 1. Rapport BRGM/RP-53739-FR. 107.
208. **Samaei M.R. ,Mortazavi S.B.,Bakashi Band JafariA.J.(2012).** Isolation and characterization of bacteria degrading n-hexadecane from soil.In processing of International Conferance on Biological and Life Science IPCBEE 40 ,Singapore .

209. **Sanger F**.,**Nicklen S and Coulson A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 5463.
210. **Santisi.S ., Cappello S.,[1] Catalfamo M.,[1] Mancini G., Hassanshahian,[4] Lucrezia M G .,[1] Giuliano L.,[1] and Yakimov M. M. (2015).** Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium, Brazilian Journal of Microbiology, 46, 377-387.
211. **Sauret C. (2011).** Ecologie des communautés bactériennes marines soumises à une pollution pétrolière. Influence des facteurs environnementaux, de la prédation et de la récurrence des polluants. Thèse de Doctorat. Université Pierre et Marie Curie.287.
212. **Schneider J., Grosser R., Jayasimhulu K., Xue W and Warshawsky, D. (20013)**: Degradation of pyrene, benz[*a*]anthracene, and benzo[*a*] pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 13–19.
213. **Scriban R. (1999).** Biotechnologie. 5eme édition. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris. 149-159.
214. **Seo J., Keum Y., Li Q. (2009).** Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. International Journal of Environmental Research and Public Health. 6, 278- 309.
215. **Sharma S.L et Pant L. (2000).** Biodegradation and conversion of alkanes and crude oil by a marine Rhodococcus sp. Biodegradation. 11, 289.
216. **Simarro R., Gonz_alez N., Bautista L. F., Molina M. C. (2013).** Assessment of the efficiency of in situ bioremediation techniques in a creosote polluted soil. Change in bacterial community, 262-158-167.
217. **Škvarla J., kupka D., Návesňákov Yand Škvarlová A. (2002).**An evaluation of the outer membrane charge and softness of *Thiobacillus ferrooxidans* by the Oshima's electrophoretic model of a Soft particle.Folia Microbiologica., 47,218-224.
218. **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.
219. **Soetaert R. G. W., Bogaert I. V. (2014).** Biotechnological opportunities in biosurfactant production. Current opinion in biotechnology. 30, 66-72.
220. **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.
221. **Soltani M. (2004).** Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse de doctorat de l'université Paris 6, spécialité chimie analytique,284.
222. Solubilization and Biodegradation of *n*-Alkanes. Applied and environmental microbiology. 61, 2247-2251.
223. **Song H., Wang X., Bartha R. (1990).** Bioremediation Potential of Terrestrial Fuel Spillst. Applied and environmental microbiology, 652-656.
224. **Stolz A. (2009)**. Molecular characteristics of xenobiotic-degrading sphingomonads. Appl. Microbiol. Biotechnol.81,793-811.
225. **Straube W.L., Nestler C. C.,Hansen L. D.,Ringleberg D.,Pritchard P. H.(2003).** Remediation of polycyclic hydrocarbons (PAHs) through Landfarming with Biostimulation and Bioaugmentation, Acta Biotechnol. 23, 179-196.
226. **Sugimori D., Nakamura M., and Mihara Y. (2002).** Microbial degradation by Acinetobacter sp. Strain SOD-1.J Biosc Biotechnol Biochem.1579-1582.

227. **Sunita J. Varjani A. B., Vivek N., Upasani C.,(2016):** .Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of Pseudomonas aeruginosa NCIM 5514 . Elsevier . 2, 195–201 .
228. **Teli N. , Verma D. , Gavankar R. et Bhalerao S. (2013).** Characterization and Identification of Diesel Engine Oil Degrading Bacteria from Garage Soil and Comparison of their Bioremediation Potential. Int. Res. J. Environment Sci. International Science Congress Association 48 Isolation. 2. 48-52.
229. **Thompson J. K., Heinberg L. J., Altabe M., & Tantleff-Dunn S. (1998).** Exacting beauty: Theory, assessment, and treatment of body image disturbance. Washington, DC: American Psychological Association..
230. **Tierney M., Young. L. Y. (2011)**. Anaerobic degradation of aromatic hydrocarbons. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, 925-934.
231. **Tortora G.J. (2003).** Introduction à la microbiologie.. Antibiotiques - les plus couramment utilisés. ERPI. 608.
232. **Tsai W. T. ,Kueil L.M.,Hung C.J ., Hung C.J. , Yi S.T. , Ming C.Y . (2009).** Characterization of bio –oil from induction-heating pyrolysis of food –prossising sewage sludges using chromatographic analysis.Bioresource Technolgy.100,2650-2654.
233. **Van-Beilen J.B., Panke S., Lucchini S., Franchini A.G., Ro¨thlisberger M., Witholt B.(2002).** Analysis of Pseudomonas putida alkane degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk-genes. Microbiology. 147, 1621.
234. **Vandecasteele J. P. (2008).** Petroleum Microbiology, Editions TECHNIP, Paris, 816 .
235. **Vandecasteele J.P.(2005).** Les hydrocarbures naturels dans l'environnement. In Microbiolobie pétrolière. Technip (ed).Paris : IFP publications, 44-73.
236. **Vandecasteele J.P. (2005**). Microbiologie pétrolière – concepts, implications environnementales, applications industrielles. Volume 1. Publications de l'institut français du pétrole, Paris, 412.
237. **Vandecasteele B., Samyn J., Devos B., Muys B. (2008)**. Effect of tree species choice and mineral capping in a woodland phytostabilisation system: A case-study for calcareous dredged sediment landfills with an oxidised topsoil. Ecological engineering. 32, 263-273.
238. **Vieira P. A., Vieira R. B . , França F. P., Cardoso V. L. (2009).** Statistical analysis and optimization of nitrogen, phosphorus, and inoculum concentrations for the biodegradation of petroleum hydrocarbons by response surface methodology. World Journal of Microbiology and Biotechnology.25, 427–438.
239. **Vitt C., Peterson T., Bennetzen J. (2011).** Transposable elements and the evolving structure of the maize genome. In: PrioulJ, ed. Advances in Maize London : Taylor and Francis, the Society for Experimental Biolog. 36.
240. **Vitte I., Duran R., Hernandez-Raquet G., Mounie J., Jézéquel R., Bellet V., et al. (2013).** Dynamics of metabolically active bacterial communities involved in PAH and toxicity elimination from oil-contaminated sludge during anoxic/oxic oscillations. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 4199.
241. **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.

242. **Wang W and Shao Z. (2013).** Enzymes and genes involved in aerobic alkane degradation.Front. Microbiol, 28.
243. **Wang X., Xu H., Ha S., Ju D and Xie Y.(2010). Proteasomal** degradation of Rpn4 in Saccharomyces cerevisiae is critical for cell viability under stressed conditions. Genetics. 184, 335.
244. **Wang Y.C., Lee C.M., Lee L.C., Tung L.C., Hsieh-Li H.M., Lee-Chen G.J., Su M.T. (2011).** Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress Contribute to the Pathogenesis of Spinocerebellar Ataxia Type 12 (SCA12). J. Biol. Chem. 286, 21742-21754.
245. **Wang. X. B., Chi.O. X., Nie. Y., Tang. Y. Q., Tan.Y., Wu. G., Wu. L.X.(2011)**. Degradation of petroleum hydrocarbons (C6–C40) and crude oil by a novel Dietzia strain. Bioresour technol, 7755-7761.
246. **Ward O., Singh. A., Van Hamme J. (2003)**. Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. Journal of industrial microbiology and biotechnology. 30, 260-270.
247. **WardLiebeg E., Cutright T.J. (1999).** The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. International biodeterioration and biodegradation. 44, 55-64.
248. **Warr L. N., Perdrial J. N., Claire-lett M., Salmeron A. H., Khodja M. (2009).** Clay mineral-enhanced bioremediation of marine oil pollution. Applied clay science. 46, 337-345
249. **Watkinson J. R., Morgan P. (2010).** Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. .Physiology of Biodegradative Microorganisms, 92.
250. **Weinel C., Nelson K.E., et Tümmler B. (2002).** Global features of the *Pseudomonas putida* KT2440 genome sequence. Environ Microbiol, 4, 809–818.
251. **Wentzel A., Ellingsen T. E., Kotlar H. K., Zotchev S. B., Throne-Holst M. (2007).** Bacterial metabolism of long chain n-alkanes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 1209–1221
252. **Wentzel A. (2007).** Bacterial metabolism of long-chain *n*-alkanes. Applied microbiology and biotechnology. 76, 1209-1221.
253. **Widdel F. et Rabus R.(2001).** Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. Curr Opin Biotechnol. 12, 259–276.
254. **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: Springer-Verlag;), 908–909.
255. **Widdel F., Musat F. (2010).** Diversity and Common Principles in Enzymatic Activation of Hydrocarbons, 981-1009.
256. **WolfeJ P.,WagawS.,Marcoux J. F and BuchwaldS. L. (1998). R**ational Development of Practical Catalysts for Aromatic Carbon−Nitrogen Bond Formation. *Acc. Chem. Res.* 31, 805–818.
257. **Wongsa P., Tanaka M., Hasanuzzaman M., Yumoto I., Okuyama H. (2004).** Isolation and Characterization of Novel Strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens*Possessing High Efficiency to Degrade Gasoline, Kerosene, Diesel Oil, and Lubricating Oil. Current microbiology. 49, 415-422.

258. **Yadav A ., Kumar N., Manna k., Pandiyan K.(2016).** Isolation and characterization of biosurfactant producing *Bacillus* sp. from diesel fuel-contaminated site. Microbiology. 85, 56–62.
259. **Yakimov M. M., Timmis K. N., Golyshin P. N. (2007).** Obligate oil-degrading marine bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18. 257–266.
260. **Yakimov M.M., Giuliano L, Gentile G., Crisafi E ., Chernikova N.˙, Abraham L, Kenneth N., Timmis P. N. (2003).** Oleispira antarctica gen. nov., sp. nov., a novel hydrocarbonoclastic marine bacterium isolated from Antarctic coastal sea water. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 53, 779-785.
261. **Yakimov M.M., Giuliano L et Denaro R. (2004**). Thalassolituus oleivorans gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. Int J Syst Evol Microbiol. 54, 141–148.
262. **Yang S.Z., Jin H.J., Wei Z., He R.X, Ji Y.J., Li X.M, Yu S.P .(2009)**. Bioremediation of Oil Spills in Cold Environments: A Review. Pedosphere., 19. 371.
263. **Yang Y ., Wang. J., Liao J. (2015).** Abundance and diversity of soil petroleum hydrocarbon-degrading microbial communities in oil exploring areas ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY Appl Microbiol Biotechno.l 99,1935–1946.
264. **Yu C.,Cai M., Blake R.E and Choi.M.M.F.(2014).**Isolation and characterisation of crude -oil degrading bacteria from oil-water mixture in Dagang oil field. China.Int.Biodeterior.Biodegrad.vol 87,pp :52-59.
265. **Yua. K.S.H., Wong.K.H.Y., Yau.Y.W.Y.,Wong.N. F. S., Tam.Y.F. (2005)**. Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. Marine pollution bulletin.51, 1071-1077.
266. **Yuliani H, Sahlan M., Hermansyah H et Wijanarko A .(2012).** Selection and Identification of Polyaromatic Hydrocarbon Degrading Bacteria. World Applied Sci. J. 20 , 1133.
267. **Yuste R., Majewska A., Holthoff K. (2000).** From form to function: calcium compartmentalization in dendritic spines. Nat Neurosci. 3, 653–659.
268. **Yuste L., Corbella M.E., Turie´ M.J., Karlson U., Puyet A. , et Rojo, F. (2000**): Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. FEMS Microbiology Ecology, 32, 69–75.
269. **Zairi M. , Rouis M.J et Shabou R.(2002)**.Etude Experimentales de la Boirestauration des Sols Souilles par les Hydrocarbres., revue francophone d'ecologie industrielle. 27, 39.
270. **Zarilla K.A., Perry J.J. (1984)**: *Themoleophilum album gen.* nov. and sp. nov., a bacterium obligate for thermophily and *n*-alkane substrates. Arch Microbiol, 137, 286–290**.**
271. **Zeinali M., Vossoughi M., Ardestani S.K. (2010)**. Characterization of a moderate thermophilic *Nocardia* species able to grow on polycyclic aromatic hydrocarbons. Letter of applied microbiology. 45, 622-628.
272. **Zeng G., Chen M., Zeng Z. (2013).**Shale gas: surface water also at risk. Nature. 499, 154.
273. **Zhang Y., Wheatley R., Fulkerson E., Tapp A., Estes P.A. (2011).** Mastermind Mutations Generate a Unique Constellation of Midline Cells within the Drosophila

CNS. Department of Genetics, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, United States of America. PLoS ONE, 6,p 14.

274. **Zhang Y., Wang F., Wei H., Wu Z., Zhao Q., Jiang X., (2013).** Enhanced biodegradation of poorly available polycyclic aromatic hydrocarbons by easily bavailable one. Int. Biodeterior. Biodegrad. 84, 72–78.
275. **Zhang Y., Miller.R.(1995)**. Effect of Rhamnolipid (Biosurfactant) Structure on
276. **Zhou J., Xia, B., Treves D.S., Wu L.Y., Marsh T.L., O'Neill R.V., Palumbo A.V., Tiedje J.M. (2002**). Spatial and resources factors influencing high microbial diversity in soil. Applied and Environmental Microbiology, 68, 326–334.
277. **Zhuang Q., McGuire A D., Melillo J M., Clein J S., Dargaville R J., Kicklighter D W., Myneni R B., Dong J., Romanovsky V E, Harden J and Hobbie J E. (2003) .** Carbon cycling in extratropical terrestrial ecosystems of the Northern Hemisphere during the 20th century: a modeling analysis of the influences of soil thermal dynamics Tellus B. 55, p751.

Annexes

Annexe I -Milieux de culture utilisés

Milieu bouillon nutritif (BN)

Eau distilée	1l
Peptone	5g
Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2 g
Chlorure de sodium	5g

pH=7,3±0,2

Milieu gélose nutritive (GN)

Eau distilée	1l
Peptone	5g
Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2 g
Chlorure de sodium	5g
Agar	15g

pH=7,3±0,2

Milieu M63

Eau distillée	1l
KH_2PO_4	100 mM
$(NH_4)_2 SO_4$	15 mM
$FeSO_4. 7H_2O$	9 mM
$MgSO_4. 7H_2O$	4 mM

pH 7= ±0,2

Annexe II : Présentation des galeries API 20 E (d'après la documentation bioMérieux).

1. Principe

La galerie API 20 E, commercialisée par la société « bioMérieux,» est un système miniaturisé, prêt àl'emploi et standardisé.

La galerie comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Au-dessous de chaque tube, unsigle indique la nature du test. Les tubes sont ensemencés avec une suspension bactérienne effectuée eneau physiologique. Les réactions produites au cours de lapérioded'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Un fond et un couvercle complètent la galerie et permettent de constituer une boîte d'incubation.

La galerie API 20 E permet d'effectuer les tests suivants : ONPG, ADH, LDC, ODC, citrate de Simmons(CIT), production d'hydrogène sulfuré par réduction du thiosulfate (H2S), synthèse d'une uréase (URE), recherche d'une tryptophane désaminase (TDA), recherche du pouvoir indologène (IND), productiond'acétoïne (VP), synthèse d'une gélatinase (GEL), recherche de l'acidification de neuf "glucides" : glucose(GLU), mannitol (MAN), inositol (INO), sorbitol (SOR), rhamnose (RHA), saccharose (SAC), mélibiose(MEL), amygdaline (AMY), et arabinose (ARA).

La galerie permet également la recherche du nitrate réductase qui se fait dans le microtube "GLU".

2. Technique

- Placer de l'eau dans les alvéoles présents dans le fond de la boite afin de créer une atmosphère humide.
- Retirer la galerie de son emballage et la placer dans le fond de la boîte.
- Prélever à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée une colonie parfaitement isolée.
- Dissociersoigneusement la colonie dans une ampoule de "suspension Medium".
- A l'aide d'une pipette munie d'une poire remplir les microtubes de la galerie. Au sein des microtubes, lefabriquant distingue deux parties, le tube et la cupule. Selon les tests, la suspension bactérienne doit êtreplacée uniquement dans le tube ou dans le tube et la cupule.
- Lorsque le sigle du test est encadré, ce qui est le cas des tests CIT, VP et GEL, la suspension doitremplir le tube et la cupule.

- Lorsque que le sigle du test est souligné (ADH, LDC, ODC, URE, H2S), la suspension doit rempliruniquement le tube. Après ensemencement complet de la galerie, la cupule sera secondairement remplied'huile de paraffine.
- Lorsque le sigle du test n'est ni encadré ni souligné (ONPG, TDA, IND, GLU, MAN, INO, SOR,RHA, SAC, MEL, AMY, ARA), la suspension doit remplir uniquement le tube.
- Refermer la boîte d'incubation, écrire les références du prélèvement sur la languette du fond de la boîte etplacer la boîte à 37 °C durant 18 à 24 heures.

3. Lecture

- Sortir la boîte de l'étuve et noter sur la fiche de lecture les résultats obtenus pour les tests à lecture spontanée (voir ci-dessous le tableau de lecture).
- Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs (voir ci-dessous le tableau de lecture) :

TDA : ajouter une goutte du réactif TDA

IND : ajouter une goutte du réactif de James

VP : ajouter une goutte du réactif VP 1 et une goutte du réactif VP 2

Nitrate réductase : après avoir noté le résultat obtenu pour l'acidification du glucose, ajouter une gouttedu réactif NIT 1 et une goutte du réactif NIT 2. Si aucune coloration rouge n'est obtenue (attendre deux àtrois minutes), ajouter une petite quantité de poudre de zinc.

- 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 uneanaérobiose.

Tableau: Lecture d'une galerie API 20 E

Test	Réactions	Composants actifs	Ajout de réactif	Résultat	
				négatif	Positif
ONPG	Bêta-galactosidase	2-nitrophényl-bêta-Dgalactopyranoside	Non	Incolore	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
H_2S	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 VP2	Incolore	Rose ou rouge
GEL*	Gélatinase	Gélatine de bœuf	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 vert	Jaune
RHA	Rhamnose	L-rhamnose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
SAC	Saccharose	D-saccharose	Non	Bleu ou bleu	Jaune

Annexe III : Dosage de carbone oraganique (CLEMENT et FRANCOISE , 2003)

1. **Principe de la méthode**

La méthode de détermination du carbone organique est basée sur l'oxydation de ce dernier par le bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) en milieu acide sulfurique à 135°C. Le chrome +VI (Cr^{6+}) est réduit par le carbone organique en chrome +III (Cr^{3+}). On admet alors que la quantité d'ions chromiques (Cr^{3+}) formés est proportionnelle à la quantité de carbone organique contenu dans la prise d'essai. Les ions chromiques (Cr^{3+}) sont dosés par spectrophotomètre.

Remarque sur la prise d'essai

La prise d'essai peut être un échantillon de terre broyée, séchée et tamisée à 2 mm. Si la prise d'essai est un échantillon de terre broyée et tamisée à 315 µm(ou 160 µm pour les échantillons dont la teneur en carbone organique dépasse 16 %), la méthode devient celle de la NF X 31-109.

2. **Mode opératoire**

2.1. Pesée

Le rendement de l'oxydation est fonction de la prise d'essai même lorsque le bichromate reste en excès. Il est donc important de choisir sa prise d'essai en fonction de la teneur présumée en carbone organique (tableau 1).

Tableau 1. Prise d'essai en fonction de la teneur supposée en matière organique.

Teneur présumée en carbone (%de terre fine)	<4	de 4,1à7, 9	De 8à16	De 16à40	>40
Poids de la prise d'essai (mg)	400 à 500	200 à 250	100 à 125	45 à 50	20 à 25

Le domaine d'incertitude de la pesée ne devrait pas excéder ± 0,25% du poids de la prise d'essai.

2.2. Oxydation

- Introduire la prise d'essai dans un tube. Au moyen des distributeurs, verser respectivement 5ml de solution de bichromate, puis 7,5 ml d'acide sulfurique. Homogénéiser soigneusement au moyen de l'agitateur.
- Placer, au fur et à mesure de l'addition d'acide sulfurique, les tubes dans le bloc chauffant et laisser réagir pendant 30 min. retirer les tubes, leur ajouter 50 ml d'eau déminéralisée, refroidir dans un bain d'eau.
- Lorsque les solutions sont revenues à température ambiante, ajuster à 75 ml avec de l'eau déminéralisée. Homogénéiser soigneusement, laisser décanter pendant 1 h.

- Transférer chacune des solutions dans les tubes à centrifuger.
- Centrifuger à 2000 G pendant 10 min.
- Les solutions sont alors prêtes pour le dosage spectophotométrique.
- S'assurer que l'ensemble des opérations - décantation /centrifugation/transfert dans la cuve de mesure – ne provoque pas l'entrainement de particules solides susceptibles de perturber le signal de mesure. Dans le cas contraire, il sera nécessaire de procéder à une filtration sur filtre.

2.3. Dosage spectrophotométrique

2.3.1. Gamme d'étalonnage

- Préparer, au moment de l'emploi, les solutions étalons ; dans des fioles jaugées de 100ml, dissoudre une masse de glucose comme indiqué au tableau 2dans 5ml de la solution de bichromate de potassium. Mélanger jusqu'à dissolution complète. Ajuster au volume avec cette solution et homogénéiser.

Tableau : Gamme d'étalonnage.

Indice	**Glucose (g)**	**Quantité de carbone dans 5ml (mg)**
T0	0,0	0
T1	2,5	5
T2	5,0	10
T3	7,5	15
T4	10,0	20

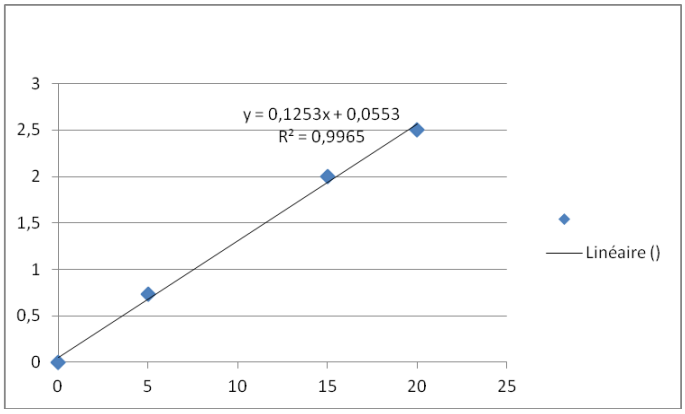
- Prélever 5 ml des solutions T0 à T4 au moyen d'une pipette. Les introduire dans les tubes. Ajouter 7,5 ml d'acide sulfurique, homogénéiser, poursuivre l'oxydation mais sans ajouter à nouveau du bichromate de potassium.

2.3.2. Mesures

- Transférer dans la cuve du spectrophotomètre, réglé à 585 nm, dans l'ordre : la gamme d'étalonnage puis les solutions d'essai.
- Tracer un graphique de lecture sur papier millimétré.
- Dis poser de plusieurs cuves de manière à ne pas avoir de problèmes de nettoyage de cuves lors des mesures. En utilisant systématiquement la même cuve rincée pour une série de mesure, on risque en effet d'avoir une décontamination insuffisante de cuve et

d'avoir dans ce cas de figure une influence d'un échantillon sur l'autre. Mais attention, il faut que les cuves soient rigoureusement identiques car si elles sont légèrement différentes les unes des autres, la lecture d'absorbance pour le même échantillon peut être différente .

- A l'aide du graphique établi préalablement calculer la concentration en carbone organique de chaque solution d'essai, exprimé en milligrammes de carbone.



Courbe d'étalonnage (carbone organique total)

Annexe IV: Techniques de bioremédiation des sols (ADEME, 2006).

Fiche technique	**Bioremediation**		
	principe	utilisation de microorganismes, généralement des bactéries, pour réduire la pollution d'un site : identification et caractérisation biochimique des microorganismes susceptibles de réaliser la transformation des polluants présents sur le site	
	application	traitement in situ ou hors site des sols, boues,sédiments,effluents liquides	
	polluant	métaux, solvants,hydrocarbures (HAP),explosifs,produits phytosanitaires,etc	
	Techniques	Bio-dégradation	utilisation de la capacité de certains microorganismes à transformer le polluant en substrat (source de carbone, d'énergie) ; la biodégradation totale d'un composé organique s'appelle la minéralisation
		Bioimmobilisation	utilisation de la capacité de certains microorganismes (essentiellement des bactéries) à immobiliser un / plusieurs composants présents à l'état soluble
		Biolixiviation	solubilisation par les microorganismes et entraînement dans la phase aqueuse de polluants fixés ou piégés dans le sol
		Injection d'eau oxygénée	injection d'eau oxygénée (H2O2) et éventuellement de nutriments dans la zone insaturée via des galeries construites, puis récupération de l'eau dans des puits de pompage
		Bio-restauration	ajout de nutriments (azote/phosphore) pour stimuler la croissance des microorganismes indigènes et favoriser la dégradation des polluants
		Bio-augmentation	introduction dans le sol contaminé de microorganismes allochtones8 capables de traiter les polluants présents
		Bio-stimulation	ré-ensemencement de populations prélevées sur le site, dont la croissance a été stimulée en laboratoire ou dans des bioréacteurs installés sur site
	Points forts	intérêt économique : coûts de traitement réduits • intérêts techniques : ➢ traitement d'une gamme diversifiée de polluants (organiques, minéraux) ➢ possibilité de préparer des microorganismes spécialisés ➢ capacité des microorganismes à vivre dans des conditions extrêmes (pH, ➢ oxygénation, concentrations élevées de polluant, etc.) ➢ nombreux microorganismes identifiés et caractérisés • tests en laboratoire concluants	

	Point faibles	• application sur le terrain plus complexe : ➢ concentrations élevées de polluant peuvent ralentir le processus ➢ aléas du terrain : composition et propriétés du terrain ➢ conditions climatiques (les fluctuations saisonnières affectent le ➢ métabolisme des microorganismes) ➢ difficulté à trouver des sites pilotes pour valider les travaux de laboratoire
	Niveau de développement	➢ stade expérimental avancé (sites pilotes, serres, etc.) ➢ caractérisation des bactéries existantes (propriétés, conditions optimales, etc. ➢ identification de nouvelles souches bactériennes ➢ - peu d'applications à grande échelle

Techniques de phytoremédiation des sols(ADEME, 2006).

Fiche technique	**phytoremediation**		
	principe	utilisation de la capacité de certains végétaux à se développer en milieu contaminé (herbacées, plantes, arbustes, arbres) : ils peuvent bloquer, extraire, accumuler, transformer ou détruire un polluan	
	application	traitement des sols, boues, sédiments, effluents liquides voire gazeux	
	pollution	métaux, solvants,hydrocarbures(HAP),explosifs,produits phytosanitaires, etc.	
	Techniques	Phytoextraction	- extraction par la plante (rhizosphère) des polluants du sol - translocation dans la plante (racines, tiges, feuilles, fruits) - récolte des plantes et incinération / co-incinération - récupération partielle de métaux lourds (traitement mâchefers/REFIDIS9)
		Phytostabilisation	stabilisation par réduction de la mobilité et biodisponibilité des polluants -limitation du transfert vers d'autres compartiments (nappe, atmosphère) - réduction du potentiel de dispersion des polluants - aide à la restauration d'une couverture végétale
		Phytodégradation	dégradation de polluants par voie métabolique en molécules moins toxiques - intégration dans les tissus de la plante - réduction ou élimination de résidus toxiques
		Phytovolatil	- extraction du polluant du sol par le végétal

		isation	- relargage atmosphérique par évapotranspiration du polluant initial ou transformé - meilleurs résultats avec des espèces à forte évapotranspiration
		Rhizodégradation	dégradation du polluant par les racines (processus interne) et l'activité microbienne associée (processus externe), i.e. par la rhizosphère10 :-possibilité de traitements plus profonds - complémentaire aux traitements biologiques
	Points forts	- intérêt économique : 10 à 100 fois moins coûteux que les techniques classiques - intérêt technique : - extraction d'une gamme variée de polluants - plus de 800 espèces végétales concernées - intérêt environnemental : technique « passive », le soleil est le seul apport énergétique - intérêt paysager : réduction de la pollution visuelle	
	Point faibles	- durée du traitement : plusieurs années - faible profondeur d'intervention (enracinement des végétaux) : 0,5 à 1 m pour les herbacées, 2 à 4 m pour les arbres et arbustes - tributaire des conditions climatiques qui affectent la vie de la plante - technologie encore jeune aux applications industrielles peu nombreuses	
	Niveau de développement	- stade expérimental avancé (sites pilotes, serres, etc.) - travaux de recherche sur les capacités des végétaux à éliminer/neutraliser des composés divers et sur les moyens de rendre le polluant plus disponible à la plante (biodisponibilité) - peu d'applications à grande échelle, sur le long terme - absence de filière globale (incluant le traitement des plantes jusqu'au déchet ultime) - forte implication en région Nord-Pas-de-Calais - amorce d'application en Rhône-Alpes (phase de recherche) - nombreux sites contaminés sans objectifs de décontamination en Rhône-Alpes : - des brevets déposés par les sociétés nord-américaines - intérêt économique naissant	