

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 Sciences Biologiques



Mémoire de fin d'études
Master Académique

Domaine : Sciences de la Nature et de La vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par : **BELAROUSSI Ahlam**

TIDJANI Chaïma

Thème

Utilisation des biosurfactants dans la biodégradation des hydrocarbures

Pétroliers par les bactéries

telluriques hydrocarbonoclastes

Soutenu publiquement

Le: 15/09/2022

Devant le jury :

Mr. BOURICHA M'hamad	MCB Univ. Ouargla	Président
Mme. OULD EL HADJ-KHELIL Aminata	Professeur Univ. Ouargla	Promoteur
Mme. BOUDERHEM Amel	MCB Univ. Ouargla	Co-promoteur
Mme. DJERBAOUI Amina Nesrine	MCA Univ. Ouargla	Examineur

Année Universitaire : 2021 /2022

REMERCIEMENTS

*Avant tout, nous remercions DIEU le tout puissant, de nous avoir accordé la force, le courage et les moyens afin de pouvoir réaliser ce modeste travail. Nous remercions tout particulièrement notre promotrice **Mme OULD ELHADJ - KHELIL Aminata** Pour accepter de nous encadrer et ses conseils judicieux durant la réalisation de cette étude.*

*Nous tenons à remercier notre Co-promoteur **Mme BOUDERHEM Amel**. Toute notre gratitude pour tous les précieux conseils donnés, de ses orientations fructueuses et son sans cesse accompagnement durant le parcours.*

*Nous remercions **M. BELARROUSSI Arroussi** d'avoir proposé et imaginé à la réalisation de notre travail au laboratoire.*

*Nous remercions également les membres du jury Monsieur **BOURICHA M'Hamed** et **Mme DJERBAOUI Nesrine** pour avoir accepté d'examiner ce travail .*

*Nous remercions **Mme AIT SOURA Saliha** « chef département d'analyse Sonatrach DLCC » qui nous a permis de réaliser notre travail dans son établissement, ainsi que tout le personnel du laboratoire au niveau du département.*

Nous remercions aussi tout le personnel de la bibliothèque de département de sciences biologiques et Sciences agronomiques et la bibliothèque de L'université d'OUARGLA. Enfin nous tenons à remercier tous ceux qui nous ont aidés, de près ou de loin, pour l'élaboration de cette mémoire.

Dédicaces

Louange à Dieu tout puissant, qui m'a permis de voir ce jour tant attendu

Je dédie cette thèse :

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études, A mes chers frères, pour leur appui et leur encouragement.

A toute ma famille

Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour votre soutien et encouragements. Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que vous m'offrez quotidiennement et votre bonté exceptionnelle. Que Dieu le Tout Puissant vous garde et vous procure santé et bonheur.

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

A tout la promotion de Microbiologie appliquée 2021/2022.

Chaïma

Dédicaces

Je dédie ce travail, tout d'abord à qui le Dieu tout puissant a placé le Paradis sous ses pieds et l'a révééré dans son cher livre, ma chère mère, source de la lumière dans ma vie, pour son soutien qui n'a jamais cessé de m'encouragée pour que j'atteigne ce niveau.

À mon cher père qui m'a toujours soutenu et encouragé, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort. Ce travail n'aurait jamais vue le jour sans ton aide, et tes sacrifices

À mes très chers sept frères et chère trois sœurs, Qui étaient toujours à mes côtés et qui n'ont jamais cessé de me soutenir et de m'encourager : Jamais de simples mots ne me permettront de vous exprimer mes remerciements que dieu vous protège et vous donne le bonheur et la réussite dans votre vie.

À mes copines, ma source de joie et d'espoir dans ma vie, que dieu te protège.

Toute ma famille, mes professeurs, mes collègues. Je vous dédie cette humble recherche et vous souhaite bonne santé.

À tous ceux que j'aime et qui m'aiment.

Ahlam

Liste des abréviations

API : Interface de programmation d'application

BS : biosurfactant

C : carbone

DBO5 : demande biologique en oxygène

DCO : demande chimique en oxygène

EPA: environmental protection agency

GRAS: generally recognized as safe

H: hydrogène

HAP: Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.

ISO : organisation internationale de normalisation

M : minérale

N : azote

NELAC : nationale environmental laboratory accreditation standards certification

O : oxygène

P : phosphore

PH : potentiel d'hydrogène

S : souche

SA : salinité

SL : Sophorolipides

TPH : Total des hydrocarbures pétroliers

VP : Voges Proskauer.

Liste des tableaux

Tableaux	Pages
Tableau I: Principaux genres bactériens dégradants isolés à partir des sites contaminés.8
Tableau II : classes principales des biosurfactants et microorganismes18
Tableau III : Caractères physico chimique de l'échantillon de sol étudié42
Tableau IV : demande en oxygène après et avant traitement43
Tableau V : Aspect des colonies bactériennes isolées45
Tableau VI : Aspect Microscopique des souches isolées47
Tableau VII : Résultats des tests biochimiques48
Tableau VIII : Les différents genres bactériens suspectés49
Tableau IX : Les genres suspectés par l'utilisation des différents milieux de culture50
Tableau X : Résultats des tests biochimiques sur la galerie API 20 ^E51
Tableau XI : Résultats de test de déplacement d'huile54

Liste des figures

Figure	Pages
Figure 1 : Différentes techniques de phytoremédiation5
Figure 2 : Les mécanismes d'accession des microorganismes aux hydrocarbures10
Figure 3 : structure de molécule des biosurfactants11
Figure 4 : Distribution of biosurfactant producers by genus.13
Figure 5 : mono-rhamnolipides (A) et di-Rhamnolipides (B) de <i>Pseudomonas Aerogenosa</i>15
Figure 6 : la structure du Tréhalolipides15
Figure 7 : structure des sophorolipides AC=acétyle (a) et lactonique (b)17
Figure 8 : Surfactine du <i>Bacillus Subtilis</i>17
Figure 9 : localisation des bourbiers22
Figure 10 : Taux de biodégradation en fonction du temps56

Liste des photos

Photo	Pages
Photo 1 : bournier de forage22
Photo 2 : étapes de mesure par la méthode de RETORT23
Photo 3 : Lixiviat final en milieu acide (a) et lixiviat en milieu aqueux (b)24
Photo 4 : Les échantillons prélevés pour l'isolement des bactéries hydrocarbonoclastes.26
Photo 5 : Enrichissement des bactéries par culture liquide.27
Photo 6 : Isolement des bactéries par étalement sur milieu M.27
Photo 7 : Test de déplacement37
Photo 8 : Colonies repiquées dans le milieu BN38
Photo 9 : Préparation de consortiums bactériens39
Photo 10 : Procédure de Landfarming41
Photo 11 : Aspect macroscopique de la souche 2 sur différents milieux de culture.46
Photo 12 : Aspect macroscopique de la souche 4 sur différents milieux de culture.46
Photo 13 : L'aspect macroscopique de six souches.46
Photo 14 : les différents aspects microscopiques obtenus après coloration de Gram48
Photo 15 : Identification biochimique de la souche S4 par galerie Api 20 ^E52
Photo 16 : Identification biochimique de la souche S3 par galerie Api 20 ^E52
Photo 17 : Résultats du test de déplacement d'huile54
Photo 18 : échantillons du sol avant traitement (a) et après traitement (b)59

Sommaire

Remerciement	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des photos	
Résumé	
المخلص	
Abstract	

Partie I: Synthèse bibliographique

Introduction.....	1
Généralités sur les hydrocarbures pétroliers.....	3
I.1. Pollution du sol par les hydrocarbures et leur impact.....	3
I.2. Types de polluants et origine	3
I.2.1. Pollutions accidentelles.....	3
I.2.2. Pollutions chroniques.....	3
I.3. Méthodes de remédiation des sols contaminés par les hydrocarbures	4
I.3.1. Les procédés physiques.....	4
I.3.2. Les procédés thermiques	4
I.3.3. Les procédés chimiques.....	4
I.3.4. Les procédés biologiques (bioremédiation)	4
I.3.4.1. Phytoremédiation	5
I.3.4.2. Bioremédiation par microorganismes	5
I.3.4.3. Techniques de bioremédiation	6
a. La bioremédiation in-situ.....	6
a ₁ . Bioventing	6
a ₂ . Bioaugmentation	6
a ₃ . Biostimulation.....	6
b. La bioremédiation ex-situ.....	6
b ₁ Land-farming	6
b ₂ Bioréacteur	6
I.4. Biodégradation des hydrocarbures	7

I.4.1. Bactéries Hydrocarbonoclastes	7
a. Les modes d'assimilation des hydrocarbures par la cellule bactérienne	9
I.4.2. Les voies de la biodégradation des hydrocarbures	10
I.4.2.1 La biodégradation primaire	10
I.4.2.2. Le Co-métabolisme	10
I.4.2.3. La biodégradation des hydrocarbures par les biosurfactants	11
I.5. Biosurfactants	11
I.5.1. Les biosurfactants	11
I.5.2. Origine microbienne	12
I.5.2.1. Biosurfactants bactérienne	12
I.5.2.2. Biosurfactants des Champignons et levures	12
I.6. Nature et Classification.....	14
I.6.1 Les glycolipides	14
I.6.1.1 Rhamnolipides	14
I.6.1.2. Tréhalolipides	15
I.6.1.3. Sophorolipides	15
I.6.2. Lipopeptides	16
I.6.2.1 Surfactine.....	16
I.6.3. Biosurfactants d'acides gras.....	17
I.6.4. Biosurfactants polymères	17
I.6. 5. Biosurfactant particulière	17
I.7. Utilisation des biosurfactants dans la biodégradation.....	19

Partie II: Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes	21
II.1. Echantillonnage	21
II.2. Méthodes physico-chimiques.....	22
II.2.1. Caractérisation des sols.....	22
II.2.1.1. Tests physiques.....	22
a. Teneur en humidité (norme NF ISO : 1146)	22
b. Dosage des hydrocarbures totaux par la méthode de RETORT	23
II.2.1.2. Tests chimiques	23

a. Lixiviation	23
b. Lixiviation en milieu acide (Norme EPA SW846/1311 approuvé par NELAC)	24
c. Lixiviation en milieu aqueux (norme NF X31-211)	24
d. Potentiel d'hydrogène (norme ISO 10523).....	24
e. Conductivité électrique (norme NF EN 27888-1994).....	24
f. Salinité	25
g. Demande chimique en oxygène DCO (norme ISO 15705).....	25
g ₁ Analyse des chlorures	25
g ₂ Analyse de la DCO	25
g ₃ Demande biologique en oxygène DBO5 (Norme NF EN 1899-1)	25
II. 3. Analyses microbiologiques du sol	26
II.3.1. Isolement et purification des souches bactériennes hydrocarbonoclastes.....	26
II.3.1.1. Échantillonnage	26
II.3.1.2. Enrichissement et isolement	26
a. Culture liquide.....	26
b. Isolement sur milieu solide.....	27
II.3.1.3. Purification	28
a. Purification sur milieu M.....	28
b. Purification sur milieu GN	28
II.3.2. Conservation.....	28
a. Conservation à longue durée	28
II.4. Caractérisation et pré-identification des souches purifiées	28
II.4.1. Etude morphologique	29
a. Aspect macroscopique.....	29
b. Aspect microscopique	29
b ₁ . Etat frais	30
b ₂ . Coloration de Gram	30
II.4.2. Caractérisation biochimique	31
II.4.2.1. Etude de métabolisme énergétique	31
a. Test de catalase	31
b. Recherche de l'oxydase	31
II.4.2.2. Métabolisme glucidique	32
a. Étude de la voie d'attaque des glucides.....	32
b. Étude des différentes voies fermentatives intermédiaires	32

c.	Recherche de la β -galactosidase	32
d.	Utilisation des sucres.....	32
e.	Utilisation du citrate comme source de carbone	33
II.4.2.3.	Métabolisme protéique	33
a.	Recherche des décarboxylases.....	33
b.	Recherche de l'uréase.....	34
c.	Production d'indole.....	34
d.	Recherche du tryptophane désaminase (TDA)	35
e.	Recherche des protéases	35
II.4.2.4.	La galerie API 20 E	35
II.4.3.	Croissance sur différents milieux de culture	36
a.	Milieu Gélose au sang	36
b.	Milieu Chromagar	36
c.	Milieu Hektoen.....	36
II.5.	Sélection des souches productrices des biosurfactants.....	37
II.5.1.	Déplacement d'huile.....	37
II.6.	Préparation de consortium bactérien.....	38
II.6.1.	Repiquage des colonies sur milieu BN	38
II.6.2.	Préparation de consortium	38
II.7.	Traitement Biologique par Landferming.....	39
a.	Bioaugmentation	39
b.	Biostimulation.....	39
c.	Matériel et réactifs.....	39
d.	Procédure opératoire	40

Partie III: Résultats et discussion

III.	Résultats et Discussion	42
III.1.	Caractérisation du sol	42
III.1.1.	Teneur en humidité.....	42
III.1.2.	Caractères physico chimiques	42
III.1.2.1.	Demande en oxygène (Demande Biologique, Demande Chimique)	43
III. 2.	Caractères microbiologiques du sol	44

III.2.1. Souches bactériennes hydrocarbonoclastes isolées	44
III.2.2. Caractérisation et identification de souches purifiées	44
III.2.2.1. Caractéristiques morphologiques	44
a. Aspect macroscopiques	44
b. Aspect microscopique	47
III.2.2.2. Caractéristiques biochimique	48
III.2.2.3. Pré-identification des isolats.....	49
III.3. Sélection des souches productrices des biosurfactants	53
III.3.1 Déplacement d’huile	53
III.4. Traitement biologique	56
CONCLUSION.....	60
<i>Références bibliographiques</i>	63

Utilisation des biosurfactants dans la biodégradation des hydrocarbures pétroliers par les bactéries telluriques hydrocarbonoclastes

Résumé

L'objet de la présente étude est la sélection et la caractérisation des souches bactériennes hydrocarbonoclastes ainsi que l'évaluation de leur pouvoir dégradant des hydrocarbures dans les rejets pétroliers solides (Bioremédiation).

L'application du bioprocédé « Landfarming » dans la bioremédiation de l'échantillon initial contaminé par 138.33 grammes d'hydrocarbures/kg de sol, en présence des 8 souches hydrocarbonoclastes dont deux ont été pré-identifiés par galerie API 20^E : *pseudomonas aerogenosa* et *klebsiella oxytoca*. a aboutit à une forte dégradation des polluants. Les souches choisies aussi bien avec ou sans production de biosurfactant se sont avérées toutes aussi performantes. Les taux d'élimination d'hydrocarbures enregistrés après 60 jours de traitement ont atteint respectivement 99 % pour un premier échantillon bioaugmenté par des souches non productrices de biosurfactant, et biostimulé par un biosurfactant commercial et 96 % pour un deuxième échantillon biostimulé et bioaugmenté par des souches non productrices de biosurfactant, et enfin 96 % pour un troisième échantillon biostimulé et bioaugmenté par les souches productrices de biosurfactant.

Il pourrait donc contribuer d'une manière très efficace à la bioremédiation des sols contaminés par les hydrocarbures dans les zones d'exploitations pétrolières.

Mots clés : Sol, Hydrocarbures, Pollution, Biodégradation, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, Biosurfactant.

استخدام المواد الخافضة للتوتر السطحي الحيوية في التحلل البيولوجي للمحروقات البترولية بواسطة سلالات بكتيرية أصلية أرضية هيدروكربونية

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو اختيار وتوصيف سلالات بكتيرية هيدروكربونية و تقييم قدرتها على استهلاك المركبات الهيدروكربونية في المكبات النفطية الصلبة - المعالجة الحيوية. تم الكشف بواسطة التحليل البكتريولوجية للتربة الملوثة بالنفط عن وجود 8 سلالات حيث تم التعرف على اثنتين منها وتصنيفها بواسطة فهرس الملف التحليل API 20E

Pseudomonas aeruginosa, *Klebsiella oxytoca*

أدى تطبيق العملية البيولوجية (**Landfarming**) في المعالجة البيولوجية للعينة الأولية الملوثة بالهيدروكربونات كغ من النفط / غرام من العينة الملوثة 33 . 138 في وجود 8 سلالات هيدروكربونية الى استهلاك الملوثات مما أدى الى انخفاض كبير في تركيز محتوى النفط. حيث أظهرت جميع السلالات المختارة كفاءتها وفعاليتها من خلال نسب ازالة النفط المتحصل عليها بعد 60 يوم من المعالجة البيولوجية. % 99 للعينة المزودة بسلالات غير منتجة لخافض التوتر السطحي الحيوي ومزودة بخافض توتر سطحي حيوي تجاري. % 96 للعينة الثانية المحفزة والمزودة ب سلالات بكتيرية منتجة لخافض التوتر السطحي الحيوي. %96 للعينة الثالثة المحفزة و المزودة ب سلالات بكتيرية منتجة لخافض التوتر السطحي الحيوي .

لذلك فان استخدام السلالات البكتيرية الارضية الهيدروكربونية في ظل ظروف ملائمة (تهوية - رطوبة) يساهم بفعالية في

المعالجة البيولوجية للتربة الملوثة بالنفط في مناطق التنقيب عن النفط

الكلمات المفتاحية: تربة , نفط , تلوث , تحلل بيولوجي , , خافض التوتر السطحي الحيوي

pseudomonas aerogenosa, *klebsiella oxytoca*

Use of biosurfactants in the biodegradation of petroleum hydrocarbons by hydrocarbonoclast bacteria

Abstract

The purpose of this study is the selection and characterization of bacterial hydrocarbonoclastic strains and the evaluation of their hydrocarbon degrading capacity in solid petroleum discharges (bioremediation).

The application of the «Landfarming» bioprocess in the bioremediation of the initial sample contaminated by 138.33 grams of hydrocarbons/kg of soil, in the presence of the 8 hydrocarbon-like strains two of which were pre-identified by API gallery 20E: *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella oxytoca*., resulted in a strong degradation of the pollutants, which has resulted in a significant decrease in hydrocarbon content. The strains selected with or without biosurfactant production were all equally effective. The hydrocarbon removal rates recorded after 60 days of treatment were 99% for a first bioaugmented sample by no-biological producing strains, respectively, and biostimulated by a brand biosurfactant and 96 % for the second sample biostimulated and bioaugmented by no-biosurfactant producing strains, and finally 96 % for the third sample biostimulated et bioaugmented by biosurfactant producing strains.

Therefore, it could contribute in a very effective way to the bioremediation of hydrocarbon contaminated soils in areas of oil treatment facilities.

Keywords: Soil, Hydrocarbons, Pollution, Biodegradation, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, Biosurfactant

Introduction

L'augmentation de la demande mondiale en produits pétroliers a entraîné une augmentation de leur production, de leur raffinage et de leur transport, conduisant à une contamination massive de l'environnement (Uwem *et al.*, 2019).

La contamination des sols due aux activités industrielle et urbaine devient aujourd'hui un problème préoccupant. En effet, cela se traduit par des impacts négatifs sur les activités dépendantes directement ou indirectement de la terre, mais aussi sur la santé humaine et les écosystèmes (Verdin *et al.*, 2004).

Une mauvaise évacuation des boues pétrolières affecte les propriétés physico-chimiques des sols avec parfois l'accumulation de fortes concentrations de métaux lourds dans les sites affectés (Uwem *et al.*, 2019).

Ces polluants peuvent être fortement retenus dans les sols, et peuvent également migrer et atteindre les ressources en eau, pouvant entraîner la contamination de la nappe et exposer les personnes et les écosystèmes au danger. Il est par conséquent essentiel d'étudier et de prévoir leur migration dans les sols ainsi que leur éventuel transfert vers la nappe phréatique (Michel *et al.*, 2010).

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour traiter les sites contaminés par les boues huileuses, mais la méthode de bioremédiation est le moyen le plus rentable et le plus respectueux de l'environnement (Uwem *et al.*, 2019).

La capacité des surfactants à solubiliser des xénobiotiques relativement insolubles est bien connue et a été largement exploitée dans de nombreuses industries. Les tensioactifs sont introduits dans les systèmes de lavage des sols en tant qu'additifs pour contrer la faible solubilité aqueuse et pour améliorer l'efficacité de l'extraction des HAP du sol à l'eau (Lau *et al.*, 2014).

À cause de l'impact environnemental des surfactants chimiques, leurs toxicités et la difficulté de leur dégradation dans l'environnement. Cela a nécessité la découverte d'une alternative aux tensioactifs synthétiques tout aussi efficace, respectueuse de l'environnement. Ces tensioactifs dérivés des microorganismes appelés biosurfactants sont diversifiés grâce à leurs structures et fonction et attirent de plus en plus l'attention en raison de leurs biodégradabilités et leur non-toxicité (Singh *et al.*, 2018).

Le présent travail a pour but d'isoler et de caractériser des souches bactériennes hydrocarbonoclastes à partir de bourbiers de la zone de Hassi Messaoud et d'autre part, d'évaluer leur efficacité dans le traitement biologique des sols pollués par les polluants hydrocarbonés.

Le manuscrit est structuré en trois parties : la première partie présente une synthèse bibliographique, la seconde décrit le matériel et les méthodes utilisés et la troisième partie est consacrée aux résultats et discussion suivis d'une conclusion et de perspectives.

*Partie I : Synthèse
bibliographique*

***Chapitre I : Généralités sur
les hydrocarbures pétroliers***

Généralités sur les hydrocarbures pétroliers

I.1. Pollution du sol par les hydrocarbures et leur impact

La pollution peut être définie comme étant une modification défavorable de l'équilibre naturel susceptible de mettre en danger la santé de l'Homme, les ressources biologiques, la faune et la flore. Les produits pétroliers, du fait de leur utilisation massive, constituent des polluants importants des sols et des aquifères (souterraines) (Solano-Serenal *et al.*, 2001).

L'action de ces produits sur les organismes peut provoquer de graves dommages notamment lorsqu' il ya accumulation de ces hydrocarbures tout au long de la chaîne alimentaire (Solano-Serenal *et al.*, 2001).

I.2. Types de polluants et origine

Les groupes de composés pétroliers polluants possibles sont Les hydrocarbures pétroliers (fuel, gasoils, kérosène, huiles minérales) et les déchets d'exploitation du pétrole (boues et résidus d'huiles, goudrons) (Blifert et Perraud, 2004).

On distingue deux origines de ces pollutions :

I.2.1. Pollutions accidentelles

Les déversements de pétrole accidentels relatifs aux ruptures de pipeline et aux fuites de réservoir, La combinaison avec une mauvaise manipulation est les principales causes de marées noires (Liu *et al.*,2017).

I.2.2. Pollutions chroniques

Le pétrole polluer l'environnement lorsqu'il est divulgué pendant les processus de production, de transport, de stockage et de raffinement (Liu *et al.*,2017). Elle comprend plusieurs vecteurs tels que les rejets des raffineries, les industries (usines pétrochimiques), les ateliers de réparation d'automobiles, les stations d'essence, les puits de pétrole, les boues et les eaux rejetées dans le sol après extraction (Jeannot *et al.*,2001).

I.3. Méthodes de remédiation des sols contaminés par les hydrocarbures

La décontamination des sites pollués est aujourd'hui devenue une nécessité croissante. Les zones contaminées sont vouées à être requalifiées. En outre, la diversité des polluants et donc leurs propriétés physico-chimiques accentuent la difficulté de cette décontamination, plusieurs voies d'élimination des hydrocarbures polluants le sol sont étudiées (Gaudu, 2014).

Les différentes techniques de dépollution peuvent être classées :

- a. en fonction de la nature des procédés employés.
- b. en fonction du lieu de traitement.
- c. en fonction du devenir des polluants.

I.3.1. Les procédés physiques

Le principe consiste à utiliser des fluides (eau ou gaz), présents dans le sol ou injectés, comme vecteur pour transporter la pollution vers des points d'extraction ou pour l'immobiliser (Colombano *et al.*,2010).

I.3.2. Les procédés thermiques

Ils utilisent la chaleur pour détruire le polluant (ex : incinération), l'isoler (ex : désorption thermique, thermolyse, etc.), ou le rendre inerte (ex : vitrification, etc.) (Colombano *et al.*,2010).

I.3.3. Les procédés chimiques

Ils utilisent les propriétés chimiques des polluants pour à l'aide des réactions appropriées, les inerte (précipitation, etc.), les détruire (oxydation, etc.) ou les séparer du milieu pollué (surfactants, etc) (Colombano *et al.*,2010).

I.3.4. Les procédés biologiques (bioremédiation)

Le procédé de la bioremédiation consiste à activer la capacité naturelle que possèdent de nombreux organismes indigènes ou exogènes (bactéries, microalgues, champignons), qui permettent la détérioration des produits toxiques en le transformer en produit moins toxique (Abdelly, 2006).

I.3.4.1. Phytoremédiation

La phytoremédiation semble également être une approche prometteuse pour la bioremédiation des sols pollués par les HPAs. En effet, plusieurs aspects caractérisent l'intérêt des plantes pour la décontamination des sols pollués :

La phytostabilisation (les polluants seraient directement immobilisés par les végétaux ou indirectement par leur présence, en limitant la dispersion de la pollution par le vent ou par l'érosion du sol, la phytodégradation (capacités dégradatives vis-à-vis de divers polluants et la phytoextraction (mise en évidence par les propriétés hyper accumulatrices des plantes vis-à-vis des métaux lourds (Verdin *et al.*,2004). Les différentes techniques de phytoremédiation sont représentées dans la Figure 1.

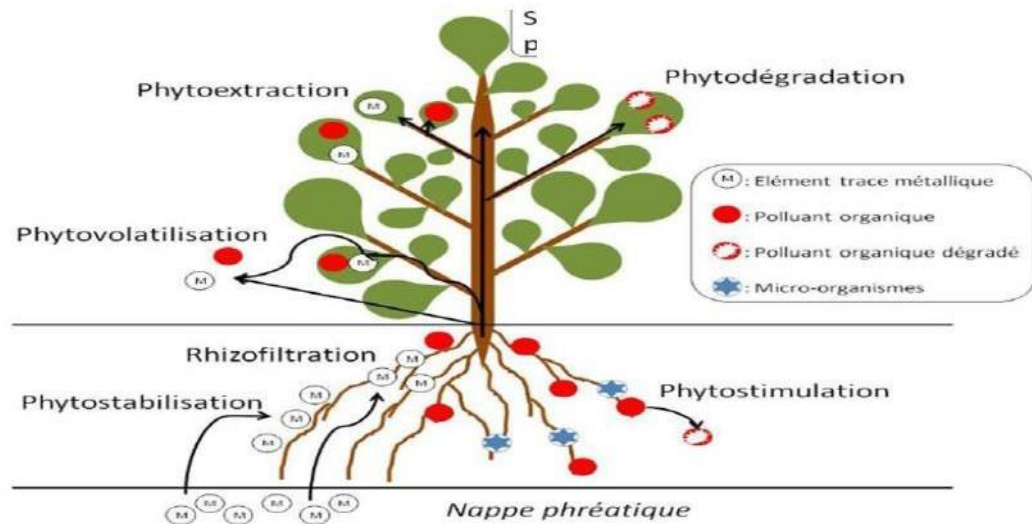


Figure 1 : Différentes techniques de phytoremédiation (Sourzat, 2016)

I.3.4.2. Bioremédiation par microorganismes

Ils consistent à utiliser des micro-organismes le plus souvent des bactéries (mais aussi des champignons et des végétaux), pour favoriser la dégradation totale ou partielle des polluants. Certains bioprocédés permettent aussi de fixer ou de solubiliser certains polluants (Colombano *et al.*,2010).

I.3.4.3. Techniques de bioremédiation

a. La bioremédiation in-situ

Il s'agit de traitement biologique directement appliqué sur le site à traité sans enlèvement du sol contaminé (Gruiz *et al.*,1995).

a₁. Bioventing

C'est une technique prometteuse pour stimuler la biodégradation in situ des polluants dans les sols en fournissant l'oxygène dont la microflore a besoin. Il s'agit d'injecter de l'air dans la zone contaminée (Lee et Swindoll, 1993).

a₂. Bioaugmentation

Est l'introduction de micro-organismes exogènes dans des environnements pour accélérer la bioremédiation. La bioaugmentation peut augmenter les taux d'élimination des polluants en augmentant la population bactérienne (Lin *et al.*, 2010).

a₃. Biostimulation

Le sol est stimulé avec un nutriment contenant principalement une source d'azote et de phosphore ou un biosurfactant connu pour améliorer la biodisponibilité du TPH sur le site, augmentant ainsi l'efficacité de la bioremédiation (Lin *et al.*, 2010).

b. La bioremédiation ex-situ

Ex situ, hors site : les sols contaminés sont excavés puis transportés d'un autre site pour effectuer le traitement (Gruiz *et al.*,1995).

b₁ Land-farming

La méthode de Landferming utilisée dans la bioremédiation des sols contaminés par les hydrocarbures constituent une technologie efficace, économique et prometteuse pour remédier les sols contaminés par les hydrocarbures (Lin *et al.* , 2010).

b₂ Bioréacteur

La bioremédiation ex situ dans des bioréacteurs est l'une des techniques efficaces pour la dégradation des contaminants organiques. Dans ce système, le sol contaminé est mis

en suspension dans une solution nutritive-eau en présence de bactéries indigènes ou exogènes et est soigneusement mélangé et aéré, Ces conditions favorisent une amélioration significative de la dégradation des contaminants et une réduction significative du temps de remédiation (Balseiro *et al.*,2019).

I.4. Biodégradation des hydrocarbures

L'utilisation de méthodes biologiques dans la dépollution des zones contaminées par les hydrocarbures se basant sur le phénomène de la biodégradation par les microorganismes appelés **hydrocarbonoclastes** a été mise en évidence dès 1946 par ZoBell. Depuis cette date le nombre d'espèces bactériennes identifiées possédant cette propriété n'a cessé d'augmenter (ZoBell, 1946).

I.4.1. Bactéries Hydrocarbonoclastes

De nombreux microorganismes peuvent détériorer les hydrocarbures pétroliers. Ils vivent dans des sols contaminés par le pétrole, ce sont principalement des organismes aérobies et responsables de la disparition de la contamination par le pétrole de l'environnement.

La contamination par le pétrole lui-même peut provoquer et accroître une activité de biodégradation spontanée dans le sol, mais après une contamination renouvelée, il faut beaucoup de temps pour qu'une concentration microbienne appropriée se développe, la croissance des bactéries du sol montre une période de latence relativement longue et la principale raison de l'application de ferments lactiques dans la biodégradation du pétrole est de raccourcir la période de latence et donc d'augmenter le taux initial de biodégradation du pétrole.

Les micro-organismes sont sélectifs ils s'attaquent généralement à des types spécifiques d'hydrocarbures plutôt qu'à tous les composants des déchets huileux.

Un mélange approprié de différentes espèces microbiennes est nécessaire, capable de former une association commensalistique qui dégradera alors tous les composants au même degré (Gruiz *et al.*,1995).

Après l'explosion de la plateforme de forage Deepwater Horizon qui causa la fuite de 5 millions de barils de pétrole brut pendant 83 jours dans le Golfe de Mexique, le calcul

de bilan en masse a révélé que plusieurs années après, 22% de pétrole répandu n'a pas été retrouvé.

Plusieurs méthodes utilisées tel que (le séquençage d'ARNr 16s, la métagénomique, le séquençage du génome de cellule unique, la mesure de de flux d'hydrocarbures-témoin marqués au ^{14}C) par la communauté scientifique indiquée que les micro-organismes présents dans les sédiments aboutissent à la dégradation d'une grande fraction de pétrole.

L'expérience du Deepwater Horizon illustre de façon criante que la décontamination naturelle des sols, des eaux ... est en grande parti un processus microbien (Willey *et al.*, 2018).

Les principaux genres bactériens dégradants isolés à partir des sites contaminés sont classé dans le Tableau I.

Tableau I: Principaux genres bactériens dégradants isolés à partir des sites contaminés.

Gram	Classes	Genres	Références
Gram(-)	Alpha – <i>Proteobacteria</i>	<i>Sphingomonas</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Agrobacterium</i>	(Haritash & Kaushik, 2009;Romineetal., 1999)
	Beta – <i>Proteobacteria</i>	<i>Alcaligenes</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Polaromonas</i>	(Daane <i>et al.</i> , 2001; Goyal &Zylstra, 1996;Jeon <i>et al.</i> , 2006;Larkin <i>et al.</i> ,1999)
	Gamma – <i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Haemophilus</i>	(Abd-Elsalam <i>et al.</i> , 2006;Haritash&Kaushik,20 09;Kimetal., 2009; Simon <i>et al.</i> ,1993)
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacterium</i>	(Abd-Elsalametal.,2006)

Gram(+)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arthrobacter; Rhodococcus, Micrococcus, Mycobacterium, Terrabacter, Gordonia</i>	Heitkampetal., 1988; Kästneretal., 1994; Khan et al., 2002; Krivoboket al., 2003; Larkin et al., 1999; Timmis et al., 2010)
	<i>Nocardioïdes</i>	<i>Nocardia</i>	(Krivoboketal., 2003; Saito et al., 1999; Zeinali et al., 2007)
	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus, Paenibacillus</i>	(Bossert & Bartha, 1986; Daane et al., 2002; Rochelle et al., 2005)

a. Les modes d'assimilation des hydrocarbures par la cellule bactérienne

Certains microorganismes utilisent les hydrocarbures en tant que source de carbone pour leur croissance. De ce fait, ils se sont adaptés en termes de résistance et d'équipement enzymatique pour utiliser ce type de substrat. Les microorganismes ont développé des stratégies pour venir au contact du substrat (ELODIE, 2008). Quatre modes d'accession, illustrés dans la figure (2) ont été avancés pour expliquer l'assimilation des hydrocarbures par les microorganismes

- **L'assimilation des hydrocarbures solubles**
- **L'accession interfaciale**
- **L'accession interfaciale facilitée (émulsification)**
- **Le transfert micellaire**

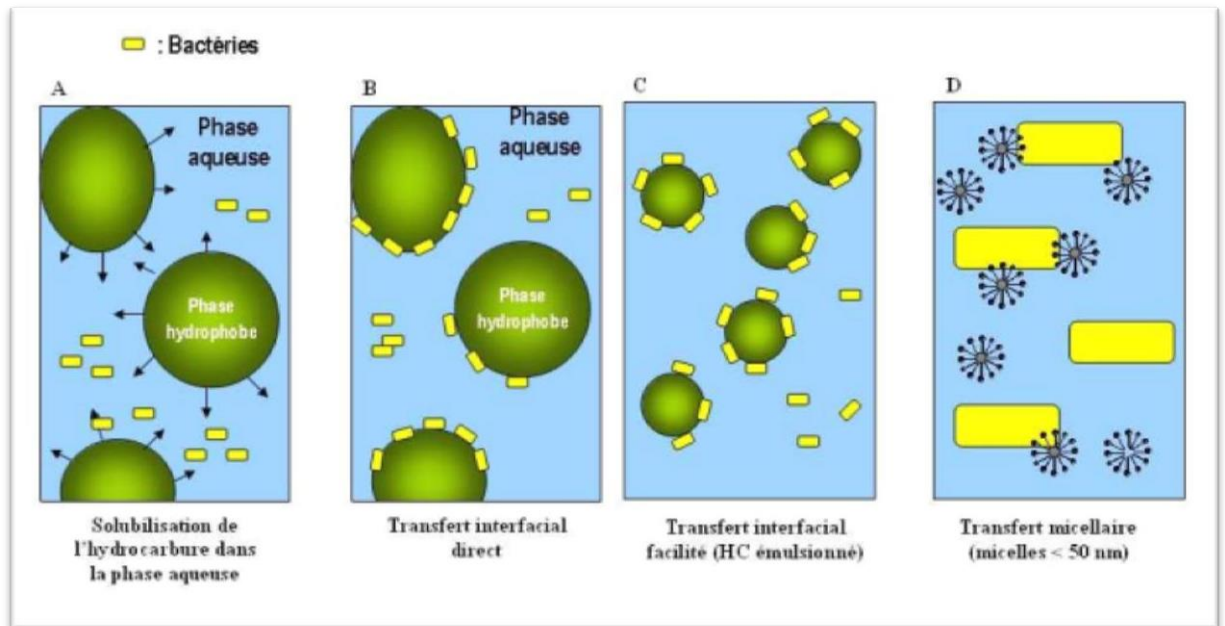


Figure 2 : Les mécanismes d'accès des microorganismes aux hydrocarbures (Vandecasteele, 2005)

I.4.2. Les voies de la biodégradation des hydrocarbures

Deux types de biodégradation sont distingués :

I.4.2.1 La biodégradation primaire

La dégradation de la molécule organique par les micro-organismes est couplée à une production d'énergie et de carbone à travers une série de réactions complexes d'oxydation. Dans ce cas les substances impliquées sont considérées comme des sources de croissances primaires.

La biodégradation des composés organiques dans l'environnement dépend de deux voies métaboliques principales : aérobie et anaérobie (Jourdain *et al.*, 2007).

I.4.2.2. Le Co-métabolisme

Consiste à l'addition de la matière organique facile à métaboliser comme le glucose, augment la biodégradation des composés récalcitrantes lorsque les communautés microbienne naturelles ne sont pas capable d'effectuer la biodégradation à la vitesse désirée à cause des facteurs physiques et nutritionnels limitants (Willey *et al.*, 2018).

I.4.2.3. La biodégradation des hydrocarbures par les biosurfactants

De nombreuses espèces bactériennes capables de dégrader le pétrole ont été découvertes ces dernières années. Certaines, comme le genre *Alcanivorax*, utilisent exclusivement les hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie (Belmenai et Benhafed, 2015).

I.5. Biosurfactants

I.5.1. Les biosurfactants

Les tensioactifs biologiques connus par le nom des biosurfactants sont des molécules hétérogènes des métabolites dérivés des amphiphiles, ça veut dire qu'ils sont constitués d'une fraction hydrophile comprennent un acide, des cations peptidiques, des anions ou des mono/di/polysaccharides et une partie hydrophobe de chaîne hydrocarbonée insaturée, saturée ou d'acides gras. (figure 3) (Das, Mukherjee, Sivapathasekaran, & Sen, 2010).

Ces structures leur confèrent un large éventail de propriétés :

- a. Capacités de s'accumuler entre les multi-phases aqueuses et abaisser la tension superficielle et interfaciale des liquides et de former des micelles et des microémulsions entre deux phases.
- b. Adhérence à la surface cellulaire ou sont excrétés extra-cellulairement dans le milieu de croissance.
- c. Alternative des tensioactifs chimiques (Banat, 1995).

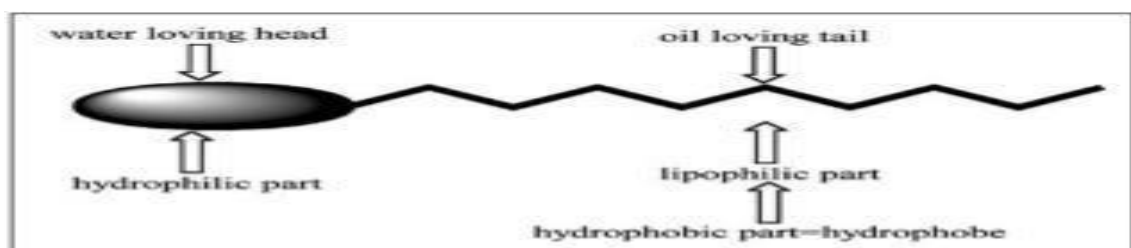


Figure 3 : structure de molécule des biosurfactants (S.K. Mehta, 2010).

I.5.2. Origine microbienne

Divers groupes de micro-organismes allant des bactéries, des levures et des champignons synthétisent des tensioactifs en utilisant divers substrats comme les résidus agricoles, les sucres, les huiles, les produits laitiers, déchets, etc.

Le type de tensioactif synthétisé varie d'un organisme à l'autre et dépend également de la matière première utilisée pour sa production ainsi que des conditions de production. Ils varient généralement par leur poids moléculaire.

Les biosurfactants de poids moléculaire élevé sont constitués de protéines, de polysaccharides, de lipopolysaccharides, tandis que les biosurfactants de faible poids moléculaire comprennent les lipopeptides, les phospholipides et les glycolipides (Rajesh Kumar, 2018).

I.5.2.1. Biosurfactants bactérienne

Les raisons de la production des biosurfactants par les espèces bactériennes ne sont pas bien connues. Il a été montré qu'ils étaient des métabolites secondaires, produits durant la phase stationnaire de la croissance bactérienne (Banat I M, 2010).

Différentes hypothèses existent quant aux raisons de leur production. Ils pourraient être produits par les bactéries pour solubiliser et rendre plus biodisponible des sources de carbone difficilement accessibles. (Hommel, 1994) (Koch A.K, 1991)

Il a été également montré que des espèces bactériennes étaient capables de produire des biosurfactants pour accéder à des sources de carbones non disponibles, puis, une fois ces sources épuisées de reconsommer les biosurfactants préalablement excrétés dans l'environnement (Hommel, 1994) (Koch A.K, 1991).

Enfin, il a été observé en présence de polluants que de nombreuses espèces étaient capables de produire des biosurfactants, mais que certaines n'étaient toutefois pas capables de dégrader les hydrocarbures présents. Il est donc possible que la production et l'émission de biosurfactant leur permettent de modifier leur environnement afin de pouvoir y survivre (Willumsen P.A, 1996)

I.5.2.2. Biosurfactants des Champignons et levures

De nombreux chercheurs ont signalé la capacité de différents champignons à produire des tensioactifs en utilisant diverses sources de nutriments. Plus tôt, il a été

documenté que *Candida* sp étaient les espèces fongiques les plus courantes utilisées pour la production de biosurfactants par rapport à d'autres champignons, comme l'application de *Candida bombicola* dans la production de sophorolipides en utilisant diverses sources de carbone provenant de sous-produits industriels.

Yarrowia lipolytica est un champignon bien connu utilisé pour la synthèse de bioémulsifiants à base de lipides, de glucides et de protéines. Ce bioémulsifiant polysaccharidique a amélioré l'hydrophobicité cellulaire tout au long des stades de développement. La recherche sur les biosurfactants à base de levure (*Candida* sp, *Pseudozyma* sp et *Yarrowia* sp) a suscité un intérêt croissant des chercheurs.

L'avantage significatif de l'utilisation de levure pour la production de biosurfactants est son statut GRAS (généralement reconnu comme sûr), qui comprend *Y. lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Kluyveromyces lactis*. Les organismes désignés GRAS ne sont pas toxiques ou pathogènes, de sorte que leurs produits peuvent être utilisés par les sociétés de produits de grande consommation et pharmaceutiques (figure 4). (Priscilla F F Amaral, 2010)

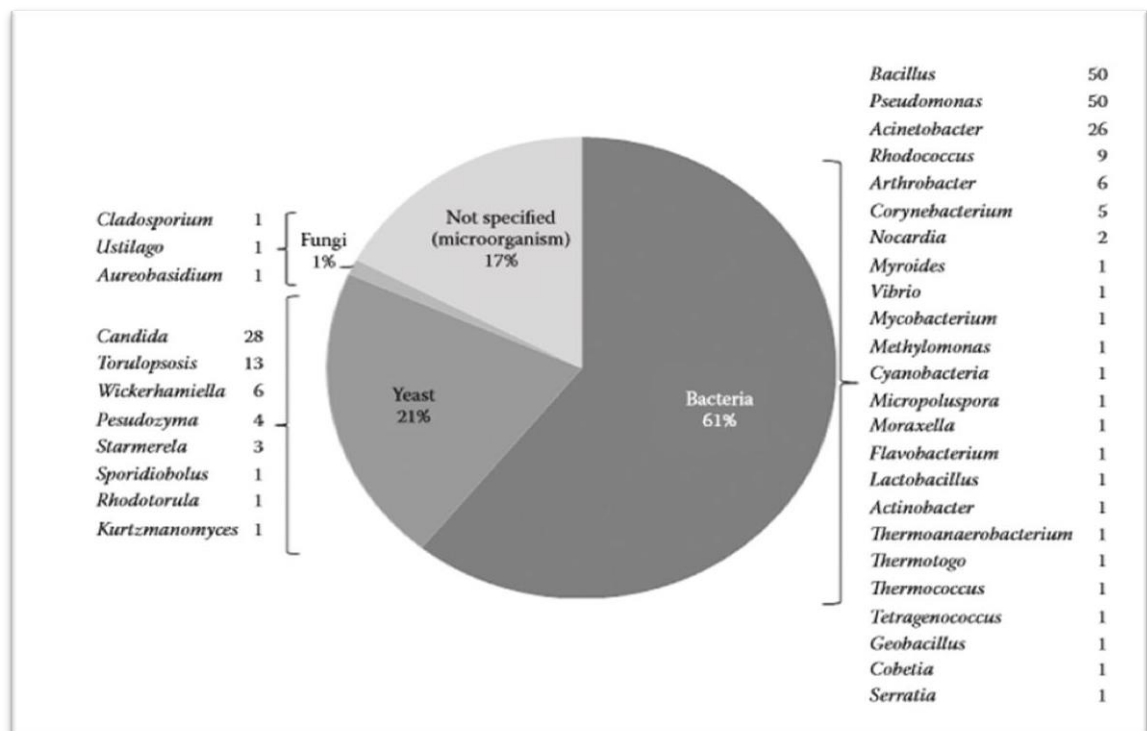


Figure 4: Distribution of biosurfactant producers by genus. (E. Esin Hames, 2015)

I.6. Nature et Classification

Contrairement aux tensioactifs synthétisés chimiquement qui sont généralement classés en fonction de la nature de leur groupe polaire, les biosurfactants sont classés principalement en fonction de leur composition chimique et les types de microbes qui les produisent. En général les principales classes des biosurfactants sont les glycolipides, les lipopeptides et les lipoprotéines, les phospholipides, les acides gras, les tensioactifs polymères et les tensioactifs particuliers (Desai J.D, 1997) .

Ces composés peuvent être grossièrement divisés en deux classes principales :

Les composés de faible poids moléculaire appelés biosurfactants, tels que les lipopeptides, les glycolipides, les protéines et les polymères de haut poids moléculaire de polysaccharides, les protéines de lipopolysaccharides ou les lipoprotéines qui sont collectivement appelés bioémulsants ou les bioémulsifiants (Banat I M, 2010) .

Le premier groupe comprend des molécules qui peuvent réduire efficacement la tension superficielle et interfaciale, tandis que les seconds sont des polymères amphiphiles et polyphiles qui sont généralement plus efficaces pour stabiliser les émulsions d'huile dans l'eau, mais qui n'abaissent pas autant la tension (Banat I M, 2010).

I.6.1 Les glycolipides

Sont les tensioactifs microbiens les mieux étudiés et ils comprennent une section de glucides hydrophiles et une chaîne d'acides gras hydrophobes. Le sucre à l'extrémité hydrophile est le sophorose dans les sophorolipides, le rhamnose dans les rhamnolipides et le mannose et l'érythritol dans MELS. Il existe quelques autres biosurfactants glycolipides, par exemple les lipides de tréhalose et les lipides de cellobiose, mais ils ont jusqu'à présent suscité moins d'intérêt (K, Mukherjee, & Das, 2010) .

I.6.1.1 Rhamnolipides

Certaines espèces de pseudomonas sont caractérisées pour produire de grandes quantités de biosurfactant glycolipide contenant de composés d'une ou deux molécules de L-rhamnose couplées à un mono ou dimère d'acides gras β -hydroxy. Alors que le groupe OH de l'un des acides est impliqué dans la liaison glycosidique avec l'extrémité réductrice du disaccharide rhamnose, le groupe OH du deuxième acide est impliqué dans la formation

d'ester. Comme l'un des acides carboxyliques est libre, les rhamnolipides abaissent la tension superficielle, émulsionnent et stimulent la croissance des pseudomonas (figure 5). (Edwards JR, 1965)

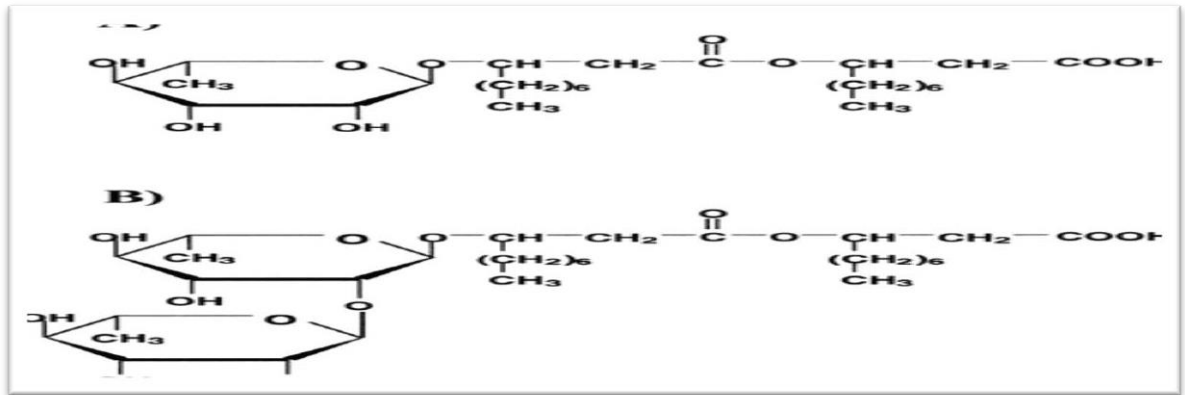


Figure 5 : mono-rhamnolipides (A) et di-Rhamnolipides (B) de *Pseudomonas Aerogenosa* (Marchant, 2010)

I.6.1.2. Tréhalolipides

Contiennent des lipides tréhaloses sous forme de fraction hydrophile produits par un certain nombre de micro-organismes différents par la taille et la structure de l'acide mycolique, le nombre d'atomes de carbone et le degré d'insaturation, tels que *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Corynebacterium*. Le disaccharide tréhalose lié à C-6 et C-6' à

l'acide mycolique est associé à la plupart des espèces. Les acides mycoliques sont des acides gras β -hydroxy à longue chaîne ramifiés (figure 6). (K, Mukherjee, & Das, 2010)

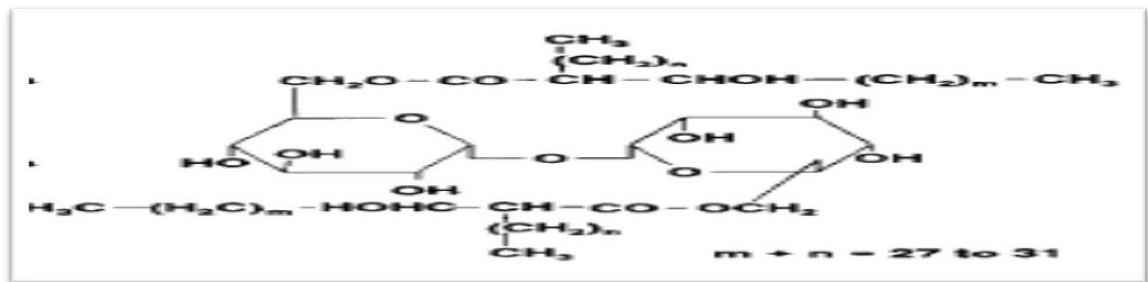


Figure 6 : la structure du Tréhalolipides (Marchant, 2010)

I.6.1.3. Sophorolipides

Il s'agit d'un groupe de biosurfactants produits par *Torulopsis sp* dans lesquels le sophorose glucidique dimérique est lié à un acide gras hydroxyle à longue chaîne par liaison

glycosidique b. Il existe deux types de SL, à savoir les SL acides (non lactoniques) et les SL lactoniques. La fraction acide gras hydroxyle des SL acides a un groupe fonctionnel acide carboxylique libre tandis que celle des SL lactoniques forme un cycle lactone macrocyclique avec le groupe hydroxyle 4 du sophorose (figure 7). (André Felipe da Silva, 2021) .

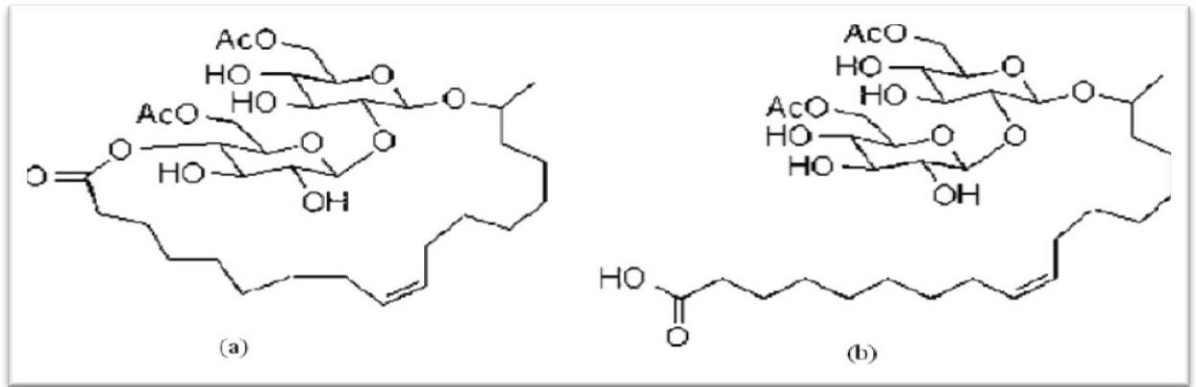


Figure 7 : structure des sophorolipides AC=acétyle (a) et lactonique (b). (Ammar AL-Jasim, 2016)

I.6.2. Lipopeptides

Sont des biosurfactants de faible poids moléculaire constitués d'un lipide attaché à une chaîne polypeptidique produits par *Bacillus SP* et d'autres bactéries contenant 7 acides

aminés liés à un groupe carboxyle d'un acide 14 carbone. La surfactine comme tout autre biosurfactant réduit la tension superficielle. Les lipopeptides anioniques cycliques sont produits par un certain nombre d'espèces de bacilles sous forme de molécules antibiotiques (Hamley, 2015) .

I.6.2.1 Surfactine

Le composé le plus important est la surfactine produite par *Bacillus Subtilis* en raison de son activité très élevée à abaisser la tension superficielle (figure 8). (Hamley, 2015) .

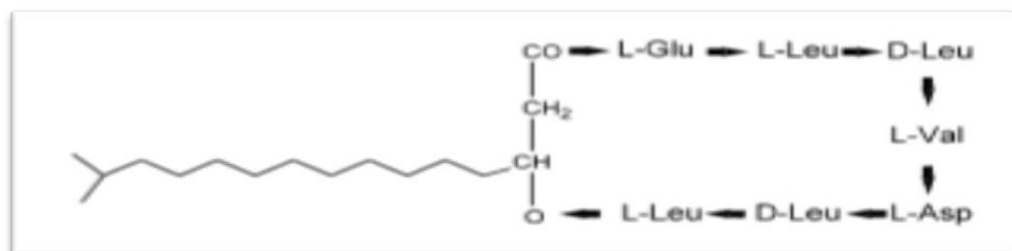


Figure 8 : Surfactine du *Bacillus Subtilis* (Lang, 2002)

I.6.3. Biosurfactants d'acides gras

Sont des acides gras saturés dans la gamme C12 à C14 et des acides gras complexes contenant des groupes hydroxyles et des branches alkyles. Certains microbes dégradent les hydrocarbures produisant des acides gras libres extracellulaires pendant la croissance sur les n-alcanes. Les acides gras produits à partir d'alcanes par oxydation microbiennes ont reçu une grande attention en tant que tensioactifs.

L'équilibre entre l'hydrophile et le lipophile présentent une bonne activité tensioactive directement liée à la longueur de la chaîne hydrocarbonée dans leurs structures (Ibrahim M. Banat, 2018).

I.6.4. Biosurfactants polymères

Sont des biopolymères de haut poids moléculaire, qui présentent des propriétés telles qu'une viscosité élevée, une résistance à la traction et une résistance au cisaillement. Les différentes classes de biosurfactants polymères sont Emulsan, Liposan, Alasan, Lipoman et autres complexes polysaccharide-protéine connus pour être les biosurfactants polymères étudiés. (S.K. Mehta, 2010)

I.6. 5. Biosurfactant particulière

Quelques exemples de biosurfactant particulière sont les vésicules des membranes extracellulaires des cellules microbiennes, aussi aident à l'émulsification des hydrocarbures. Une accumulation de vésicules de membrane extracellulaire ayant un diamètre de 20 à 50 nm et une densité bouyante de 1,158 g/cm³ a été rapporté dans les cellules *Acinetobacter* SP. HO1-N.62 les vésicules purifiées sont composées de protéines, de phospholipides et de lipopolysaccharides.

Les vésicules de la membrane extracellulaire séparent les hydrocarbures pour former une microémulsion, qui joue un rôle important dans l'absorption des alcanes par les cellules microbiennes. Les vésicules de la souche HO1-N de l'espèce *Acinetobacter* d'un diamètre de 20 à 50 nm et d'une densité flottante de 1,158g/cm³ sont composées de protéines, de phospholipides et de lipopolysaccharides. En outre, les cellules microbiennes avec des hydrophobicités de surface cellulaire élevées sont la plupart des microorganismes dégradent les hydrocarbures, de nombreux dégradateurs hydrocarbonés, certaines espèces de cyanobactéries et certains agents pathogènes ont une forte affinité pour les interfaces

hydrocarbures-eau et air-eau. Dans de tels cas, la cellule microbienne elle-même est un tensioactif. (Mnif, 2015)

Le tableau II ci-dessous présente les principales classes des biosurfactants et microorganismes

Tableau II : classes principales des biosurfactants et microorganismes (Rajesh Kumar, 2018)

Classe de biosurfactant	Type	Micro-organisme	Référence(s)
Glycolipides	• Rhamnolipides	• <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	• Guerra-Santos L. et coll., 1984, Robert M. et coll., 1989
	• Sophorolipides	• <i>Torulopsis bombicola</i> , • <i>T. apicola</i>	• Cooper D.G. et coll., 1989, Gobbert U. et coll.1984 • Hommel R. et coll., 1987, Tulloch P. et coll., 1967 • Rapp P. et coll., 1979
	• Tréhalolipides	• <i>Rhodococcus erythropolis</i> • <i>Mycobacterium sp.</i>	• Cooper D.G. et coll., 1989
Lipopeptides et lipoprotéines	• Peptide-lipide	• <i>Bacillus licheniformis</i>	• Javaheri, M. et coll., 1985, Yakimov, M. et coll., 1996 • Neu, T. et coll., 1990
	• Viscosine	• <i>Pseudomonas fluorescens</i>	• Matsuyama, T. et coll.1991
	• Serrawettin	• <i>Serratia marcescens</i>	• Arima, K. et coll., 1968, Bernheimer, A. W. et coll., 1970
	• Surfactine	• <i>Bacillus subtilis</i>	• Bernheimer, A. W. et coll., 1970 • Marahiel, M. et coll., 1977 • Suzuki, T. et coll., 1965
	• Subtilisine	• <i>Bacillus subtilis</i>	
	• Gramicidine • Polymyxine	• <i>Bacillus brevis</i> • <i>Bacille polymyxie</i>	
Acides gras, lipides neutres et phospholipides	• Acides gras	• <i>Candida lepus</i>	• Cooper D.G. et coll., 1989, Cooper D.G. et coll., 1978
	• Lipides neutres	• <i>Nocardia erythropolis</i>	• MacDonald, C. R. et coll., 1981 • Beeba, J. L. et coll., 1971
	• Phospholipides	• <i>Thiobacillus thiooxidans</i>	
Tensioactifs	• Émulsan	• <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	• Rosenberg, E. et coll., 1979, Zosim, Z., 1982

polymères	<ul style="list-style-type: none"> 1. Biodispersan 2. Liposan • Carbohydate-lipides-protéines • Mannan-lipide-protéine 	<ul style="list-style-type: none"> • Acinetobacter calcoaceticus • Candida lipolytica • Pseudomonas fluorescens • Candida tropicalis 	<ul style="list-style-type: none"> • Rosenberg, E. et coll., 1988 • Cirigliano, M.C. et coll., 1984, 1985 • Desai, A. J. et coll., 1988, Persson, A. et coll., 1988 • Kappeli, O. et coll., 1984
Tensioactif particulaire	<ul style="list-style-type: none"> • Vésicules 	<ul style="list-style-type: none"> • Acinetobacter calcoaceticus 	<ul style="list-style-type: none"> • Gutnick, D. L. et coll., 1987, Kappeli, O. et coll., 1979

I.7. Utilisation des biosurfactants dans la biodégradation

L'élimination de produits industriels toxiques dans les sols et les milieux aquatiques est devenue une tâche peu rassurante et nécessaire. Des composés tels que le perchloréthylène (PCE), le trichloréthylène (TCE) et les biphényles polychlorés (PCB) sont des contaminants communs. « Ils s'absorbent la matière organique de l'environnement, ce qui rend difficile ou inefficace la décontamination par les moyens traditionnels. L'utilisation des microorganismes pour transformer ces polluants en produits de dégradation non toxique s'appelle la bioremédiation » (Willey *et al.*, 2018).

L'utilisation la plus importante de biosurfactants a été étudiée en biorestauration, par exemple pour éliminer les métaux lourds et les hydrocarbures des sites contaminés. Les biosurfactants peuvent améliorer la bioremédiation aux hydrocarbures grâce à deux mécanismes.

Tout d'abord, en accroissant la biodisponibilité du substrat aux microorganismes, alors que l'autre implique une interaction avec la surface cellulaire qui augmente l'hydrophobie de la surface permettant à des substrats hydrophobes de s'associer plus facilement avec des cellules bactériennes (Sekhar *et al.*, 2015).

(Kang *et al.*, 2010) ont étudié la capacité dégradante des tensioactifs microbiens, testé le sophorolipide dans la biodégradation des hydrocarbures et du pétrole brut léger iranien à l'échelle de laboratoire.

L'addition de ce surfactant bio-sourcé montre une efficacité, un taux de dégradation plus élevé que les surfactants chimiques. Leurs résultats ont indiqué que le sophorolipide peut avoir le potentiel de faciliter la bioremédiation des sites contaminés par des hydrocarbures ayant une solubilité limitée dans l'eau et d'augmenter la biodisponibilité des consortiums microbiens pour la biodégradation. (Kang *et al.*.,2010)

*Partie II : Matériel et
méthode*

II. Matériel et méthodes

Le travail entrepris vise à étudier et à essayer de traiter un des écosystèmes les plus complexes à travers des analyses microbiologiques et physico-chimiques afin d'isoler des souches bactériennes à partir desquelles deux consortiums sont préparés (des bactéries productrices de biosurfactants et des bactéries non productrices de biosurfactants). Une concentration de biosurfactant est utilisée dans un traitement Landfarming des sols contaminés après la caractérisation des conditions physico-chimiques de ces derniers. Le suivi du traitement est évalué en fonction du taux de biodégradation du polluant.

❖ Lieu et durée de l'étude :

Ce travail a été partiellement réalisé au niveau de Sonatrach précisément dans la direction laboratoire et cartothèque central (DLCC) dans le laboratoire d'environnement, Ce laboratoire offre ses services pour différentes entreprises, et il a pour mission Analyses chimique, bactériologique et toxicologique des Eaux de rejet. Pour déterminer les paramètres qui sont regroupés en liste d'analyses bactériologiques et physico- chimiques lesquelles sont régulièrement pratiquées dans ce laboratoire. Cette étude a été effectuée durant la période du 03 avril 2022 au 04 juin 2022.

II.1. Echantillonnage

Le prélèvement est effectué au niveau d'un bourbier de stockage des solides contaminés par les hydrocarbures pétroliers (Sludges) situé dans le champ pétrolier de Bir de Berkine-BBK, éloigné de 416 km au sud-est de Hassi Messaoud 30 kg de sol pollué le 1er Avril 2022) (Figure 9) , (photo 1).



Figure 9 : localisation des borbier .



Photo 1: borbier de forage

II.2. Méthodes physico-chimiques

II.2.1. Caractérisation des sols

II.2.1.1. Tests physiques

a. Teneur en humidité (norme NF ISO : 1146)

L'approche thermogravimétrique est une méthode de référence pour la mesure d'humidité en séchant l'échantillon à température constante, la teneur est donc déterminée en pesant le poids initial et le poids final du solide.

Le séchage se fait dans une étuve et l'échantillon est placé dans un dessiccateur jusqu'à refroidissement à température ambiante.

a. Dosage des hydrocarbures totaux par la méthode de RETORT

La norme API 13B-2 fournit une méthode de mesure pour déterminer les pourcentages d'eau, d'huile et de solide.

La méthode est basée sur le principe de distillation d'un échantillon solide au moyen d'un Appareil appelé RETORT équipé d'un système d'échauffement électrique et thermostatique pour s'éteindre automatiquement lorsqu'une température prédéterminée (498°C) spécifiée par l'API est atteinte (photo2).



Photo 2 : étapes de mesure par la méthode de RETORT

II.2.1.2. Tests chimiques

a. Lixiviation

Dans le but de caractériser le sol pollué, des analyses physico-chimiques sont effectuées. Pour réaliser ces analyses, on doit d'abord procéder à une lixiviation par solvants d'extraction pour transférer les matières organiques et inorganiques contenue dans le solide vers un milieu liquide.

Deux types de lixiviation sont réalisés :

Lixiviation en milieu acide : Lixiviation de l'échantillon brut par une eau acidifiée à l'aide de l'acide acétique

Lixiviation en milieu aqueux : Lixiviation des échantillons traités à l'aide de l'eau

distillée stérile.

b. Lixiviation en milieu acide (Norme EPA SW846/1311 approuvé par NELAC)

Pour le fluide d'extraction, des solutions de 1 litre sont préparées en ajoutant à l'eau distillée 5,7 ml d'acide acétique glacial et 64,3 ml de NaOH 1N à $\text{pH} = 4,93 \pm 0,05$.

Après la préparation de la solution de lixiviation, le lixiviat est réparti en 8 flacons en mettant dans chacun d'eux 6,25 g de sol dans 125 ml de solution de lixiviation.

Les flacons sont ensuite maintenus dans une étuve rotative (RollingOven) pendant 18 heures à température ambiante. La suspension est ensuite filtrée sur un papier filtre 0.45 microns. Le filtrat obtenu sera utilisé pour les analyses.

c. Lixiviation en milieu aqueux (norme NF X31-211)

Cette lixiviation est réalisée en mélangeant 25,5g de solide dans 1l d'eau distillée pendant 18 heures dans une étuve rotative (Rolling Oven). (photo 3)



Photo 3: Lixiviat final en milieu acide (a) et lixiviat en milieu aqueux (b)

d. Potentiel d'hydrogène (norme ISO 10523)

La détermination de la valeur du pH est basée sur le mesurage de la différence de potentiel d'une cellule électrochimique.

e. Conductivité électrique (norme NF EN 27888-1994)

La conductivité d'une solution est une mesure de la capacité des ions à transporter le courant électrique. Ce passage du courant électrique s'effectue par la migration des ions dans un champ électrique produit par un courant alternatif.

f. Salinité

La salinité absolue SA d'une eau correspond au rapport de la masse de sel en solution à la masse de la solution (en g/kg). En pratique, cette grandeur n'est pas directement mesurable. C'est pourquoi on utilise la salinité pratique selon IOT. Celle-ci se détermine par la mesure de la conductivité électrique.

g. Demande chimique en oxygène DCO (norme ISO 15705)**g₁ Analyse des chlorures**

Les ions chlorures réagissent avec le thiocyanate de mercure pour donner le chlorure de mercure peu dissocié. Le thiocyanate ainsi libéré forme avec les ions fer le rouge thiocyanate de fer. La concentration en chlorures est déterminée semi-quantitativement par comparaison visuelle de la couleur de la solution à mesurer avec les zones colorées d'une carte colorimétrique.

g₂ Analyse de la DCO

La matière oxydable contenue dans un échantillon est oxydée par chauffage à reflux en milieu fortement acide avec une quantité connue de bichromate de potassium dans une éprouvette fermée.

La matière oxydable dans l'échantillon qui réagit avec le bichromate de potassium provoque un changement de couleur dont l'absorbance est proportionnelle à la quantité de bichromate de potassium réduit et se mesure en équivalent d'oxygène.

g₃ Demande biologique en oxygène DBO₅ (Norme NF EN 1899-1)

La DBO₅ est la mesure de la consommation d'oxygène d'un effluent après cinq jours d'incubation à 20°C. la consommation d'oxygène de l'échantillon provient de la dégradation des molécules organiques et de l'oxydation des molécules inorganiques comme les sulfures, les ions ferreux et les différentes formes de composés azotés.

La méthode consiste à déterminer la quantité d'oxygène consommée par la matière oxydable à l'aide de bactéries acclimatées pendant une période de 5 jours d'incubation à une température de 20°C. Une eau dont le rapport DCO/DBO₅ est supérieur à 0,3 est considérée comme biodégradable.

II. 3. Analyses microbiologiques du sol

II.3.1. Isolement et purification des souches bactériennes hydrocarbonoclastes

II.3.1.1. Échantillonnage

L'échantillonnage est réalisé de manière aléatoire après homogénéisation de la zone de prélèvement, à l'aide d'une spatule stérile en acier inoxydable à une profondeur comprise entre 15 et 30 cm, 4 échantillons dont 3 bourbiers et un bac de stockage. Les échantillons prélevés sont stockés aseptiquement dans des flacons stériles étiquetés puis conservés à 4°C avant d'être emballés et acheminés directement au laboratoire (photo 4).



1, 2,3 : bourbiers.

4 : bac de stockage.

Photo 4 : Les échantillons prélevés pour l'isolement des bactéries hydrocarbonoclastes.

II.3.1.2. Enrichissement et isolement

a. Culture liquide

Les cultures d'enrichissement sont utilisées pour favoriser la croissance des bactéries dégradant le pétrole selon la méthode d'enrichissement de (Bilen Ozyurek *et al.*, 2017). Nous avons effectué ces cultures pour chaque échantillon tout seul (4 échantillons dont 3 bourbiers et un bac de stockage).

Dans un Erlenmeyer stérile, 5g d'échantillon sont mélangés à 50 ml de milieu liquide M et 0.5 ml de pétrole brut. Les cultures sont ensuite incubées à 30°C sous agitation à 150 tr/min pendant 3 jours (Bilen Ozyurek *et al.*, 2017) (photo5).



Photo 5 : Enrichissement des bactéries par culture liquide.

b. Isolement sur milieu solide

Dans cette étape, l'isolement de ces cultures enrichies est effectué par étalement sur boîtes de pétri, chacune contenant 20 ml de milieu M solide plus 60µl de pétrole brut. L'incubation se fait à 30°C pendant 5 jours. (Photo 6).



Photo 6: Isolement des bactéries par étalement sur milieu M.

II.3.1.3. Purification

a. Purification sur milieu M

Les colonies sont sélectionnées, prélevés à partir de milieu d'isolement et purifiées par repiquages successifs par la méthode des stries sur le milieu M solide contenant 60 µl de pétrole, l'incubation se fait à 30°C pendant 5 jours (Martinneau, 1996).

b. Purification sur milieu GN

Les colonies obtenues après la purification sur milieu M sont sélectionnées, purifiées sur milieu GN pour obtenir une culture pure d'une seule souche et la caractériser (Willey *et al.*, 2018). A l'aide d'une anse de platine stérile, un échantillon de chaque type de colonie est prélevé et ensuite purifié par repiquages successifs selon la méthode de stries sur le milieu M solide contenant 60µl de pétrole ensuite incubées à 30°C pendant 24 h (Martinneau, 1996).

II.3.2. Conservation

a. Conservation à longue durée

Les bactéries sont ensemencées dans 1 ml de bouillon nutritif stérile dès la croissance à 30°C, puis additionné de 20% de glycérol, vortexer pendant 2 minutes et conserver dans des tubes Eppendorf stériles à -20°C pour une longue durée (Stanley *et al.*, 2000 ; Obayori *et al.*, 2009).

II.4. Caractérisation et pré-identification des souches purifiées

Concernant la sélection et la classification des souches ; elles sont basées principalement sur une série de caractères phénotypiques résumés ci-dessous

- Morphologies cellulaires et coloniales (forme, mobilité, coloration de Gram,...).
- Biochimiques, incluant des activités enzymatiques et l'usage de divers composés (dégradation, croissance) (Rossello et Amann, 2001).

Dans ce cas sélectif, des systèmes commerciaux de batteries de tests sont utilisés (API 20 E).

II.4.1. Etude morphologique

a. Aspect macroscopique

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies visible à l'œil nu (forme, taille, couleur, ...) permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification (Singleton, 1999). La description des colonies doit mentionner :

- **La forme** : Ronde, Irrégulière, Filamenteuse, Fusiforme, Ponctiforme, Rhizoïde
- **L'élévation** : Convexe, Bombée, Plat, Bossue, Elevée,
- **Le bord** : Régulier, Ondulé, Filamenteux, Lobé, Dentelé, Bouclé
- **La taille** : Par la mesure de diamètre
- **La surface** : Lisse, Rugueuses
- **La couleur** : Couleur de la colonie
- **L'opacité** : Opaque, Translucide, Transparentes
- **La consistance** : Sèches, crémeuses, muqueuses

b. Aspect microscopique

Etudier la morphologie microbienne, au microscope photonique, c'est rechercher la forme des bactéries et leur mode de regroupement.

b₁. Etat frais

Une préparation à l'état frais permet d'examiner la mobilité des bactéries. Pour observer la mobilité, une petite goutte d'eau stérile déposée sur une lame, puis une colonie sur gélose est prélevée et incorporée progressivement dans la goutte d'eau, la lame est recouverte après par une lamelle en évitant d'enfermer des bulles d'air, ensuite l'observation est effectuée à l'objectif 40 (Delarras, 2014).

b₂. Coloration de Gram

La coloration de Gram, développée en 1884 par le médecin danois Christian Gram, est la méthode de coloration la plus largement utilisée en bactériologie. Ce procédé de coloration divise les bactéries en deux classes : Gram- négative (Gram-), et Gram- positive (Gram+) (Henry et Stacey, 1943).

- **Mode opératoire**

- Réaliser un frottis et le fixer à la flamme.
- Verser le Violet de Gentiane sur la lame ; laisser en contact 1 minute.
- Jeter le colorant et finir de le chasser par la solution de Lugol ; laisser agir le Lugol environ 1 min.
- Jeter le Lugol et faire couler de l'alcool sur la préparation ; rincer immédiatement à l'eau.
- Recouvrir la préparation de Safranine, laisser agir environ 1 min. Laver abondamment.
- Sécher au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen.

- **Observation microscopique**

Observer à l'objectif x 100, en immersion.

- **Lecture**

- Les bactéries colorées en violet foncé ; elles ont gardé le violet, 'le Gram' elles sont dites « Gram positif ».
- Les bactéries colorées en rose ou rouge pâle ; elles ont perdu le violet, 'le Gram' elles sont dites «Gram négatif».

II.4.2. Caractérisation biochimique

II.4.2.1. Etude de métabolisme énergétique

a. Test de catalase

L'enzyme catalase sert à la détoxification de l'eau oxygénée produite au cours de certaines réactions métaboliques, présente chez beaucoup de bactéries aérobies ou aéro-anaérobies et souvent absentes chez les bactéries anaérobies.

Une colonie bactérienne est déposée sur une lame propre contenant une goutte d'eau oxygénée, la lecture se fait immédiatement, et à l'œil nue. Si des bulles se forment, la bactérie possède la catalase, si rien n'est observable, la bactérie ne possède pas l'enzyme (Cappuccino et Welsh, 2017).

b. Recherche de l'oxydase

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

II.4.2.2. Métabolisme glucidique

a. Étude de la voie d'attaque des glucides

L'étude de la voie d'attaque des glucides permet de distinguer les bactéries à métabolisme oxydatif ou fermentatif ou les deux à la fois (Tortora *et al.*, 2003).

b. Étude des différentes voies fermentatives intermédiaires

L'étude des différentes voies fermentatives intermédiaires permet d'effectuer une différenciation entre la fermentation des acides mixtes (réaction rouge de méthyle : RM) et butylène glycolique (réaction Voges Proskauer, VP) (Singleton, 1999).

c. Recherche de la β -galactosidase

L'orthonitrophényl- β -D- galactopyranoside (ONPG) est un analogue structural du lactose.

Ce substrat synthétique incolore peut être scindé en galactose et en orthophénol (composé soluble jaune) en présence d'une des enzymes appelées ONPG hydrolases.

En effet, ces enzymes correspondent :

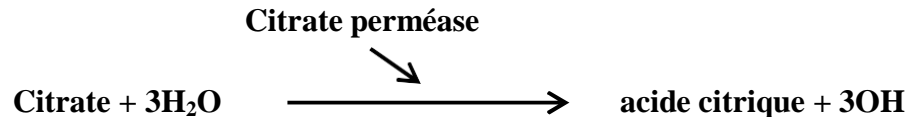
- Soit à la β galactosidase, ONPG-hydrolase qui catalyse la réaction de l'hydrolyse de l'ONPG.
- Soit à d'autres enzymes bactériennes ONPG hydrolases, mais pas le lactose, elles sont différentes de la β galactosidase (Delarras, 2007).

d. Utilisation des sucres

La voie d'utilisation des sucres permet de mettre en évidence d'une part, la fermentation du glucose (avec ou sans dégagement de gaz), du lactose, du saccharose et d'autre part, la production d'hydrogène de sulfate (H₂S) (Marchal et Bourdon, 1982).

e. Utilisation du citrate comme source de carbone

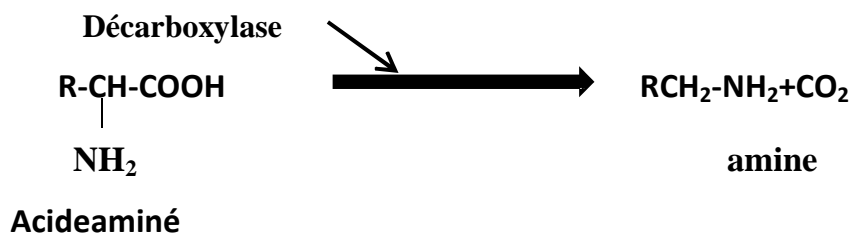
Le milieu utilisé ne contient que le citrate ($C_6H_5O_7$) comme seule source de carbone. Seules les bactéries possédant une citrate perméase seront donc capables de se développer sur ce milieu en provoquant la libération des OH qui alcalinisent le milieu, entraînent un virage au bleu (Singleton, 1999).



II.4.2.3. Métabolisme protéique

a. Recherche des décarboxylases

Les décarboxylases, scindent les acides aminés entraînant la formation de l'amine correspondante avec la libération de CO_2 suivant la réaction:



Il s'agit d'enzymes induites, dont la synthèse est favorisée par un pH acide (pH = 3,5-5,5) et des conditions d'anaérobiose (Joffin et Leyral, 2006).

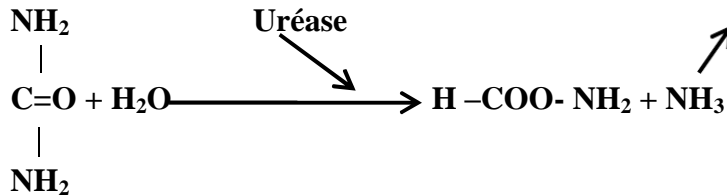
La lysine décarboxylase ou LDC : Lysine \longrightarrow Cadavérine + CO_2

L'ornithine décarboxylase ou ODC : Ornithine \longrightarrow Putricine + CO_2

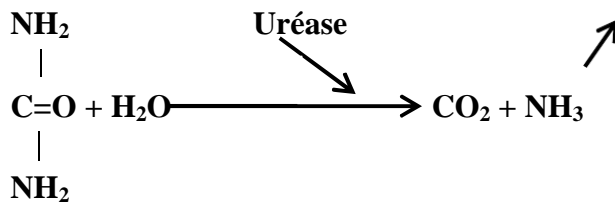
L'arginine dihydrolase ou ADH : Arginine \longrightarrow Agmatine + CO_2

b. Recherche de l'uréase

Selon Singleton (1999), toutes les bactéries hydrolysent l'urée grâce à la réaction suivante:



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



Le CO_2 et le NH_3 en présence d'eau se combinent en donnant le carbonate d'ammonium selon la réaction:



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

c. Production d'indole

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

d. Recherche du tryptophane désaminase (TDA)

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



e. Recherche des protéases

En pratique, une seule protéase est recherchée ; la gélatinase. Certaines bactéries possédant cette enzyme qui hydrolyse le collagène en acides aminés ou en peptides (Joffin et Lyeral, 2006).

II.4.2.4. La galerie API 20 E

L'utilisation de la galerie API® 20 E (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) permet la mise en évidence de quelques tests biochimiques tels que la β -galactosidase (ONPG), l'Ornithine décarboxylase (ODC), de la lysine décarboxylase (LDC) et de l'arginine dihydrolase (ADH), production d'H₂S, utilisation du citrate, production d'indole et réaction de Voges-Proskauer, liquéfaction de la gélatine et la dégradation des sucres.

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes de la galerie API® 20 E sont inoculés avec une suspension bactérienne, incubées à une température de 30°C pendant 24 heures. Les réactions positives des tests effectués sont traduites par les virages de couleur spontanés ou par l'addition des réactifs. Une lecture est effectuée à l'aide du tableau (annexe) (Emanuel et Lorrence, 2009).

II.4.3. Croissance sur différents milieux de culture

a. Milieu Gélose au sang

La gélose au sang est un milieu à la fois différentiel et enrichi. Permet la croissance de nombreuses bactéries exigeantes, qui peuvent être différenciées par la production d'hémolysines – des protéines qui lysent les hématies. L'hémolyse apparaît comme une zone claire (hémolyse β) ou comme un halo verdâtre (hémolyse α) autour de la colonie (Willey *et al.*, 2018).

b. Milieu Chromagar

Le milieu Chromagar est l'une de nombreuses géloses chromogéniques utilisées pour faciliter et orienter l'identification des certaines bactéries Gram- et certaines bactéries Gram+ sur la base de différentes colonies contrastées produites par des réactions enzymatiques spécifiques au genre à l'espèce avec un substrat chromogène propriété (Merlino *et al.*, 1996).

c. Milieu Hektoen

La gélose Hektoen est un milieu différentiel modérément sélectif servant à l'isolement et à la culture de microorganismes entériques à Gram négatif, en particulier à l'isolement des espèces *Shigella* et *Salmonella* issues d'échantillons (King et Metzger, 1968).

II.5. Sélection des souches productrices des biosurfactants

II.5.1. Déplacement d'huile

Dans le but d'explorer la production des biosurfactants chez les souches isolées, le test de déplacement d'huile a été réalisé selon la méthode décrite par (Morikawa *et al.*, 2000). Dans une boîte de pétri 10 cm de diamètre, 20 ml d'eau distillée sont déposés puis 20 μ l de pétrole ont été ajoutés à la surface de l'eau. 10 μ l de la suspension bactérienne sont déposés au centre délicatement.

En dernier lieu, le diamètre des zones claires est mesuré. La forme de la goutte sur la surface de l'huile est inspectée après 1 min. Si la goutte d'huile sur le surnageant est devenue plate 1 min après l'ajout de l'huile, le résultat est considéré comme positif. Si les gouttes restaient perlées, le résultat est noté comme négatif (Morikawa *et al.*, 2000). La représentation de test dans la (Photo 7).

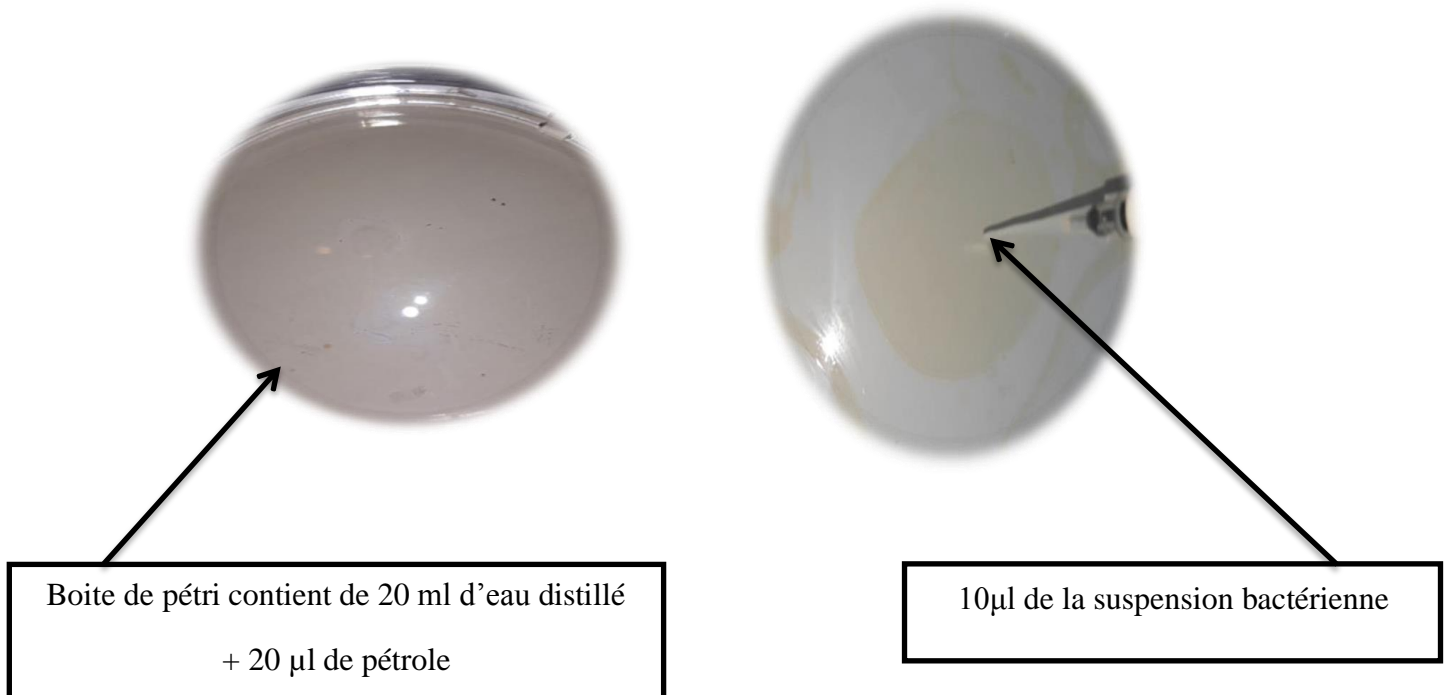


Photo 7 : Test de déplacement

II.6. Préparation de consortium bactérien

II.6.1. Repiquage des colonies sur milieu BN

A l'aide d'une anse de platine stérile en effectuant un repiquage des souches purifiées dans des tubes à essai stériles contenant de 15 ml du Milieu BN et incubées à 30 °C sous agitation 150tr/mn pendant 48 h (**photo 8**).



Photo 8 : Colonies repiquées dans le milieu BN

II.6.2. Préparation de consortium

Après la période d'incubation des colonies repiquées, deux consortiums bactériens sont préparés en mélangeant à proportions égales de cultures bactériennes pures isolées à partir de sols contaminés par des hydrocarbures (**Photo 9**).

Consortium 1: composé du consortium des souches S1, S5, S6, S8 non productrices de BS.

Consortium 2: composé du Consortium des souches S2, S3, S4, S7 productrices de BS.

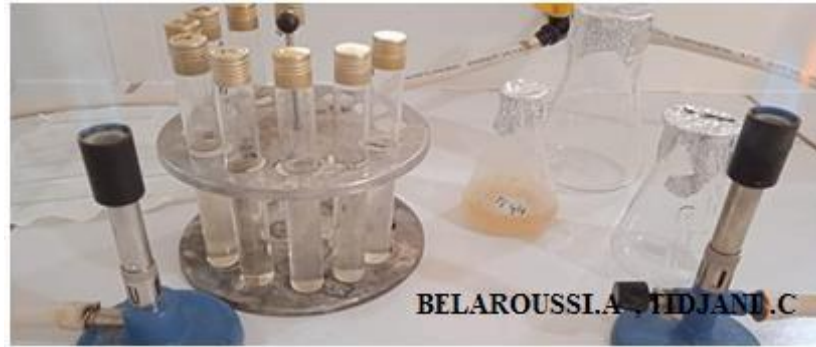


Photo 9: Préparation de consortiums bactériens

II.7. Traitement biologique par Landfarming

Le procédé Landfarming consiste à étaler sur une faible épaisseur et de grandes surfaces des sols pollués sur un support imperméable ; ce qui permet une interaction entre la matrice polluée et l'atmosphère. Le but est de favoriser l'aération et donc la dégradation aérobie.

La biodégradation est aussi favorisée par l'ajout de compléments nutritionnels (minéraux et engrais). Comme tout traitement biologique, les paramètres essentiels à prendre en compte et à maîtriser sont l'humidité, les nutriments, le pH et la température. Une fois mélangés, les sols sont généralement retournés afin d'améliorer l'aération qui est le facteur limitant principal (Ademe 2020).

a. Bioaugmentation

La bioaugmentation est le processus de l'ajout des microorganismes actifs dans le sol (Willey et al, 2018).

b. Biostimulation

La biostimulation consiste à modifier l'environnement pour stimuler les bactéries existantes capables de bioremédiation, en optimisant les conditions par l'aération et l'humidité.

c. Matériel et réactifs

- Bacs en plastique de même dimensions (L 25 x l 25 x H 10 cm).
- 30 kg de solides contaminés provenant d'un borbier situé au niveau du Champ de Berkine au sud-est de l'Algérie.

- Eau stérile pour humidification des sols contaminés.
- Biosurfactant de type Rhamnolipide acquit auprès d'un fabricant français.
- Consortium 1 : Composé des souches, S1, S5, S6, S8 (non productrices de BS)
- Consortium 2 : Composé des souches S2, S3 S4, S7 (productrices des BS).

d. Procédure opératoire

Le bioprocédé s'effectue par l'étalement des échantillons de solides sur des bacs en plastique, chaque bac contenant 1 Kg d'échantillon à traiter étalé sur une épaisseur de 10 cm. Les traitements sont réalisés en double comme suite :

- **Témoins 1 et 2** : solides pollués non aéré et non humidifié.
- **Témoins 3 et 4** : solide aéré et humidifié.
- **Bacs 5 et 6** : solide aéré et humidifié bioaugmenté par les souches non productrices de biosurfactant.
- **Bacs 7 et 8** : solide aéré et humidifié bioaugmenté par les souches productrices de biosurfactant.
- **Bacs 9 et 10** : solide aéré et humidifié bioaugmenté par les souches non productrices de biosurfactant + 20 ml de biosurfactant.

Toutes les boîtes sont aérées et humidifiées chaque jour et le suivi des traitements est fait par des prélèvements effectués chaque 15 jours pour le dosage des hydrocarbures (méthode de Retort). Le taux de biodégradation et d'extraction sont calculés en pourcentage volumique par rapport à la teneur initiale en hydrocarbures. (Photo 10).



Photo 10 : procédure de Landfarming

*Partie III : Résultats et
Discussion*

III. Résultats et Discussion

III.1. Caractérisation du sol

III.1.1. Teneur en humidité

L'eau joue un rôle essentiel dans tous les phénomènes physiques, chimiques et biologiques qui se produisent dans le sol. Elle pourra entrer en compétition avec les molécules organiques pour l'adsorption sur les matériaux solides, entraînant une baisse de l'adsorption des polluants lorsque le taux d'humidité du sol augmente (Sayyad, 2010)

Le taux d'humidité de notre échantillon (7.05%) dépend fortement des conditions climatiques au moment des prélèvements.

III.1.2. Caractères physico chimiques

Les paramètres physico chimiques de l'échantillon de sol contaminé par les hydrocarbures (pH, Salinité et conductivité électrique) sont consignés dans le tableau VI.

Tableau III : Caractères physico chimique de l'échantillon de sol étudié.

Echantillons	Avant traitement	Après traitement	Valeur limite
Potentiel d'hydrogène (PH)	6,7	7,2	6.5-8.5
Conductivité électrique (µs/cm)	3,1	2,5	2800
Salinité	2,2	2	////////////////////

Les valeurs de pH avant et après traitement varient entre 6.7 et 7.2. On constate donc une légère augmentation de la valeur de pH après traitement indiquant ainsi un milieu plus favorable pour l'activité bactérienne.

Le pH apparait ainsi comme un paramètre qui influence de manière majeure la

structure et la diversité des communautés bactériennes dans les sols, et impose directement une contrainte physiologique sur les bactéries du sol (Nicolas ,2013).

La conductivité est fonction de la concentration en sels solubles (chlorures, sulfates, carbonates et bicarbonates alcalins et alcalinoterreux, nitrates et phosphates). Elle permet de déterminer la salinité globale (Baize, 1988).

La salinité est proportionnelle à la conductivité, elle diminue le nombre de micro-organismes dans le sol. Elle ralentit les processus de l'humidification et de la minéralisation des matières organiques. En effet, de tous les processus biologiques, la nitrification est la plus touchée, ainsi que le dégagement de CO₂ (Mallouhi N, 1989).

Des chercheurs ont trouvé que la biodégradation des hydrocarbures est maximale pour une concentration en sel de 0.4 M et diminue lentement pour des valeurs supérieures et inférieures à celle-ci (Soltani M, 2004).

III.1.2.1. Demande en oxygène (Demande Biologique, Demande Chimique)

Nous avons réalisé des tests afin d'estimer le taux de biodégradation des polluants des bourbiers. Les mesures de la DCO et de la DBO5 de l'échantillon ont donné les résultats regroupés dans le tableau VII.

Tableau IV : demande en oxygène après et avant traitement

Echantillons	Avant traitement	Après traitement
Chlorure	<1000	<1000
DCO	6000	800
DBO	200	400
DBO/DCO	30	2

Selon la norme NF EN 1899-1, les résultats montrent que la matière organique et la matière inorganique brutes extraites par lixiviation avant traitement est non biodégradable en raison d'absence des conditions de la biodégradation. La forte valeur de la DCO par rapport à la DBO5 signifie la forte concentration en matière chimique.

D'autre part, après traitement on note une diminution de valeur de DCO et l'augmentation de la DBO5 mettant en évidence la forte activité biologique.

Les résultats obtenus laisse apparaitre une forte biodégradation du polluant traduite par le rapport $DCO/DBO5 = 2$ obtenu après traitement du sol pollué.

Selon Mohan *et al.*, (2006), les hydrocarbures sont facilement dégradés par les bactéries et autres organismes microscopiques ; par conséquent, ils ne posent pas beaucoup de menace pour l'environnement.

III. 2. Caractères microbiologiques du sol

III.2.1. Souches bactériennes hydrocarbonoclastes isolées

L'isolement des bactéries sur milieu M contenant le pétrole a permis la croissance de nos isolats après 5 j d'incubation. La croissance des isolats issus des échantillons sur le milieu de culture M contenant le pétrole comme seule source de carbone indique leur capacité de métaboliser ce dernier ainsi que ces dérivés.

III.2.2. Caractérisation et identification de souches purifiées

III.2.2.1. Caractéristiques morphologiques

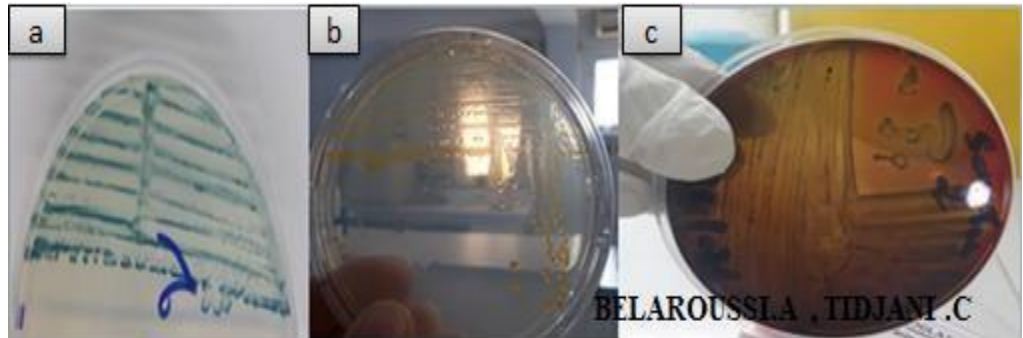
a. Aspect macroscopiques

L'observation macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation. Le repiquage des huit isolats sur la GN nous a permis d'étudier l'aspect des colonies. Les caractères macroscopiques des souches sont regroupés dans le **tableau V**.

Tableau V : Aspect des colonies bactériennes isolées

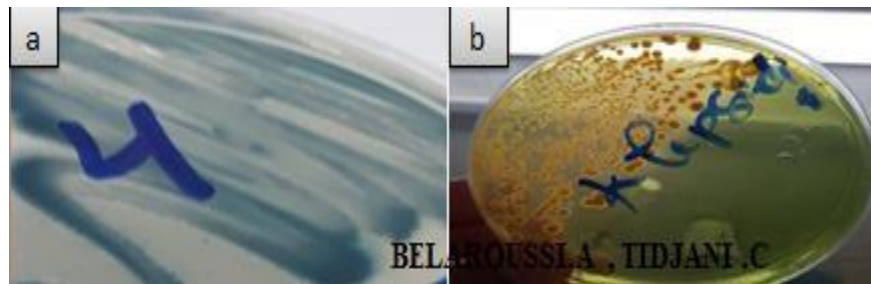
	Forme	Relief	Contour	Taille	Surface	Opacité	Couleur	Consistance
S1	Ronde	Plat	Régulier	2 mm	Lisse	Opaque	Blanche	Crémeuse
S2	Ronde	Convexe	Régulier	1-3mm	Lisse	Opaque	Jaune	Crémeuse
S3	Ronde	Plate	Régulier	2mm	Rugueuse	Translucide	Blanc jaunâtre	Crémeuse
S4	Ronde	Bombé	Régulier	3mm	Lisse	Opaque	Blanc	Muqueuse
S5	Ronde	Convexe	Régulier	2 mm	Lisse	Opaque	Beige	Crémeuse
S6	Ronde	Bombé	Régulier	3 mm	Lisse Brillante	Opaque	Blanche	Crémeuse
S7	Ronde	Convexe	Irrégulier	1 mm	Lisse	Opaque	Beige	Crémeuse
S8	Ronde	Bossue	Régulier	2-3 mm	Lisse	Opaque	Beige	Crémeuse

Les caractéristiques macroscopiques des bactéries présentées dans le tableau V montrent une variété 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 aux autres tests d'identification.



a : S2 sur milieu Chromagar b : S2 sur milieu GN c: S2 sur milieu gélose au sang

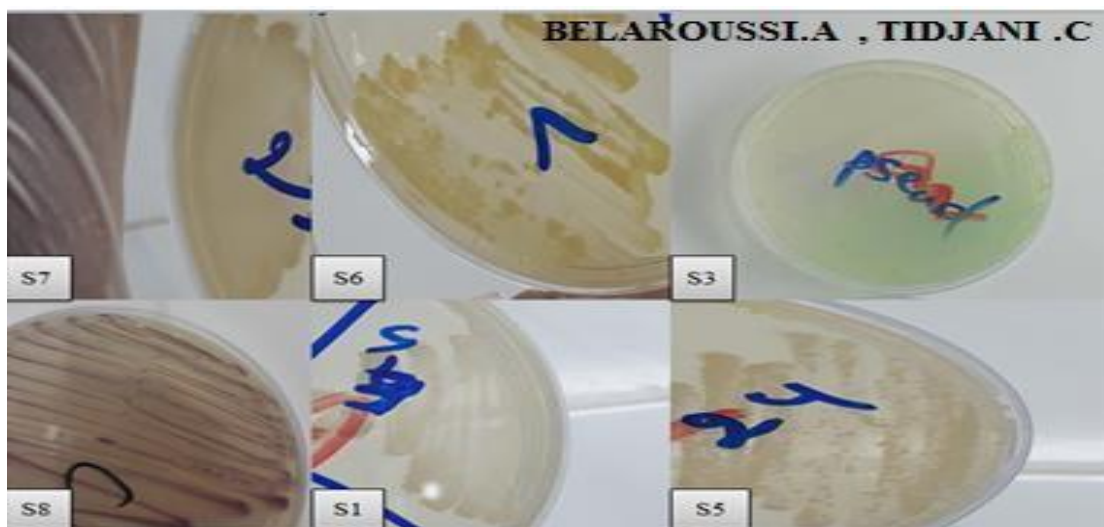
Photo 11: Aspect macroscopique de la souche 2 sur différents milieux de culture.



a: S4 sur milieu Chromagar

b : S4 sur milieu Hektoen

Photo 12: Aspect macroscopique de la souche 4 sur différents milieux de culture.



S8 sur milieu Chromagar.

S7, S6, S3, S1, S5 sur milieu GN

Photo 13 : L'aspect macroscopique de six souches.

b. Aspect microscopique

L'observation microscopique a été réalisée suivant deux étapes :

À l'état frais, coloration de gram. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau VI.

Tableau VI : Aspect Microscopique des souches isolées

Souche	Coloration de Gram			Mobilité
	Gram	Forme des cellules	Arrangement	
S1	-	Cocci	Isolés, paire	-
S2	+	Cocci	Isolés, paire et en chaînette,	-
S3	-	Bacille	Isolés, paire et Amas	+
S4	-	Bacille	Isolés, diplo et Amas	-
S5	-	Cocci	Isolés, diplo et Amas	-
S6	+	Cocci	Isolés, diplo et Amas	-
S7	+	Bacille	Diplo, en Chaînette	+
S8	-	Bacille	Isolés, paire	+

D'après nos observations (tableau IX), il ressort que les bactéries isolées présentent différentes formes : bacille, coque, soient mobiles ou immobiles avec une paroi de type positive ou négative

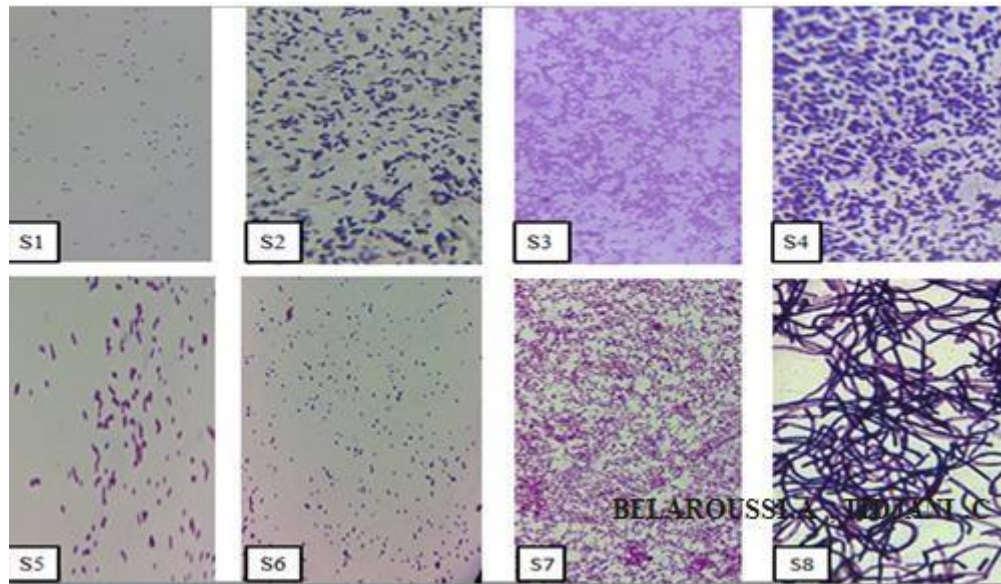


Photo 14: les différents aspects microscopiques obtenus après coloration de Gram

III.2.2.2. Caractéristiques biochimique

Les résultats des tests biochimiques sont regroupés dans le tableau X

Tableau VII : Résultats des tests biochimiques

Souche	Métabolisme énergétique	
	Catalase	Oxydase
S1	-	-
S2	-	-
S3	+	+
S4	+	-
S5	+	+
S6	+	-
S7	+	-
S8	+	-

(+) : Réaction positive, (-) : Réaction négative

III.2.2.3. Pré-identification des isolats

Tableau VIII: Les différents genres bactériens suspectés

Gram	Souche	Catalase	Oxydase	Genre suspecté
Cocci Gram ⁻	S5	+	+	<i>Neisseria sp</i>
Cocci Gram ⁺	S6	+	-	<i>Micrococcus sp</i> <i>Staphylococcus sp</i>
	S1	-	-	<i>Enterococcus sp</i> <i>Streptococcus sp</i>
	S2	-	-	<i>Enterococcus sp</i> <i>Streptococcus sp</i>
Bacille Gram ⁻	S4	+	-	<i>Enterobacter sp</i>
	S8	+	-	<i>Enterobacter sp</i>
	S3	+	+	<i>Pseudomonaceae</i> <i>Vibrionaceae</i>
Bacille Gram ⁺	S7	+	-	<i>Bacillus sp</i>

D'après ces clés d'orientation on suspecte l'appartenance de nos isolats aux genres suivants : *Neisseria sp*, *Micrococcus sp*, *Staphylococcus sp*, *Enterococcus sp*, *Streptococcus sp*, *Bacillus sp*, *Enterobacter sp*, *Pseudomonas sp*,

Tableau IX : Les genres suspectés par l'utilisation des différents milieux de culture

N° de souche	Les milieux utilisés	Genre suspecté
S2	Chromagar, Gélose au sang	<i>Streptococcus sp</i>
S8	Chromagar	<i>Enterobacter sp</i>
S4	Hektoen	<i>Enterobacter sp</i>
S3	Chromagar	<i>Pseudomonas sp</i>

L'utilisation des milieux spécifiques Chromagar et Gélose au sang et les différentes morphologies a permis de différencier et d'identifier la souche S2 par le genre *streptococcus sp*. En raison de l'aspect de ses colonies (Photo 11). Des petites colonies bleu sur le milieu Chromagar et hémolyse β sur la gélose au sang et de la forme de ces cellules qui sont des Cocci, Gram-positive, immobile (Tableau V), Oxydase-négative (tableau VII), (Habib, 2000 ; Delarras, 2010 ; Willey *et al.*, 2018) .

Pour identifier ces coques on utilise de nombreux caractères. L'une de leurs caractéristiques taxonomiques les plus importantes est la propriété de lyser les érythrocytes lorsqu'ils se développent sur la gélose au sang. Selon le tableau II (annexe) de classification et caractérisation des streptocoques le groupage de Lancefield l'hémolyse β représente les *streptocoques pyogènes*, parmi les espèces représentatives *S.agalactiae*, *S.pyogenes*, *S.equi*, *S.dysgalactiae* (Willey *et al.*.,2018).

La souche 8 a été rattachée au genre *Enterobacter sp* pour sa morphologie macroscopique et microscopique : d'après la (Photo 13) les colonies sont rondes, opaques. Et se présentent sous forme de Bacille Gram - (Tableau V). Oxydase-, Catalase+ (Delarras, 2007). Les colonies d'E.coli se caractérisent par la couleur rose en milieu Chromagar (Habib *et al.*., 2000) , donc il est probable que la souche8 fait partie de l'espèce *E.coli*.

La souche 7 a été rattaché au genre *Bacillus* en raison de leur morphologie, bacille, Gram+ , Oxydase-négative , catalase-positive , mobile en comparaison avec ceux établis par (Bergey,1984 et CamilleDelarras,2007).Il est probable que cette souche correspond au genre *Bacillus*.

Tableau X: Résultats des tests biochimiques sur la galerie API 20E

Souche		S3	S4
Test biochimique			
Métabolisme protéique	LDC	-	+
	ODC	-	-
	ADH	+	-
	URE	-	-
	TDA	-	-
	IND	-	+
	GEL	+	-
Métabolisme glucidique	ONPG	-	+
	MAN	-	+
	CIT	+	+
	VP	-	+
	GLU	+	+
	MAN	-	+
	INO	-	+
	SOR	-	+
	RHA	-	+
	SAC	-	+
	MEL	-	+
	AMY	-	+
	ARA	-	+

(+) : Réaction positive, (-) : Réaction négative



Photo 15: Identification biochimique de la souche S4 par galerie Api 20E

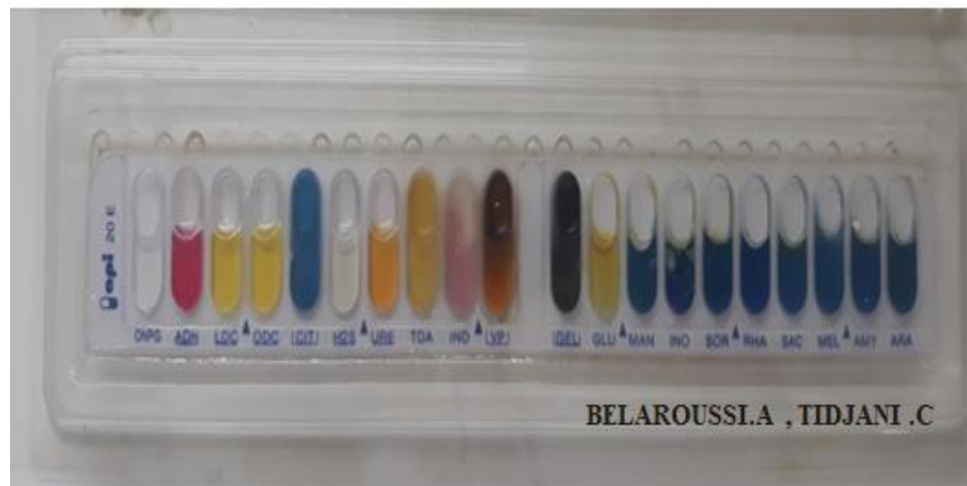


Photo 16 : Identification biochimique de la souche S3 par galerie Api 20E

L'étude de Chamkha et ses collaborateurs a démontré que la souche BSC5 isolée d'une eau de production d'un champ pétrolier et appartenant à l'espèce *Klebsiella oxytoca*, la souche a pu se développer en aérobiose utilisant du pétrole brut comme source de carbone. L'analyse GC-MS a montré que la souche BSC5 était capable de dégrader une large gamme d'hydrocarbures aliphatiques de C13 à C30. Le taux de biodégradation des n-alcane a atteint 44 % et 75 %, après 20 et 45 jours d'incubation, respectivement (Chamkha *et al.* , 2011).

Le genre *Bacillus* peut dégrader le pétrole brut ,et la comparaison des résultats obtenus et des statistiques existant avec des études similaires à révéler que le bacille isolé

peut être utilisé pour la biorestauration et l'enlèvement des polluants provenant du pétrole brut de l'environnement (Akhavan *et al.*, 2008).

Des échantillons de sol contaminés par des hydrocarbures examinés dans différents ateliers de réparation de mécanique automobile abritaient des bactéries d'importance possible pour la biodégradation. Parmi les souches étudiées *Streptococcus sp* avéré capable d'utiliser et dégrader l'huile motrice usée comme source d'énergie. Donc cet isolat est recommandé comme espèce bactérienne pour une utilisation possible dans la bioremédiation des hydrocarbures (Ebakota *et al.* , 2017)

Les résultats des études réalisées par (Pacwa-Plóciniczak *et al.*, 2016) indiquent que la souche *Pseudomonas aeruginosa* a la capacité de dégrader divers hydrocarbures (hexadécane, pétrole brut...), et est efficace dans la production des rhamnolipides et l'émulsification des hydrocarbures.

Ses caractéristiques en font un agent prometteur pour nettoyer les environnements contaminés par des composés pétroliers (Pacwa-Plóciniczak *et al.* , 2016) .

III.3. Sélection des souches productrices des biosurfactants

III.3.1 Déplacement d'huile

Les résultats obtenus ont montré que les souches S7, S3, S4, S2 sont productrices de biosurfactants avec des diamètres des zones claires formées 25 mm, 15 mm, 7 mm et 5mm respectivement, et les autres souches S8 S5 S6 S1 sont incapables de produire le BS (Photo 17), Tableau XI.

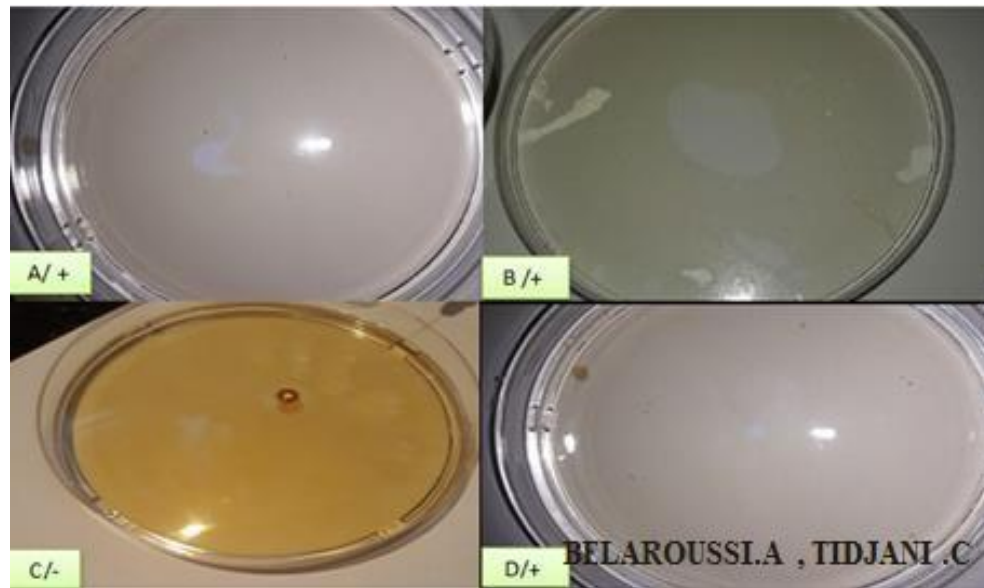


Photo 17 : Résultats du test de déplacement d'huile

Résultat positif / +

Résultat négatif / -

Tableau XI : Résultats de test de déplacement d'huile

Souche	Résultat	Diamètre (mm)
S1	-	0
S2	+	5 mm
S3	+	15 mm
S4	+	7 mm
S5	-	0
S6	-	0
S7	+	25 mm
S8	-	0

Les résultats du test de déplacement d'huile sont indiqués positivement lorsqu'une zone claire se forme sur les gouttelettes de surnageant dans la couche d'huile (photo).

La zone claire se forme car la partie hydrophobe de l'huile et hydrophile dans le biosurfactant fusionne, provoque alors une pression entre les parties hydrophobes et hydrophiles. Cette condition provoque une diminution de la tension d'interface, la couche d'huile se rompt et une zone claire se forme (Kurniati *et al.*, 2019).

Branch *et al.*, 2012 ont étudié la production du biosurfactant par *Bacillus sp* isolée à partir des sols contaminés par les hydrocarbures et signalé leur potentiel élevé de production des molécules tensio-actif biosourcés, en particulier pour la récupération microbienne améliorée du pétrole (MEOR) et la bioremédiation de la contamination par le pétrole, (Branch *et al.*, 2012).

Parmi les souches isolées et caractérisées par Liu et ses collaborateurs dans leurs étude *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella oxytoca* parent se développer et utiliser le pétrole brut comme seule source de carbone et produits des biosurfactants efficaces avec un taux plus élevé pour la biodégradation des hydrocarbures et l'efficacité de remédiation des sols pollués par l'utilisation de consortium bactérien pendant le procédé de traitement (Liu *et al.*, 20)

Kumar et ses collaborateurs ont étudié l'application de genre *streptococcus sp* isolé à partir des sites contaminés par les hydrocarbures dans la biodégradation de pétrole et ses dérivées, d'après les résultats obtenus ont déclaré que ce genre a la capacité de dégrader les hydrocarbures (Kumar *et al.*, 2013).

III.4. Traitement biologique

La figure 30 représente l'évolution des teneurs en Hydrocarbures pour les différents échantillons traités.

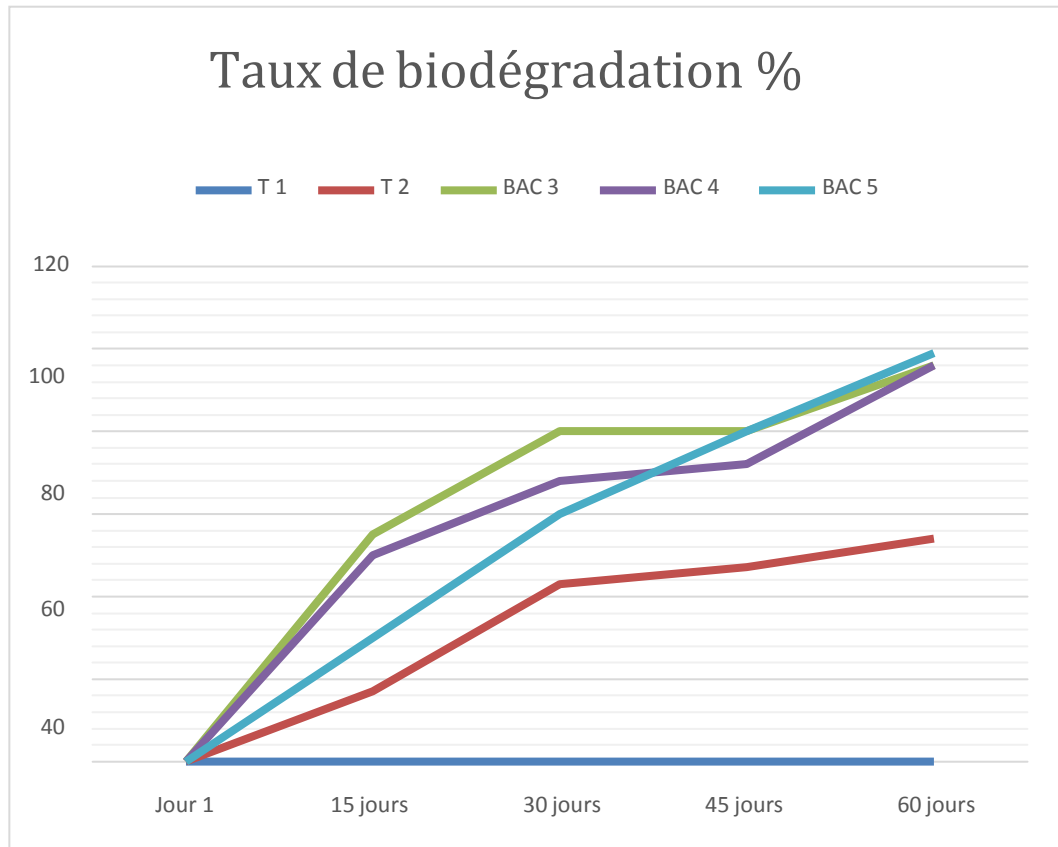


Figure 10 : Taux de biodégradation en fonction du temps

Un premier dosage a été effectué sur un échantillon brut pour évaluer le taux de pollution initiale. Le résultat obtenu a montré que la teneur totale en hydrocarbures est égale à 13.83% par rapport à la quantité de sol. D'après les normes et exigences industrielles, la teneur en hydrocarbures des rejets pétroliers solides doit être inférieure à 5 %. Donc, le sol étudié est considéré comme pollué et nécessite un traitement préalable avant d'être rejeté.

La détermination des hydrocarbures pétroliers totaux (TPH) constitue une des approches les plus largement utilisées pour évaluer les polluants pétroliers et établir les niveaux de nettoyage cibles pour le sol (Yang *et al.*, 2013).

Le résultat en TPH est de 138.33 gr/kg. Ce résultat constitue un niveau de pollution très élevé dans le sol analysé. La concentration des TPH dans les échantillons étudiés est supérieure à celle obtenue auparavant par Mme BOUDERHEM Amel (2011) qui a enregistré 123,7 gr d'hydrocarbures/kg de sol, pour des échantillons de sol contaminés prélevés d'un site similaire

Aucune biodégradation n'a été enregistrée pendant toute la période de traitement pour l'échantillon témoin non humidifié et non aéré (conditions naturelles).

On a constaté une biodégradation moyenne de plus de 50 % pour l'échantillon témoin humidifié et aéré avec une vitesse moins prononcée après le premier mois de traitement. (Oudot *et al.*, 1987). Atlas (1995) a rapporté que la présence d'une pollution pétrolière augmente la population des microorganismes dégradant les hydrocarbures dans le sol de 1% à typiquement 10% de la population totale

Pour les échantillonsensemencés par des bactéries non productrices de biosurfactants ainsi que ceuxensemencés par des bactéries productrices de surfactants, on a enregistré un important taux de biodégradation des hydrocarbures qui dépasse 95 % après seulement deux mois de traitement.

Ces résultats peuvent être comparés avec les résultats obtenus par (Cipinyte *et al.*, 2011) qui montrent que le taux de production de biosurfactants diffère d'un isolat à un autre et Amaral. 2010 montre que le taux de production de biosurfactants augmente proportionnellement avec l'augmentation de l'agitation et l'aération.

Enfin, l'échantillonensemencé par des bactéries non productrices de biosurfactants avec ajout de biosurfactant a subi une dégradation très importante avec un taux de 99 % après deux mois de traitement.

Nous avons également remarqué que sa vitesse de biodégradation possède une allure linéaire pendant toute la durée de traitement. Les biosurfactants ont donc favorisé la biodégradation en diminuant la tension superficielle du sol en présence d'eau.

Les biosurfactants sont reconnus pour être non toxiques, biodégradables et restent fonctionnels malgré des conditions extrêmes (pH, température et salinité) (Banat, 2000) associés aux sols contaminés par les hydrocarbures dans le sud algérien.

Les composés pétroliers diffèrent par leur susceptibilité à l'attaque microbienne. Ainsi, la vitesse de biodégradation est plus élevée pour les hydrocarbures saturés, viennent ensuite les hydrocarbures aromatiques légers, les hydrocarbures aromatiques à haut poids moléculaire et les composés polaires ayant la vitesse de dégradation la plus faible (Soltani, 2004).

La biodégradabilité des pétroles bruts est très fortement dépendante de leur composition ; à une température déterminée, un pétrole léger est plus susceptible d'être biodégradé qu'un pétrole lourd (Atlas, 1975). En général, ils sont classés selon leur sensibilité aux attaques microbiennes de la manière suivante : n-alcanes > alcanes ramifiés > aromatiques à faible poids moléculaire > alcanes cycliques > aromatiques à haut poids moléculaire > stéranes-hopanes (Van Hamme *et al.*, 2003).

La photo 18-a et 18-b représentent l'aspect extérieur des échantillons avant et après traitement. On constate un net éclaircissement du sol après traitement dû à la disparition des hydrocarbures.

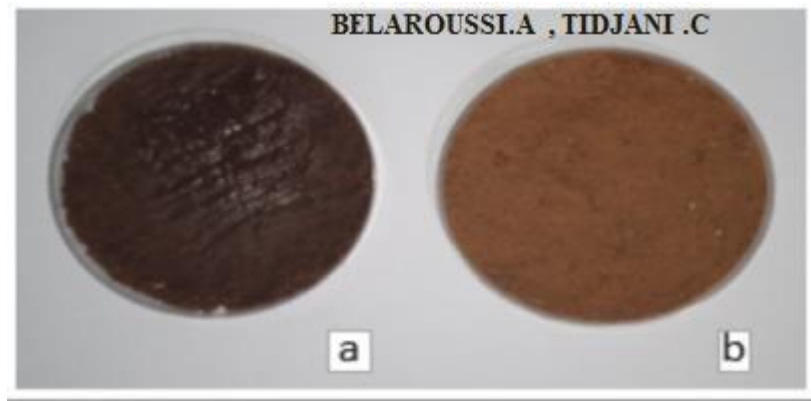


Photo 18 : échantillons du sol avant traitement (a) et après traitement (b)

CONCLUSION

CONCLUSION

D'après les différents essais et au vu des résultats obtenus, nous pouvons conclure que :

L'étude du sol pollué a révélé la présence d'une population importante de bactéries (8 souches bactériennes) ayant subi naturellement un effet d'accoutumance au milieu et dans lequel elles peuvent facilement survivre et se développer. Parmi ces 8 souches, deux espèces ont été pré-identifiées par galerie API 20^E : *pseudomonas aerogenosa* et *klebsiella oxytoca*.

Parmi les 8 souches utilisées, 4 ont été évaluées comme productrices de biosurfactant et les 4 comme non productrices de biosurfactant.

L'essai préliminaire de traitement réalisé sur un échantillon de sol non biostimulé et un autre échantillon biostimulé a donné un taux de dégradation nul pour le premier et un taux de dégradation moyen (50 %) pour le deuxième et ce après deux mois de traitement.

Les deux types de bactéries (productrices ou non de biosurfactants) ont montré un excellent pouvoir biodégradant des hydrocarbures présents dans le sol et le taux de biodégradation après deux mois de traitement a atteint 95 %.

Les bactéries non productrices de biosurfactant peuvent être stimulées grâce à l'ajout d'un biosurfactant commercial de type Rhamnolipide pour atteindre un taux de biodégradation très satisfaisant de 99 %.

Le consortium bactérien peut être utilisé pour un éventuel traitement des rejets. L'ajout d'un biosurfactant s'avère non indispensable ce qui facilitera la mise en œuvre des opérations de traitement à l'échelle industrielle.

La souche non productrice de biosurfactant est parfaitement compatible le biosurfactant type Rhamnolipide utilisé.

CONCLUSION

L'ajout de biosurfactant peut être adopté comme mode de traitement uniquement pour les rejets fortement contaminés et dont le taux de traitement doit être supérieur à 99 % pour pouvoir répondre aux exigences normatives et contractuelles en matière de traitement des rejets solides contaminés par les hydrocarbures. Enfin, les concentrations résiduelles des hydrocarbures doivent être comprises entre 1 et 5 % selon le mode de traitement appliqué (Stabilisation/Solidification ou Thermique).

A l'exception de l'échantillon traité par le biosurfactant, toutes les réactions de biodégradation ont subi un léger ralentissement pendant la période de grande chaleur (Températures supérieures à 45%).

Le déroulement des opérations de traitement dans des conditions ambiantes démontre la possibilité d'un tel traitement à l'échelle industrielle directement sur le site de stockage des rejets contaminés.

Contrairement aux sols traités par les autres modes de traitement, ce procédé génère un sol complètement restauré et ne présentant aucun danger dans le cas d'une éventuelle réutilisation.

Perspectives :

Afin de compléter cette étude, nous recommandons de procéder dans le futur aux travaux suivants :

Sélection des souches (productrices ou non de biosurfactants) les plus efficaces en vue de les utiliser séparément pour le traitement biologique des sols contaminés.

L'utilisation de ce même traitement pour évaluer son efficacité sur les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) considérés comme les plus récalcitrant et les principaux responsables de la toxicité et la non biodégradabilité des hydrocarbures en général.

L'utilisation d'autres types de biosurfactants commerciaux pour le traitement des sols contaminés.

CONCLUSION

L'étude de l'efficacité des souches productrices de biosurfactants afin de les utiliser dans le mode de traitement par extraction Solide/Liquide, très recherché par les compagnies pétrolières à cause de sa simplicité et rapidité d'exécution, de son faible coût.

Références bibliographiques

1. **Abdelly, C. (2006).** Bioremédiation / Phytoremédiation. Université de Tunis – Institut supérieur de l'éducation et de la formation continue, Département des sciences naturelles, 32 p. SN232.
2. **Abd-El salam, H., Shameseldin, A., & Hafez, E. E. (2006).** PAH degradation by two native Egyptian strains *Flavobacterium* sp. and *Pseudomonas putida*. *J Appl Sci Res*, 2, 1092-1098.
3. **AKHAVAN, S. A., DEZHBAN, G. P. I., Emami, M., & Nakhoda, A. M. (2008).** Isolation and characterization of Crude oil degrading *Bacillus* spp.
4. **Adu, S. A., Naughton, P. J., Marchant, R., & Banat, I. M. (2020).** Microbial biosurfactants in cosmetic and personal skincare pharmaceutical formulations. *Pharmaceutics*, 12(11), 1099.
5. **Amaral, P.-F., Coelho, M. Marrucho, I. et Coutinho, J.-P. (2010).** Biosurfactants from yeasts: characteristics, production and application. In: *Biosurfactants*. Sen, R. Edition, Springer Science, p. 236-249.
6. **Atlas, R. M. (1995).** Bioremediation of petroleum pollutants. *Int Biodeterior Biodegrad*, 35, 317–327.
7. **ADEME 2020.** Landfarming
8. **Ammar AL-Jasim, M. D. (2016).** isolation of sophorose during sophorolipid production and studies of its stability in aqueous alkali : epimeriation of sophorose to 2-O-B-d-glucopyranosyl-d-mannos. ELSEVIER, 47
9. **André Felipe da Silva, I. (2021).** Fungal biosurfactants, from nature to biotechnological product : bioprospection, production and potential applications. Springer Nature, 3-4
10. **Balseiro-Romero, M., Monterroso, C., Kidd, P. S., Lu-Chau, T. A., Gkorezis, P., Vangronsveld, J., & Casares, J. J. (2019).** Modelling the ex situ bioremediation of diesel-contaminated soil in a slurry bioreactor using a hydrocarbon-degrading inoculant. *Journal of environmental management*, 246, 840-848.
11. **Betancur-Galvis, L. A., Alvarez-Bernal, D., Ramos-Valdivia, A. C., & Dendooven, L. (2006).** Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated saline–alkaline soils of the former Lake Texcoco. *Chemosphere*, 62(11), 1749-1760.
12. **-BLIFERT et PERRAUD, (2004).** Chimie de l'environnement air, eau, sols, déchet. De Boeck université. P (369 ,372-375)
13. **Bossert, I. D., and R. Bartha. 1986.** Structure-biodegradability relationships of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 37:490-495
14. **Branch, T. (2012).** Biosurfactan production by *Bacillus* sp. isolated from petroleum contaminated soils of Sirri Island. *American Journal of Applied Sciences*, 9(1), 1-6.

15. **Bouderhem, A.** (2010). UTILISATION DES SOUCHES BACTERIENNES TELLURIQUES AUTOCHTONES DANS LA BIODÉTECTION ET LA BIOREMEDIATION DES SOLS POLLUES PAR LES HYDROCARBURES.
16. **Baize, D.** (1988). Guide des analyses courantes en pédologie. Institut national de la recherche agronomique. 172p.
17. **Bodour A.A and Miller-Maier R.M.** (1998). Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*. 32 : 273-280.
18. **Banat, I. M.** (1995). Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation. *Bioresource Technology* 51, 1-12.
19. **Banat I M,** (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. 427-444.
20. **Belmenai, M., Benhafed, N.E** (2015) . Isolement et caractérisation des bactéries hydrocarbonoclastes. Thème de master de l'Université des Frères Mentouri Constantine .Spécialité : *Ecologie Microbienne*.P :24.
21. **Cappuccino, J. G., & Welsh, C. T.** (2017). *Microbiology: a laboratory manual*. Pearson Education.
22. **Chamkha, M., Trabelsi, Y., Mnif, S., & Sayadi, S.** (2011). Isolation and characterization of *Klebsiella oxytoca* strain degrading crude oil from a Tunisian off-shore oil field. *Journal of basic microbiology*, 51(6), 580-589.
23. **Colombano, S., Saada, A., Guerin, V., Bataillard, P., Bellenfant, G., Beranger, S., ... & Girardeau, I.** (2010). Quelles techniques pour quels traitements-Analyse coûts-bénéfices. *Rapport final BRGM-RP-58609-FR*, 403.
24. **Cipinyte, V., Grigiskis, S., Sapokate, D. and Baskys, E.** (2011). Production of biosurfactants by *Arthrobacter* sp. N3, a hydrocarbon degrading petroleum, the 8th International Scientific and Practical Conference, Lithuania.
25. **Daane, L. L., Harjono, I., Barns, S. M., Launen, L. A., Palleron, N. J., & Häggblom, M. M.** (2002). PAH-degradation by *Paenibacillus* spp. and description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from the rhizosphere of salt marsh plants. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(1), 131-139.
26. **Daane, L. L., Harjono, I., Zylstra, G. J., & Haggblom, M. M.** (2001). Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2683-2691.
27. **Delarras, C.** (2010). Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux. *Lavoisier*
28. **Delarras.C.,** (2014). Pratique en microbiologie de laboratoire? Recherche de bactéries et de levures-moisissures. *Lavoisier*.

29. **Delarras.C., (2007)**. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. 427 p.
30. **Das, A. K. (2010)**. Microbial surfactants and Their Potential Applications: An Overview. Dans R. Sen, Biosurfactants. 54-64
31. **Ebakota, O. D., Osarueme, J. O., Gift, O. N., Odoligie, I., & Osazee, J. O. (2017)**. Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria in top and subsoil of selected mechanic workshops in Benin City metropolis, Nigeria. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 21(4), 641-645.
32. **ELODIE .2008** Biodégradation du 2-éthylhexyl nitrate par *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2173 :De l'élucidation de la voie de dégradation aux enzymes impliquées. Thèse de doctorat. De l'université JOSEPH FOURIER GRENOBLE I.
33. **EMANUEL G., et LORRENCE H.G. (2009)**. Practical handbook of microbiology. CRC press. USA, pages : 853.
34. **Esin Hames. (2015)**. Patents on Biosurfactants and Futur Trends. 169
35. **Edwards JR, H. J. (1965)**. Structure if rhamnolipid from pseudomonas. 111
36. **Gaudu,F. (2014)**. Bioremediation des sols pollués aux hydrocarbures, les hydrocarburesMaster2 Université de Rennes 1, UFRSVE. 56p
37. **Goyal, A. K., & Zylstra, G. J. (1996)**. Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39. *Applied and environmental microbiology*, 62(1), 230-236.
38. **Goyal, A. K., & Zylstra, G. J. (1996)**. Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39. *Applied and environmental microbiology*, 62(1), 230-236.
39. **Gruiz, K., & Kriston, E. (1995)**. In situ bioremediation of hydrocarbon in soil. *Soil and Sediment Contamination*, 4(2), 163-173.
40. **Habib, M. A., Al-Kaisi, E., & Al-Omar, L. S. (2000)**. The use of CHROM agar Orientation for the detection of uropathogens. *Iraqi Journal of Medical Sciences*, 241.
41. Giot et Cousin 2012, al Majou 2007, Thiebeau et Bertrand, 2016)
42. Giot G, Cousin. I, 2012, « Méthode d'étalonnage des réflectomètres de teneur en eau.
43. **Haritash, A. K., & Kaushik, C. P. (2009)**. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of hazardous materials*, 169(1-3), 1-15.
44. **Heitkamp MA, Franklin W, Cerniglia CE (1988)** Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. *Appl Environ Microbiol* 54: 2549–2555

45. **Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams. 1994.** Bergey's manual of determinative bacteriology (9th edition). Baltimore: Williams and Wilkins.
46. **Hunter, Rochelle. D., Ekunwe, S. I., Dodor, D. E., Hwang, H. M., & Ekunwe, L. (2005).** Bacillus subtilis is a potential degrader of pyrene and benzo [a] pyrene. *International journal of environmental research and public health*, 2(2), 267-271.
47. **HAICHOOR NORA.** Travaux pratiques de microbiologie générale. Université Ferhat ABBAS Sétif 1 Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.
48. **Hamley, I. W. (2015).** Lipopeptides: from self-assembly to bioactivity. Chemical communications
49. **Henry, H., & Stacey, M. (1943).** Histochemistry of the Gram-staining reaction for micro-organisms. *Nature*, 151(3841), 671-671.

50. **Hommel, R. (1994).** Formation and function of biosurfactants for degradation of water-insoluble. 63-87
51. **Ibrahim M. Banat, R. T. (2008).** Microbial Biosurfactants. 6-7
52. **Jeon, C. O., Park, M., Ro, H. S., Park, W., & Madsen, E. L. (2006).** The naphthalene catabolic (nag) genes of Polaromonas naphthalenivorans CJ2: evolutionary implications for two gene clusters and novel regulatory control. *Applied and environmental microbiology*, 72(2), 1086-1095.
53. **Joffin, J. N., & Leyral, G. (2006).** Microbiologie Technique Tome 1" Dictionnaire des techniques". Bordeaux, France, centre régional de documentation d'Aquitaine, p 368
54. **Jean-Louis SALAGER (2002),**Laboratory of Formulation, Interfaces,Rheology & Processes.
55. **Kastner, M., Breuer-Jammali, M. and Mahro, B. (1994)** Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol* 41, 267– 273.
56. **Khan, A. A., Kim, S. J., Paine, D. D., & Cerniglia, C. E. (2002).** Classification of a polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing bacterium, Mycobacterium sp. strain PYR-1, as Mycobacterium vanbaalenii sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(6), 1997-2002.
57. **Kim, Y. M., Ahn, C. K., Woo, S. H., Jung, G. Y., & Park, J. M. (2009).** Synergic degradation of phenanthrene by consortia of newly isolated bacterial strains. *Journal of Biotechnology*, 144(4), 293-298.
58. **King, S., & Metzger, W. I. (1968).** A new plating medium for the isolation of enteric pathogens: I. Hektoen enteric agar. *Applied microbiology*, 16(4), 577-578.
59. **Krivobok, S, Meyer, C, Willison, J.C. 2003.** Identification of pyrene induced protein in Mycobacterium sp. evidence for two ring hydroxylating dioxygenase. *J Bacteriol* 185: 3828-3841.

60. **Kurniati, T. H., Rahayu, S., Sukmawati, D., & Maharani, W. (2019).** Screening of biosurfactant producing bacteria from hydrocarbon contaminated soil. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1402, No. 5, p. 055026). IOP Publishing.
61. **Koch A. (1991).** Hydrocarbon Assimilation and Biosurfactant Production. 4212-4219
62. **Larkin, M. J., Allen, C. C., Kulakov, L. A., & Lipscomb, D. A. (1999).** Purification and characterization of a novel naphthalene dioxygenase from *Rhodococcus* sp. strain NCIMB12038. *Journal of Bacteriology*, 181(19), 6200-6204.
63. **LEE, M. D., & SWINDOLL, C. M. (1993).** Bioventing for in situ remediation. *Hydrological sciences journal*, 38(4), 273-282.
64. **LEFEBVRE.G (1986).** Notion de chimie du pétrole, édition Technip, Paris. P 41.
65. **LEFEBVRE.G (1987).** Chimie des hydrocarbures, édition Technip, Paris. P 9-60.
66. - **Lin, T. C., Pan, P. T., & Cheng, S. S. (2010).** Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 176(1-3), 27-34.
67. **Liu, Y., Li, C., Huang, L., He, Y., Zhao, T., Han, B., & Jia, X. (2017).** Combination of a crude oil-degrading bacterial consortium under the guidance of strain tolerance and a pilot-scale degradation test. *Chinese journal of chemical engineering*, 25(12), 1838-1846.
68. **Lotfabadt.B., ShourianM., RoostaazadR., NajaR., Laurent P., Buchon L., Guespin- Michel J. F. et Orange N., (2000).** Production of pectatylases and cellulases by *Chryseomonas luteola* strain MFCL0 depends on the growth temperature and the nature of the culture medium:evidence for two critical temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*66 : 1538-1543.
69. **Lang, S. (2002).** Biological amphiphiles. ELSEVIER, 17
70. **Madigan, M., & Martinko, J. (2007).** Brock. Biologie des micro-organismes. 11 e édition. *Person Education France*, 599-60.
71. **Marchal N. et Bourdon J. L., (1982).** Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed. *Doin*, Paris.
72. **Martineau B., (1996).** Systématique bactérienne, Guide d'identification des bactéries aérobies. Edition *DECLARIE* ; Montréal.
73. **McGenity, T., Van Der Meer, J. R., & de Lorenzo, V. (2010).** Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology (p. 4716). K. N. Timmis (Ed.). Berlin: Springer.
74. **Merlino, J., Siarakas, S., Robertson, G. J., Funnell, G. R., Gottlieb, T., & Bradbury, R. (1996).** Evaluation of CHROMagar Orientation for differentiation and presumptive identification of gram-negative bacilli and *Enterococcus* species. *Journal of clinical microbiology*, 34(7), 1788-1793.
75. **Michel, J., & Denys, S. (2010).** Le transport d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans les sols non saturés. Rapport Scientifique INERIS, 2009, 38-40.

76. **Morikawa, M., Hirata, Y., & Imanaka, T. (2000).** A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488(3), 211-218.
77. Majou H, Bruand A, Duval O, Josière O , 2007, Etudes des propriétés de rétention en eau des sols argileux. 5è colloque du Groupe Français des Argiles ; 18-19 avril 2007,
78. **Mallouhi, N., (1989).** Etude de la dynamique de matière organique dans les sols affectés par la salinité. *Tropicultura*
79. **Marchant, I. M. (2010).** Microbial biosurfactants production, application and future potential. Springer, 2
80. **Morikawa T., Ishibashi Y., Fukuoka T., Imura T., Sakai H., Abe M., Kitamoto D. (2011).** Production of Glycolipid Biosurfactants, cellobiose lipids, by *Cryptococcus humicola* JCM 1461 and their interfacial properties. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 75 : 1597-1599.
81. **Mnif, I.G. (2015).** Review lipopeptides biosurfactants: mean classes and new insights for. *Peptide science*, 129-147
82. **-NORMAD. X et TREIL.A (1985).** L'industrie du raffinage du pétrole. Leçon
83. **Norme API 13B-2.**
84. **Norme EPA SW846/1311 approuvé par NELAC.**
85. **Norme NF ISO : 1146.**
86. **Norme ISO 10523.**
87. **Norme ISO 15705.**
88. **Norme NF EN 1899-1.**
89. **Norme NF EN 27888-1994.**
90. **Norme NF X31-211.**
91. **Obayori, O. S., Ilori, M. O., Adebuseye, S. A., Oyetibo, G. O., Omotayo, A. E., & Amund, O. O. (2009)** Degradation of hydrocarbons and biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. strain LP1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(9), 1615-1623.
92. **Ozyurek, S. B., & Bilkay, I. S. (2017).** Determination of petroleum biodegradation by bacteria isolated from drilling fluid, waste mud pit and crude oil. *Turkish Journal of Biochemistry*, 42(6), 609-616.
93. **Oudot, J., Fusey, P., Abdelouahid, D. E., Haloui, S., & Roquebert, M. F. (1987).** Capacités dégradatives de bactéries et de champignons isolés d'un sol contaminé par un fuel. *Can J Microbiol*, 33, 232–243
94. **P, Singh ,Y, Patil and V, Rale .2018 .** Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies , *Journal of Applied Microbiology* ,1364-5072 page2

95. **Pacwa-Plociniczak, M., Plaza, G. A., Poliwoda, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2014).** Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(15), 9385-9395.
96. **Prescott, L. M., Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2018).** *Microbiologie*. De Boeck Supérieur.
97. **Priscilla f. Amaral, M. A. (2010).** Biosurfactants from yeasts: characteristics, production and application. Landes Bioscience and Springer Science, 236-249
98. **Rodrigues, L., Banat, I. M., Teixeira, J., & Oliveira, R. (2006).** Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 57(4), 609-618.
99. **Romine MF, Stillwell LC, Wong KK, Thurston SJ, Sisk EC, Sensen C, Gaasterland T, Fredrickson JK, Saffer JD (1999)** Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *J Bacteriol* 181:1585–1602
100. **Rossello-Mora .R, Amann.R., (2001).** The species concept for prokaryotes. *FEMS microbio. Rev.* 25, 39-67.
101. **Rajesh Kumar, A. J. (2018).** Rhamnolipid Biosurfactant Recent Trends in Production and Application. Singapore : Springer Nature.
102. **Sabullah, M. K., Rahman, M. F., Ahmad, S. A., Sulaiman, M. R., Shukor, M. S., Shamaan, N. A., & Shukor, M. Y. (2016).** Isolation and characterization of a molybdenum-reducing and glyphosate-degrading *Klebsiella oxytoca* strain Saw-5 in soils from Sarawak. *AGRIVITA, Journal of Agricultural Science*, 38(1), 1-13.
103. **Sadrtdinova, G. R., & Vasiliev, D. A. (2017).** Efficiency of the use of nutritional media in the primary diagnosis of *klebsiellaoxytoca* bacteria. in agrarian science and education at the present stage of development: experience, problems and ways of their solution (pp. 255-260).
104. **Singleton P., (1999),** Bactériologie, Edition *Duonod* 4ème édition Paris. 415 p.
105. - **Solano-Serena, F., Marchal, R., & Vandecasteele, J. P. (2001).** Biodégradabilité de l'essence dans l'environnement: de l'évaluation globale au cas des hydrocarbures récalcitrants. *Oil & Gas Science and Technology*, 56(5), 479-498.
106. -**Sourzat, M. (2015).** Evaluation d'un procédé de dépollution des sols contaminés par du plomb, à l'aide de plantes ornementales associées à des microorganismes. Master 2 Sciences Technologie Santé Mention Biologie et Technologie du Végétal Spécialité : Production et Technologie du Végétal (ProTeV).
107. **Stanley, T., & Moore, J. E. (2000).** Long-term preservation of thermophilic *Campylobacter* species: a simple method. *British Journal of Biomedical Science*, 57(3), 214

108. **Sayyad, G., Afyuni, M., Mousavi, S.-F., Abbaspour, K. C., Richards, B. K & Schulin R., 2010**, Transport of Cd, Cu, Pb and Zn in a calcareous soil under wheat and safflower cultivation-A column study. *Geoderma*, vol. 154 pp. 311-320.
109. **SALAGER, (2002)**. Surfactants Types And Uses. Venezuela : laboratorio FIRP.
110. **S. K. Mehta. (2010)**. Biomimetic amphiphiles: Properties and Potential. 102-119
111. **Tortora G .J., Funke B.R. et CASE C. L., (2003)**. Introduction à la microbiologie. *Ed. de Renouveau pédagogique Inc.* pp : 157- 355.
112. **Uwem, U. M., Sunday, D. M., Wosilat, A. F., & Jonah, U. U. (2018)**. Bioremediation of petroleum sludge impacted soils using agro-waste from Moringa seed. *Science Journal of Analytical Chemistry*, 7(1), 1.
113. **Vandecasteele, J. P. (2005)**. Biodegradation des hydrocarbures aliphatiques et alicycliques. In *Microbiologie Pétrolière*, pp. 173-239. Edited by E. Technip. Paris.
114. **-Verdin, A., Sahraoui, A. L. H., & Durand, R. (2004)**. Les agents de la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures polycycliques aromatiques. *Déchets sciences et techniques*, 36, 30-37.
115. **Von Lau, E., Gan, S., Ng, H. K., Poh, P. E. (2014)**. Extraction agents for the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from soil in soil washing technologies. *Environmental pollution*, 184, 640-649.
116. **Willumsen P. A, (1996)**. Screening of bacteria, isolated from PAH- contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers
117. **Yang, Z., Wang, Z., Yang, C., Hollebone, B. P., Brown, C., & Landriault, M. (2013)**. **Evaluation** of total petroleum hydrocarbons (TPH) measurement methods for assessing oil contamination in soil. *Environmental Forensics*, 14(3), 193-203.
118. **Zeinali, M., Vossoughi, M., & Ardestani, S. K. (2007)**. Characterization of a moderate thermophilic *Nocardia* species able to grow on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Letters in applied microbiology*, 45(6), 622-628.
119. **Zobell S. (1946)** Microbial degradation of petroleum hydrocarbons an environmental perspective. 108-119
120. **Zajic J. E., Guignard H., Gerson D. F., 1977**. Properties And Biodegradation of a Bioemulsifier from *Corynebacterium hydrocarboclastus*. *Biotechnol. And Bioeng.* Vol. 19 No. 9, p.1303-1320.

Annexes

Annexe I -Milieux de culture utilisés :

Les milieux solides :

Milieu bouillon nutritif (BN)

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

pH=7,3±0,2

Milieu M

Eau distillée	1l
FeSO ₄	0.02g
MgSO ₄	1g
KH ₂ PO ₄	1g
Agar	15g

pH 7= ±0,2

Milieu Hektoen:

Protéose peptone	12g
Extrait de levure	3g

Annexes

Chlorure de sodium	5g
Thiosulfate de sodium	5g
Sels biliaires	9g
Citrate de fer ammoniacal	1,5g
Salicine	2g
Lactose	12g
Saccharose	12g
Fuchsine acide	0,1g
Bleu de bromothymol	0,065g
Agar	14g

pH final = $7,5 \pm 0,2$

Milieu Chromagar Orientation :

Peptone et extrait de levure	17g
Mix chromogéniques	1g
Agar	15g
Eau distillée	1L

pH= 7.0 ± 0.2

Milieu Gélose au sang cuit (chocolatée) :

Polypeptone	15g
Amidon de maïs	1g
Phosphate dipotassique	4g
Phosphate monopotassique	1g
Chlorure de sodium	10g
Gélose	10g
Eau distillée	1 L

P H final = $7,3 \pm 0,2$

Les milieux liquides :

Milieu M

Eau distillée	1l
FeSO ₄	0.02g
MgSO ₄	1g
KH ₂ PO ₄	1g

pH 7= ±0,2

Annexe II : Les techniques utilisées

Coloration de Gram :

1. Principe :

La coloration de Gram est la base de l'identification d'une souche bactérienne. Elle doit être parfaitement maîtrisée car c'est le point de départ du choix des examens complémentaires à effectuer, des milieux à ensemercer etc...

Au terme du processus de coloration, les bactéries dites « Gram Négatives » apparaissent roses tandis que les bactéries dites « Gram Positives » sont colorés en bleu foncé/violet.

La coloration de Gram est une coloration qui teste l'alcool résistance d'une souche bactérienne. En effet, les différences de coloration des bactéries reposent sur des différences de constitution de la paroi : Les bactéries Gram négatives ont une paroi plus fine que celles à Gram positives. De plus, cette paroi est très riche en lipides (membrane externe de la paroi) dans laquelle l'éthanol est fortement soluble...

2. Réactifs :

- Violet de gentiane phénique
- Lugol (iodo-iodure de potassium)
- Alcool à 95% (ou mélange alcool absolu+ 1/5ème d'acétone)
- Safranine (ou Fuchsine phéniquée de ziehl)

3. Mode opératoire :

1. Réaliser un frottis et le fixer à la flamme
2. Verser le Violet de Gentiane sur la lame ; laisser en contact 1 minute
3. Jeter le colorant et finir de la chasser par la solution de Lugol ; laisser agir le Lugol environ 1 min
4. Jeter le Lugol et faire couler de l'alcool sur la préparation ; rincer immédiatement à l'eau
5. Recouvrir la préparation de Safranine, laisser agir environ 1 min. laver abondamment.
6. Sécher au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen.

Observation microscopique :

Observer à l'objectif x 100, en immersion.

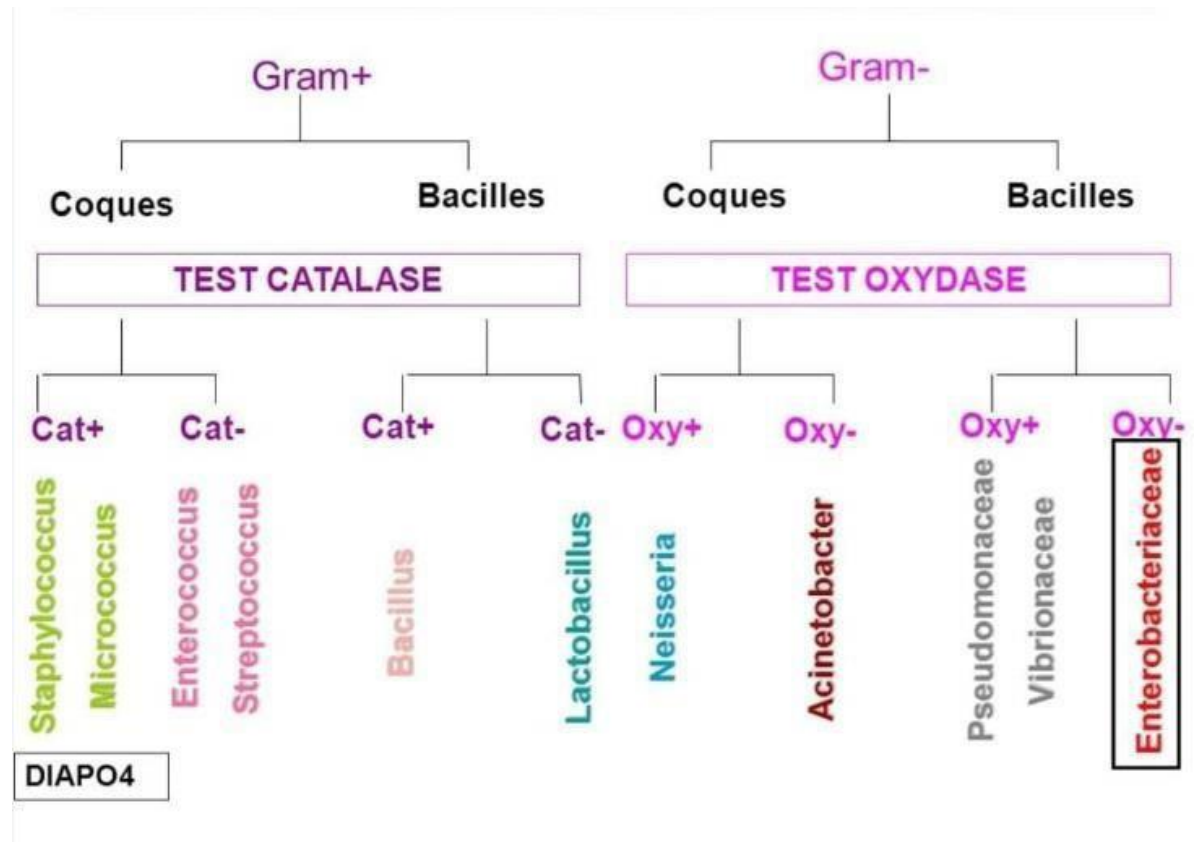
4. Résultats :

A l'issue de cette coloration, on peut distinguer :

- Des bactéries colorées en violet foncé ; elles ont gardé le violet, 'le gram' elles sont dites 'Gram positif'.
- Des bactéries colorées en rose ou rouge pâle ; elles ont perdu le violet, 'le Gram' elles sont dites 'gram négatif'.

Annexe III :

Orientation de l'identification bactérienne selon les critères morphologiques, biochimique



Annexe IV : 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 à l'emploi et standardisé.

La galerie comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Au-dessous de chaque tube, un sigle indique la nature du test. Les tubes sontensemencés avec une suspension bactérienne effectuée en eau physiologique. Les réactions produites au cours de la période d'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), production d'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 boîte 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.

- Dissocier soigneusement 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, le fabricant distingue deux parties, le tube et la cupule. Selon les tests, la suspension bactérienne doit être placée 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 doit remplir le tube et la cupule.
- Lorsque que le sigle du test est souligné (ADH, LDC, ODC, URE, H₂S), la suspension doit remplir uniquement le tube. Après ensemencement complet de la galerie, la cupule sera secondairement remplie d'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 et placer 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 goutte du réactif NIT 1 et une goutte du réactif NIT 2. Si aucune coloration rouge n'est obtenue (attendre deux à trois minutes), ajouter une petite quantité de poudre de zinc.

TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISEE API 20E






















Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β -galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d' α -naphthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO ₂ / N ₂	Nitrates (NO ₃)	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		



Figure1: Identification biochimique de la souche S4 par galerie Api 20E

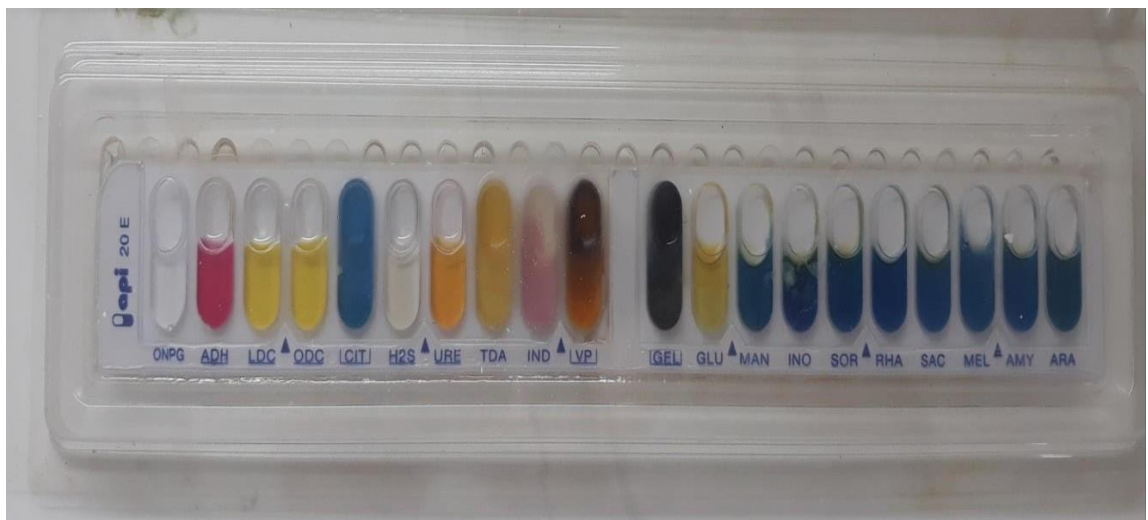


Figure2 : Identification biochimique de la souche S3 par galerie Api 20E

Remarque : un accident pendant l'addition de réactifs (VP et James) faussés les résultats de VP et IND sur la galerie API 20E, mais généralement la souche est caractérisé et identifiée en *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau II :

Tableau II	Classification des streptocoques,		
Caractéristiques	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>
Disposition prédominante (la plus commune en premier)	Chaines. paires	Paires, chaines	Paires, courtes chaines

Annexes

Capsule/couche de mucus	+	-	-
Habitat	Bouche, voies respiratoires	Système gastro-intestinal	Produits laitiers
Croissance a 45°C	Variable	+	-
Croissance a 10°C	Variable	Habituellement	+
Croissance dans du bouillon NaCl 6.5%	Variable	+	-
Croissance a pH 9.6	Variable	+	-
Hémolyse	Habituellement fi (pyogènes) ou u (oraux)		Habituellement -
Groupe sérologique de Lancefield	Variable (A-O)	Habituellement D	Habituellement N
Espèce représentatives	<p><i>Streptocoques pyogènes :</i></p> <p><i>S. agalactiae,</i> <i>S. pyogènes. S. equi,</i> <i>S. dysgalactiae</i></p> <p><i>Streptocoques oraux :</i></p> <p><i>S. gordonii, S. solvarius.</i> <i>S. sanguis, S. oralis,</i> <i>S. pneumoniae, S. mitis, S. mutans</i></p> <p><i>Autres streptocoques :</i></p> <p><i>S. bovis, S. thermophilus</i></p>	<p><i>E. faecalis,</i> <i>E faecium,</i> <i>E. avium, E. durans,</i> <i>E .gallinarum</i></p>	<p><i>L. lactis.</i> <i>L. raffinolactis.</i> <i>L plantarum</i></p>

Annexe V : Caractère physico-chimiques

Teneur en humidité : norme NF ISO : 1146

Matériel et réactifs :

- Etuve
- Dessiccateur
- Balance analytique
- Capsule en verre

Procédure opératoire :

- Mettre 100 g d'échantillon dans une capsule en verre puis laisser sécher dans une étuve à 105°C pendant 1 heure et puis mettre dans un dessiccateur jusqu'à refroidissement.

Calcul :

Le taux d'humidité en pourcentage est calculé comme suit :

$$H\% = ((P_i - P_f) \times 100) / P_i$$

P_i : poids initial de la prise d'essai en grammes

P_f : poids final de la prise d'essai en grammes

Dosage des hydrocarbures totaux par la méthode de RETORT: (API Recommended Practice 13B-2 Recommended Practice for Field Testing Oil-Based Drilling Fluids FIFTH EDITION | APRIL 2014).

Matériel et réactifs :

Retort (Distillateur à boue OFITE)

Balance analytique

Eprouvette graduée

Annexes

Procédure opératoire :

On remplit le godet avec l'échantillon à tester en prenant soin de noter son poids vide et plein. On note également le poids de l'éprouvette en verre vide. A la fin de la distillation, on note les volumes de l'huile et de l'eau récupérés ainsi que le poids de l'éprouvette en verre pleine de liquides. On note également le poids du godet. On procède ensuite au calcul des pourcentages massiques de l'eau, de l'huile et des solides.

Calcul :

Les volumes d'huile et d'eau mesurés en ml sont convertis en pourcentages massiques en utilisant les formules suivantes :

$$\% \text{ en huile} = \frac{100 (\text{Volume Huile Collecté} \times 0.83)}{\text{Poids Godet Plein Avant Distillation} - \text{Poids Godet Vide}}$$

$$\% \text{ en eau} = \frac{100 (\text{Volume Eau collecté})}{\text{Poids Godet Plein Avant Distillation} - \text{Poids Godet Vide}}$$

$$\% \text{ en Solides} = 100 - (\% \text{ en Huile} + \% \text{ en Eau})$$

Potentiel d'hydrogène : norme ISO 10523

Matériel et réactifs :

PH-mètre approprié de type inolab-WTW.

Procédure opératoire :

Le pH est mesuré en plongeant l'électrode combinée sur la solution liquide jusqu'à fixation de la valeur sur le pH-mètre.

Calcul :

La différence de potentiel mesurée est définie par la Loi de Nernst.



Figure : ph mètre

Conductivité électrique : norme NF EN 27888-1994

Matériel et réactif :

La mesure est faite par un appareil salino-conductivimètre de type inolab-WTW 740

Procédure opératoire :

Sa mesure s'effectue par l'utilisation d'une cellule de conductivité couplé à un conductimètre, en plongeant la cellule dans la solution de mesure.

Calcul :

La conductivité s'exprime en $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Salinité : non normalisé

Procédure opératoire :

Le mesure de salinité est effectué en parallèle avec la conductivité par le même appareil



Figure : appareil de salino-conductivimètre

Demande chimique en oxygène DCO : norme ISO 15705

1. Analyse des chlorures

Matériel et réactifs

- Chromate de potassium
- AgNO₃
- Burette automatique de type Titronic Universal

Procédure opératoire :

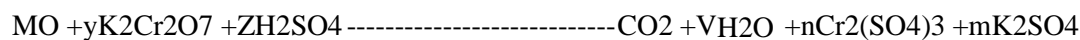
On mélange 2 ml d'échantillon avec 0,5 ml de chromate de potassium et on le dose avec une solution de AgNO₃ 0,5 N.



Figure : appareil de dosage burette automatique

1. Analyse de la DCO

Reaction:



Matériel et réactifs :

- Tubes de DCO avec réactifs de digestion et sulfate de mercure dont la gamme de concentrations se situe entre 20 et 1500 mg/l O₂ de qualité ACS
- Bloc chauffant à une température de 150 °C ± 2 °C de type WTW-CR4200
- Photoflex type WTW

Procédure opératoire :

Homogénéiser l'échantillon et Prélever 2,0 ml et l'introduire dans le tube, fermer et mélanger avant porter dans un bloc chauffant au 150 °C ± 2°C pendant 2 heures.

L'étalonnage est fait à la longueur d'onde du Photoflex à 600 nm. A l'aide d'un blanc et à l'ajustement au zéro on Note la lecture de la transmittance des solutions étalons et des échantillons.

Calcul :

Les résultats d'analyse Pour les échantillons pour lesquels il n'y a pas eu d'ajout de sulfate mercurique, le témoin est utilisé pour tracer la courbe. La concentration de la demande chimique en oxygène est exprimée en mg/l O₂ selon l'équation suivante :

$$A = C \times F$$

Où C : concentration de la demande chimique en oxygène dans l'échantillon

(mg/l O₂) ; A : concentration de la demande chimique en oxygène dans la solution dosée (mg/l O₂) ;

F : facteur de dilution, si nécessaire.



Figure : tubes DCO avant et après oxydation dans un bloc chauffant

2. Demande biologique en oxygène DBO5 : Norme NF EN 1899-1

Matériel et réactifs :

- Flacons en verre de 500 ml de capacité
- Barreau magnétique
- Incubateur à 20°C
- OXITOP WTW
- Pastilles de soude caustique.

Procédure opératoire :

Les échantillons homogénéisés et mesurés d'après le tableau d'essai sont remplis dans des flacons en verre bruns propres. Fermés par un support en caoutchouc qui contiendra deux pastilles de NaOH Et une tête OXITOP WTW, l'incubation commence après 2h d'enclenchement de la mise en marche d'incubateur DBO5 à température de 20°C.

Le pH doit être compris entre 6 et 7, sinon un ajustement de pH est nécessaire.