



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ KASDI MERBAH – OUARGLA
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : 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 :
M. GHOUINI Djamal

Thème :

**Traitement de sol pollué par les hydrocarbures pétroliers par
biostimulation (biochar _biosurfactant)**

Soutenu publiquement le : [17/06/2026]

Devant le jury :

Qualité	Nom et Prénom	Grade	Établissement
Président	Mme KHELIL Aminata	Professeur	UKM Ouargla
Examineur	Mme DJARBAOUI Amina Nesrine	MCB	UKM Ouargla
Encadrant	Mme BOUDERHEM Amel	MCB	UKM Ouargla

Année Universitaire : 2025/2026

Dédicace

Je dédie ce travail à mes chers parents, en témoignage de ma profonde gratitude, de mon respect et de ma reconnaissance pour leur amour, leurs sacrifices, leurs encouragements constants et leur soutien indéfectible tout au long de mon parcours académique.

Je le dédie également à toute ma famille, particulièrement à la famille «*GHOUINI*», pour leur affection, leur soutien moral et leurs précieux conseils.

Mes sincères remerciements et ma reconnaissance vont aussi à toutes les personnes qui nous ont aidés et accompagnés dans notre parcours universitaire, de près ou de loin.

J'exprime également ma profonde gratitude à l'ensemble des enseignants et du personnel de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et tout particulièrement à ceux du Département des Sciences Biologiques, pour leur encadrement, leur disponibilité et les connaissances qu'ils nous ont transmises tout au long de notre formation.

À tous ceux qui ont contribué à notre réussite, je dédie humblement ce travail avec respect et reconnaissance.

Remerciement

Avant tout, nous rendons grâce à Allah le Tout-Puissant pour Sa bénédiction, Sa guidance et la force qu'Il nous a accordée pour mener à bien ce modeste travail. Sans Son aide, nous n'aurions jamais pu atteindre cet objectif.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à notre estimée directrice de mémoire, Madame BOUDERHEM Amel, pour ses efforts considérables, sa générosité scientifique intellectuelle, son soutien indéfectible, sa patience et ses précieuses orientations qui ont grandement enrichi notre travail de recherche.

Nous exprimons notre profond respect et notre vive considération aux éminents membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail:

Madame KHELIL Aminata, Présidente du jury.

Madame DJARBAOUI Amina Nesrine, Examinatrice du jury.

Nos remerciements s'adressent également à Monsieur BELKHALFA Hakim, Directeur de la Plateforme Technologique d'Analyses Physico-Chimiques (CRAPC Ouargla), pour nous avoir ouvert les portes des laboratoires, ainsi qu'à l'ensemble du personnel technique pour leur accueil et leur aide précieuse.

Un grand merci à tous nos honorables enseignants, véritables piliers du savoir et flambeaux de la connaissance, qui nous ont guidés tout au long de notre parcours universitaire. Nous tenons à mentionner particulièrement:

Monsieur HENNI Abdellah

Monsieur AZIB Salim

Monsieur BOURICHA Mohamed

Enfin, nous adressons nos remerciements du fond du cœur aux services administratifs de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et plus particulièrement au Département des Sciences Biologiques, pour leur soutien continu. Que Dieu vous récompense tous de la meilleure des manières.

Traitement de sol pollué par les hydrocarbures pétroliers par biostimulation (biochar _biosurfactant)

Résumé

Cette étude a évalué l'efficacité d'une stratégie de biostimulation et bio augmentation fondée sur l'action synergique du biochar, des biosurfactants et des micro-organismes autochtones pour la remédiation des sols contaminés par les hydrocarbures pétroliers issus des régions de Hassi Messaoud et de Haoud Berkaoui et Rhourd Nouss (Illizi). Dans cette optique, les souches bactériennes et fongiques hydrocarbonoclastes isolées ont été immobilisées sur des biochars synthétisés à partir de feuilles de palmier dattier et de marc de café ; les résultats expérimentaux ont mis en évidence la supériorité du biochar de feuilles de palmier en termes de capacité de rétention microbienne, confirmant ainsi son aptitude en tant que support biologique optimal.

En outre, le traitement appliqué a permis une réduction significative des métaux lourds. L'évaluation du taux de dégradation des hydrocarbures totaux pétroliers (HTP) a montré que le procédé basé sur le biochar immobilisé associé aux biosurfactants a obtenu le rendement épuratoire le plus élevé, atteignant 22,9 %, contre 17,6 % pour le traitement biologique reposant uniquement sur les micro-organismes. Parallèlement, une diminution de la biodisponibilité des métaux lourds a été observée après traitement, avec des taux de réduction atteignant 37,25 % pour le mercure (Hg), 8,70 % pour le chrome (Cr) et 7,84 % pour le plomb (Pb). L'ensemble de ces résultats met en évidence que la combinaison biochar–biosurfactants–micro-organismes autochtones constitue une approche biotechnologique efficace, écologique et durable pour la bioremédiation des sols contaminés par les hydrocarbures pétroliers.

Mots-clés : Biostimulation, Bio augmentation, Biochar, Biosurfactants, Hydrocarbures pétroliers, Métaux lourds, Bioremédiation.

Treatment of soil polluted by petroleum hydrocarbons by biostimulation (Biochar _Biosurfactant)

Abstract :

This study evaluated the efficacy of a biostimulation and bioaugmentation strategy based on the synergistic action of biochar, biosurfactants, and indigenous microorganisms for the remediation of soils contaminated with petroleum hydrocarbons in the Hassi Messaoud, Haoud Berkaoui, and Rhourd Nouss (Illizi) regions. Hydrocarbonoclastic bacterial and fungal strains were immobilized on biochars synthesized from date palm leaves and coffee grounds. Experimental results demonstrated the superiority of date palm leaf biochar in terms of microbial retention capacity, confirming its suitability as an optimal biological support.

Furthermore, the applied treatment enabled a significant reduction in heavy metal content. The evaluation of total petroleum hydrocarbon (TPH) degradation rates showed that the process utilizing immobilized biochar combined with biosurfactants achieved the highest purification yield, reaching 22.9%, compared to 17.6% for biological treatment using only microorganisms. Concurrently, a decrease in heavy metal bioavailability was observed post-treatment, with reduction rates reaching 37.25% for mercury (Hg), 8.70% for chromium (Cr), and 7.84% for lead (Pb). These findings indicate that the combination of biochar, biosurfactants, and indigenous microorganisms constitutes an effective, ecological, and sustainable biotechnological approach for the bioremediation of petroleum-contaminated soils.

Keywords: Biostimulation, Bioaugmentation, Biochar, Biosurfactants, Petroleum Hydrocarbons, Heavy Metals, Bioremediation.

المعالجة الحيوية للتربة الملوثة بالهيدروكربونات النفطية عن طريق التحفيز الحيوي (المستحلبات الحيوية والفحم الحيوي)

ملخص:

قيمت هذه الدراسة فعالية استراتيجية التحفيز الحيوي والتعزيز الحيوي القائمة على العمل التآزري للفحم الحيوي، والمواد الخافضة للتوتر السطحي الحيوية، والكائنات الدقيقة المحلية لمعالجة التربة الملوثة بالهيدروكربونات النفطية في مناطق حاسي مسعود، وحوض بركاوي، ورورد النص (إيليزي). في هذا السياق، تم تثبيت السلالات البكتيرية والفطرية المستهلكة للهيدروكربونات على فحم حيوي تم تصنيعه من سعف نخيل التمر وتقل القهوة؛ حيث أظهرت النتائج التجريبية تفوق فحم سعف النخيل من حيث قدرته على الاحتفاظ بالميكروبات، مما يؤكد صلاحيته كدعم بيولوجي مثالي.

علاوة على ذلك، أدت المعالجة المطبقة إلى انخفاض كبير في تركيز المعادن الثقيلة. أظهر تقييم معدل تحليل إجمالي الهيدروكربونات النفطية أن العملية القائمة على الفحم الحيوي المثبت المرتبط بالمواد الخافضة للتوتر السطحي الحيوية حققت أعلى كفاءة تنقية، حيث بلغت 22.9%، مقابل 17.6% للمعالجة البيولوجية التي تعتمد فقط على الكائنات الدقيقة. بالتوازي مع ذلك، لوحظ انخفاض في التوافر الحيوي للمعادن الثقيلة بعد المعالجة، مع معدلات انخفاض بلغت 37.25% للزئبق، و8.70% للكروم، و7.84% للرصاص. تشير هذه النتائج مجتمعة إلى أن الجمع بين الفحم الحيوي، والمواد الخافضة للتوتر السطحي الحيوية، والكائنات الدقيقة المحلية يشكل نهجاً تكنولوجياً حيوياً فعالاً، وصديقاً للبيئة، ومستداماً لمعالجة التربة الملوثة بالهيدروكربونات النفطية.

الكلمات المفتاحية: التحفيز الحيوي، التعزيز الحيوي، الفحم الحيوي، المواد الخافضة للتوتر السطحي الحيوية، الهيدروكربونات النفطية، المعادن الثقيلة، المعالجة الحيوية.

LISTES DES FIGURES

Figure 1 .Bourbier pétrolier dans la région de Haoud Berkaoui, Ouargla.	19
Figure 2 .Structures squelettiques (ou liaisons carbone-carbone) des n-alcanes présents dans le pétrole (D'après Hunt., 1996).....	23
Figure 3.Structures des iso-alcanes (alcanes à chaîne ramifiée) présents dans le pétrole (D'après Hunt., 1996).	23
Figure 4.Structures chimiques du groupe d'hydrocarbures mono aromatiques connus collectivement sous le nom de BTEX (Montoya et al., 2018).....	24
Figure 5 .Structures des cyclo-alcanes présents dans le pétrole (D'après Hunt., 1996).....	25
Figure 6.Schéma de principe du procédé de bioaugmentation pour la décontamination d'un milieu (Goswami et al., 2018).....	27
Figure 7 .Schéma de principe du procédé de biostimulation pour la décontamination d'un milieu (Goswami et al., 2018).....	28
Figure 8 .Schéma de principe du procédé de biostimulation pour la décontamination d'un milieu (Goswami et al., 2018).....	31
Figure 9 . puits pétrolier OMM763, situé dans la région de Hassi Messaoud et Haoud Berkaoui.	36
Figure 10 .Dispositif de pyrolyse (four à moufle)	40
Figure 11 . Différentes modalités du sol au cours de l'expérimentation	45
Figure 12.Aspect macroscopique des isolats bactériens.	48
Figure 13.Observation microscopique des souches fongiques isolées C1 , C2 C3, C4, C5 et C6 au microscope optique (grossissement $\times 100$), respectivement.	55
Figure 14.Interactions in vitro entre les souches bactériennes isolées B1, B2, B3, B5, B6,B7 et B10.	57
Figure 15.Produit final de la pyrolyse des feuilles de palmier dattier.	59
Figure 16.Produits final de la pyrolyse de marc de café.....	60
Figure 17.Observation morphologique au microscope électronique à balayage (MEB) du biochar élaboré à partir de marc de café	60
Figure 18.Observation morphologique au microscope électronique à balayage (MEB) du biochar élaboré à partir de feuilles de palmier dattier.	61
Figure 19.Analyse élémentaire par EDX des différents biochars utilisés : (1) Profil spectral du biochar de marc de café ; (2) Profil spectral du biochar de feuilles de palmier dattier	62
Figure 20 . Nano -biochar	64
Figure 21.Variation de la biomasse des souches bactériennes avant et après immobilisation sur biochar.....	65
Figure 22.Évaluation comparative de l'efficacité d'immobilisation d'un consortium microbien sur différents types de biochar (BCPD et BCMC).....	66
Figure 23.Observation au microscope électronique à balayage (MEB) des micro-organismes immobilisés sur le biochar.	67

Figure 24 .Schéma représentant le processus d'immobilisation des micro-organismes par l'application du biochar.....	68
Figure 25. Comparaisons des performances de dégradation des hydrocarbures des trois modalités expérimentales.....	71
Figure 26. Pourcentage de diminution des concentrations en métaux lourds (Hg, Pb et Cr) après traitement par biostimulation.	73
Figure 27. feuilles de palmier dattier	101
Figure 28 . Souches bactériennes purifiées dans des tubes de milieu nutritif liquide (étape préalable à la préparation d'un consortium microbien).	101
Figure 29 .Mélange de souches bactériennes formant un consortium	102
Figure 30 .Mélange de souches Fongiques formant un consortium	102
Figure 31 .Trois répétitions expérimentales de sols contaminés par des hydrocarbures pétroliers amendés avec du biochar enrichi en microorganisms.....	103
Figure 32 .Essai expérimental en triplicat de sols contaminés par des hydrocarbures pétroliers, traités par inoculation de suspensions bactériennes et fongiques	103
Figure 33 .Dispositif expérimental témoin en triplicat, constitué de sols contaminés par des hydrocarbures pétroliers sans ajout exogène	103
Figure 34 .Profil biochimique des souches bactériennes révélé par le système API 20E.....	104

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I .Microorganismes utilisés dans les études de bioaugmentation (Goswami et al., 2018)	27
Tableau II.Caractéristiques des sites de prélèvement.....	35
Tableau III . Identification préliminaire et caractéristiques microscopiques et biochimiques des souches bactériennes isolées.....	48
Tableau IV. Étude morphologique des souches fongiques	51
Tableau V. Résultats des interactions inter-souches bactériennes.....	56
Tableau VI. Résultats des interactions inter-souches fongiques.....	57
Tableau VII. Résultats des interactions entre souches bactériennes et fongiques	58
Tableau VIII. Rendements en biochar des deux matières végétales utilisées.	59
Tableau IX. Caractérisation élémentaire des biochars obtenue par analyse EDX.....	61
Tableau X. Caractéristique chimique de biochar	63
Tableau XI.l'état physico-chimique et microbiologique initial d'un sol pollué avant tout traitement.....	70
Tableau XII.Comparaison de valeur de ph et de salinité des bacs après le traitement par biostimulation	74
Tableau XIII. Les composants des milieux	93
Tableau XIV.Les appareils utilisés.....	95

Tableau XV.La coloration des bactéries isolées par la coloration de Gram	98
Tableau XVI.Caractéristiques physico-chimiques du gasoil (KHODJA , 2008).....	99

LISTE DES ABREVIATIONS

PHCs : Hydrocarbures pétroliers.
POAs : Hydrocarbures aromatiques polycycliques.
HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène .
Fe : Fer .
EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique .
C : Carbone.
N : Azote.
P : Phosphore.
CO₂ : Dioxyde de carbone.
H₂O : Eau.
pH : potentiel hydrogène.
MEOR : Récupération améliorée du pétrole par des micro-organismes
US-EPA : US Environmental Protection Agency
CMC : Concentration micellaire critique.
FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.
BCPD : biochar de palmier dattier
BCMC : biochar de marc des caffè
MEB : Microscope électronique à balayage
SAA : Spectrométrie d'Absorption Atomique
BTEX : Benzene Toluene Ethylbenzene xylenes

PAH : Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

Table des matières

Résumé.....	4
Abstract :.....	5
LISTE DES TABLEAUX.....	7
<i>Chapitre I : Synthèse bibliographique</i>	16
I.1.1.Hydrocarbures pétroliers.....	17
I.1.2. Fluide de forage.....	17
I.1.3. Bourbiers	18
I.1.4. Effets des hydrocarbures sur les sols.....	19
I.2 1. Rôle des microorganismes dans la dégradation des hydrocarbures.....	21
I.2.2. Différentes techniques de bioremediation.....	26
I.2.2.1. Atténuation naturelle.....	26
I.2.2.2 Bioaugmentation.....	26
I.2.2.3. Biostimulation	27
I.2.2.4. Combinaison Biostimulation et Bioaugmentation	28
I.3.Rôle du biochar dans la stimulation et la modulation des communautés microbiennes du sol.....	29
I.3. Biochar.....	29
I.3.1. Interet de biochar.....	29
I.3.2. Mécanismes d'interaction entre le biochar et les communautés microbiennes Du sol.....	29
a) Efficacité de dégradation.....	29
b) Adaptabilité environnementale	30
c) Synergie communautaire	30
I.3.3. Immobilisation des microorganismes sur le biochar	30
I.3.3.1 .Processus d'immobilisation microbienne	30
I.3.3.2.Facteurs influençant l'immobilisation des microorganismes sur le biochar.	32
a)Propriétés physico-chimiques du biochar	32
b)Composition nutritive et teneur en cendres.....	32
c) Température de pyrolyse	32
d) pH environnemental	32
e)Concentration initiale des contaminants.....	32
f)Compétition microbienne et conditions Environnementales.....	33

g)Structure poreuse et protection contre les prédateurs.....	33
h)Propriétés chimiques du biochar et survie de L'inoculum.....	33
Chapitre II : Méthodologie	34
II. Méthodologie	35
II.1.Échantillonnage	35
II.2. Isolement et sélection des microorganismes aérobies hydro-carbonoclastes	36
II.2.1. Purification	36
II.2.2. Etude des interactions microbiennes	36
II.2.3 Pré -identification des souches sélectionnées	37
II.3. Préparation de biochar	39
II.3.1. Analyse du biochars	40
II.3.1.1. Caractéristiques physiques	40
II.3.1.2.Caractéristiques chimiques	40
II.3.2. Préparation du nano-biochar par traitement ultrasonique	41
II.4. Inoculation (Formation des biofilms microbiens)	41
II.4.1. Préparation d'inoculum bactérienne et fongique	41
II. 4.2. Immobilisation les cellules microbiennes sur le biochar	41
II.4.3. Vérification de l'immobilisation des microorganismes sur le biochar	42
II.5. Mise en place du dispositif expérimental de traitement d'un sol pollué	42
II.5.1.1.pH du sol	42
II.5.1.2. Mesure du la conductivité électrique (CE)	43
II.5.1.3. Dosage des métaux lourds par spectrométrie d'absorption atomique (SAA)	43
II.5.1.4. Évaluation de la contamination pétrolière	43
II.5.1.5. Evaluation de flore microbienne totale du sol	43
II.5.2. Dispositif de traitement	44
Chapitre III : Résultats et discussion	46
III.1. Isolement des souches bactériennes et fongiques hydrocarbonoclastes	47
III.2.Pré -identification des souches sélectionnées	47
III.2.1.Pré -identification des souches bactérienne	47
III.2.1.1. Caractéristiques macroscopiques des isolats bactériens	47
III.2.2. Pré-identification des souches bactériennes isolées	48
III.2.3. Pré-identification des isolats fongiques	51
1. Étude macroscopique	51

2.	Étude microscopique	54
III. 3.	les interactions entre les souches bactériennes et fongiques	56
III.4.	Production de biochar	58
III.4.1	Rendement en biochar.....	58
III.3.2.2.	Caractéristiques chimiques.....	63
III.4.3.	Préparation de nano biochar.....	64
III.5.	Immobilisation	64
III.5.1.	Résultats des mesures de la densité optique (DO) avant et après l'immobilisation microbienne sur biochar.....	64
III.6.	Traitement du sol polluée.....	69
III.6.1.	Caractéristiques physico-chimiques des sols étudiés.....	69
III.6.1.1.	Aspect physique des sols contaminés étudiés.....	69
III.6.1.2.	Caractéristique phsico -chimiques et microbiologiques de sol	70
III.6.2.	Résultats de traitement	71
III.6.2.1.	Le Taux de biodégradation des hydrocarbures	71
III.6.3.	Évolution de pH et de salinité.....	74
Conclusion :		75
Références		77
Annexes		92

Introduction générale

La contamination des sols par les hydrocarbures pétroliers constitue aujourd'hui l'une des problématiques environnementales les plus préoccupantes à l'échelle mondiale. L'essor rapide des activités industrielles liées à l'exploration, à l'extraction et au raffinage du pétrole a engendré des perturbations profondes de l'équilibre des écosystèmes terrestres, compromettant les propriétés physiques, chimiques et biologiques des sols, et menaçant la santé des organismes vivants ainsi que la durabilité des ressources naturelles **(Fuentes et al., 2014)** .

En Algérie, la région de Hassi Messaoud représente l'un des pôles pétroliers les plus importants du pays, où l'exploitation intensive des ressources souterraines a conduit à une contamination chronique des sols environnants. Les prélèvements effectués au niveau du puits pétrolier OMM763 ainsi qu'au sein de la zone de Haoud Berkaoui témoignent d'une pollution avérée par les hydrocarbures totaux du pétrole (HTP). Incluant les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les composés monocycliques de type BTEX (Benzène, Toluène, Éthylbenzène, Xylène). Ces polluants, en s'accumulant dans les horizons pédologiques, altèrent significativement la structure des agrégats du sol, réduisent la disponibilité des nutriments et inhibent les communautés microbiennes autochtones, compromettant ainsi les fonctions écosystémiques fondamentales du sol. **(Boudiaf et al., 2023)**

Face à l'ampleur de ce phénomène, les techniques de remédiation conventionnelles de nature physico-chimique — se révèlent souvent coûteuses, peu sélectives et susceptibles de générer des impacts environnementaux secondaires indésirables. C'est pourquoi la bioremédiation s'est imposée comme une alternative écologique, efficiente et économiquement viable. Parmi les stratégies biologiques disponibles, la biostimulation occupe une place centrale : elle consiste à stimuler l'activité des microorganismes indigènes déjà présents dans les sols contaminés, en leur apportant les conditions favorables à leur développement et à l'expression de leurs capacités cataboliques vis-à-vis des hydrocarbures **(Gilan et al., 2022)** .

Dans ce contexte, le biochar — matériau carboné issu de la pyrolyse de la biomasse végétale en conditions hypoxiques — présente des propriétés physico-chimiques remarquables : une grande surface spécifique, une porosité élevée et une capacité d'adsorption prononcée. Ces caractéristiques en font un support d'immobilisation microbienne privilégié, permettant de concentrer et de protéger les populations bactériennes et fongiques impliquées dans la dégradation des polluants organiques. La présente étude exploite deux sources de biomasse locales et disponibles, les feuilles de palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) et le marc de café

(*Coffea arabica*) ou (*Coffea robusta*) pour la production de biochar, valorisant ainsi des sous-produits agro-industriels dans une perspective d'économie circulaire .

Par ailleurs, l'utilisation de biosurfactants (molécules tensioactives d'origine microbienne) est envisagée comme complément à la biostimulation. Ces composés amphiphiles facilitent la biodisponibilité des hydrocarbures hydrophobes en réduisant leur tension interfaciale, augmentant ainsi leur accessibilité aux enzymes microbiennes dégradantes. La synergie entre biochar, biosurfactants et consortiums microbiens autochtones constitue ainsi le socle de la stratégie thérapeutique proposée dans cette étude .

C'est dans ce cadre scientifique et environnemental que s'inscrit la problématique centrale de ce travail : dans quelle mesure les microorganismes autochtones isolés à partir de sols contaminés par les hydrocarbures pétroliers, immobilisés sur un biochar d'origine végétale locale et associés à des biosurfactants, sont-ils capables d'assurer une bioremédiation efficace, reproductible et écologiquement durable de ces sols pollués ?

Pour répondre à cette question, la présente recherche poursuit plusieurs objectifs complémentaires : (I) l'isolement et la caractérisation morphologique, biochimique et fonctionnelle des souches bactériennes et fongiques autochtones à potentiel dégradant ; (II) la préparation et la caractérisation physico-chimique du biochar issu de deux biomasses végétales locales ; (III) l'immobilisation des consortiums microbiens sur ce biochar et la vérification de l'adhésion cellulaire par mesure de la densité optique ; et (IV) l'évaluation comparative de l'efficacité de traitement des sols pollués selon différents dispositifs expérimentaux incluant biostimulation par biochar enrichi, inoculation directe et témoin sans apport exogène .

Le présent mémoire est structuré en trois chapitres. Le premier chapitre développe la synthèse bibliographique ; il aborde successivement les généralités sur le sol et ses propriétés physico-chimiques, la pollution des sols par les hydrocarbures pétroliers et ses impacts écosystémiques, les différentes techniques de bioremédiation microbiologique, ainsi que le rôle du biochar dans la stimulation et la modulation des communautés microbiennes du sol. Le deuxième chapitre décrit le matériel et les méthodes expérimentales mis en œuvre, tandis que le troisième chapitre présente et discute les résultats obtenus. Enfin, le travail se clôt par une synthèse des apports scientifiques de l'étude et les perspectives envisagées.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1. Pollution par les hydrocarbures pétroliers

La pollution des sols est définie comme l'accumulation dans les milieux de composés toxiques persistants, de produits chimiques, de sels, de matériaux radioactifs ou d'agents pathogènes, qui ont des effets néfastes sur la croissance des plantes et la santé des animaux (Okrent, D., 1999) Ces composés diffèrent toutefois par leur nature chimique, leur structure moléculaire et leur comportement dans le sol, ce qui influence fortement leur degré de persistance et de biodégradabilité. Certains polluants, tels que les hydrocarbures aliphatiques simples ou certains composés organiques biodégradables, peuvent être relativement rapidement décomposés par l'activité microbienne du sol. En revanche, d'autres substances, notamment les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Kebede et al., 2021).

I.1.1.Hydrocarbures pétroliers

Les hydrocarbures sont des composés organiques contenant exclusivement des atomes de carbone (C) et d'hydrogène (H), le terme « hydrocarbure pétrolier » est un terme générique qui désigne les mélanges de composés organiques présents dans des matières géologiques comme l'huile, le bitume et le charbon ou dérivés de ces matières. Ils constituent la fraction la plus importante d'un brut pétrolier, ils représentent entre 65 et 95 % de la plupart des pétroles bruts. Ces hydrocarbures peuvent être classés en quatre familles principales qui sont présentes en proportions variables selon leur origine : les hydrocarbures saturés (30 à 70 %), les hydrocarbures aromatiques et poly-aromatiques (20 à 40 %), les composés polaires (5 à 25 %) et les asphaltènes (0 à 10 %) (Guermouche et al., 2015).

I.1.2. Fluide de forage

I.1.2.1.Définition

Le fluide de forage, appelé aussi boue de forage, est un système composé de différents constituants liquides (eau, huile) et/ou gazeux (air, gaz naturel) contenant en suspension d'autres additifs minéraux et organiques (argiles, polymères, tensioactifs, déblais, ciments, etc.), ces produits doivent conférer à la boue des propriétés qui permettent d'obtenir des rendements élevés au cours des forages (Aitoumeraci., 2020) .

I.1.2.2 .Classification des fluides de forage

Les fluides de forage sont classés en trois catégories principales selon la nature du fluide de base utilisé dans leur formulation : l'air, l'eau ou l'huile (Aitoumeraci., 2020).

a) Fluides de forage à base de gaz

Ce sont des fluides dont la phase continue est constituée d'un gaz, généralement mélangé avec de l'eau en proportions variables. Le gaz utilisé peut être de l'air ou du gaz naturel. Ces fluides se présentent sous forme de mousse ou de brouillard (Aitoumeraci., 2020).

b) Fluides de forage à base d'eau

Ces fluides sont couramment désignés par l'appellation anglo-saxonne « Water-Based Muds » (WBM). Ils sont dans la majorité des cas constitués de suspensions de bentonite dans l'eau, avec des concentrations généralement comprises entre 30 et 60 g/L (Aitoumeraci., 2020).

c) Fluides de forage à base d'huile

Les fluides à base d'huile, généralement dénommés « Oil-Based Muds » (OBM), sont des systèmes dans lesquels la phase continue est constituée d'une huile minérale (pétrole brut, fuel, gasoil, etc.), tandis que la phase dispersée est composée d'eau. La phase continue la plus couramment utilisée jusqu'aux dernières années était le gasoil (Aitoumeraci., 2020).

I.1.3. Bourbiers

Sur les champs pétroliers, les systèmes à base d'eau (WBM) sont généralement employés pour le forage des premières phases du puits, tandis que des systèmes à base d'huile (OBM) sont utilisés pour les phases ultérieures.

L'utilisation du gasoil comme constituant majeur dans une formulation de boue à base d'huile varie en fonction du rapport huile/eau. Pour un volume de 1 m³ de boue formulée, ce rapport peut osciller entre 50 % et plus de 90 % par rapport au volume total de la boue préparée (Khodja., 2008).

À la sortie du puits, le fluide de forage remonte chargé de déblais de forage. Ces déblais sont séparés du fluide de forage par un procédé de tamisage. Les déblais solides ainsi séparés sont généralement stockés dans une grande excavation spécialement réalisée à cet effet, communément appelée bourbier (Aitoumeraci., 2020).

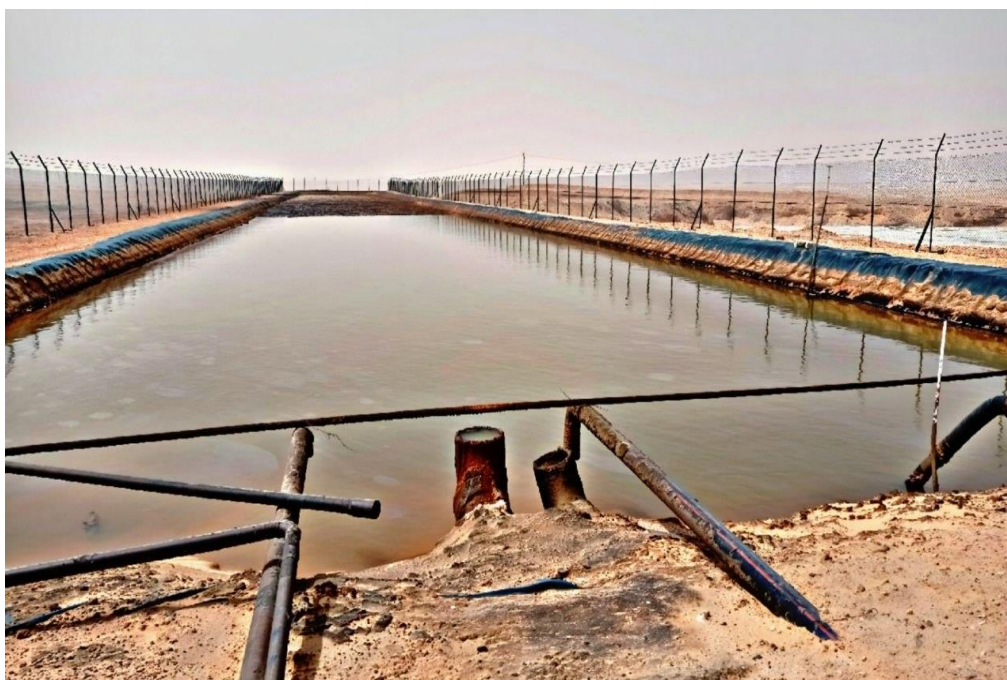


Figure 1 .Bourbier pétrolier dans la région de Haoud Berkaoui, Ouargla.

I.1.4. Effets des hydrocarbures sur les sols

Les hydrocarbures pétroliers sont principalement constitués de carbone et d'hydrogène, accompagnés parfois de faibles proportions de soufre, d'azote et d'oxygène. Leur accumulation dans le sol entraîne une perturbation importante des propriétés physico-chimiques et biologiques du sol, ce qui affecte directement son fonctionnement écologique et sa fertilité (Majeed et al., 2025).

La présence de ces composés dans le sol provoque un déséquilibre du rapport carbone/azote (C/N), entraînant une carence en azote assimilable par les microorganismes. Cette situation limite leur activité métabolique et ralentit les processus naturels de décomposition de la matière organique et de recyclage des éléments nutritifs essentiels au maintien de la fertilité du sol (Haider et al., 2021).

Par ailleurs, les hydrocarbures pétroliers modifient les propriétés physiques du sol en réduisant sa porosité, sa perméabilité et sa capacité de rétention en eau. Leur caractère hydrophobe favorise l'obstruction des pores du sol et diminue l'infiltration de l'eau et de l'oxygène vers les horizons profonds, ce qui crée des conditions défavorables au développement des microorganismes aérobies et à la croissance racinaire des plantes (Kuppusamy et al., 2017; Sakshi & Haritash., 2019). En outre, la contamination par les hydrocarbures entraîne une diminution de la biomasse microbienne et de la diversité des

communautés microbiennes du sol. Certaines fractions toxiques, notamment les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), peuvent inhiber l'activité enzymatique du sol et perturber les cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote et du phosphore, affectant ainsi la qualité biologique du sol (**Alrumman et al., 2015**) .

De plus, plusieurs études ont montré que la contamination par les hydrocarbures provoque des effets phytotoxiques importants, notamment la réduction du taux de germination des graines, l'inhibition de la croissance racinaire et la diminution de la teneur en chlorophylle des plantes. Ces effets contribuent à la dégradation progressive de la productivité agricole des sols contaminés (**Haider et al., 2021**) .

Enfin, la persistance des hydrocarbures dans le sol peut favoriser leur migration vers les nappes phréatiques et entraîner une contamination secondaire des ressources en eau souterraine. Cette situation représente un risque environnemental majeur pour les écosystèmes terrestres et aquatiques et souligne la nécessité de développer des stratégies efficaces et écologiques de remédiation des sols contaminés (**Varjani., 2017**) .

La contamination des sols par le pétrole et ses dérivés altère de manière significative l'ensemble des propriétés édaphiques, incluant les paramètres physiques, physico-chimiques et chimiques (**Zahermand et al., 2020**). L'ampleur de ces modifications dépend étroitement de la nature du sol, de son état initial, ainsi que du type et de la concentration du contaminant. Sous l'effet de la pollution et de la formation d'un film pétrolier enrobant les particules de terre, la couleur du profil pédologique vire au gris ou au brun foncé (**Abu-Khasan et al., 2021**).

Cette modification chromatique de la surface réduit les propriétés de réflexion lumineuse du sol (**Salimnezhad et al., 2021**). On observe toutefois que l'albédo des sols pollués augmente proportionnellement au temps, sous l'effet de la transformation des hydrocarbures, un phénomène qui favorise un réchauffement plus important de ces substrats. En raison de l'enrobage des particules par des films hydrophobes composés de molécules pétrolières à haut poids moléculaire, le sol perd sa capacité d'absorption et de rétention d'eau. Il en résulte une diminution considérable de la conductivité et de la capacité hydrique.

L'accentuation de l'hydrophobie provoque le dessèchement des couches superficielles contaminées, tandis que les horizons inférieurs, plus propres, subissent une humidité excessive. Ce déséquilibre hydrique et gazeux favorise l'installation de processus anaérobies (**Wang et al., 2021 ; Hewelke et al., 2018**). Ces conditions hydriques anormales réduisent la solubilité

et la biodisponibilité des oligo-éléments pour la végétation, inhibant ainsi les processus de nitrification et d'ammonification.

Par ailleurs, les eaux adjacentes aux zones pétrolières présentent souvent de fortes concentrations en sodium. Les ions sodium intègrent le complexe adsorbant du sol et se substituent aux cations régulateurs de pH, entraînant ainsi une élévation du pH du sol (Camenzuli et al., 2015 ; Klamerus-Iwan et al., 2015). Le pétrole altère également les propriétés rédox : le défaut d'aération et l'anaérobiose en profondeur abaissent le potentiel d'oxydoréduction, pouvant causer un engorgement, voire un ennoïement de la surface.

I.2. Bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures

La bioremédiation est une approche efficace, économique et écologique, qui a progressivement gagné en popularité pour la minéralisation des contaminants organiques dans les eaux usées (Aragaw., 2021) et les sols (Sayara et Sánchez., 2020). En particulier, la bioremédiation des sols contaminés par les PHCs a suscité un intérêt croissant en raison de son caractère respectueux de l'environnement (Roy et al., 2018). Les microorganismes jouent un rôle essentiel dans la biotransformation des mélanges complexes de polluants lors de la restauration des sols contaminés (Macaulay et Rees., 2014).

La littérature scientifique montre qu'un grand nombre de microorganismes (bactéries, champignons et certaines algues), ainsi que diverses espèces végétales, sont capables de minéraliser complètement les PHCs en CO₂, H₂O, composés inorganiques, protéines cellulaires et composés organiques simples présents dans le sol et l'eau (Das et Chandran., 2011). Cependant, l'activité biologique des microorganismes est influencée par de nombreux facteurs environnementaux, notamment les sources d'énergie, la biodisponibilité, la bio activité, la biochimie, la disponibilité en oxygène et en nutriments, le pH, la température et l'inhibition métabolique (Kebede et al., 2021).

I.2.1. Rôle des microorganismes dans la dégradation des hydrocarbures

Les microorganismes constituent un élément clé du fonctionnement des sols, en intervenant activement dans la décomposition de la matière organique, le recyclage des éléments nutritifs et la biodégradation des polluants (Kebede et al., 2021).

I.2.1.1. Microorganismes dégradant les hydrocarbures aliphatiques

Les microorganismes capables d'oxyder les hydrocarbures aliphatiques sont essentiellement des bactéries et diverses levures présentes en abondance dans les sols (Aitoumeraci., 2020).

a) n-alcanes

La dégradation des hydrocarbures aliphatiques par les microorganismes alcanotrophes montre une spécialisation dépendant de la longueur de la chaîne hydrocarbonée (Guermouche, 2015 ; Fuentes., 2014). Dans le cas du gasoil, les alcanes à longue chaîne (C10 à C20) sont généralement mieux assimilés et plus rapidement biodégradés par les microorganismes que les alcanes à chaîne moyenne (Aitoumeraci., 2020).

Les bactéries capables d'utiliser ce type de substrat appartiennent principalement aux genres *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* et surtout *Rhodococcus*, connus pour leur efficacité dans la dégradation des hydrocarbures à longue chaîne. Par ailleurs, certaines bactéries Gram négatif, notamment *Pseudomonas* et *Alcaligènes*, participent également activement à la biodégradation de ces composés pétroliers (Aitoumeraci., 2020).

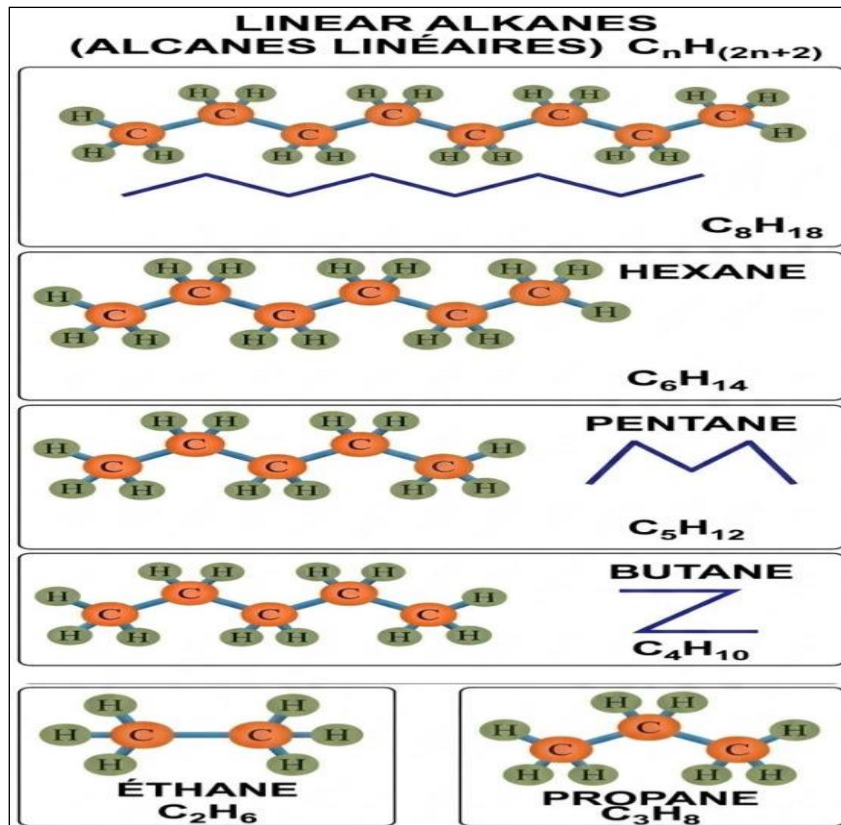


Figure 2 .Structures squelettiques (ou liaisons carbone-carbone) des n-alcanes présents dans le pétrole (D'après Hunt., 1996).

b) Les iso-alcanes:

La biodégradation des iso-alcanes est généralement plus lente que celle des n-alcanes en raison de leur structure ramifiée, qui limite l'attaque enzymatique initiale par les microorganismes alcanotrophes. En effet, la ramification de la chaîne carbonée réduit l'accessibilité des enzymes oxydatives, notamment les monooxygénases, responsables de l'oxydation terminale des hydrocarbures aliphatiques. Ainsi, la dégradation des iso-alcanes nécessite souvent l'intervention de microorganismes spécialisés appartenant à des genres tels que *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas* et *Acinetobacter*, capables d'utiliser ces composés comme source de carbone et d'énergie en conditions aérobies. Par conséquent, la biodégradabilité des hydrocarbures aliphatiques suit généralement l'ordre suivant : n-alcanes > iso-alcanes > cycloalcanes, ce qui reflète l'influence directe de la structure moléculaire sur leur vitesse de dégradation dans les sols contaminés par les hydrocarbures pétroliers (Fuentes et al., 2014 ; Guermouche et al., 2015).

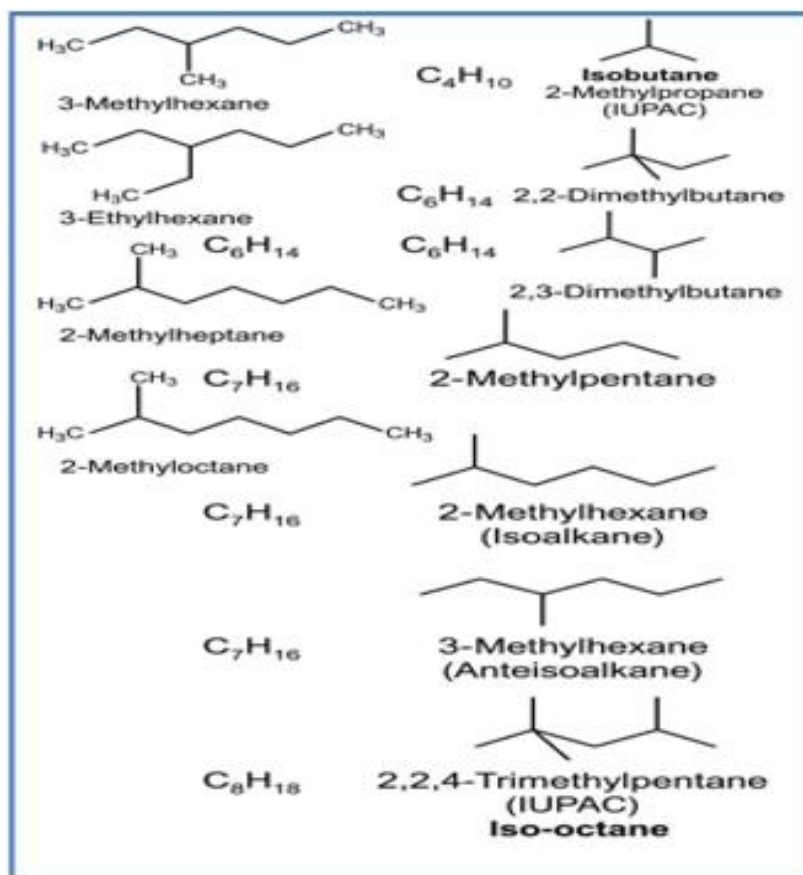


Figure 3 .Structures des iso-alcanes (alcanes à chaîne ramifiée) présents dans le pétrole (D'après Hunt., 1996).

I.2.1.2. Microorganismes dégradant les hydrocarbures aromatiques

La biodégradation des hydrocarbures aromatiques est généralement plus lente et plus complexe que celle des hydrocarbures aliphatiques en raison de la stabilité élevée du noyau benzénique (**Guermouche et al., 2015**).

Cette structure aromatique confère une résistance importante à l'attaque enzymatique microbienne, ce qui limite leur biodégradabilité dans les sols contaminés (**Fuentes et al., 2014**).

Toutefois, certaines bactéries spécialisées appartenant notamment aux genres *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Acinetobacter* et *Bacillus* sont capables de dégrader ces composés en conditions aérobies grâce à l'action d'enzymes spécifiques telles que les dioxygénases, initiant l'ouverture du cycle aromatique (**Guermouche et al., 2015**).

La dégradation des hydrocarbures aromatiques dépend fortement de leur poids moléculaire, les composés monocycliques (BTEX) étant généralement plus facilement biodégradables que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), plus persistants dans l'environnement (**Fuentes et al., 2014**).

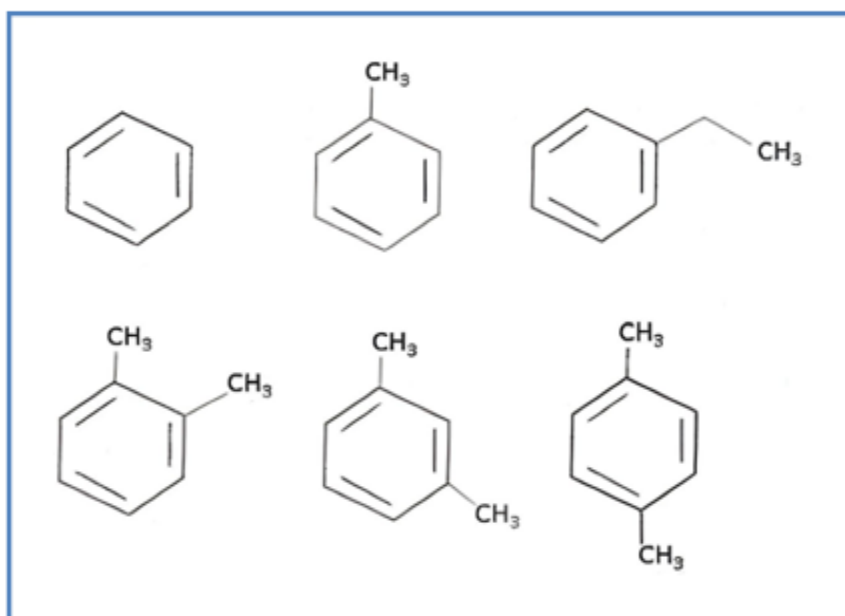


Figure 4 .Structures chimiques du groupe d'hydrocarbures mono aromatiques connus collectivement sous le nom de BTEX (**Montoya et al., 2018**).

I.2.1.3 Microorganismes dégradant les cycloalcanes

La biodégradation des cycloalcanes dans l'environnement est généralement plus lente et plus difficile que celle des alcanes linéaires, en raison de la stabilité de leur structure cyclique, qui rend l'ouverture de l'anneau récalcitrante à l'attaque enzymatique (par exemple cyclohexane). Sous conditions aérobies, certaines bactéries isolées, notamment des souches de *Pseudomonas* ont montré la capacité de transformer ces cycloalcanes en alcools cycliques puis en cétones, indiquant une activité enzymatique spécialisée. Dans des environnements anaérobies, la dégradation peut se produire via une activation par addition à la fumarate, produisant des dérivés tels que le cyclohexylsuccinate, une étape catalysée par des bactéries réductrices de sulfates affiliées au groupe *Desulfosarcina-Desulfococcus* (Jaekel et al., 2015).

Cette résistance relative fait que les cycloalcanes sont généralement plus persistants dans les sols contaminés par rapport aux alcanes linéaires et iso-alcanes, les rendant des indicateurs de pollution durable.

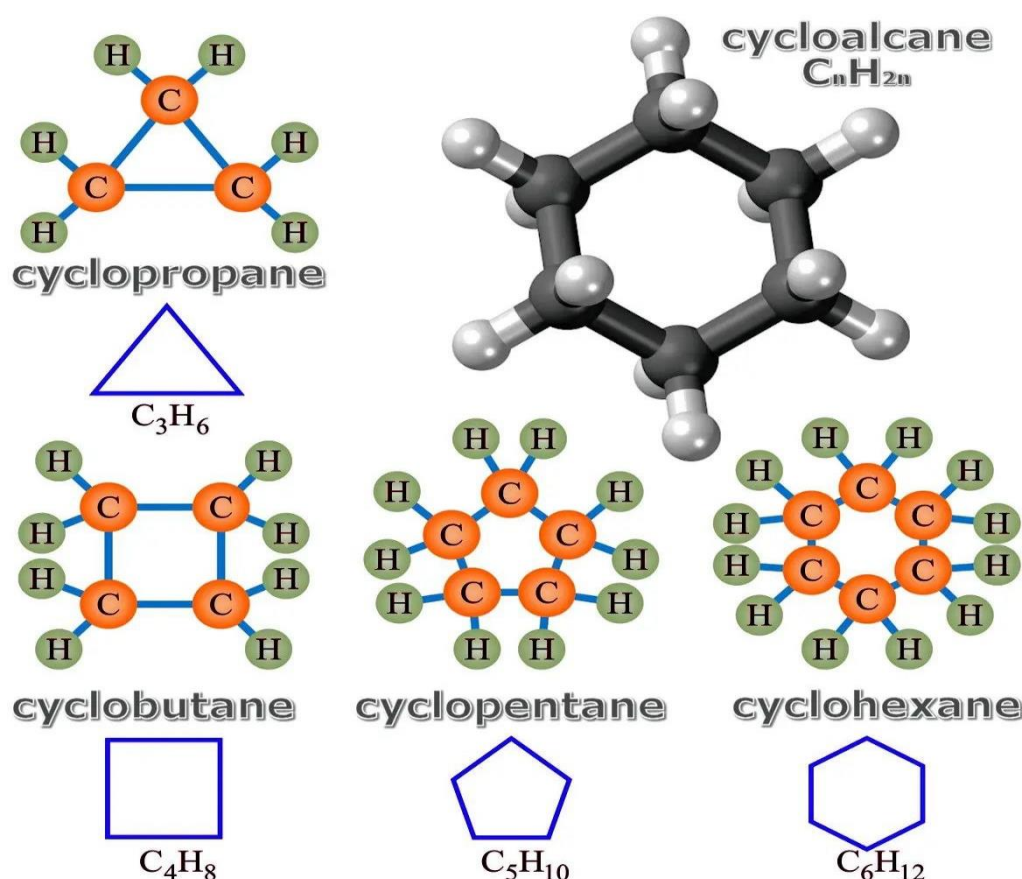


Figure 5 .Structures des cyclo-alcanes présents dans le pétrole (D'après Hunt., 1996).

I.2.2. Différentes techniques de bioremediation

I.2.2.1. Atténuation naturelle

L'atténuation naturelle désigne la dégradation des sols contaminés par un ensemble de processus naturels (biologiques, chimiques et physiques), sans intervention humaine directe. Dans les environnements très froids comme l'Arctique, ce processus est très lent en raison des basses températures, de la faible activité microbienne et des contraintes environnementales, ce qui limite l'efficacité de la biodégradation naturelle des hydrocarbures (**Góngora et al., 2022**).

I.2.2.2 Bioaugmentation

La bioaugmentation est une méthode consistant à appliquer des microorganismes autochtones ou allochtones, de type sauvage ou génétiquement modifiés, sur des sites de déchets dangereux pollués afin d'accélérer l'élimination des composés indésirables (**Mrozik & Piotrowska-Seget., 2010**). la figure(f 6) illustre le processus de bioaugmentation. La bioaugmentation est principalement réalisée dans les environnements contaminés par des hydrocarbures, en tant que stratégie alternative de bioremédiation.

La bioaugmentation repose sur l'introduction de microorganismes capables de dégrader les polluants afin d'augmenter la vitesse et/ou le degré de biodégradation des contaminants complexes présents dans les sites pollués. Cette stratégie permet de renforcer la communauté microbienne indigène du sol contaminé, ce qui favorise une élimination plus efficace des polluants (**Goswami et al., 2018 ; Adams et al., 2015**).

En outre, la bioaugmentation contribue à l'augmentation du potentiel génétique fonctionnel du site contaminé, en enrichissant le réservoir de gènes impliqués dans la dégradation des composés polluants. Ainsi, cette approche entraîne une amélioration de la diversité génétique microbienne, laquelle peut être renforcée davantage par l'augmentation de la diversité des populations microbiennes introduites dans le milieu contaminé (**Goswami et al., 2018**).

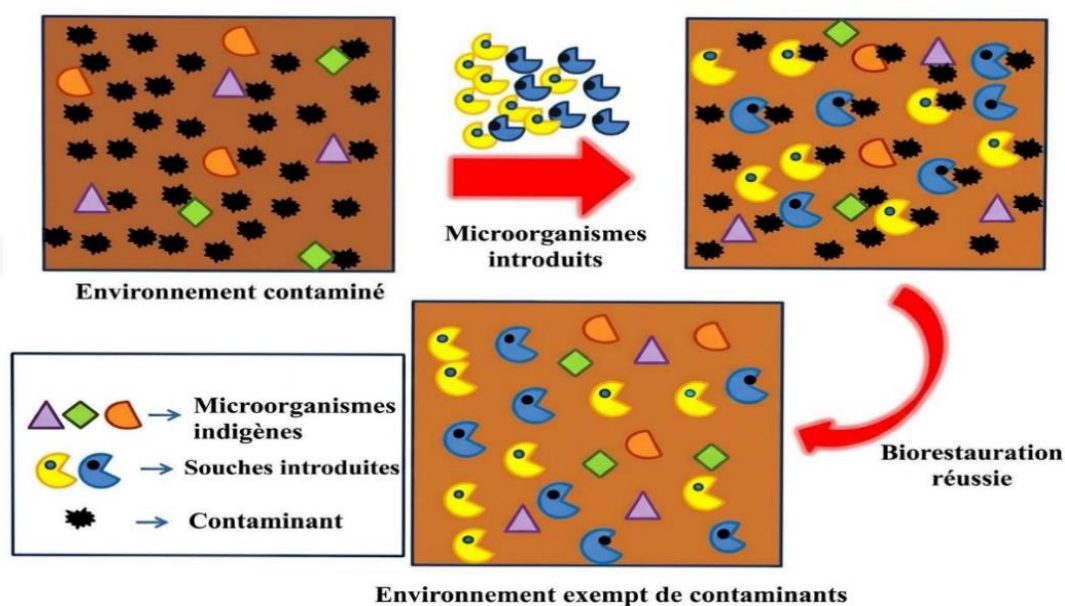


Figure 6. Schéma de principe du procédé de bioaugmentation pour la décontamination d'un milieu (Goswami et al., 2018).

Tableau I . Microorganismes utilisés dans les études de bioaugmentation (Goswami et al., 2018)

<i>Microorganismes utilisés</i>	<i>Polluants dégradés</i>
<i>Pseudomonas putida</i> PaW340/pDH5	4 chlorobenzoic acid
<i>Cupriavidus necator</i> RW112	Chlorobenzoates
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400 (ohb)	Arochlor 1221 and 123294 Arochlor 124295
<i>Pseudomonas putida</i> KT2442	Naphtalene
<i>Rhodococcus sp. Strain RHA1</i>	4-chlorobenzoate
<i>Escherichia coli</i> AtzA	Atrazine
<i>Rhodococcus sp. F92</i>	Various petroleum products
<i>Arthrobacter, Burkholderia, Pseudomonas, Rhodococcus etc.</i>	Petroleum hydrocarbons

I.2.2.3. Biostimulation

La biostimulation est une technique de rémediation qui se distingue par son efficacité, son faible coût et son caractère écologique. La biostimulation consiste en l'apport de nutriments limitants, tels que le phosphore, l'azote, l'oxygène ou des donneurs d'électrons, sur des sites

fortement pollués afin de stimuler les bactéries existantes pour dégrader les contaminants dangereux et toxiques (Tyagi, da Fonseca & de Carvalho., 2010 ; Elektorowicz., 1994 ; Rhykerd et al., 1999). La figure 06 illustre le processus de biostimulation.

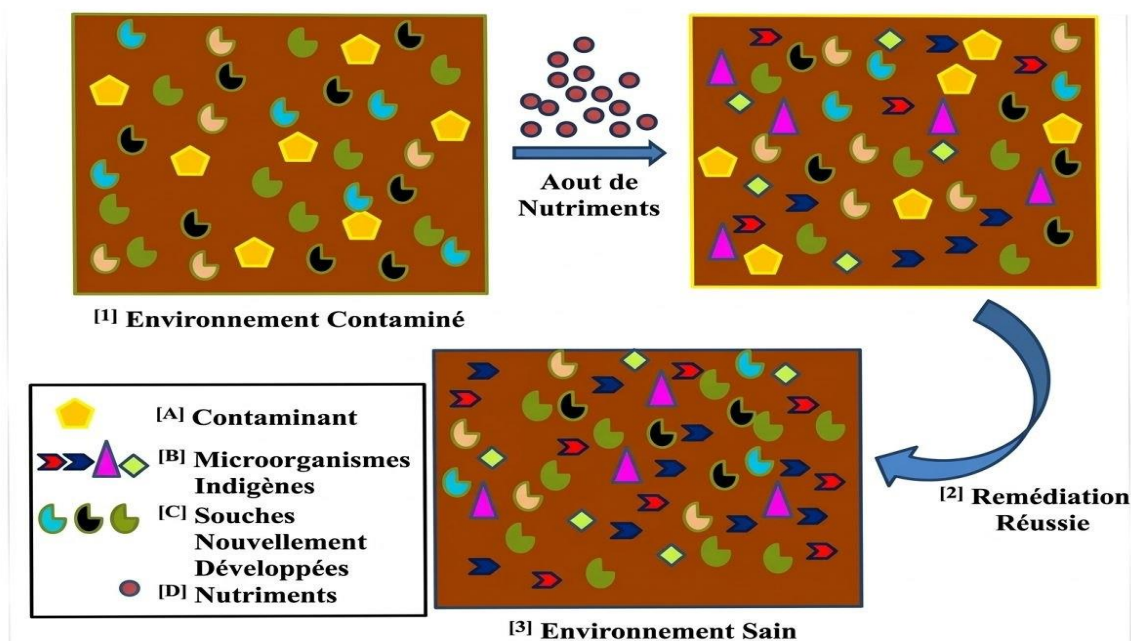


Figure 7 .Schéma de principe du procédé de biostimulation pour la décontamination d'un milieu (Goswami et al., 2018)

I.2.2.4. Combinaison Biostimulation et Bioaugmentation

C'est un procédé utilisant des micro-organismes pour dégrader ou immobiliser les polluants, notamment les hydrocarbures. Elle repose sur des réactions biologiques de type oxydoréduction permettant la transformation des composés organiques complexes en produits simples (minéralisation). Son efficacité dépend de plusieurs facteurs, tels que la présence de micro-organismes adaptés, la disponibilité en nutriments, et les conditions environnementales (oxygène, accepteurs d'électrons), les communautés microbiennes autochtones jouent un rôle clé grâce à leur capacité d'adaptation aux polluants, tandis que l'utilisation de consortiums microbiens permet d'élargir le spectre de dégradation des hydrocarbures. Globalement, elle constitue une méthode efficace, écologique et durable pour le traitement des sols contaminés (Gilan et al., 2022) .

I.3. Rôle du biochar dans la stimulation et la modulation des communautés microbiennes du sol

I.3. Biochar

Le biochar est un matériau carboné issu de la conversion thermochimique de la biomasse dans des conditions limitées en oxygène (**Hou., 2021a, 2021b**). Le chauffage de la biomasse, utilisée comme matière première, à une température optimale (température de pyrolyse) pendant une durée déterminée (temps de résidence), avec une vitesse d'élévation de température appropriée (vitesse de chauffage), permet d'obtenir le biochar comme produit solide, accompagné de sous-produits tels que le bio-huile et le gaz de synthèse (syngaz).

Généralement, le rendement en biochar se situe entre 30 % et 60 % (**Al-rumaihi et al., 2022 ; Elkhaila et al., 2022**). Grâce à sa production durable à partir d'une grande variété de matériaux résiduels, le biochar est disponible à l'échelle mondiale et ne nécessite pas d'exploitation minière, contrairement à deux supports commerciaux couramment utilisés, la tourbe et la vermiculite, dont l'extraction constitue un inconvénient majeur (**Herrmann et Lesueur., 2013 ; Schoebitz et al., 2013**).

I.3.1. Intérêt de biochar

Le biochar se distingue par ses multiples avantages pour l'environnement et l'agriculture, contribuant au combat contre le changement climatique, l'amélioration de la fertilité des sols, la sécurité alimentaire et la réduction de la pollution. Il est économique, coûtant moins que le charbon actif et ne nécessite pas de traitement d'activation (**Banu et al., 2023**). Sa capacité d'adsorption des contaminants, due à ses groupes fonctionnels oxygénés et sa grande capacité d'échange ionique, le rend supérieur aux charbons actifs. Il stimule l'activité microbienne, conserve l'eau, améliore la porosité et réduit la perte de nutriments, tout en étant riche en nutriments lorsqu'il est produit à partir de déchets organiques (**Xu et al., 2023**).

I.3.2. Mécanismes d'interaction entre le biochar et les communautés microbiennes du sol

Les interactions des micro-organismes avec le biochar peuvent être comprises à travers plusieurs mécanismes fonctionnels majeurs :

a) Efficacité de dégradation

Certains groupes microbiens, en particulier les Actinobactéries et les champignons, possèdent des systèmes enzymatiques performants leur permettant de dégrader des composés

organiques complexes tels que la lignine et la cellulose, entraînant ainsi des modifications progressives des surfaces du biochar au cours du temps (Hsin et al. 2025). Les champignons ligninolytiques, par exemple, sécrètent des enzymes oxydatives, notamment des peroxydases et des laccases, qui favorisent l'oxydation de la surface du biochar, augmentant ainsi sa porosité et son potentiel de rétention des nutriments. De même, les bactéries solubilisatrices du phosphore améliorent la biodisponibilité de cet élément en métabolisant les acides organiques adsorbés sur le biochar (Wang et al. 2025 ; Zhang et al. 2025).

b) Adaptabilité environnementale

Les communautés microbiennes présentent des tolérances variables aux conditions environnementales telles que le pH, l'humidité et le potentiel rédox. Le biochar contribue à la régulation de ces paramètres en tamponnant l'acidité du sol, en améliorant la capacité de rétention en eau et en créant des microenvironnements microaérophiles (He et al. 2022). Les microorganismes acidophiles peuvent se développer dans les sols acides amendés en biochar, tandis que les rhizobiums fixateurs d'azote bénéficient de la neutralisation du pH dans les sols alcalins (Hailegnaw et al. 2019 ; Huang et al. 2023). En outre, la matrice poreuse du biochar offre des refuges protecteurs permettant aux microorganismes sensibles à la sécheresse de mieux résister aux conditions de stress hydrique (He et al. 2023).

c) Synergie communautaire

Les communautés microbiennes fonctionnent souvent selon des interactions métaboliques coopératives, dans lesquelles les produits du métabolisme d'un groupe servent de substrats à d'autres microorganismes. Le biochar favorise ces relations synergétiques en fournissant des niches hétérogènes à sa surface, réduisant ainsi la compétition directe pour les ressources et stimulant la spécialisation fonctionnelle. Par exemple, les bactéries méthanotrophes et les microorganismes nitrifiants peuvent coexister sur les surfaces du biochar, l'oxydation du méthane par *Methylobacter* soutenant les processus de nitrification (Le et Lee., 2023). De plus, le transfert d'électrons facilité par le biochar renforce les interactions syntrophiques entre les bactéries fermentaires et les méthanogènes, notamment dans les systèmes anaérobies (Huang et al., 2025).

I.3.3. Immobilisation des microorganismes sur le biochar

I.3.3.1 .Processus d'immobilisation microbienne

L'immobilisation microbienne est une biotechnologie consistant à confiner les microorganismes dans un espace spécifique afin de préserver leur activité biologique (Karel

et al., 1985) . Les mécanismes d'immobilisation microbienne ainsi que les applications environnementales des microorganismes immobilisés sur le biochar ont été synthétisés par Li et al. (2022a, 2022b). Ce processus repose généralement sur la fixation des microorganismes à la surface et dans les pores du biochar par adsorption, interactions électrostatiques, formation de réseaux ioniques et liaisons covalentes (Liu et al., 2020 ; Vasilieva et al., 2021 ; Zhang et al., 2014). L'encapsulation des microorganismes dans le biochar est réalisée à l'aide de stabilisateurs tels que l'alginate de calcium et l'alginate ferrique pour produire des billes de biochar contenant des microorganismes immobilisés destinées à des applications agricoles et environnementales (Zhao et al., 2021 ; Zheng et al., 2021). Par ailleurs, des protocoles utilisant l'alginate de calcium et l'alcool polyvinylique en présence d'agents de réticulation ont été proposés pour la synthèse de ces billes immobilisées (Yang et al., 2020a, 2020b) .

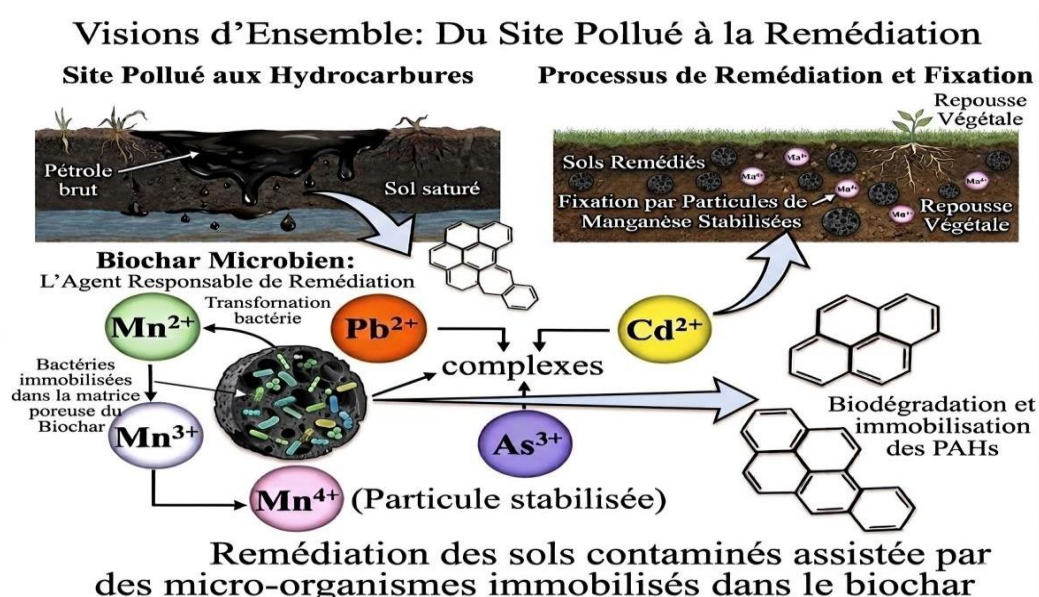


Figure 8 .Schéma de principe du procédé de biostimulation pour la décontamination d'un milieu (Goswami et al., 2018)

L'interaction électrostatique représente l'un des principaux mécanismes impliqués dans l'immobilisation des microorganismes par le biochar, les surfaces microbiennes étant généralement chargées négativement, tandis que les supports à charge positive favorisent leur fixation. Des travaux ont montré que les microalgues immobilisées sur le biochar participent efficacement à la remédiation du cadmium grâce à ces interactions électrostatiques (Shen et al., 2017a). Par ailleurs, le biochar produit à basse température, riche en groupes fonctionnels oxygénés et azotés, présente une meilleure capacité d'immobilisation des microorganismes

ainsi que des métaux et métalloïdes (Başer et al., 2021). Toutefois, certaines limites persistent, notamment l'instabilité de l'immobilisation et la faible tolérance des microorganismes aux fortes concentrations de contaminants, ce qui nécessite de renforcer leur résilience (Li et al., 2022a, 2022b). En outre, l'encapsulation des microorganismes dans des réseaux polymériques fins, appelée formation de réseau ionique, permet de limiter leur libération tout en facilitant les échanges de petites molécules avec le milieu extérieur, favorisant ainsi leur croissance, leur tolérance aux contaminants et leur capacité de biodégradation (Lu et al., 2020 ; Wu et al., 2022).

I.3.3.2. Facteurs influençant l'immobilisation des microorganismes sur le biochar

a) Propriétés physico-chimiques du biochar

La surface spécifique, la taille et la distribution des pores du biochar favorisent l'adhésion et la colonisation des microorganismes. Ces propriétés dépendent principalement du type de biomasse utilisée et de la température de pyrolyse, qui déterminent la stabilité structurale et chimique du biochar. (Zhao et al., 2020; Das et al., 2021; Wu et al., 2022)

b) Composition nutritive et teneur en cendres

Le biochar peut fournir des éléments nutritifs essentiels (azote, soufre, phosphore) et sa teneur en cendres favorise la stabilité métabolique des microorganismes. Cette provision de nutriments soutient les fonctions microbiennes nécessaires au cycle des nutriments dans le sol. (Adnan et al., 2015; Xu & Chen, 2013; Fox et al., 2014)

c) Température de pyrolyse

La température de pyrolyse influence la porosité, la surface spécifique et la composition chimique du biochar. Une pyrolyse à haute température augmente la stabilité du biochar et favorise l'enrichissement microbien, mais peut entraîner une perte des nutriments et des groupes fonctionnels. (Das et al., 2021; Hossain et al., 2021; Tomczyk et al., 2020)

d) pH environnemental

Le pH du milieu affecte la viabilité des microorganismes et la charge de surface du biochar, influençant ainsi l'adsorption et la biodégradation des contaminants. Dans des conditions optimales, le pH se situe généralement entre 6 et 8, ce qui favorise la reproduction microbienne. (Wu et al., 2022; Zhang et al., 2022; Hu et al., 2019; Wang et al., 2021b)

e) Concentration initiale des contaminants

Des concentrations élevées de contaminants peuvent inhiber l'activité microbienne et provoquer la mort cellulaire. L'immobilisation sur biochar améliore la tolérance à la toxicité et augmente l'efficacité de l'élimination des polluants, grâce à la combinaison de l'adsorption et de la biodégradation. (Wahla et al., 2020; Zhao et al., 2020).

f) Compétition microbienne et conditions environnementales

Dans les sols, les microorganismes indigènes peuvent limiter la survie des inoculums introduits. Le biochar agit comme un support protecteur, offrant un micro-habitat favorable qui réduit la compétition et améliore la colonisation et la survie des microorganismes. (Wu et al., 2022; Shi et al., 2018; Shi et al., 2019).

g) Structure poreuse et protection contre les prédateurs

Les pores du biochar offrent des niches écologiques qui protègent les microorganismes des prédateurs tels que les protozoaires et les nématodes, tout en permettant la rétention des nutriments essentiels à leur croissance et activité métabolique. (Wildman & Derbyshire., 1991; Brewer et al., 2014; Tao et al., 2018)

h) Propriétés chimiques du biochar et survie de l'inoculum

La teneur en azote, le pH et les matières organiques volatiles influencent la survie des microorganismes immobilisés sur biochar. Les propriétés physiques, comme la porosité et la taille des pores, déterminent également la survie après incorporation dans le sol. (Hale et al., 2015; Vanek et al., 2016).

Chapitre II : Méthodologie

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer le potentiel des souches microbiennes autochtones isolées à partir des sols pollués par les hydrocarbures et de les utiliser pour la réhabilitation de ces sols. Plus précisément, le projet vise à mettre en œuvre ces souches en combinaison avec des biostimulant, biologique afin d'améliorer la biodégradation des hydrocarbures.

II. Méthodologie

II.1.Échantillonnage

Dans le cadre de cette étude expérimentale portant sur le traitement biologique des sols contaminés par les hydrocarbures pétroliers, des échantillons de sol ont été prélevés au niveau du puits pétrolier OMM763, situé dans la région de Hassi Messaoud, ainsi que au niveau de la zone pétrolière de Haoud Berkaoui et de bourbier de Bourbier de Rhourd Nouss Illizi

Le site d'étude faisait l'objet d'un dispositif de confinement technique préalablement mis en place afin de limiter la migration verticale des sols contaminés et de réduire la dispersion des hydrocarbures vers les horizons profonds du sol.

Tableau II.Caractéristiques des sites de prélèvement

Échantillons	Origines	Localisation	Age de bourbier	Date de prélèvement
1	Hassi Messaoud	84 Km	3 mois (20/10/2025)	20-01-2026
2	Haoud Berkaoui	35 Km	3 ans (2023)	07-02-2026
3	Bourbier de Rhourd Nouss Illizi	347Km	1an	07-02-2026

Les opérations de prélèvement ont été réalisées dans des conditions strictement aseptiques, et les échantillons ont été conditionnés dans des récipients stériles avant leur acheminement vers le laboratoire.



Figure 9 . puits pétrolier OMM763, situé dans la région de Hassi Messaoud et Haoud Berkaoui.

II.2. Isolement et sélection des microorganismes aérobies hydro-carbonoclastes

Afin d'isoler les souches microbiennes hydrocarbonées, nous cultivons les bactéries prélevées dans les deux échantillons dans les milieux MM additionnée de 100 ul pétrole , Pour cela, nous avons réalisé une série de dilutions de 1/2 à 1/4, les boîtes sont incubées pendant 72h à une température de 30°C et 40C.

II.2.1. Purification

Après une première étape d'isolement, les souches bactériennes et fongiques capables de se développer sur un milieu (MM supplémenté en pétrole, utilisé comme unique source de carbone, ont été sélectionnées. Ces souches ont ensuite été repiquées sur de nouvelles boîtes de Petri contenant le même milieu (MM + pétrole), en veillant à cultiver chaque souche séparément afin d'obtenir des cultures pures. Cette étape correspond au processus de purification des souches microbiennes. Les cultures ont été incubées dans des conditions contrôlées, à savoir une température de 40 °C et 30C.

II.2.2. Etude des interactions microbiennes

a. Interactions entre les souches bactériennes

Les souches bactériennes isolées ont été évaluées pour leurs interactions en utilisant des boîtes de Petri divisées en deux compartiments, contenant du milieu gélose nutritive (GN). Chaque test consistait à inoculer côte à côte les différentes souches afin d'observer la synergie ou l'antagonisme éventuel entre elles. Les boîtes ont été incubées à 40 °C pendant 24 à 48

heures, et la croissance des colonies ainsi que les zones d'interaction ont été soigneusement observées. Cette méthode permet de sélectionner les combinaisons bactériennes les plus compatibles, capables de collaborer efficacement pour la dégradation des hydrocarbures.

b. Interactions entre les champignons

Les souches fongiques ont été préalablement mélangées dans un tube à essai avec de l'eau physiologique afin de préparer une dilution permettant de réduire la concentration initiale du mycélium. Ce mélange a ensuite été inoculé sur des boîtes de Petri contenant du milieu gélose Sabouraud pour tester les interactions entre les différentes souches fongiques. Les boîtes ont été incubées à 30 °C pendant 4 jours, et l'expansion du mycélium a été suivie afin d'identifier la fusion, la compatibilité ou la compétition entre les champignons. Cette étape permet de constituer des consortiums fongiques stables et adaptés à une application conjointe avec les bactéries.

c. Interactions entre les bactéries et les champignons

Les interactions entre bactéries et champignons ont été évaluées en coculture, avec le mycélium placé au centre de la boîte de Petri et les colonies bactériennes inoculées autour. Cette configuration a permis d'observer les effets réciproques des bactéries et des champignons sur leur croissance et leur activité métabolique.

II.2.3 Pré -identification des souches sélectionnées

II.2.3.1. Caractérisation morphologique

L'examen macroscopique des colonies bactériennes constitue une étape préliminaire essentielle permettant d'obtenir une première orientation avant l'identification précise des espèces bactériennes. Cette observation repose sur l'étude de plusieurs critères morphologiques visibles à l'œil nu après incubation sur milieu de culture.

Les principaux caractères macroscopiques analysés sont :

- l'aspect des colonies (lisse, rugueux ou sec)
- l'opacité (colonies opaques, translucides ou transparentes)
- le relief ou l'élévation (plane, convexe ou bombée)
- la pigmentation correspondant à la coloration des colonies
- la taille des colonies déterminée par la mesure de leur diamètre (petite, moyenne ou grande)
- la forme des colonies (ponctiforme, circulaire, irrégulière, etc.) (**Bahaz , 2018**).

II.2.3.1. Caractérisation microscopique

. Coloration de Gram

La coloration de Gram est une technique fondamentale en microbiologie permettant de distinguer les bactéries selon la structure de leur paroi cellulaire. Les bactéries à Gram positif se caractérisent par une paroi riche en peptidoglycane et relativement épaisse, ce qui leur permet de retenir le cristal violet après l'étape de décoloration et d'apparaître en violet à l'observation microscopique. En revanche, les bactéries à Gram négatif possèdent une couche de peptidoglycane plus mince associée à une membrane externe riche en lipides, ce qui favorise la perte du colorant primaire lors de la décoloration. Elles prennent ensuite la coloration de contraste et apparaissent en rose au microscope (Paray et al., 2023).

II.2.3.2. Caractérisation biochimiques

Les analyses biochimiques constituent une étape fondamentale dans l'identification et la différenciation des microorganismes, puisqu'elles reposent sur l'étude de leurs activités métaboliques spécifiques. Parmi les systèmes couramment utilisés, la galerie bio-Mérieux API 20E est composée de 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés permettant la réalisation simultanée de plusieurs tests biochimiques standardisés. Ces micro-tubes sont ensemencés à l'aide d'une suspension bactérienne qui assure la reconstitution des milieux de culture. Au cours de l'incubation, les réactions métaboliques bactériennes provoquent des changements de coloration spontanés ou révélés par l'ajout de réactifs spécifiques. La lecture des résultats est effectuée à l'aide du tableau d'interprétation fourni, puis l'identification de la souche est obtenue par comparaison avec l'index du profil analytique ou via un logiciel d'identification dédié (BioMérieux, n.d.; bioMérieux APIWEB™, n.d.).

- **Recherche de catalase**

Le test de la catalase est une analyse biochimique couramment utilisée pour mettre en évidence la présence de l'enzyme catalase chez les bactéries. Cette enzyme joue un rôle important dans la protection cellulaire contre les effets toxiques du peroxyde d'hydrogène en catalysant sa décomposition en eau et en oxygène. Sur le plan pratique, une petite quantité de culture bactérienne est déposée sur une lame propre, puis une goutte de peroxyde d'hydrogène à 3 % est ajoutée. L'apparition immédiate de bulles d'oxygène traduit une réaction positive indiquant la présence de l'enzyme catalase, tandis que l'absence de bulles correspond à un résultat négatif (Hartline, 2023)

- **Recherche de l'oxydase**

Le test de l'oxydase constitue une méthode qualitative couramment utilisée pour détecter la présence de l'enzyme cytochrome c oxydase, qui joue un rôle clé dans la chaîne respiratoire aérobie des bactéries. Cette enzyme catalyse le transfert final des électrons vers l'oxygène moléculaire, servant ainsi d'accepteur terminal dans la respiration cellulaire. Lorsqu'une bactérie possède cette enzyme, le réactif d'oxydase est rapidement oxydé, entraînant l'apparition d'une coloration violette ou bleuâtre, ce qui traduit un résultat positif. À l'inverse, l'absence de changement de coloration indique une réaction négative et l'absence de l'enzyme dans la souche bactérienne testée (**Hartline, 2023**).

II.3. Préparation de biochar

Le biochar est un matériau carboné obtenu par la pyrolyse de biomasses lignocellulosiques en conditions limitées en oxygène. Il est largement utilisé dans les domaines de l'agriculture, de la remédiation environnementale et de la gestion des sols contaminés, notamment pour l'adsorption des polluants organiques tels que les hydrocarbures pétroliers.

L'objectif de ce protocole est de décrire la méthode expérimentale de production de biochar à partir de feuilles de palmier en utilisant un système de pyrolyse à double compartiment, sous une température contrôlée comprise entre 350 et 500 °C pendant une durée de 3 heures (**Seddiki & Bessaci, 2024**) .

Notre travail de recherche porte sur la production, par une méthode traditionnelle, de biochar à partir de deux types de biomasses d'origines végétales : le marc de café et les feuilles de palmier dattier (biomasses végétales). Ces matières premières ont été sélectionnées en raison de leur disponibilité locale, de leur caractère renouvelable ainsi que de leur fort potentiel pour la production de biochar destiné à des applications environnementales, notamment en tant que support d'immobilisation des micro-organismes impliqués dans la dégradation des hydrocarbures pétroliers.



Figure 10 .Dispositif de pyrolyse (four à moufle) .

II.3.1. Analyse du biochar

II.3.1.1. Caractéristiques physiques

MEB couplée avec EDX

Dans le cadre de cette étude, le MEB a été utilisé pour examiner la structure des biochars obtenus à partir des feuilles de palmier dattier et du marc de café. Cette analyse permet de mettre en évidence la porosité, la distribution des pores ainsi que l'état de surface du biochar, des paramètres déterminants pour l'immobilisation des micro-organismes et l'amélioration des processus de biostimulation.

En outre, le couplage du MEB avec un spectromètre à dispersion d'énergie (EDX) a permis d'identifier et de quantifier les éléments chimiques présents à la surface des biochars étudiés, fournissant ainsi des informations essentielles sur leurs propriétés et leur aptitude à servir de support pour les communautés microbiennes (Shi et al., 2021).

II.3.1.2. Caractéristiques chimiques

a. pH du biochar

La détermination du pH du biochar a été réalisée par la méthode de suspension aqueuse. Un échantillon de 20 g de biochar séché et tamisé a été mélangé à 100 mL d'eau distillée (rapport 1:5 m/v), puis agité mécaniquement afin d'obtenir une suspension homogène. Après décantation et filtration, le pH du filtrat a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre électronique préalablement étalonné avec des solutions tampons standards (pH 4, 7 et 10). Les mesures ont

été effectuées à température ambiante après stabilisation de la lecture (Afnor 1999; Soltner 2005).

b. Mesure de la conductivité électrique (CE) de biochar

La conductivité électrique (CE) du biochar a été déterminée selon la méthode de suspension aqueuse. Une masse de 20 g de biochar préalablement séché et tamisé a été introduite dans un bécher contenant 100 ml d'eau distillée, correspondant à un rapport solide/liquide de 1:5 (m/v). Le mélange a été agité pendant 30 minutes afin de favoriser la dissolution des sels solubles, puis laissé au repos pour permettre la décantation des particules solides. La conductivité électrique de la suspension a ensuite été mesurée à l'aide d'un conductimètre préalablement calibré. Les résultats ont été exprimés en ms/cm (Baize ,2000).

II.3.2. Préparation du nano-biochar par traitement ultrasonique

Le biochar a été transformé en nano-biochar par traitement ultrasonique (37 kHz, puissance 100 %, durée 2 h) dans un milieu aqueux. L'effet de cavitation généré par les ultrasons a provoqué la fragmentation des particules, réduisant leur taille jusqu'à l'échelle submicronique à nanométrique. Ce traitement a également amélioré la dispersion des particules, augmenté leur surface spécifique et modifié leur structure poreuse, renforçant ainsi leurs capacités d'adsorption et leur potentiel comme support d'immobilisation microbienne. L'efficacité du procédé dépend des conditions opératoires, notamment la fréquence, la puissance et la durée de sonication.

II.4. Inoculation (Formation des biofilms microbiens)

II.4.1. Préparation d'inoculum bactérienne et fongique

Les consortiums bactérien et fongique ont été préparés à partir de souches compatibles préalablement sélectionnées après vérification de l'absence d'interactions antagonistes. Les souches bactériennes ont été cultivées dans un bouillon nutritif à 30 °C pendant 48 h, tandis que les souches fongiques ont été incubées dans le même milieu à 30 °C pendant 5 jours afin d'obtenir des inoculés homogènes destinés aux essais expérimentaux.

II. 4.2. Immobilisation les cellules microbiennes sur le biochar

Une culture mixte de bactéries et de champignons a été préparée dans un bouillon nutritif, puis concentrée par centrifugation. Le culot microbien obtenu a été remis en suspension dans 400 ml d'eau physiologique stérile avant l'ajout de biochar stérile d'origine végétale(100g). Le mélange a été incubé à 30 °C sous agitation (100 tr/min) pendant 48 heures afin de favoriser l'adhésion et l'immobilisation des microorganismes sur le biochar. Après centrifugation, le

biochar colonisé a été récupéré et utilisé comme support biologique actif contenant des microorganismes immobilisés.

II.4.3. Vérification de l'immobilisation des microorganismes sur le biochar

Dans cette étude, une culture microbienne mixte (bactéries et champignons) a été mise en contact avec du biochar afin d'évaluer son aptitude à immobiliser les microorganismes. La densité optique de la culture a été mesurée avant et après incubation avec le biochar aux longueurs d'onde de 540nm et 600 nm. Après plus de 48 heures d'incubation sous agitation, le mélange a été centrifugé et la densité optique du surnageant a été de nouveau déterminée. La diminution de la densité optique observée après contact avec le biochar a permis d'estimer l'efficacité de l'immobilisation microbienne, traduisant l'adsorption et la fixation des cellules sur ce support.

II.5. Mise en place du dispositif expérimental de traitement d'un sol pollué

Le traitement des sols contaminés par les hydrocarbures pétroliers a été réalisé à travers un dispositif expérimental comprenant trois conditions distinctes, chacune effectuée en triplicat afin d'assurer la reproductibilité et la fiabilité des résultats.

Le sol utilisé dans cette étude pour les essais de traitement biologique correspond à un mélange homogène de deux échantillons prélevés au niveau de bourbiers pétroliers. Ces échantillons provenaient respectivement du champ pétrolier de Haoud Berkaoui et de la zone de Haoud El Hamra (Hassi Messaoud). Le mélange a été réalisé afin d'obtenir une matrice contaminée représentative des sols impactés par les hydrocarbures pétroliers et les résidus d'huiles de forage.

II.5.1. Analyses d'échantillon de sol

II.5.1.1. pH du sol

La détermination du pH du sol a été réalisée par la méthode de suspension aqueuse selon un rapport sol/eau de 1/5 (m/v). Un échantillon de 20 g de sol séché et tamisé a été mélangé à 100 ml d'eau distillée, puis agité afin d'obtenir une suspension homogène. Après décantation et filtration, le pH du filtrat a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre préalablement étalonné avec des solutions tampons standards (pH 4, 7 et 10). Les mesures ont été effectuées à température ambiante après stabilisation des valeurs afin d'assurer la fiabilité et la reproductibilité des résultats (Afnor 1999) ; (Soltner 2005).

II.5.1.2. Mesure du la conductivité électrique (CE)

La conductivité électrique (CE) du sol a été déterminée selon la méthode de suspension aqueuse. Une masse de 20 g de sol a été introduite dans 100 ml d'eau distillée, correspondant à un rapport sol/eau de 1/5 (m/v). Le mélange a été soigneusement homogénéisé afin d'obtenir suspension uniforme, puis soumis à une agitation pour favoriser la dissolution des sels solubles.

Après homogénéisation, la suspension a été filtré à l'aide d'un papier filtre afin d'obtenir un filtrat clair. La conductivité électrique de la solution obtenue a ensuite été mesurée à l'aide d'un conductimètre préalablement étalonné. Les mesures ont été réalisées à température ambiante, et les valeurs ont été relevées après stabilisation de l'appareil afin d'assurer la fiabilité des résultats (Baize ,2000).

II.5.1.3. Dosage des métaux lourds par spectrométrie d'absorption atomique (SAA)

Selon (Norme ISO 11466) le dosage des métaux lourds a été réalisé par spectrométrie d'absorption atomique (SAA) après minéralisation par voie humide. Pour ce faire, des prises d'essai de 2 g de sol (séché et tamisé) ont été traitées à chaud (100 °C) avec un mélange de 15 ml de Hcl (37 %), 6 ml de HNO₂ (65 %) et 2 ml de H₂O₂. La digestion de la matrice organique et des hydrocarbures s'est traduite par l'obtention d'une solution claire et d'un résidu blanchâtre. Après refroidissement et filtration, le filtrat a été analysé pour quantifier l'efficacité d'adsorption du biochar immobilisé par comparaison des concentrations métalliques avant et après traitement.

Le dosage des métaux lourds a été réalisé afin d'évaluer le degré de contamination des sols étudiés ainsi que l'efficacité du traitement appliqué. Trois métaux lourds ont été analysés : le mercure (Hg), le plomb (Pb) et le chrome (Cr) en raison de leur toxicité élevée et de leur présence fréquente dans les sols contaminés par les hydrocarbures pétroliers selon Norme NFX 31-151.

II.5.1.4. Évaluation de la contamination pétrolière

Le dosage des hydrocarbures a été réalisé selon la norme API RP 13B-2 :2014-04. La méthode consiste à extraire les hydrocarbures présents dans l'échantillon à l'aide d'un solvant organique approprié, puis à quantifier la teneur en hydrocarbures par mesure gravimétrique ou par analyse instrumentale. Après extraction, le solvant est évaporé et le résidu d'hydrocarbures est pesé afin de déterminer sa concentration. Les résultats sont exprimés en pourcentage (%) ou en mg/kg de matière.

II.5.1.5. Evaluation de flore microbienne totale du sol

Le dénombrement des bactéries présentes dans le sol contaminé par les hydrocarbures a été réalisé par la méthode des dilutions décimales successives. Une quantité de 1 g de sol a été introduite dans 9 ml d'eau physiologique stérile afin d'obtenir la dilution mère (10^{-1}). Des dilutions successives ont ensuite été préparées jusqu'à la dilution 10^{-5} par transfert aseptique de 1 ml de chaque dilution dans 9 ml d'eau physiologique stérile. À partir des dilutions obtenues, un volume déterminé a été ensemencé sur un milieu de culture approprié puis incubé dans des conditions favorables au développement bactérien. Après incubation, les colonies visibles ont été comptées et le nombre de bactéries viables a été exprimée unité formant colonies par gramme de sol (UFC/g). Cette méthode a permis d'estimer la charge bactérienne présente dans le sol pollué et d'évaluer la capacité des microorganismes autochtones à survivre dans un environnement contaminé par les hydrocarbures.

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2) \times d \times v}$$

N : nombre de microorganismes exprimé en (UFC/g).

$\sum C$: Somme des colonies comptées sur deux dilutions successives

n_1 : Nombre de boîtes comptées à la première dilution retenue

n_2 : Nombre de boîtes comptées à la deuxième dilution retenue

d : facteur de dilution correspondant à la première dilution retenue

v : volume inoculé dans chaque boîte de Pétri

II.5.2. Dispositif de traitement

Le protocole de traitement adopté pendant quatre semaines est le suivant:

✓ **Bac 1 : échantillon témoin**

Les bacs témoins contiennent uniquement 2 kg de sol contaminé, sans ajout de biochar ni de suspension microbienne, afin de suivre l'évolution naturelle du système.

✓ **Bac 2 : Échantillons bio augmenté et bio stimulé**

Les bacs sont été rempli avec 2 kg de sol contaminé, auxquels ont été ajoutés 200 g de biochar préalablement enrichi par immobilisation d'un consortium microbien composé de bactéries et de champignons. L'amendement en biochar représente 10 % de la masse totale du sol . Ces échantillons sont aussi stimuler par ajout de 200ml de

solution contenant par 2% de mélange des biosurfactants produits par des souches microbiennes autochtones.

✓ **Bac 3 : échantillon bio augmenté**

Dans cette condition, 2 kg de sol contaminé ont été mélangés avec 200 ml d'une suspension microbienne contenant le même consortium bactérien et fongique. Cette approche permet d'évaluer l'efficacité de l'inoculation directe sans support solide. **10%.**



Figure 11 . Différentes modalités du sol au cours de l'expérimentation

Les bacs bio augmentes a été maintenu dans des conditions contrôlées, avec un arrosage régulier tous les trois jours afin de maintenir un taux d'humidité favorable à l'activité microbienne. Cette humidification est essentielle pour assurer des conditions optimales de biodégradation des hydrocarbures.

Après 4 semaines de traitement, les hydrocarbures totaux et les métaux lourds des échantillons traités sont quantifiés.

Chapitre III : Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

III.1. Isolement des souches bactériennes et fongiques hydrocarbonoclastes

Après les étapes d'isolement et de purification, plusieurs colonies bactériennes ont été obtenues sur milieu minéral supplémenté en gasoil comme unique source de carbone. Les colonies observées présentent des morphologies variées en termes de forme, taille, couleur, relief et texture.

Sept souches bactériens retenus ont été codifiés comme suit : **B1, B2, B3, B5, B6, B7 et B10.**

Les isolats fongiques obtenus présentent également des différences morphologiques remarquables. Les colonies fongiques se distinguent par leur couleur, leur texture et leur vitesse de croissance.

Sept isolats fongiques purifiés ont été désignés par les codes **C1, C2, C3, C4, C5, C6 et C7.**

La sélection des isolats bactériens et fongiques a été effectuée sur la base de critères fonctionnels essentiels afin de constituer un consortium microbien performant pour la bioremédiation des sols contaminés par les hydrocarbures.

III.2. Pré-identification des souches sélectionnées

III.2.1. Pré-identification des souches bactérienne

III.2.1.1. Caractéristiques macroscopiques des isolats bactériens

B1 : Colonies circulaires, lisses et brillantes, de couleur blanc crème, à bords réguliers et légèrement convexes.

B2 : Petites colonies circulaires, lisses et opaques, de couleur blanchâtre, présentant des marges régulières.

B3 : Colonies irrégulières, à surface rugueuse et mate, de couleur beige clair, avec des contours ondulés et un relief plat.

B5 : Colonies circulaires, lisses et muqueuses, de couleur crème jaunâtre, à bords réguliers et relief légèrement convexe.

B6 : Grandes colonies opaques, de couleur blanche, à surface sèche et rugueuse, avec des marges irrégulières et un relief convexe.

B7 : Colonies circulaires, lisses et brillantes, de couleur jaunâtre, présentant des contours réguliers et un relief bombé.

B10 : Petites colonies circulaires et translucides, à surface lisse, de couleur blanc pâle, avec des bords réguliers et un relief légèrement surélevé.

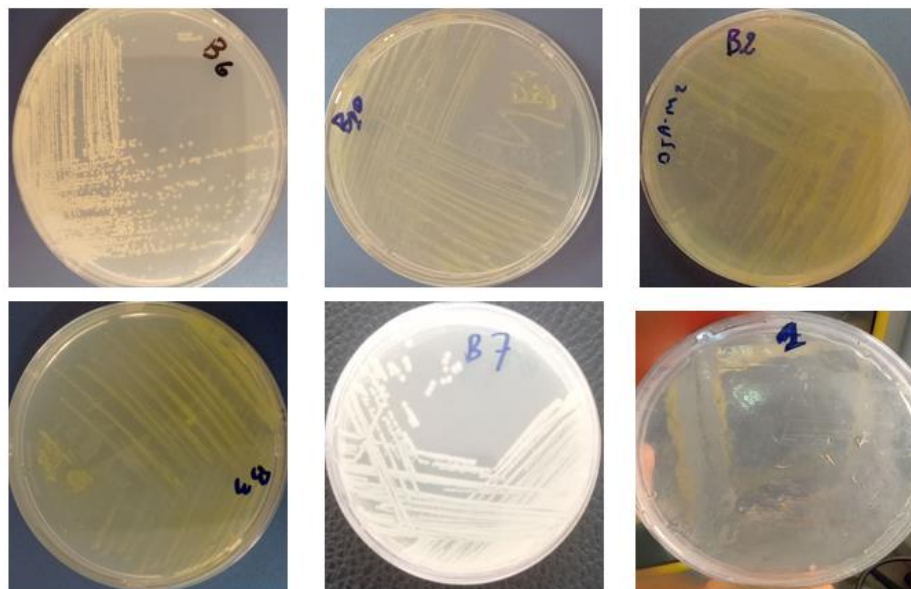


Figure 12. Aspect macroscopique des isolats bactériens.

III.2.2. Pré-identification des souches bactériennes isolées

Tableau III . Identification préliminaire et caractéristiques microscopiques et biochimiques des souches bactériennes isolées

EXAM API 20	B1	B2	B3	B5	B6	B10	B7
ONPG	-	-	+	-	+	+	-
ADH	+	-	-	-	-	-	-
LDC	-	-	-	-	-	-	+
ODC	-	-	-	-	-	-	-

CIT	+	-	-	-	-	-	-
H₂S	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	+	+	+	+	+	+
IND	-	-	-	-	-	-	+
VP	-	-	+	-	-	-	-
GEL	+	+	+	+	+	+	-
GLU	-	-	-	-	-	-	-
MAN	-	+	-	-	-	-	-
INO	-	-	-	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	-	-	-
RHA	-	+	+	-	-	-	-
SAC	-	-	-	-	-	-	-
MEL	-	-	-	-	-	-	+
AMY	-	-	-	-	-	-	-
ARA	-	-	-	-	-	-	-
OXYDASE	+	-	-	+	-	-	-
GRAM	G-	G+	G-	G+	G-	G+	G+
La forme	BACILLE	COCCI	BACILLE	BACILLE	BACILLE	COCCI	BACILLE
Catalase	+	+	+	+	+	+	+

Souche B1 : est un bacille à Gram- qui présente des réactions positives pour l'oxydase, la catalase et l'arginine dihydrolase (ADH+). Sur la galerie API 20E, elle manifeste une réaction ONPG+ mais s'avère incapable de dégrader le mannitol (MAN-). En se basant sur cet ensemble de caractéristiques biochimiques, cette souche est plus proche d'être assimilée à l'espèce *Pseudomonas sp* selon les critères de **Leyral et Joffin(1998)** .

Les bactéries des groupes Gamma et Beta-proteobacteria jouent un rôle très important dans le nettoyage des sites pollués. Parmi elles, le genre *Pseudomonas* est souvent le plus abondant ,ces bactéries agissent dès le début de la décontamination lorsque les polluants sont facilement accessibles (**Kaplan et Kitts, 2004**). Des espèces comme *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas*

stutzeri et *Pseudomonas aeruginosa* sont très étudiées car elles sont capables de dégrader des hydrocarbures comme le naphthalène et le phénanthrène, et elles ont même la capacité de se déplacer vers ces polluants grâce au chimiotactisme (El-sayed et Rossi 2024).

Souche B2 : se caractérise par une morphologie de bacille à Gram⁺ et une activité gélatinase positive (GEL⁺), tandis que les tests ONPG, ADH, LDC et ODC sont strictement négatifs. De plus, elle montre une capacité à oxyder le mannitol (MAN⁺) sans production d' H₂S. En se référant à ces propriétés enzymatiques, cette souche apparaît comme la plus proche de l'espèce *Micrococcus sp* (Bergey, 1984 ; Leyral et Joffin, 1998).

Souche B10 : présente une morphologie microscopique en coques à Gram⁺ (Gram⁺\ Cocci) et s'avère oxydase négative. Ses tests biochimiques révèlent des réactions positives pour l'ONPG et la gélatinase. Compte tenu de ces critères morpho-trimétriques et enzymatiques, cette souche est plus proche d'être définie comme *Micrococcus sp* selon les descriptions établies par Bergey (1984).

Selon les conclusions de l'étude de Kumar et al. (2013), la bactérie B2 et B10 a été identifiée comme appartenant au genre *Micrococcus sp*. et a démontré une aptitude significative à biodégrader les hydrocarbures, les souches ont démontré une aptitude à utiliser les hydrocarbures pétroliers comme source de carbone et d'énergie(Kumar et al., 2013)..

L'étude de Kumar et ses collègues. démontre l'efficacité de *Streptococcus sp.3 et *Micrococcus sp*.4 dans la biodégradation des hydrocarbures, avec un net avantage pour la première souche (58 % de dégradation contre 29 % en 45 heures, à un pH de 8 et 35 °C). L'optimisation du procédé par immobilisation cellulaire dans des billes d'alginate améliore significativement la stabilité et le taux d'élimination des polluants, soulignant le rôle clé de la complémentarité enzymatique et des plasmides cataboliques au sein des consortia microbiens (Kumar et al., 2013).

L'étude de Kumar et ses collègues démontre l'efficacité de *Micrococcus sp*. Dans la biodégradation des hydrocarbures, cette souche permettant d'atteindre un taux de dégradation de 29 % en 45 heures d'incubation sous des conditions environnementales optimales fixées à un pH de 8 et une température de 35 °C. L'optimisation du procédé par immobilisation cellulaire dans des billes d'alginate améliore significativement la stabilité de la biomasse et le taux d'élimination des polluants lors des essais en colonne, soulignant l'importance de la complémentarité enzymatique et des plasmides cataboliques au sein des consortia microbiens (Kumar et al., 2013).

Souche B3 : se présente sous forme de bacille à Gram⁻ négatif pour l'oxydase et positif pour la catalase. Son profil métabolique révèle des réactions positives pour l'ONPG, le VP (production d'acétoïne), la gélatinase, ainsi qu'une utilisation nette du citrate (CIT⁺). Suite à ces résultats biochimiques, cette souche est plus proche d'être rattachée à l'espèce *Enterobacter sp* conformément aux descriptions de (Benammar et al., 2023).

Souche B5 : est un bacille à Gram+ et catalase+ capable d'utiliser le citrate (CIT+), de liquéfier la gélatine (GEL+) et d'oxyder activement les sucres, tout en affichant une réponse positive à l'ONPG. Au vu de ces caractères physiologiques, et malgré un caractère oxydase positif, cette souche est au plus proche d'être identifiée comme *Bacillus sp* selon **Bergey (1984) et Leyral et Joffin".(1998)**

Souche B7: se présente sous forme de bacille à Gram+ et catalase+. Son profil biochimique sur galerie API 20E se distingue par des activités LDC et TDA positives, une production d'indole (IND+), et une capacité à fermenter le mélibiose (MEL+), tout en étant négative pour la gélatinase (GEL-). En se fondant sur cette morphologie bacillaire et la spécificité de ces réactions enzymatiques, cette souche au plus proche d'être classée parmi le genre *Bacillus sp*, décrites par **Bergey (1984).**

L'action de *Bacillus sp.* sur les hydrocarbures aromatiques monocycliques a été faible; Toutefois ,cette bactérie dégradait les ¾ des LHA et la moitié des NHA. Cette bactérie posséderait des dioxygénases capables de s'associer aux NHA pour transformer les hydrocarbures aromatiques en catéchol (**Ladino -orjuela et al. 2016).**

L'action de *Bacillus sp.* sur les hydrocarbures aromatiques monocycliques a été faible; Toutefois ,cette bactérie dégradait les ¾ des LHA et la moitié des NHA. Cette bactérie posséderait des dioxygénases capables de s'associer aux NHA pour transformer les hydrocarbures aromatiques en catéchol (**Ladino -orjuela et al. 2016).**Le cycle de ce dernier composé s'ouvrirait alors pour que le pyruvate et le succinate formés soient utilisés par la bactérie comme source d'énergie à travers le cycle de Krebs (**El-sayed et Rossi 2024).**

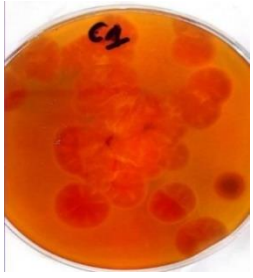
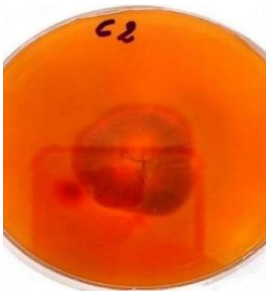
Souche B6 : B6 affiche une morphologie de bacille à Gram- avec une oxydase négative (oxydase-) et un profil non-fermenteur vis-à-vis des glucides. Elle montre néanmoins des activités positives pour l'ONPG et la gélatinase. Sur la base de ces traits distinctifs, cette souche est considérée comme la plus proche de l'espèce *Acinetobacter sp* au sens de (**Guedidi et al., 2024).**

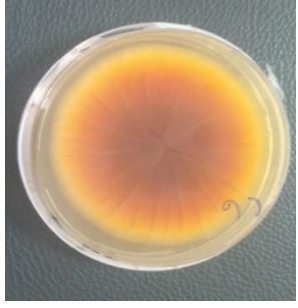
III.2.3. Pré-identification des isolats fongiques

1. Étude macroscopique

Tableau IV. Étude morphologique des souches fongiques

Espèce	Milieu de culture	Description	PHOTO	
			Face supérieure / recto	Face inférieure /verso

<i>Penicillium</i> <i>m</i> <i>SP1</i>	SD A	C1 : Colonie verte à texture poudreuse et veloutée, présentant une surface rugueuse avec des marges irrégulières et une croissance mycélienne étalée, 30°C.		
<i>Penicillium</i> <i>m</i> <i>SP2</i>	SD A	C2 : Colonies vert foncé à texture granuleuse et poudreuse, très denses, avec une surface irrégulière fortement plissée. Présence d'un pigment vert diffusant dans le mycélium et le milieu de culture, accompagné de zones jaunâtres, 30°C.		
<i>Aspergillus</i> <i>s sp</i>	SD A	C3 : Colonie beige clair à texture cotonneuse et dense, caractérisée par une surface plissée, un relief		

		convexe et une croissance rapide envahissante, 30°C.		
<i>Aspergillus</i> sp	SD A	C4 : Les colonies présentent une texture veloutée à floconneuse, le centre est gris-verdâtre tandis que la périphérie est blanche. Un pigment jaunâtre diffuse dans le milieu de culture, 40°C.		
<i>Aspergillus</i> sp	SD A	C5 : Les colonies présentent une texture rase à finement veloutée, avec une coloration brun-jaunâtre. La surface est marquée par des sillons radiaux profonds, et un pigment brun diffusant est observé dans le milieu de culture, 30°C.		
<i>Aspergillus</i> sp	SD A	C6 : L'isolat présente une colonie filamenteuse circulaire, plane et à symétrie radiaire régulière, montrant une texture feutrée à duveteuse due à un réseau dense de mycélium aérien. La surface est caractérisée par une sectorisation pigmentaire nette : une large bordure		

		périphérique blanche, stérile et en croissance active, entoure une zone centro-médiane nuancée de beige à brun-chamois clair, témoignant d'une fructification active, 40°C.		
<i>Aspergillus sp</i>	SD A	C7: colonie à croissance envahissante et irrégulière. Elle se distingue par une pigmentation brun-rougeâtre intense et une texture granuleuse ou veloutée, accompagnée d'une forte diffusion de pigments dans la gélose environnante. Ces traits suggèrent une activité métabolique importante et un développement de type mycélien, 30°C.		

2. Étude microscopique

La caractérisation morphologique des isolats fongiques a été réalisée en combinant une observation macroscopique des colonies (aspect, couleur et cinétique de croissance) et une analyse microscopique structurale. Pour cette dernière, la technique de coloration au bleu de méthylène a été employée afin de mettre en évidence les structures reproductrices et végétatives des champignons filamenteux isolés.

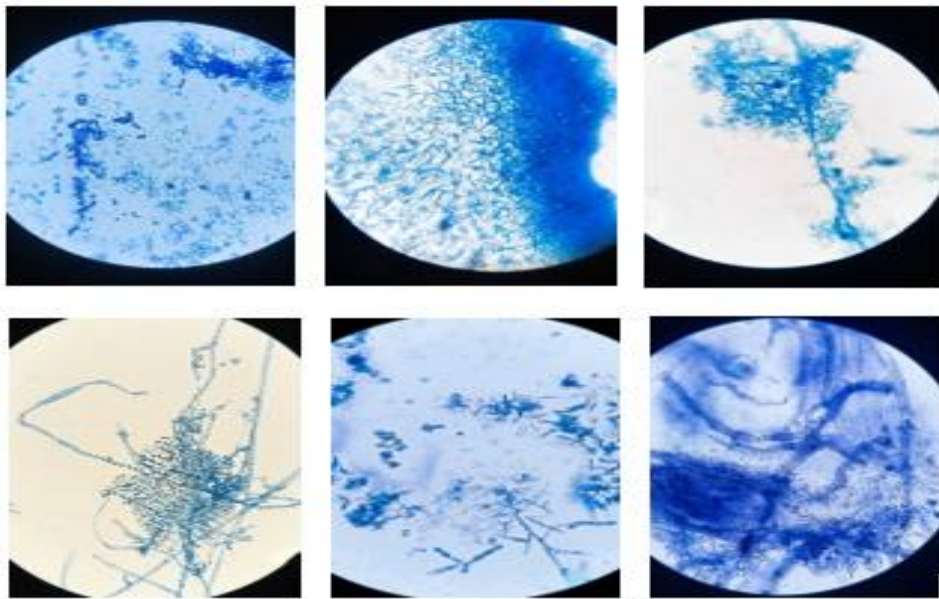


Figure 13. Observation microscopique des souches fongiques isolées C1 , C2 C3, C4, C5 et C6 au microscope optique (grossissement $\times 100$), respectivement.

Les souches fongiques isolées ont été identifiées comme appartenant aux genres *Penicillium* sp. (C1 et C2) et *Aspergillus* sp. (C3 à C7). Leur isolement à partir de sols contaminés par des hydrocarbures pétroliers suggère leur adaptation à ce type d'environnement et témoigne de leur capacité potentielle à utiliser et à dégrader ces composés comme source de carbone et d'énergie.

L'étude réalisée par Odili et ces collègues, pesant 5 g d'échantillon de sol contenant les fungi (*Aspergillus* sp) a été mise en suspension dans 100 ml de milieu stérile de sel minéral déjà préparé et 0,025 g de chloramphénicol et complétés par 1 % de pétrole brut comme seule source de carbone. Le flacon a été incubé pendant 7 jours à température ambiante sur un agitateur rotatif à 130 rpm ,après agitation une dilution décuplée a été effectuée et 1 ml de chaque dilution a été versée dans des plaques doubles de Potate Dextrose Agar (PDA) pour l'isolement des champignons utilisant le pétrole brut. Les plaques ont été incubées à 28°C pendant 7 jours (**Barnes et al., 2017**) .

L'isolat *Aspergillus* sp a montré une grande capacité de dégradation avec un degré de dégradation de 78,3 % au jour 3 à 92,8 % au jour 15 (**Odili et al .2020**).

Dans son étude, BENGUENAB a évalué le potentiel de biodégradation du pétrole brut par six isolats fongiques sélectionnés à partir de sols contaminés. Les essais ont été réalisés en utilisant

le pétrole comme unique source de carbone et d'énergie afin d'apprécier la capacité métabolique des souches à dégrader les hydrocarbures pétroliers.

Les résultats obtenus ont révélé des performances variables selon les isolats testés. L'isolat DSL1 identifié comme *Penicillium glabrum* a présenté le taux de biodégradation le plus élevé, atteignant 55,98 %, suivi de l'isolat *Aspergillus sp* avec un taux de dégradation de 54,11 %. Des capacités de dégradation importantes ont également été observées chez les isolats, *Penicillium sp* et *Aspergillus fumigatus*, qui ont permis respectivement l'élimination de 44,55 % , 43,19 % du pétrole initialement présent. L'isolat *Aspergillus ustus* a également démontré une activité biodégradatrice notable avec un taux de dégradation de 30,43% (Benguenab. 2022).

L'ensemble de ces résultats met en évidence la capacité des souches fongiques étudiées à utiliser les hydrocarbures pétroliers comme source de carbone pour leur croissance et leur développement. Cette étude a ainsi confirmé le potentiel des champignons filamenteux C1.C2.C3.C4.C5.C6 et C7 dans les processus de bioremédiation des sols contaminés par les hydrocarbures, tout en soulignant une variabilité de l'efficacité de biodégradation selon les genres et les espèces fongiques.

Dans une autre étude, la constance de dégradation maximale ($K = 0.0224$ jour⁻¹ des hydrocarbures totaux) dans le sol a été obtenue par *A. niger* suivi par *Penicillium ochrochloron* ($k = 0.0213$ jour⁻¹) Les temps de demi-vie correspondants étaient 30.9 et 32.4 jours , respectivement (Essabri et al., 2019).

III. 3. les interactions entre les souches bactériennes et fongiques

Tableau V. Résultats des interactions inter-souches bactériennes

Bacteries	B1	B2	B3	B10	B5	B6	B7
B1		+	+	+	+	+	+
B2	+		+	+	+	-	+
B3	+	+		+	+	-	+
B10	+	+	+		+	-	+
B5	+	+	+	+		-	+
B6	+	-	-	-	-		+
B7	+	+	+	+	+	+	

L'analyse des interactions entre les différentes souches bactériennes présentées dans le tableau met en évidence que la souche B6 exerce un effet antagoniste marqué vis-à-vis de la majorité des autres isolats. En effet, cette souche inhibe la croissance de toutes les bactéries testées, à l'exception de la souche B1 et B7 avec laquelle une interaction positive a été observée.

Compte tenu de ce comportement inhibiteur, la souche B6 a été exclue des essais d'immobilisation. Son maintien pourrait en effet compromettre l'efficacité du consortium bactérien.



Figure 14. Interactions in vitro entre les souches bactériennes isolées B1, B2, B3, B5, B6, B7 et B10.

Tableau VI. Résultats des interactions inter-souches fongiques

Champignons	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
C1	+	+	+	+	+	+	+
C2	+	+	+	+	+	+	+
C3	+	+	+	+	+	+	+
C4	+	+	+	+	+	+	+
C5	+	+	+	+	+	+	+
C6	+	+	+	+	+	+	+

Les observations ont montré que les sept isolats fongiques sont capables de croître simultanément dans les mêmes conditions de culture, sans manifestation apparente de zones d'inhibition ni de signes de compétition directe entre eux.

Tableau VII. Résultats des interactions entre souches bactériennes et fongiques

Champi	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
Bacteries							
B1	+	+	-	-	-	-	-
B2	+	+	-	+	+	+	+
B3	+	+	-	-	-	+	+
B10	+	+	+	-	-	+	+
B5	+	+	-	-	-	+	+
B6	+	+	+	+	+	+	+
B7	+	+	-	-	+	+	+

Les souches retenues pour la suite de l'étude sont C1, C2, C6, C7, B1, B2, B5 B10,B3 et B7. Ces isolats ont montré une bonne compatibilité avec les souches bactériennes sélectionnées, ainsi qu'une capacité d'adaptation aux conditions expérimentales appliquées.

III.4. Production de biochar

III.4.1 Rendement en biochar

Les résultats relatifs au rendement en biochar sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau VIII. Rendements en biochar des deux matières végétales utilisées.

Biochars	Moyenne (g)	Rdt biochar (%)
BCPD	460 +/- 16.2	46
BCMC	455.8 +/- 18.1	45.58

BCMC : Biochar de Marc de café

BCPD : Biochar de feuilles de palmier dattier

D'un point de vue comparatif, on observe une proximité remarquable entre les rendements des deux matières premières. L'écart entre le rendement des feuilles de palmier dattier (46%) et celui du marc de café (45,58%) est minime (une différence de seulement 0,42%).

De plus, l'analyse des écarts-types (pm 16,2g pour le premier et pm 18,1g pour le second) indique une variabilité expérimentale comparable d'un essai à l'autre. Sur le plan statistique, cette faible fluctuation mathématique entre les deux moyennes suggère que les deux types de biomasse possèdent un potentiel de conversion en carbone fixe (pyrolyse ou thermolyse) quasiment équivalent dans les conditions opératoires appliquées.



Figure 15.Produit final de la pyrolyse des feuilles de palmier dattier.



Figure 16. Produits final de la pyrolyse de marc de café.

III.4.2. Analyse de biochar

III.4.2.1. Caractéristiques physiques

III.4.2.1.1. Microscopie Electronique à Balayage (MEB) couplée à la spectrométrie EDX

Le resultat de biochar par microscope electronique illustre par la figure suivante

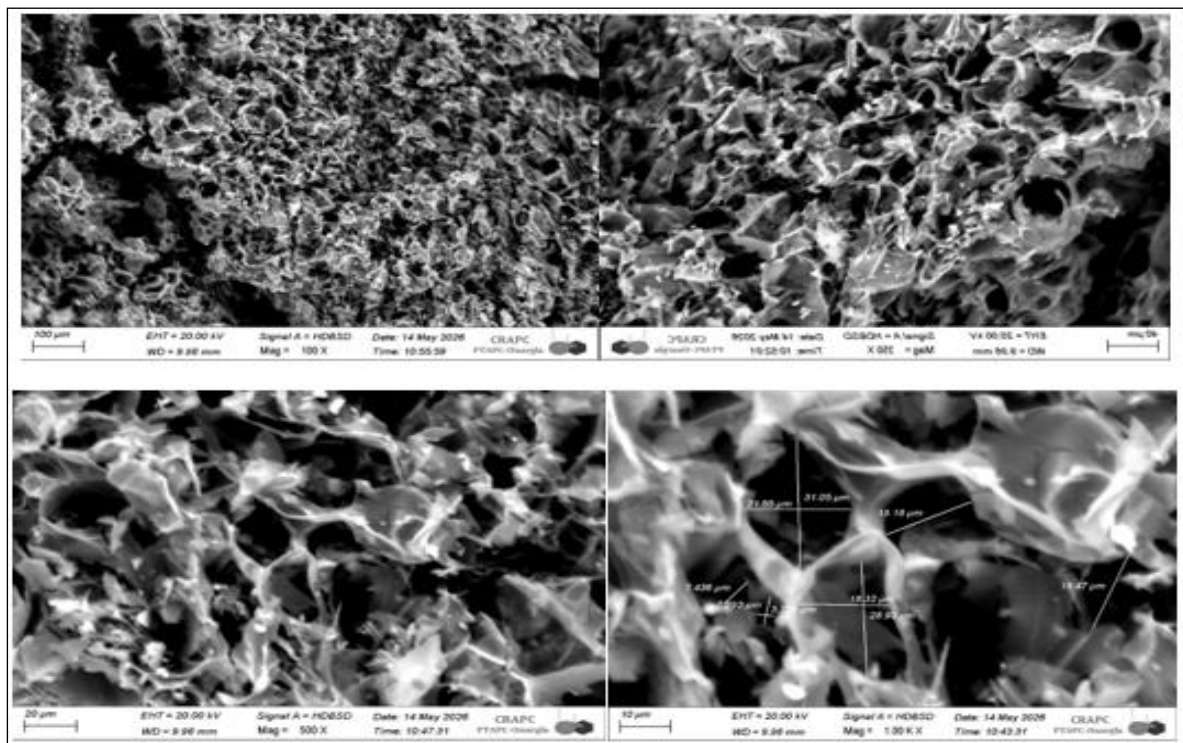


Figure 17. Observation morphologique au microscope électronique à balayage (MEB) du biochar élaboré à partir de marc de café

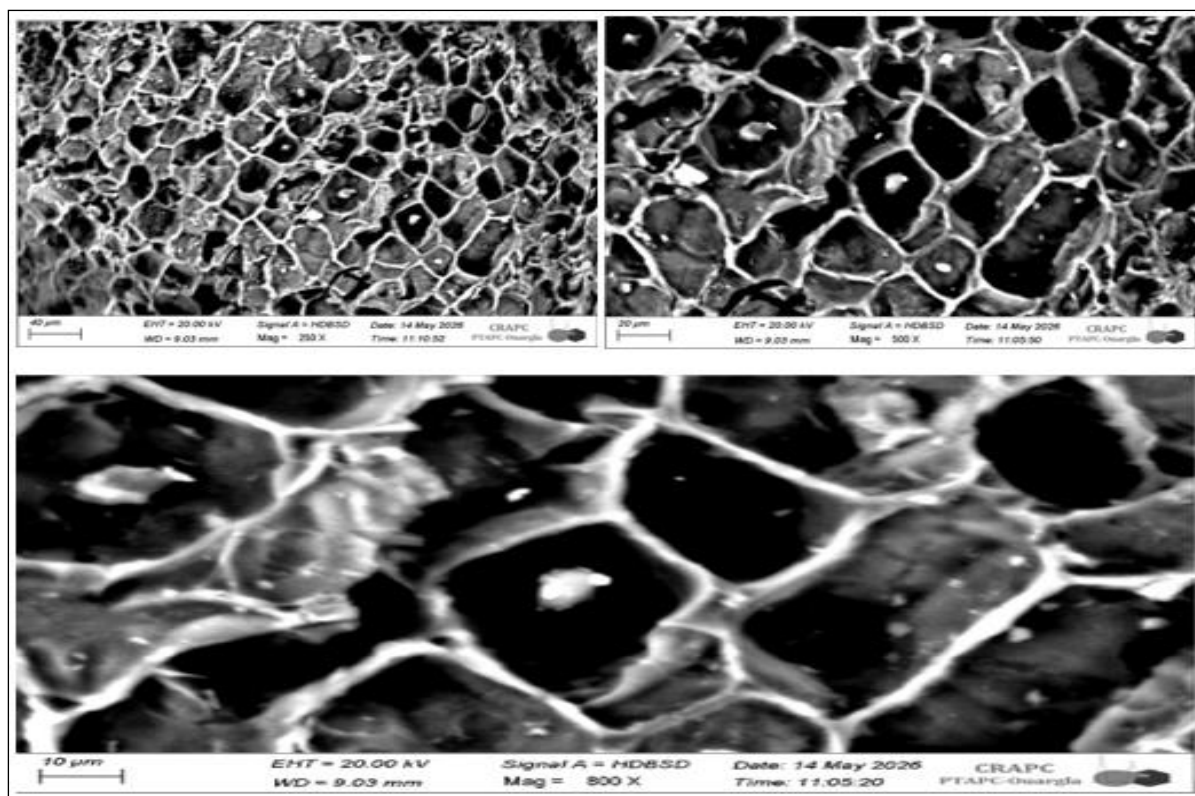


Figure 18. Observation morphologique au microscope électronique à balayage (MEB) du biochar élaboré à partir de feuilles de palmier dattier.

Tableau IX. Caractérisation élémentaire des biochars obtenue par analyse EDX

Éléments	% Atomique BCPD	% Atomique BCMC	Moyenne
C	81.82	78.12	79.97
O	16.64	15.93	16.285
Na	-	0.57	0.57
Mg	0.36	2.28	1.32
Cl	-	0.72	0.72
K	0.66	0.89	0.775
Ca	0.15	0.17	0.16
Cu	-	0.11	0.11
Si	-	0.29	0.29
S	-	0.66	0.66
Au	0.14	0.23	0.185
Mo	-	0.03	0.03
P	0.10	-	0.10
Al	0.12	-	0.12

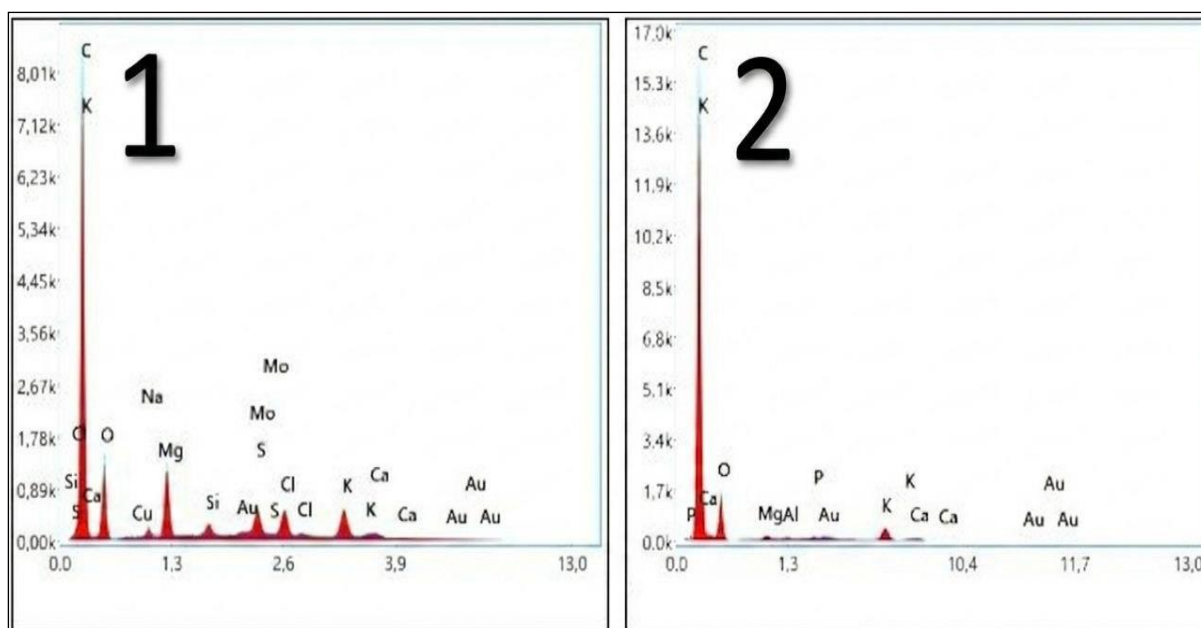


Figure 19. Analyse élémentaire par EDX des différents biochars utilisés : (1) Profil spectral du biochar de marc de café ; (2) Profil spectral du biochar de feuilles de palmier dattier

L'analyse microscopique met en évidence une structure hautement poreuse caractérisée par la présence de macropores interconnectés, traduisant le développement d'une surface spécifique importante. Cette porosité est principalement attribuée à la libération des composés volatils lors du processus de pyrolyse et de carbonisation du matériau organique. Par ailleurs, la présence de fissures et de cavités internes témoigne d'une altération significative de l'organisation lignocellulosique initiale du marc de café sous l'effet du traitement thermique. (Seddiki & Bessaci, 2024)

Ces propriétés morphologiques confèrent au biochar un potentiel élevé d'adsorption des composés organiques et des contaminants. La structure poreuse observée favorise également l'adhésion et l'immobilisation des microorganismes, tout en améliorant la rétention de l'eau et des nutriments. De ce fait, ce matériau présente des caractéristiques particulièrement intéressantes pour les applications de bioremédiation des sols contaminés par les hydrocarbures pétroliers.

L'analyse morphologique met en évidence une architecture carbonée relativement homogène, caractérisée par la présence de parois fines et d'un réseau important de macropores interconnectés. Cette organisation structurale résulte principalement de l'élimination des matières volatiles au cours du processus de pyrolyse, entraînant la formation d'un matériau doté d'une surface spécifique développée. La présence de pores ouverts et de cavités internes favorise les mécanismes de diffusion et d'adsorption des composés organiques.

Les caractéristiques morphologiques observées confèrent au biochar de feuilles de palmier dattier une capacité importante de rétention des polluants, de l'eau et des éléments nutritifs. Par ailleurs, la porosité développée constitue un support propice à l'adhésion, à la prolifération et à l'immobilisation des microorganismes impliqués dans les processus de biodégradation. Ces propriétés font de ce matériau un candidat particulièrement intéressant pour les applications de bioremédiation des sols contaminés par les hydrocarbures pétroliers.

III.3.2.2. Caractéristiques chimiques

Les données chimiques de mélange de des biochar sont illustrés dans le tableau suivant

Tableau X. Caractéristique chimique de biochar

Paramètre	CE	PH
BCPD +BCMC	2.83	8.61

Le biochar obtenu présente un pH alcalin de 8,61, ce qui indique la présence importante de composés minéraux basiques issus du processus de pyrolyse. Cette alcalinité est généralement observée dans les biochars produits à des températures élevées, en raison de la concentration des cendres minérales contenant des carbonates, des oxydes et des éléments alcalins.

Un pH alcalin peut avoir un effet positif sur les sols contaminés par les hydrocarbures, notamment en améliorant les conditions de croissance des microorganismes responsables de la biodégradation. Il contribue également à réduire l'acidité du sol et à augmenter la disponibilité de certains nutriments essentiels. Ainsi, ce biochar pourrait favoriser les mécanismes de Biostimulation et améliorer l'efficacité de la bioremédiation des sols pollués (**Schnee et al., 2016**).

La conductivité électrique mesurée est de 2,83 ms/cm, ce qui traduit une salinité modérée du biochar. Cette valeur indique la présence d'ions minéraux solubles libérés durant la pyrolyse de la matière première. La conductivité électrique est un paramètre important, car elle reflète la quantité de sels dissous susceptibles d'influencer l'activité biologique du sol.

La valeur obtenue reste dans une gamme acceptable pour une utilisation environnementale et agricole. Une salinité modérée peut être bénéfique en apportant certains

éléments nutritifs nécessaires au métabolisme microbien. Cependant, des valeurs très élevées pourraient provoquer un stress osmotique et limiter le développement des microorganismes (Seddiki & Bessaci , 2024)

III.4.3. Préparation de nano biochar



Figure 20 . Nano -biochar

Les résultats obtenus ont révélé une absorbance positive à 253 nm, ce qui confirme la formation du nano-biochar. Cette absorbance peut être attribuée à la présence de composés aromatiques et de structures carbonées de taille nanométrique possédant une forte capacité d'interaction avec le rayonnement UV. Ces propriétés témoignent d'une réduction efficace de la taille des particules après le traitement appliqué.

III.5.Immobilisation

III.5.1.Résultats des mesures de la densité optique (DO) avant et après l'immobilisation microbienne sur biochar

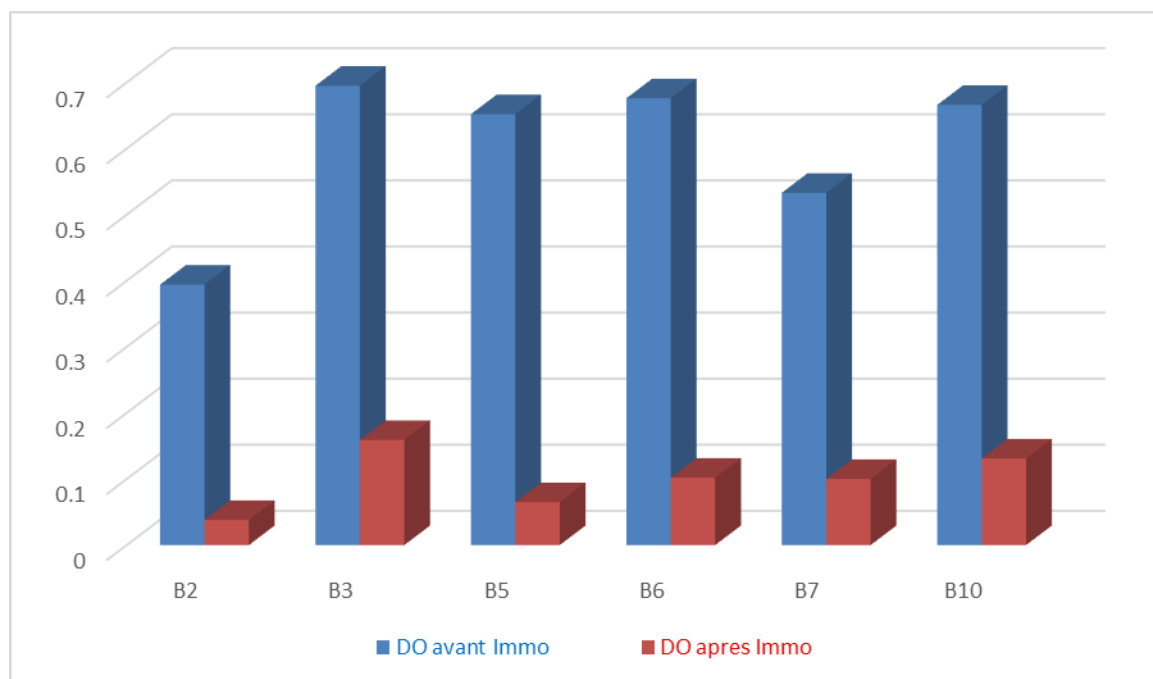


Figure 21. Variation de la biomasse des souches bactériennes avant et après immobilisation sur biochar.

Les résultats obtenus à partir de l'histogramme (**Figure 22**) des valeurs de densité optique avant et après immobilisation sur biochar montrent une différence claire dans la capacité d'adhésion des souches bactériennes étudiées.

Cette variation traduit une différence dans le comportement des souches vis-à-vis du biochar, où certaines souches s'attachent plus efficacement que d'autres. Les valeurs plus faibles de densité optique après immobilisation indiquent une meilleure fixation des cellules sur le support, tandis que des valeurs plus élevées traduisent une immobilisation moins importante (Thunshirn et al., 2022).

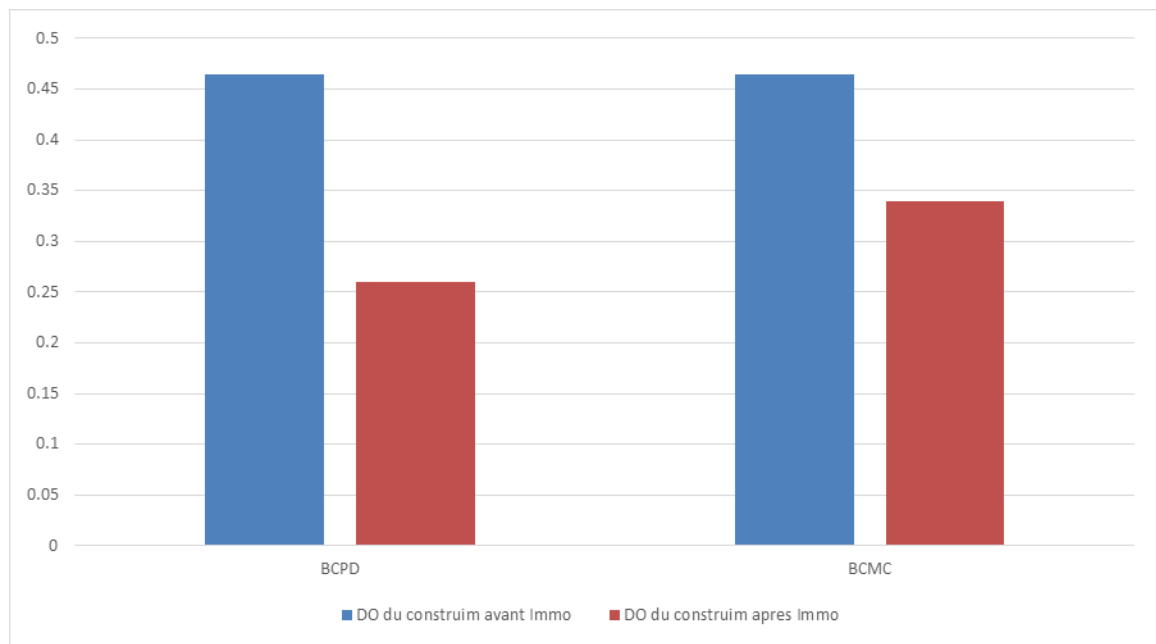


Figure 22.Évaluation comparative de l'efficacité d'immobilisation d'un consortium microbien sur différents types de biochar (BCPD et BCMC).

Les résultats obtenus à partir du histogramme (**Figure 23**), consacré à la comparaison entre deux types de biochar, montrent une différence significative dans leur efficacité d'immobilisation.

D'après la figure (**Figure 23**). Le biochar issu des feuilles de palmier présente une meilleure performance en termes d'immobilisation par rapport à l'autre type de biochar étudié. Cette observation est mise en évidence par des valeurs de densité optique plus faibles après immobilisation, indiquant une fixation plus importante des microorganismes sur ce support.

Ainsi, le biochar de feuilles de palmier apparaît comme le support le plus efficace pour l'immobilisation microbienne dans les conditions expérimentales considérées (**Thunshirn et al., 2022**).

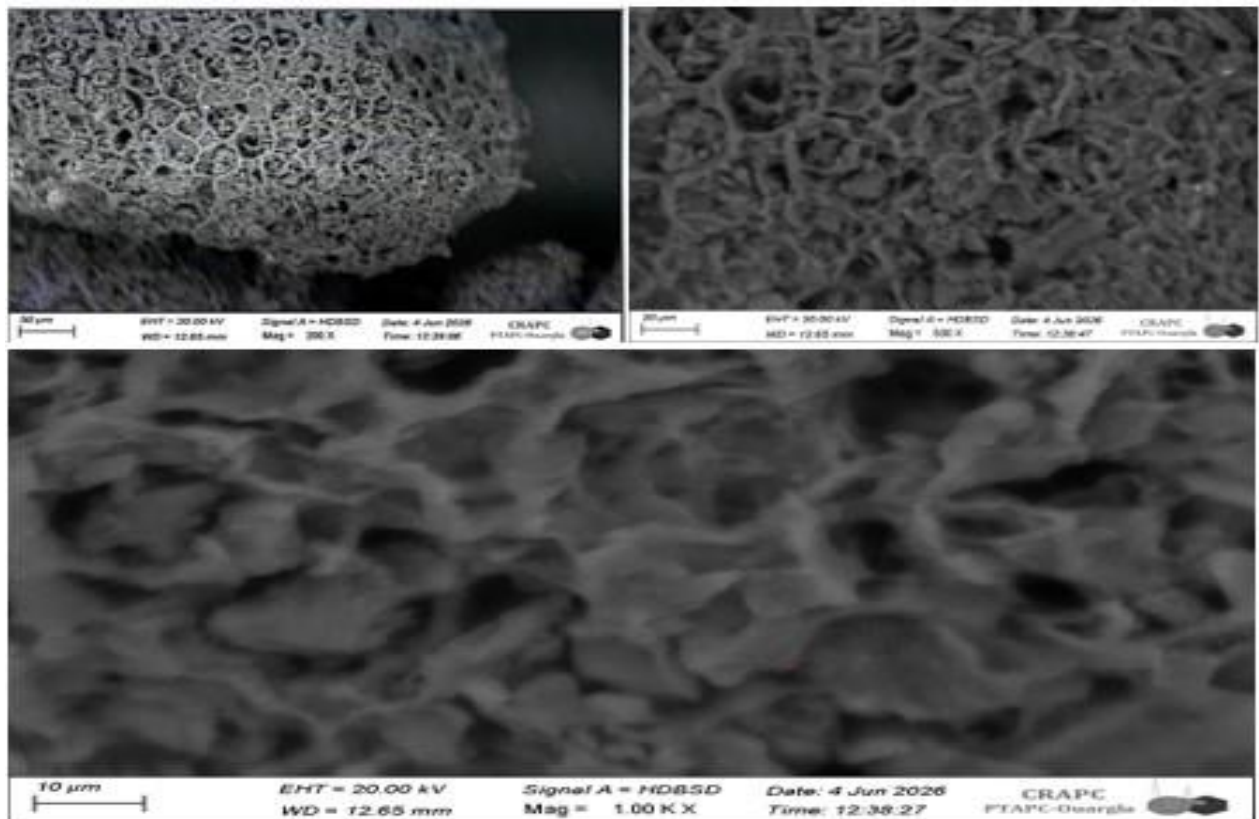


Figure 23. Observation au microscope électronique à balayage (MEB) des micro-organismes immobilisés sur le biochar.

Les résultats de la microscopie électronique à balayage (MEB) montrent une faible distinction morphologique entre les échantillons, notamment en ce qui concerne la structure poreuse du biochar. Cette absence de contraste net peut s'expliquer par la formation d'un biofilm microbien à la surface du matériau.

En effet, l'adhésion et la colonisation microbienne sur le biochar conduisent à la production de substances polymériques extracellulaires (EPS), lesquelles forment une matrice tridimensionnelle susceptible de recouvrir partiellement ou totalement les pores et les irrégularités de surface. Ce processus peut entraîner une obstruction des pores, une atténuation de la rugosité superficielle et, par conséquent, une diminution de la résolution morphologique observable en MEB.

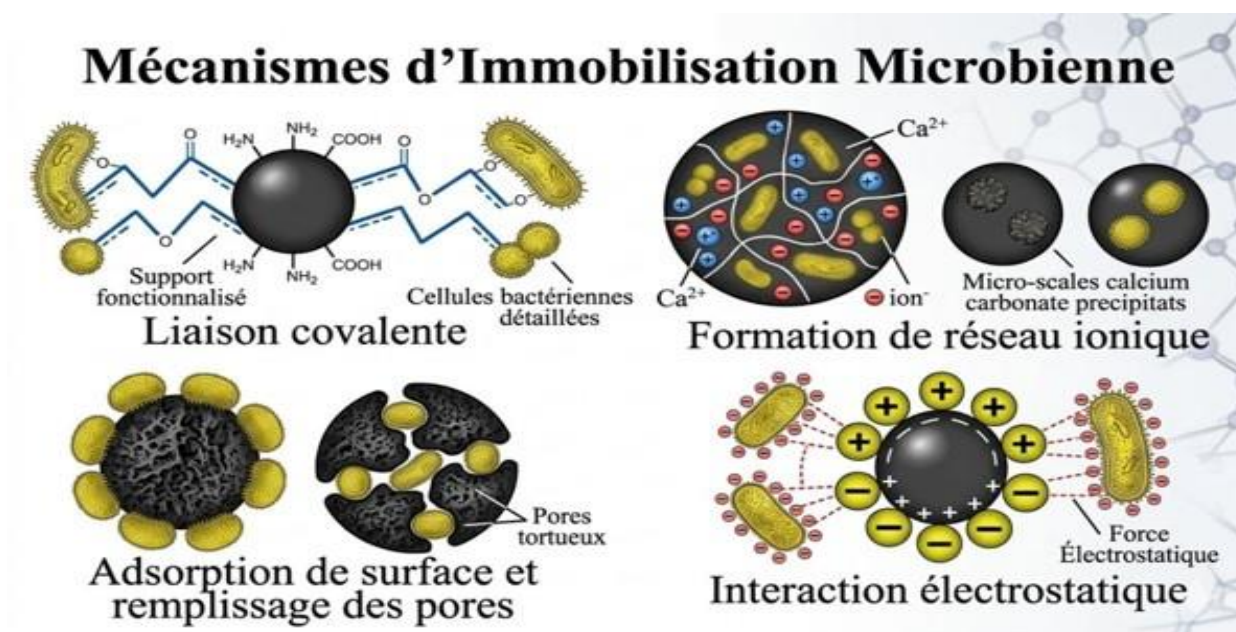


Figure24 .Schéma représentant le processus d'immobilisation des micro-organismes par l'application du biochar.

III.6.Traitement du sol polluée

III.6.1.Caractéristiques physico-chimiques des sols étudiés

Les échantillons de sols contaminés utilisés dans cette étude ont été prélevés au niveau de deux sites pétroliers situés dans le sud algérien, à savoir le site de **Haoud Berkaoui** et celui de **Hassi Messaoud**. Ces régions sont reconnues pour leurs importantes activités d'exploitation des hydrocarbures pétroliers et présentent plusieurs zones affectées par des rejets accidentels ou chroniques de pétrole brut et de dérivés pétroliers.

Le site de Haoud Berkaoui est caractérisé par la présence de bourbiers contaminés par les hydrocarbures, issus principalement des activités de forage et de stockage des résidus pétroliers. Quant au site de Hassi Messaoud, il représente l'un des plus grands champs pétroliers d'Algérie, où les sols subissent fréquemment des contaminations liées aux opérations d'extraction, de transport et de raffinage des hydrocarbures.

Les prélèvements ont été réalisés de manière aseptique afin de préserver la flore microbienne autochtone présente dans les sols contaminés.

III.6.1.1. Aspect physique des sols contaminés étudiés

Les sols étudiés présentent un aspect sombre à noirâtre, caractéristique des sols fortement contaminés par les hydrocarbures pétroliers. Une odeur prononcée de pétrole brut et de dérivés pétroliers a également été observée au moment de l'échantillonnage.

Le sol de Haoud Berkaoui se distingue par une texture plus compacte et visqueuse, liée à une forte imprégnation en hydrocarbures lourds. En revanche, le sol provenant de Hassi Messaoud présente une texture relativement sableuse avec des agrégats plus friables, typiques des sols sahariens contaminés. Par ailleurs, la présence de zones huileuses et d'agglomérats sombres témoigne d'une accumulation importante de composés hydrocarbonés dans les deux sols étudiés.

III.6.1.2.Caractéristique physico -chimiques et microbiologiques de sol

Tableau XI.l'état physico-chimique et microbiologique initial d'un sol pollué avant tout traitement

Caractérisation	Teneur en HC (%)	quantité métaux lourds ug/kg	Conductivité électrique	pH	Dénombrement de flore microbienne UFC/g
Sol avant le traitement	24 (%)	Hg = 404.34 ug/kg Pb = 26703 ug/kg Cr = 4726.5 ug/kg	6.4 ms/cm	8.86	1.75×10^5 UFC /g

Le tableau présenté expose les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques initiales d'un sol soumis à une pollution de nature anthropique, principalement hydrocarburée et métallique.

L'évaluation de ces paramètres est cruciale pour comprendre le niveau de dégradation du site et pour orienter le choix de la stratégie de dépollution (biostimulation, bio-augmentation, ou traitements physico-chimiques). Teneur en hydrocarbures (HC) : Elle s'élève à 5,94 %. C'est un taux de contamination particulièrement élevé, témoignant d'une pollution massive (par exemple, suite à un déversement industriel ou de produits pétroliers). Contamination en métaux Lourds : Le sol présente une multi-contamination par des éléments traces métallique Plomb (Pb) : 26703 ug/kg (soit 26,7 mg/kg) concentration la plus prédominante. Chrome (Cr) : 4726,5 ug/kg (soit 4,73 mg/kg). Mercure (Hg) : 404,34 ug/kg (soit 0,40 mg/kg).

La caractérisation initiale du sol révèle un état critique de co-contamination mixte, illustré par une teneur massive en hydrocarbures pétroliers (5,94 %) associée à une multi-contamination par des éléments traces métalliques (ETM), dominée quantitativement par le plomb (Pb = 26 703 ug/kg), suivi du chrome (Cr = 4 726,5 ug/kg) et du mercure (Hg = 404,34 ug/kg).

Dans ce système complexe, les polluants organiques et inorganiques n'agissent pas de manière isolée, mais exercent une toxicité synergique sur la biologie du sol. Selon (Aziz et al. 2021) Conductivité Électrique (CE) : Elle est mesurée à 6,4 ms/cm. Cette valeur élevée indique une forte salinité ou une forte concentration en ions dissous dans la solution du sol, ce qui témoigne d'une forte salinité du milieu.

Selon **Violante et ses collègues** Le pH : Il est de 8,86, ce qui classe ce sol dans la catégorie des sols fortement alcalins (basiques).le sol étudié présente un pH fortement alcalin de 8,86. Cette alcalinité élevée joue un rôle déterminant dans la spéciation des métaux lourds ; elle favorise généralement leur précipitation sous forme de carbonates ou d'hydroxydes, réduisant ainsi leur biodisponibilité et leur toxicité immédiate pour la microflore **Violante et al.(2022)**.

Dénombrement de la Flore Microbiologique : La charge microbienne initiale est de $1,75 \cdot 10^5$ UFC/g, Bien que la présence d'une flore microbienne $1,75 \cdot 10^5$ UFC/g témoigne de la survie de micro-organismes autochtones, cette valeur reste particulièrement faible en comparaison avec celle d'un sol témoin non pollué, où la densité bactérienne dépasse généralement 10^6 à 10^8 UFC/g. Cette réduction significative de la biomasse microbienne met en évidence l'effet toxique et inhibiteur exercé par la forte charge en hydrocarbures (5.94%) et en métaux lourds notamment le plomb (**Benahmed & Houali, 2014**).

III.6.2.Résultats de traitement

III.6.2.1.Le Taux de biodégradation des hydrocarbures

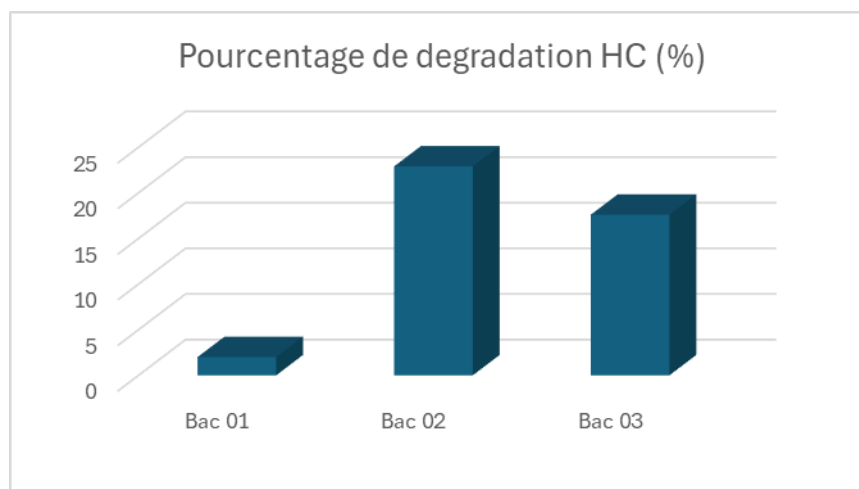


Figure 25. Comparaisons des performances de dégradation des hydrocarbures des trois modalités expérimentales.

- Bac 01. Sol témoin non traité
- Bac 02. Sol + MO immobilisé dans le Biochar(+biosurfactant)
- Bac 03. Sol + Microorganismes (MO)

L'Histogramme présenté regroupe les données expérimentales relatives à l'évolution de la teneur en hydrocarbures (HC), de l'humidité (teneur en eau), de la fraction solide du sol, ainsi que le pourcentage de dégradation final après traitement pour quatre modalités différentes (Bac 01 à Bac 03).

L'analyse des pourcentages de dégradation met en évidence une nette variabilité de l'efficacité des traitements selon la formulation appliquée au sol contaminé :

Le sol témoin (2 % de dégradation) : Indique la présence d'une activité microbienne indigène basale capable de métaboliser une faible fraction des hydrocarbures.

- **Sol + Micro-organismes (MO) (17,6 % de dégradation)** : L'apport d'un consortium microbien (bio-augmentation) améliore significativement le taux de biodégradation par rapport au témoin). Cela confirme le potentiel métabolique des souches sélectionnées pour l'assimilation des fractions hydrocarbonées.
- **Sol + Biochar immobilisé par les MO (22,9 % de dégradation)** : Cette modalité affiche le taux de dégradation le plus élevé. L'association du biochar et des micro-organismes montre un effet synergique remarquable. Le biochar n'agit pas seulement comme un agent d'adsorption des polluants, mais joue un rôle crucial de support protecteur (matrice d'immobilisation) pour les micro-organismes. Cette structure poreuse protège la biomasse microbienne des chocs toxiques dus aux fortes concentrations de HC, améliore la rétention des nutriments et offre un micro-environnement optimal (niches écologiques) favorisant leur survie, leur prolifération et leur activité métabolique continue (**Wang et al. 2025**).

Dans l'optique d'optimiser la biorestauration des sols contaminés par les hydrocarbures pétroliers, l'intégration des biosurfactants, s'avère une stratégie hautement efficace pour pallier la faible solubilité de ces contaminants hydrophobes. Selon l'étude menée par **Li et al. (2018)**,

le rôle de ces biomolécules est bidimensionnel, combinant des effets physico-chimiques et des modifications biologiques structurales au sein du système édaphique. D'une part, les biosurfactants réduisent drastiquement la tension superficielle et interfaciale, favorisant ainsi la désorption et l'émulsification des hydrocarbures sous forme de micro-gouttelettes (**Li et al. 2018**)

• **III.6.2.3. Taux de réduction des métaux lourds dans les Bacs 02. (Sol + Microorganismes (MO) immobilisé dans le Biochar+ biosurfactant)**

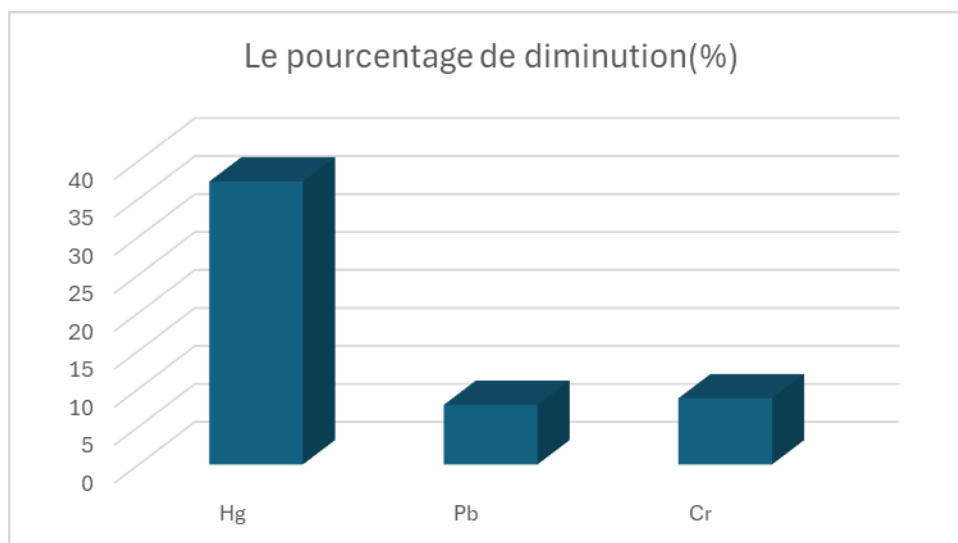


Figure 26. Pourcentage de diminution des concentrations en métaux lourds (Hg, Pb et Cr) après traitement par biostimulation.

Trois métaux lourds ont été analysés : le mercure (Hg), le plomb (Pb) et le chrome (Cr).

Les résultats montrent une diminution globale de la concentration de certains métaux lourds dans le bac traité avec le biochar immobilisé par les micro-organismes (Bac 02) par rapport au sol témoin non traité (Bac 01), ce qui indique l'efficacité potentielle du traitement biologique dans l'immobilisation ou la réduction de la biodisponibilité des métaux lourds.

- Le mercure (Hg) passe de 404.34 $\mu\text{g/kg}$ dans le Bac 01 à 253.69 $\mu\text{g/kg}$ dans le Bac 02. Cette diminution importante suggère une adsorption efficace du mercure par le biochar ainsi qu'une possible intervention des micro-organismes dans la stabilisation de ce métal toxique.

Le pourcentage de diminution est 37.25(%)

- Le plomb (Pb) présente également une légère diminution, avec une concentration passant de 26703 $\mu\text{g/kg}$ à 24610 $\mu\text{g/kg}$ après traitement. Cette réduction peut être liée à la grande capacité d'échange cationique du biochar favorisant la fixation des ions métalliques

Le pourcentage de diminution est 7.84 (%)

- Le chrome (Cr) diminue de 4726.5 $\mu\text{g/kg}$ à 4314.84 $\mu\text{g/kg}$ dans le bac traité. Cette baisse confirme l'effet positif du consortium microbien immobilisé sur biochar dans la réduction de la mobilité des métaux lourds dans le sol contaminé.

Le pourcentage de diminution est 8.7 (%)

Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que l'utilisation du biochar enrichi par des micro-organismes peut contribuer à la réduction de la contamination métallique des sols pollués par les hydrocarbures pétroliers, notamment pour le Hg, le Pb et le Cr.

Le biochar agit probablement comme un adsorbant naturel grâce à sa surface poreuse et à ses groupements fonctionnels, tandis que les micro-organismes participent à la transformation et à l'immobilisation des métaux lourds dans le sol selon le travail de **Rees et Morel (2012)**.

III.6.3. Évolution de pH et de salinité

Tableau XII. Comparaison de valeur de pH et de salinité des bacs après le traitement par biostimulation

Bacs \ Temp	Avant le traitement		Après le traitement	
	pH	salinité	pH	salinité
Bac1	8,86	6,4 ms/cm	7,2	7,42 ms/cm
Bac2			8,68	5,12 ms/cm
Bac3			9,03	5,57 ms/cm

- Bac 01. Sol témoin non traité
- Bac 02. Sol + Microorganismes (MO) immobilisé dans le Biochar+ biosurfactant
- Bac 03. Sol + Microorganismes (MO)

Les résultats obtenus montrent que les différents traitements ont influencé le pH et la salinité du sol contaminé. Le sol original présentait un pH alcalin de 8,86 et une salinité de 6,4 ms/cm.

Le témoin a enregistré la salinité la plus élevée (7,42 ms/cm) ainsi qu'un pH (7,2), traduisant une dégradation défavorable du milieu en absence de traitement.

Le traitement traité par biochar immobilisé et biosurfactant a montré les meilleurs résultats avec une salinité plus faible (5,12 ms/cm) et un pH stable de 8,68, proche de celui du sol original. Cette amélioration est liée à la capacité absorbante du biochar et à son rôle de support favorable à l'activité microbienne.

Dans l'ensemble, le traitement par biochar immobilisé apparaît comme le plus performant, puisqu'il permet à la fois de réduire la salinité du sol et de maintenir un pH stable favorable à l'activité microbienne. Ces résultats confirment le rôle du biochar comme support biologique efficace et comme amendement capable d'améliorer les propriétés physico-chimiques des sols contaminés par les hydrocarbures (**Wang et al. 2025**).

Conclusion

Ce travail met en lumière le potentiel de la biostimulation assistée par biochar et biosurfactant en tant qu'approche écologique, durable et prometteuse pour la réhabilitation des sols contaminés par les hydrocarbures pétroliers et les métaux lourds. La valorisation de résidus organiques locaux a été au cœur de cette étude, qui a porté sur l'évaluation d'une stratégie de biostimulation et bio augmentation appliquée à des sols contaminés par les hydrocarbures pétroliers provenant des régions de Hassi Messaoud et de Haoud Berkaoui. L'approche adoptée reposait sur l'association synergique de microorganismes autochtones hydrocarbonoclastes, de biosurfactants et de biochars élaborés à partir de biomasses locales, notamment le marc de café et les feuilles de palmier dattier.

Après l'isolement et la sélection de souches bactériennes et fongiques capables d'utiliser les hydrocarbures comme source de carbone, les microorganismes ont été immobilisés sur le biochar afin d'améliorer leur survie, leur stabilité et leur activité biologique. Les observations réalisées ont confirmé l'aptitude du biochar à constituer un support favorable à la colonisation microbienne grâce à sa structure poreuse, sa grande surface spécifique et ses propriétés adsorbantes.

Les résultats obtenus ont démontré l'efficacité de la biostimulation dans la dépollution des sols contaminés. Le traitement associant les microorganismes autochtones et le biochar et biosurfactant permis d'atteindre un taux de réduction des hydrocarbures totaux pétroliers de 22,9 %, contre 17,6 % pour le traitement microbien seul et seulement 2 % pour le témoin. Ces résultats mettent en évidence l'effet synergique du biochar et des microorganismes dans l'amélioration de la biodégradation des hydrocarbures pétroliers.

Parallèlement, une diminution de la biodisponibilité des métaux lourds a été observée après traitement. Les taux de réduction enregistrés ont atteint 27,25 % pour le mercure (Hg), 8,70 % pour le chrome (Cr) et 7,84 % pour le plomb (Pb). Le mercure a présenté le pourcentage d'abattement le plus élevé, traduisant l'efficacité du biochar dans l'adsorption et l'immobilisation des contaminants métalliques, ainsi que la contribution des microorganismes à la réduction de leur mobilité dans le sol.

Le biochar a joué un rôle déterminant dans l'amélioration de l'efficacité du procédé de biostimulation. En plus de servir de support d'immobilisation pour les microorganismes, il a favorisé la formation d'un biofilm microbien stable et actif. Sa capacité à retenir l'eau, à

améliorer l'aération du sol et à adsorber les polluants a permis de créer un microenvironnement favorable au développement microbien et à l'intensification des processus de biodégradation et de stabilisation des contaminants. Ainsi, cette étude démontre que la biostimulation assistée par biochar constitue une approche écologique, durable et prometteuse pour la réhabilitation des sols contaminés par les hydrocarbures pétroliers et les métaux lourds. La valorisation de résidus organiques locaux pour la production de biochar représente également une solution économiquement intéressante et respectueuse de l'environnement pour les régions sahariennes.

Afin de consolider et d'approfondir les résultats obtenus, plusieurs perspectives peuvent être envisagées. Il serait pertinent de :

Réaliser des essais à plus grande échelle sur des sites pétroliers réels afin d'évaluer les performances du procédé dans les conditions environnementales du Sahara.

L'étude des mécanismes microbiologiques, enzymatiques et moléculaires impliqués dans la biodégradation des hydrocarbures permettrait également de mieux comprendre les interactions entre les microorganismes et le biochar.

Références

A

- Abu-Khasan, M.S.; Makarov, Y.I. Analysis of soil contamination with oil and petroleum products. *IOP Conf. Ser. Earth Environ.Sci.* 2021,937, 022046.
- AbdelRahman., ME. (2011). Biodegradation of Crude Oil by Bacteria Isolated from Produced Formation Water of an Onshore Oil Field in Sudan. A published Masters Thesis Submitted to the Department of Botany, University of Khatoum, Khatoum.
- Adams, G. O., Fufeyin, P. T., Okoro, S. E., et al. (2015). Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 3(1), 28–39.
- Adnan, A., Karin, H. A., Gerhard, S., & Siegrid, S. (2015). Compost and biochar alter mycorrhization, tomato root exudation, and development of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Frontiers in Plant Science*, 6, 529.
- AFNOR. (1999). *Qualité du sol — Détermination du pH (NF ISO 10390)*. Paris, France: Association Française de Normalisation.
- Ait Oumeraci, Mohamed. (2020). Bioremédiation d'un sol contaminé par les hydrocarbures : Recherche des modes de la biostimulation (site de forage Hassi Messaoud) [Mémoire d'ingénieur, École Nationale Polytechnique].
- Al-Rumaihi, A., Shahbaz, M., McKay, G., Mackey, H., & Al-Ansari, T. (2022). A review of pyrolysis technologies and feedstock: a blending approach for plastic and biomass towards optimum biochar yield. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 167, 112715.
- Alrumman, S. A., Standing, D. B., & Paton, G. I. (2015). Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial biomass and enzyme activity. *Journal of Environmental Management*.
- Aragaw, T. A. (2021). Functions of various bacteria for specific pollutants degradation and their application in wastewater treatment: a review.

International Journal of Environmental Science and Technology, 18, 2063–2076.

- Aziz, F., Amin, M., & El-Shatoury, S. A. (2021). Effects of co-contamination with petroleum hydrocarbons and heavy metals on soil microbial communities and their bioremediation potential. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(14), 17345-17358. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11925-w>.

B

- Bahaz, A. (2018). Capacité de biodégradation du pétrole brut par des bactéries autochtones isolées de sols contaminés (Mémoire de Master, Université de Ghardaïa). <https://theses-algerie.com/2315805580364526/memoire-de-master/universite-de->
- Baize, D. (1997). Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols ; France (Guide pour l'interprétation des données). Inra Éditions. Paris, France.
- Barnes, NM., Khosde, VB., Lotlikar, NP., Meena, RM and Damare, SR. (2017). Bioremediation Potential of Hydrocarbon-utilizing Fungi from Select Marine Niches of India. *Biotech. J.*
- Başer, B. Y., Yetis, U., Abbas, Q., et al. (2021). Formation of nitrogen functionalities in biochar materials and their role in the mitigation of hazardous emerging organic pollutants from wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 416, 126131.
- Benahmed, A., & Houali, K. (2014). Évaluation du potentiel de biodégradation des hydrocarbures par des souches bactériennes isolées de sols pollués. *Journal algérien des régions arides (JARA)*.
- Benammar, S., Martinez, M., & Bouras, R. (2023). Isolation, biochemical identification, and evaluation of petroleum hydrocarbon degradation

- potential of an indigenous *Enterobacter* sp. strain from oil-contaminated soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 178, 105560.
- Benguenab, A. (2022). *Bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures avec des champignons telluriques* (Thèse de doctorat, Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, Algérie).
 - Bergey, D. H., Krieg, N. R., & Holt, J. G. (Eds.). (1984). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Volume 1). Baltimore, MD: Williams & Wilkins.
 - Berthelin, J., Leyval, C., & Toutain, F. (2001). *Biologie des sols : rôle dans le fonctionnement des écosystèmes*. Éditions Masson. Paris, France.
 - bioMérieux. (n.d.). API 20E identification system – Manual microbial identification.
<https://www.biomerieux.com/fr/fr/notre-offre/produits-clinique/galeries-identification-api-et-apiweb.html>
 - Boudiaf, R., Belkacemi, H., & Keddari, M. (2023). Assessment of petroleum-based pollution in arid soil: Physico-chemical and microbiological characterization of the Hassi Messaoud oil field, Algeria. *Journal of African Earth Sciences*, 198, 104-115.
 - Boufkhed, N. R., Bouzit, W., & Chabane, N. (2024). Méthodes conventionnelles et innovantes d'identification des bactéries. Université Constantine 1.
<https://fac.umc.edu.dz/snv/bibliotheque/biblio/mmf/2024/239-%20M%C3%A9thodes%20conventionnelles%20et%20innovantes%20d%E2%80%99identification%20des%20bact%C3%A9ries%20%20identification%20pr%C3%A9somptive%20de%2025%20bact%C3%A9ries%20phytopathog%C3%A8nes.pdf>.
 - Brewer, C. E., Chuang, V. J., Masiello, C. A., et al. (2014). New approaches to measuring biochar density and porosity. *Biomass and Bioenergy*, 66, 176–185.

C

- Camenzuli, D., & Freidman, B. L. (2015). On-site and in situ remediation technologies applicable to petroleum hydrocarbon contaminated sites in the Antarctic and Arctic. *Polar Research*, 34.

D

- Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnology Research International*, 2011, 941810.
- Das, S. K., & Ghosh, G. K. (2021). Development and evaluation of biochar-based secondary and micronutrient enriched slow release nano-fertilizer. *Biomass Conversion and Biorefinery*.
- Denis Baize (2000). Guide des analyses courantes en pédologie : Choix, expression, présentation et interprétation. Paris, France : INRA Éditions.

E

- Elektorowicz, M. (1994). Bioremediation of petroleum-contaminated clayey soil with pretreatment. *Environmental Technology*, 15(4), 373–380.
- Elkhailifa, S., Mackey, H. R., Al-Ansari, T., & McKay, G. (2022). Pyrolysis of biosolids to produce biochars: a review. *Sustainability*, 14(15), 9626.
- El-Sayed, A. M., & Rossi, G. (2024). Comparative genomics of *Pseudomonas* and *Bacillus* strains isolated from oil-contaminated soils: Insights into metabolic pathways for BTEX degradation. *Environmental Science and Pollution Research*, 31(14), 20415–20428.
- Essabri, A. M. A., Aydinlik, N. P., & Williams, N. E. (2019). Bioaugmentation and biostimulation of total petroleum hydrocarbon degradation in a petroleum-contaminated soil with fungi isolated from olive oil effluent. *Water Air Soil Poll*, 230, 76–91.
- EVANS, F.Flavia., ROSADO, Alexandre.Soaes., SEBASTIAN, Gina.Vasquez. et al, 2004. Impact of oil contamination and biostimulation

on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 49 N°2, p 295-305.

F

- Fox, A., Kwapinski, W., Griffiths, B. S., & Schmalenberger, A. (2014). The role of sulfur- and phosphorus-mobilizing bacteria in biochar-induced growth promotion. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(1), 78–91.
- Fuentes, S., Méndez, V., Aguila, P., et al. (2014). Bioremediation of petroleum hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 4781–4794.
<https://doi.org/10.1007/s00253-014-5684-9>

G

- Gilan, R. S., Parvizi, Y., Pazira, E., & Rejali, F. (2022). Bioremediation of petroleum-contaminated soil in arid region using different arid-tolerant tree, shrub, and grass plant species with bacteria. *Environment, Development and Sustainability*, 24, 1–22.
<https://doi.org/10.1007/s13762-022-04420-4>
- Góngora, E., Chen, Y.-J., Ellis, M., Okshevsky, M., & Whyte, L. (2022). Hydrocarbon bioremediation on Arctic shorelines: Historic perspective and roadway to the future. *Environmental Pollution*, 312, 119247.
- Goswami, M., Chakraborty, P., Mukherjee, K., et al. (2018). Bioaugmentation and biostimulation: A potential strategy for environmental remediation. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 6(5), 223–231.
- Goswami, M., Chakraborty, P., Mukherjee, K., Mitra, G., Bhattacharyya, P., Dey, S., & Tribedi, P. (2018). Bioaugmentation and biostimulation: A potential strategy for environmental remediation. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 6(5), 223–231.

<https://doi.org/10.15406/jmen.2018.06.00219>

- Guedidi, H., Souissi, Y., & Bourguignon, T. (2024). Biodegradation of long-chain n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons by an indigenous *Acinetobacter* sp. isolated from petroleum-contaminated sludge. *Journal of Environmental Management*, 352, 119910.
- Guermouche M'rassi, A., Bensalah, F., Gury, J., et al. (2015). Isolation and characterization of different bacterial strains for bioremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 15332–15346. : <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4343-8>.
- Grimm, C., & Harwood, C. R. (1999). Control of development in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 145(9), 2133-2134.

H

- Haider, F. U., Ejaz, M., Cheema, S. A., et al. (2021). Phytotoxicity of petroleum hydrocarbons. *Environmental Research*, 197, 111031.
- Hailegnaw, N. S., Mercl, F., Pracke, K., et al. (2019). Mutual relationships of biochar and soil pH, CEC, and exchangeable base cations. *Journal of Soils and Sediments*, 19(5), 2405–2416.
<https://doi.org/10.1007/s11368-019-02264-z>
- Hale, L., Luth, M., & Crowley, D. (2015). Biochar characteristics relate to its utility as an alternative soil inoculum carrier. *Soil Biology and Biochemistry*, 81, 228–235.
- Hartline, R. (2023). Catalase test – Microbiology Laboratory Manual.
https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_Laboratory_Manual_%28Hartline%29/01%3A_Labs/1.18%3A_Catalase_Test
- He, K., Liu, Q., Zhang, J., et al. (2023). Biochar enhances the resistance of legumes and soil microbes to drought. *Plants*, 12(24), 4155.

-
- Herrmann, L., & Lesueur, D. (2013). Challenges of formulation and quality of biofertilizers. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Hewelke, E., Szatylowicz, J., Hewelke, P., et al. (2018). The impact of diesel oil pollution on the hydrophobicity and CO₂ efflux of forest soils. *Water, Air, & Soil Pollution*, 229, 51.
- Hossain, M. Z., Bahar, M. M., Sarkar, B., et al. (2021). Assessment of the fertilizer potential of biochars. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 155.
<https://doi.org/10.1016/j.jaap.2021.105043>.
- Hou, D. (2021a). Biochar for sustainable soil management. *Soil Use and Management*, 37(1), 2–6.
- Hou, D. (2021b). Sustainable remediation in China. *Environmental Science & Technology*, 55(23), 15572–15574.
- Hsin, K.-T., Lee, H., Huang, Y.-C., et al. (2025). Lignocellulose degradation in bacteria and fungi. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1583746.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1583746>
- Hu, B., Song, Y., Wu, S., et al. (2019). Slow released nutrient-immobilized biochar. *Journal of Molecular Liquids*, 286, 110876.
- Huang, K., Li, M., Li, R., et al. (2023). Soil acidification and salinity. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1206820.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1206820>
- Huang, Y., Igarashi, K., Liu, L., et al. (2025). Methanol transfer supports metabolic syntrophy. *Nature*.
<https://doi.org/10.1038/s41586-024-08491-w>

- **IBI. (2015). Standardized product definition and product testing guidelines for biochar. International Biochar Initiative.**

J

- **Jaekel, U., Zedelius, J., Wilkes, H., & Musat, F. (2015). Anaerobic degradation of cyclohexane. *Frontiers in Microbiology*, 6, 116.**

K

- **Karel, S. F., Libicki, S. B., & Robertson, C. R. (1985). The immobilization of whole cells. *Chemical Engineering Science*, 40(8), 1321–1354.**
- **Kaplan, C. W., & Kitts, C. L. (2004). Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1777-1786.**
- **Kebede, B., Ayalew, A., Demisse, W., et al. (2021). Environmental factors influencing microbial bioremediation. *Journal of Hazardous Materials*, 401.**
- **Klamerus-Iwan, A., Błońska, E., Lasota, J., et al. (2015). Influence of oil contamination on physical and biological properties of forest soil. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226, 389.**
- **Kumar, K. S., Dhanarani, T. S., & Thamaraiselvi, K. (2013). Utilization of petroleum hydrocarbons by *Micrococcus* and *Streptococcus* spp. isolated from contaminated site. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 3(1), 71–78.**
- **Kuppusamy, S., Thavamani, P., Megharaj, M., & Naidu, R. (2017). Petroleum hydrocarbon contamination in soil. *Environmental Science and Pollution Research*.**

L

- Le, H. T. Q., & Lee, E. Y. (2023). Methanotrophs: metabolic versatility. *Bioresource Technology*, 384, 129296. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129296>
- Leyral, G., & Joffin, J.-N. (1998). *La microbiologie technique : Tome 1 : Dictionnaire des techniques*. Centre Régional de Documentation Pédagogique (CRDP) d'Aquitaine.
- Li, L., Long, A., Fossum, B., & Kaiser, M. (2022a). Effects of pyrolysis temperature and feedstock type on biochar characteristics. *Soil Use and Management* <https://doi.org/10.1111/sum.12848>
- Li, R., Wang, B., Niu, A., et al. (2022b). Application of biochar immobilized microorganisms. *Science of the Total Environment*, 837, 155563.
- Li, X., Fan, F., Chen, B., & Zhang, B. (2018). Biosurfactant enhanced soil bioremediation of petroleum hydrocarbons: Design of experiments (DOE) based system optimization and phospholipid fatty acid (PLFA) based microbial community analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 132, 114-123. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.05.011>
- Liu, X., Xue, P., Jia, F., et al. (2020). Tailoring polymeric composite gelbeads-encapsulated microorganism. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 32, 301–306.
- Lounis S., Daoud I., 2005. Analyse microbienne et physico-chimique des sols contaminés par les hydrocarbures à Hassi-Messaoud. Mémoire ingénieur d'état, écologie, option: pathologie des écosystèmes, 63 p.
- Lu, L., Yu, W. T., Wang, Y. F., et al. (2020). Application of biochar-based materials in environmental remediation. *Biochar*, 2, 1–31.
- Lummus J.L., Azar J.J., 1986. *Drilling fluids optimization, a practical field approach*, pennwell books, Tulsa, Oklahoma, pp.3-5.

M

- Macaulay, B. M., & Rees, D. (2014). Bioremediation of hydrocarbon contamination in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 843–856.
- Majeed, B. K., Shwan, D. M. S., & Rashid, K. A. (2025). A review on environmental contamination of petroleum hydrocarbons. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 27, 526–548.
- Montero-Montoya, R. D., de la Rosa, J. R., & Reséndiz-Rodríguez, S. J. (2018). Evolution of the aromatic structure of charcoal during carbonization of biomass. *Scientific Reports*, 8(1), 1-13.
- Mrozik, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2010). Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research*, 165(5), 363–375.

O

- Odili UC., Ibrahim FB., Shaibu-Imodagbe EM and Atta HI. (2020). Comparative Assessment of Crude Oil Degradation by *Monocillium* sp. and *Aspergillus niger*.
- Okrent, D. (1999). Intergenerational equity and disposal of wastes. *Risk Analysis*, 19, 877–901.

P

- Paray, A. A., Singh, M., Mir, M. A., & Kaur, A. (2023). Gram staining: A brief review. *International Journal of Research and Review*, 10(9), 336–341. <https://doi.org/10.52403/ijrr.20230934>.
- Peysson Y., 2004. Solid/Liquid Dispersions in Drilling and Production. *Oil and Gas Science and Technology-Rev. IFP*, Vol 59. Pp 11-21.

R

- Rees, F., & Morel, J.-L. (2012). Interactions entre biochar et métaux lourds dans les systèmes sol-plante. *Laboratoire Sols et Environnement, Université de Lorraine – INRA*.13, 653.
- Rhykerd, R. L., Crews, B., McInnes, K. J., et al. (1999). Impact of bulking agents, forced aeration and tillage. *Bioresource Technology*, 67(3), 279–285.
- Roy, A. S., et al. (2018). Advances in bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soils. *Environmental Technology & Innovation*, 10, 1–15.

S

- Soltner, D. (2005). Les bases de la production végétale : Tome 1 – Le sol et son amélioration. Sainte-Gemmes-sur-Loire, France: Collection Sciences et Techniques Agricoles.
- Salimnezhad, A., Soltani-Jigheh, H., & Soorki, A. A. (2021). Effects of oil contamination and bioremediation on geotechnical properties. *Journal of Rock Mechanics and Geotechnical Engineering*, 13, 653–670.
- Sayara, T., & Sánchez, A. (2020). Bioremediation of contaminated soils: A review. *Sustainability*, 12(5), 1974.
- Schoebitz, M., López, M. D., & Roldán, A. (2013). Bioencapsulation of microbial inoculants. *Agronomy for Sustainable Development*, 33(4), 751–765.
- Schnee, L. S., Knauth, S., Hapca, S., Otten, W., & Eickhorst, T. (2016). Analysis of physical pore space characteristics of two pyrolytic biochars and potential as microhabitat. *Plant and Soil*, 408(1), 357–368. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-2936-7>.
- Seddiki, D. K., & Bessaci, A. E. (2024). Production et caractérisation physicochimique et biologique de différents biochars issus de diverses matières organiques végétales ,Mémoire de Master Académique, Université Kasdi Merbah Ouargla.
- Shen, Y., Li, H., Zhu, W., et al. (2017). Microalgal-biochar immobilized complex. *Bioresource Technology*, 244, 1031–1038.

- Shi, R.-Y., Hong, Z.-N., Li, J.-Y., et al. (2018). Peanut straw biochar increases resistance to acidification. *Journal of Environmental Management*, 210, 171–179.
- Shi, R. Y., Ni, N., Nkoh, J. N., et al. (2019). Beneficial dual role of biochars in inhibiting soil acidification. *Chemosphere*, 234, 43–51.
- Shi, W., Li, X., Zhang, Y., Wang, J., Liu, H., Zhao, M., Chen, Q., & others. (2021). Physical, chemical and biological remediation technologies for petroleum contaminated soils. *Journal of Cleaner Production*, 335, 130–145.
- Singha, L. P., & Pandey, P. (2021). Rhizosphere assisted bioengineering approaches. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41, 749–766.

T

- Tao, S., Wu, Z., He, X., Ye, B. C., & Li, C. (2018). Characterization of biochar prepared from cotton stalks. *Bioresources*, 13(1), 1773–1786.
- Thunshirn, P., Wenzel, W. W., & Pfeifer, C. (2022). Pore characteristics of hydrochars and their role as a vector for soil bacteria: A critical review of engineering options. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 52(23), 4147–4171.
<https://doi.org/10.1080/10643389.2021.1980424>
- Tomczyk, A., Sokołowska, Z., & Boguta, P. (2020). Biochar physicochemical properties. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 19, 191–215.
- Tyagi, M., da Fonseca, M. M., & de Carvalho, C. C. (2010). Bioaugmentation and biostimulation strategies. *Biodegradation*, 22(2), 231–241.

V

- Vanek, S., Thies, J., Wang, B., Hanley, K., Lehmann, J., 2016. Pore-size and water activity effects on survival of *Rhizobium tropici* in biochar inoculant carriers. *J. Microb. Biochem. Technol.* 8, 296–306.
- Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223, 277–286.
- Vasilieva, S., Lobakova, E., Grigoriev, T., et al. (2021). Bio-inspired materials for nutrient biocapture. *Journal of Water Process Engineering*, 40, 101774.
- Violante, A., Cozzolino, V., Perelomov, L., & Caporale, A. G. (2022). Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soils as affected by biochemical processes. *Soil Science Society of America Journal*, 86(3), 515-535.

W

- Wahla, A. Q., Anwar, S., Mueller, J. A., et al. (2020). Immobilization of metribuzin degrading bacterial consortium on biochar. *Journal of Hazardous Materials*, 390, 121493.
- Wang, L., Cheng, Y., Naidu, R., & Bowman, M. (2021). The key factors for the fate and transport of petroleum hydrocarbons in soil. *Frontiers in Environmental Science*, 9, 620.
- Wang, L., Chen, H., Wu, J., et al. (2021b). Effects of magnetic biochar-microbe composite on Cd remediation. *Journal of Hazardous Materials*, 414, 125494.
- Wang, Z., Chen, B., Cao, Y., et al. (2025). Insights into the interfacial dynamics between phosphate-solubilizing bacteria and biochar. *Biochar*, 7(1), 55.
<https://doi.org/10.1007/s42773-025-00444-4>
- Wang, Y., Liu, X., & Zhang, J. (2025). Biochar-immobilized microbial consortia for the enhanced bioremediation of organic pollutants in soils: Mechanisms, efficiency, and future perspectives. *Bioresource Technology*, 402, 131210.

- Wildman, J., & Derbyshire, F. (1991). Origins and functions of macroporosity in activated carbons. *Fuel*, 70(5), 655–661.
- Willey, J. M., Sherwood, L., & Woolverton, C. J. (2020). *Prescott's Microbiology* (11th ed.). McGraw-Hill.
- Wu, C., Zhi, D., Yao, B., et al. (2022). Immobilization of microbes on biochar for water and soil remediation. *Environmental Research*, 212, 113226.

X

- Xu, P., Gao, Y., Cui, Z., Wu, B., Yan, B., Wang, Y., Zaitongguli, K., Wen, M., Wang, H., Jing, N., Wang, Y., Chao, C., & Xue, W. (2023). Research Progress on Effects of Biochar on Soil Environment and Crop Nutrient Absorption and Utilization. *Sustainability*, 15(6), 4861. <https://doi.org/10.3390/su15064861>

- Xu, Y., & Chen, B. (2013). Investigation of thermodynamic parameters in pyrolysis conversion. *Bioresource Technology*, 146, 485–493.

Y

- Yang, M., Zhang, H., Ni, J., et al. (2020a). Effect of cadmium on pyrene biodegradation. *Applied Soil Ecology*, 150, 103472.
- Yang, Y. W., Duan, X. Y., Jiang, J., et al. (2020b). Immobilization of cold-resistant mixed bacteria. *Applied Ecology and Environmental Research*, 18(1), 515–529.
- Young, I. M., Crawford, J. W., Nunan, N., Otten, W., & Spiers, A. (2008). Microbial distribution in soils. *Advances in Agronomy*, 100, 81–121.

Z

- Zahermand, S., Vafaeian, M., & Bazyar, M. H. (2020). Analysis of the physical and chemical properties of soil contaminated with oil hydrocarbons. *Earth Sciences Research Journal*, 24, 161–166.
- Zhang, J., Li, J., Ye, D., et al. (2014). Tubular bamboo charcoal for anode in microbial fuel cells. *Journal of Power Sources*, 272, 277–282.
- Zhang, L., Chang, L., Liu, H., et al. (2025). Biochar application to soils can regulate soil phosphorus availability. *Biochar*, 7(1), 13.
<https://doi.org/10.1007/s42773-024-00415-1>
- Zhang, X., Gong, Z., Allinson, G., et al. (2022). Joint effects of bacterium and biochar in remediation. *Chemosphere*, 299, 134333.
- Zhao, C., Hu, L., Zhang, C., et al. (2021). Preparation of biochar-interpenetrated iron-alginate hydrogel. *Environmental Pollution*, 287, 117303.
- Zhao, L., Xiao, D., Liu, Y., et al. (2020). Biochar as simultaneous shelter and adsorbent. *Water Research*, 172, 115494.
- Zheng, Z., Ali, A., Su, J., et al. (2021). Layered double hydroxide modified biochar. *Bioresource Technology*, 323, 124630.

Annexes

Annexes 01

Tableau XIII. Les composants des milieux

-Les composant de Milieu M2	La quantité
• NH ₄ CL	2g
• KCL	0.1g
• K ₂ HPO ₄	1g
• Ca cl	0.01g
• KH ₂ PO ₄	0.5g
• FeSO ₄ 7H ₂ O.....	0.01g
• MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5g
• Agar	15g
• Eau distillée	1000ml
• pH=.....	6.5

Les composant de Milieu M2 salé	La quantité
• M2	1 L
• NaCl	75g

Les composant de gélose nutritive GN :	La quantité
• Extrait de viande :	1.0 g/L
• Extrait de levure:	2.5 g/L
• Peptone:	5.0 g/L
• Chlorure de sodiu.....	5.0 g/L
• Agar-agar:	15.0 g/L
• pH=.....	7.0

Les composant de gélose sabouraud (Sabouraud Dextrose Agar) SDA :	
• Peptone :	10 g/L
• Dextrose (glucose)	40 g/L
• Agar	15 g/L
• Eau distillée :	1 L
• pH : ~5,6 (acide, pour favoriser la croissance des champignons et inhiber la plupart des bactéries)	
Les composant de bouillon nutritive:	La quantité
• Tryptone:	10.0 g/L
• Extrait de viande:	5.0 g/L
• Chlorure de sodium:	5.0 g/L
• pH final à 25°C:	7.2+ _ 0.2

BN salé: BN +75gNaCl

Composition des milieu:

Milieu MM:	La quantité
• NH ₄ NO ₃	0.4g
• K ₂ HPO ₄	0.3g
• KH ₂ PO ₄	0.3g
• NaCl.....	10g
• MgCl ₂	0.33g
• CaCl ₂	0.05g
• Extrait de levure.....	0.1g
• d'eau distillée.....	1L

Milieu MM salé:

•	NH ₄ NO ₃	0.4g
•	K ₂ HPO ₄	0.3g
•	KH ₂ PO ₄	0.3g
•	NaCl.....	55g
•	MgCl ₂	0.33g
•	CaCl ₂	0.05g
•	Extrait de levure.....	0.1g
•	d'eau distillée.....	1L

Eau physiologique	La quantité
Eau distillée.....	1000ml
NaCl.....	9g
Autoclaver à 120°C pendant 2heures	

Annexes 02**Tableau XIV. Les appareils utilisés**

<u>Nom de l'appareil</u>	<u>Utilisation</u>	<u>Image</u>
Bain-marie	Appareil utilisé pour maintenir les échantillons ou les milieux de culture à une température constante grâce à un chauffage indirect par l'eau. Il permet notamment l'incubation douce, la dissolution de substances et le maintien des réactifs à une température déterminée.	

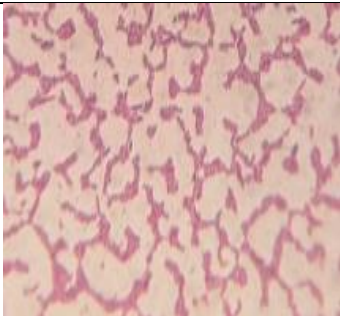
<u>Incubateur (Étuve bactériologique)</u>	Équipement destiné à assurer des conditions contrôlées de température favorables à la croissance et au développement des micro-organismes au cours des phases d'incubation microbiologique.	
Spectrophotomètre	Appareil analytique permettant de mesurer l'absorbance ou la densité optique d'un échantillon à une longueur d'onde spécifique. Il est utilisé pour estimer la concentration cellulaire, suivre la croissance microbienne ou analyser différents composés chimiques.	
<u>Centrifugeuse</u>	Équipement permettant de séparer les constituants d'un mélange en fonction de leur densité par l'action de la force centrifuge. Elle est utilisée pour récupérer les cellules microbiennes, les biomasses ou les particules solides après centrifugation.	
pH-mètre	Appareil servant à mesurer le potentiel hydrogène (pH) d'une solution ou d'un échantillon de sol afin de déterminer son caractère acide, neutre ou alcalin.	

<u>Conductimètre</u>	Instrument utilisé pour mesurer la conductivité électrique d'une solution ou d'un extrait de sol, permettant d'évaluer la salinité et la concentration en ions dissous.	
Agitateur magnétique	Appareil équipé d'un barreau aimanté permettant l'homogénéisation continue des solutions par agitation magnétique. Il est utilisé pour préparer les milieux, maintenir les suspensions homogènes et favoriser les réactions chimiques ou biologiques.	
Four classique de pyrolyse	Four utilisé pour la production du biochar à partir des feuilles de palmier dattier par traitement thermique à température contrôlée en condition limitée en oxygène.	
Four à moufle	appareil thermique à haute température utilisé pour la pyrolyse des marc de café afin de produire le biochar dans des conditions contrôlées et en absence partielle d'oxygène.	

L'autoclave	L'autoclave est un appareil de stérilisation utilisant la vapeur d'eau saturée sous pression afin d'éliminer l'ensemble des micro-organismes, y compris les spores bactériennes. Il est largement utilisé pour la stérilisation des milieux de culture, de la verrerie et du matériel microbiologique.	
--------------------	---	--

Annexes 03

Tableau XV. La coloration des bactéries isolées par la coloration de Gram

La bactérie	Description	Image de coloration de gram
B1	<u>BACILLE</u> G-	
B2	COCCI <u>G+</u>	
B3	<u>BACILLE</u> G-	

B5	<u>BACILLE</u> <u>G+</u>	
B6	<u>BACILLE</u> <u>G-</u>	
B10	COCCI <u>G+</u>	
B7	<u>BACILLE</u> <u>G+</u>	

Annexes 04

Tableau XVI.Caractéristiques physico-chimiques du gasoil (KHODJA , 2008)

CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES	Gasoil ALGÉRIEN	Gasoil sans soufre NF EN 590 : 2004	Spécifications du gasoil Norme Algérienne NA 8110-1992
---------------------------------------	--------------------	--	--

Densité à 15 °C, g/c°API m Viscosité Cinématique en cSt, à : • 20°C • 37.8°C • 40°C Point d'écoulement, °C Point de congélation, °C Point d'éclair, °C Indice d'acidité, mg KOH/g	0.8321 38.4 4.615 2.960 2.001 -29 -32 89.8 0.859	De 0.820 à 0.85 De 2.00 à 4.50 m ² s m /	De 0.810 0 0.860 g/c m ² 9 cSt Max Hiver -12 °C max Eté -7 °C Max 55°C min
Teneur en soufre Teneur en eau de sédiments, BSW, % Vol Teneur en eau par extraction, % Vol Couleur ASTM Corrosion à la lame de cuivre (3h à 50°C) Indice de Cétane Température Limite de Filtrabilité, °C Facteur de caractérisation, Kuop Poids moléculaire, g/mole Pouvoir Calorifique Supérieur, Kcal/Kg Distillation ASTM • Point initial, °C 5 % Vol 10 " 20 " 30 " 40 " 50 " 60 " 70 " 80 " 90 " 95 " Point Final, °C Distillat, % Vol Résidu " Perte "	734 ppm <0.1 Nulle 4.5 L 1 a 55.3 -16 11.90 208 10 940 207.9 222.7 230.1 239.9 249.5 259.6 270.8 282.5 296.2 312.7 336.2 355.8 362.9 98.5 0.6 0.9 Point Final, °C Distillat, % Vol Résidu " Perte "	10.0 mg/kg max Max 200 mg/kg Classe 1 min 51.0 (mesuré) min 46.0 (calculé) Classe E (max-15°C) Classe B (max°C) % (v/v) récupéré à 350 °C : 85% min	2500 ppm Max Traces non dosables 2.5 Max 48 Min 65 % Vol 250° Min 90% Vol 350° Max Point Final 390° Max

Annexes 06



Figure 27. feuillets de palmier dattier

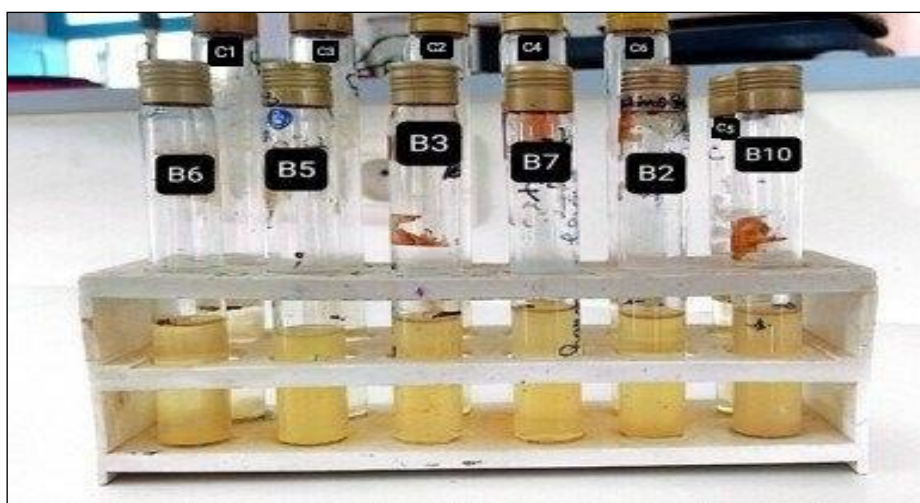


Figure 28 . Souches bactériennes purifiées dans des tubes de milieu nutritif liquide (étape préalable à la préparation d'un consortium microbien).

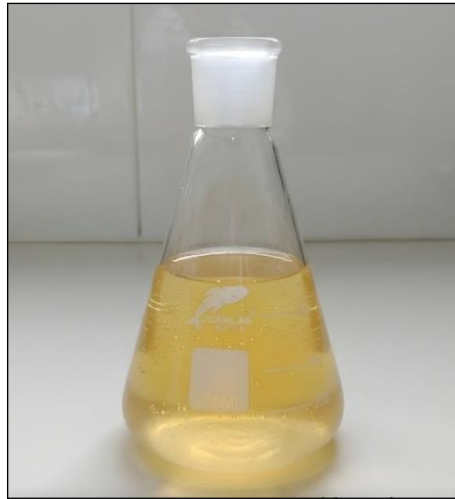


Figure 29 .Mélange de souches bactériennes formant un consortium

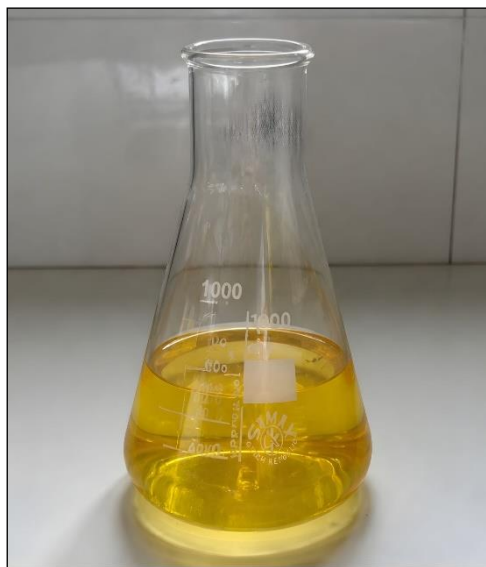


Figure 30 .Mélange de souches Fongiques formant un consortium



Figure 31 .Trois répétitions expérimentales de sols contaminés par des hydrocarbures pétroliers amendés avec du biochar enrichi en microorganismes



Figure 32 .Essai expérimental en triplicat de sols contaminés par des hydrocarbures pétroliers, traités par inoculation de suspensions bactériennes et fongiques



Figure 33 .Dispositif expérimental témoin en triplicat, constitué de sols contaminés par des hydrocarbures pétroliers sans ajout exogène

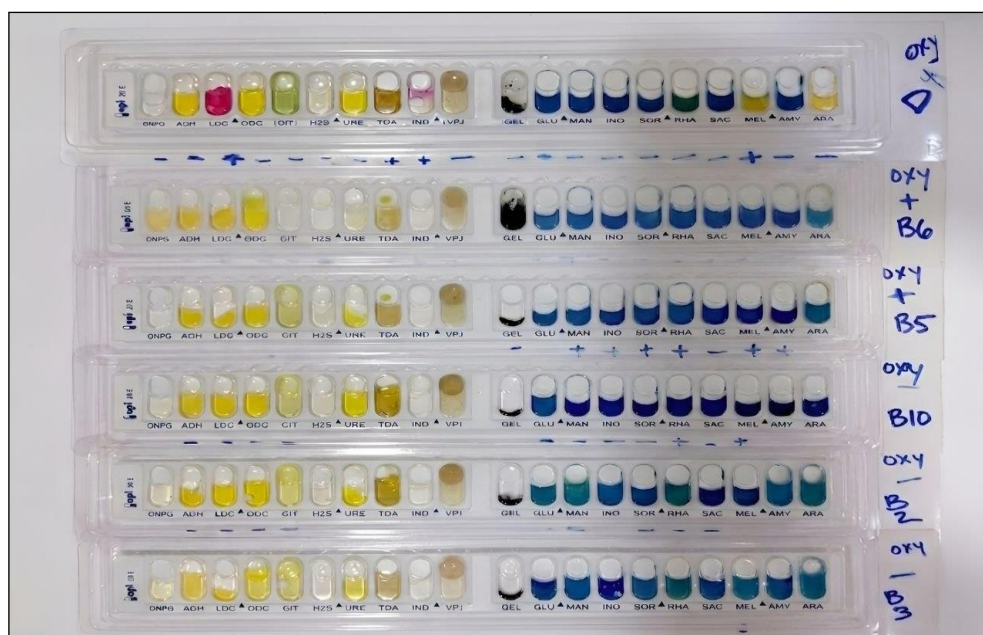


Figure 34 .Profil biochimique des souches bactériennes révélé par le système API 20E

Bioremédiation des sols pollués par hydrocarbures pétrolier par biostimulation (Biosurfactant et biochar)

Résumé

Cette étude a évalué l'efficacité d'une stratégie de biostimulation et bio augmentation fondée sur l'action synergique du biochar, des biosurfactants et des micro-organismes autochtones pour la remédiation des sols contaminés par les hydrocarbures pétroliers issus des régions de Hassi Messaoud et de Haoud Berkaoui et Rhourd Nouss (Illizi). Dans cette optique, les souches bactériennes et fongiques hydrocarbonoclastes isolées ont été immobilisées sur des biochars synthétisés à partir de feuilles de palmier dattier et de marc de café ; les résultats expérimentaux ont mis en évidence la supériorité du biochar de feuilles de palmier en termes de capacité de rétention microbienne, confirmant ainsi son aptitude en tant que support biologique optimal.

En outre, le traitement appliqué a permis une réduction significative des métaux lourds. L'évaluation du taux de dégradation des hydrocarbures totaux pétroliers (HTP) a montré que le procédé basé sur le biochar immobilisé associé aux biosurfactants a obtenu le rendement épuratoire le plus élevé, atteignant 22,9 %, contre 17,6 % pour le traitement biologique reposant uniquement sur les micro-organismes. Parallèlement, une diminution de la biodisponibilité des métaux lourds a été observée après traitement, avec des taux de réduction atteignant 37,25 % pour le mercure (Hg), 8,70 % pour le chrome (Cr) et 7,84 % pour le plomb (Pb). L'ensemble de ces résultats met en évidence que la combinaison biochar-biosurfactants-micro-organismes autochtones constitue une approche biotechnologique efficace, écologique et durable pour la bioremédiation des sols contaminés par les hydrocarbures pétroliers.

Mots-clés : Biostimulation, Bio augmentation, Biochar, Biosurfactants, Hydrocarbures pétroliers, Métaux lourds, Bioremédiation.

Bioremediation of petroleum hydrocarbon-polluted soils by bio stimulation (biosurfactants and biochar).

Abstract :

This study evaluated the efficacy of a biostimulation and bioaugmentation strategy based on the synergistic action of biochar, biosurfactants, and indigenous microorganisms for the remediation of soils contaminated with petroleum hydrocarbons in the Hassi Messaoud, Haoud Berkaoui, and Rhourd Nouss (Illizi) regions. Hydrocarbonoclastic bacterial and fungal strains were immobilized on biochars synthesized from date palm leaves and coffee grounds. Experimental results demonstrated the superiority of date palm leaf biochar in terms of microbial retention capacity, confirming its suitability as an optimal biological support.

Furthermore, the applied treatment enabled a significant reduction in heavy metal content. The evaluation of total petroleum hydrocarbon (TPH) degradation rates showed that the process utilizing immobilized biochar combined with biosurfactants achieved the highest purification yield, reaching 22.9%, compared to 17.6% for biological treatment using only microorganisms. Concurrently, a decrease in heavy metal bioavailability was observed post-treatment, with reduction rates reaching 37.25% for mercury (Hg), 8.70% for chromium (Cr), and 7.84% for lead (Pb). These findings indicate that the combination of biochar, biosurfactants, and indigenous microorganisms constitutes an effective, ecological, and sustainable biotechnological approach for the bioremediation of petroleum-contaminated soils.

Keywords: Biostimulation, Bioaugmentation, Biochar, Biosurfactants, Petroleum Hydrocarbons, Heavy Metals, Bioremediation.

المعالجة الحيوية للتربة الملوثة بالهيدروكربونات النفطية عن طريق التحفيز الحيوي (المستحلبات الحيوية والفحم الحيوي)

ملخص:

قُيِّمت هذه الدراسة فعالية استراتيجية التحفيز الحيوي والتعزيز الحيوي القائمة على العمل التآزري للفحم الحيوي، والمواد الخافضة للتوتر السطحي الحيوية، والكائنات الدقيقة المحلية لمعالجة التربة الملوثة بالهيدروكربونات النفطية في مناطق حاسي مسعود، وحوض بركاوي، ورورد النص (إيليزي). في هذا السياق، تم تثبيت السلالات البكتيرية والفطرية المستهلكة للهيدروكربونات على فحم حيوي تم تصنيعه من سعف نخيل التمر ونقل القهوة؛ حيث أظهرت النتائج التجريبية تفوق فحم سعف النخيل من حيث قدرته على الاحتفاظ بالميكروبات، مما يؤكد صلاحيته كدعم بيولوجي مثالي.

علاوة على ذلك، أدت المعالجة المطبقة إلى انخفاض كبير في تركيز المعادن الثقيلة. أظهر تقييم معدل تحلل إجمالي الهيدروكربونات النفطية أن العملية القائمة على الفحم الحيوي المثبت المرتبط بالمواد الخافضة للتوتر السطحي الحيوية حققت أعلى كفاءة تنقية، حيث بلغت 22.9 %، مقابل 17.6 % للمعالجة البيولوجية التي تعتمد فقط على الكائنات الدقيقة. بالتوازي مع ذلك، لوحظ انخفاض في التوافر الحيوي للمعادن الثقيلة بعد المعالجة، مع معدلات انخفاض بلغت 37.25 % للزئبق، و 8.70 % للكروم، و 7.84 % للرصاص. تشير هذه النتائج مجتمعة إلى أن الجمع بين الفحم الحيوي، والمواد الخافضة للتوتر السطحي الحيوية، والكائنات الدقيقة المحلية يشكل نهجاً تكنولوجياً حيوياً فعالاً، وصديقاً للبيئة، ومستداماً لمعالجة التربة الملوثة بالهيدروكربونات النفطية.

الكلمات المفتاحية: التحفيز الحيوي، التعزيز الحيوي، الفحم الحيوي، المواد الخافضة للتوتر السطحي الحيوية، الهيدروكربونات النفطية، المعادن الثقيلة، المعالجة الحيوية.