

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane Mira de Bejaïa
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du Diplôme de Master
Option : Ecologie Microbienne et Environnement

THEME

Evaluation de la dégradation du pétrole brut chez certaines souches autochtones

Réalisé par :

M^{lle} BELKHODJA Célia

M^{lle} BOUAOUD Yousra

Membres du jury :

Président : M. AISSAT K.

Promoteur: M. BELHADI D.

Examineurs: M^{me} SAIDANI K.

M. LADJOUZI R.

Remerciements

Nos remerciements vont à ALLAH le tout puissant, le majestueux, Qui nous a donné le courage et la force pour mener à terme ce modeste travail.

Nous tenons à remercier tout particulièrement notre promoteur Mr. Belhadi, qu'il trouve ici l'expression de notre plus vive gratitude, pour sa gentillesse, sa patience, sa disponibilité et tous ses conseils prodigués tout au long de ce parcours. Jamais nous n'oublierons vos qualités humaines et professionnelles qui nous ont profondément touchées.

Un grand merci aux membres du jury, Mr. Aissat qui nous à fait l'honneur de présider le jury. M^{lle} Saidani et Mr. Ladjouzi qui ont accepté de porter une évaluation à notre travail.

Nous remercions également l'ensemble du personnel du Laboratoire d'Ecologie Microbienne (L.E.M) en la personne de son responsable madame Boulifa, pour leur collaboration et leur aide tout au long de ce travail.

Enfin, nous remercions à travers ce travail tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Merci

Dédicaces

Je dédie ce travail

A la mémoire de ma mère

*A la personne la plus chère au monde, la plus précieuse à mes yeux
« mon papa » sans ces encouragements, son soutien et sa patience je n'en
serai pas là.*

*A ma très chère belle mère, qui m'a toujours soutenu et encouragée tout
au long de mon parcours*

A mes grands parents

A mes chers frères : Ghiles et Sid-ali

A ma chère sœur Déhia

Mes tantes, mes oncles, cousins et cousines

A toute ma famille

A une fille adorable

Mon binôme « yousra » et à toute sa famille

A mes amies

Yasmine, Djahida, Sonia, Ounissa, Nadia et Yasmine

*A mes enseignants et toute la promotion d'Ecologie Microbienne et
Environnement*

Et à tous ceux qui me sont chers

Célia

Dédicaces

Je dédie ce travail à

A toute ma famille

Particulièrement à la personne la plus précieuse et la plus chère à mon cœur, ma chère maman, je la remercie pour son soutien indéfectible et tous ces sacrifices.

A ma sœur Nessilia et à mes deux frères Massinissa et Amazigh.

A khalil Abd-rahmen.

A mes tantes et mes cousines.

A mon très cher binôme Célia et à toute sa famille

A toutes mes amies

*Plus particulièrement Saliha, Lydia, Sonia, Djahida, Sissa, Rosa,
Chafia...*

*A tous mes enseignants et camarades d'écologie microbienne et
environnement*

Et à tous ceux qui me sont chers

YOUSRA

Liste des tableaux

Tableau I : Concentrations critiques exprimant une tolérance ou une sensibilité aux métaux lourds	09
Tableau II : Concentrations et volumes des sels métalliques pour 100 ml de milieu de culture	
Tableau III : Paramètres de croissance	12
Tableau IV : Niveaux de croissance des souches sur le pétrole brut	13
Tableau V : Dégradation des hydrocarbures	13
Tableau VI : Dégradation des hydrocarbures à différentes concentrations	15
Tableau VII: Index d'émulsion E_{24}	16
Tableau VIII: Tolérance au Plomb	17
Tableau IX: Tolérance au Zinc	17
Tableau X : Tolérance au Mercure	18
Tableau XI : Tolérance au Cadmium	18
Tableau XII : Tolérance au Cuivre	19
Tableau XIII : Concentrations minimales inhibitrices	19
Tableau XIV: Tolérance des souches aux métaux lourds.....	20

Liste des figures

Figure I : Dispositif de la détermination de la cinétique de croissance	07
Figure II : Cinétique de croissance des différentes souches en présence du pétrole brut comme seule source de carbone	11
Figure III : Résultats du test d'émulsion	15

Sommaire

Liste des tableaux et figures

Problématique.....	1
---------------------------	----------

Matériel et méthodes

1. Souches bactériennes.....	7
2. Détermination de la cinétique de croissance	7
3. Dégradation des hydrocarbures	7
4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices pour les hydrocarbures	8
5. Test d'émulsion	8
6. Tolérance aux métaux lourds	8

Résultats et discussion

1. Détermination de la cinétique de croissance	11
2. Dégradation des hydrocarbures	13
3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices pour les hydrocarbures	14
4. Test d'émulsion	15
5. Evaluation de la tolérance aux métaux.....	16
5.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices pour les métaux lourds.....	19
5.2. Détermination de la tolérance aux métaux lourds.....	20

Conclusion.....	22
------------------------	-----------

Références bibliographiques

Annexe

Problématique

Le pétrole est connu depuis l'antiquité, il était utilisé en Mésopotamie pour assurer l'étanchéité des navires, et semble avoir été au moyen âge apprécié pour ces vertus médicinales pour soigner le rhumatisme et les maux de têtes (Durousset, 1999). Depuis la découverte du premier gisement exploitable à Titusville en Pennsylvanie aux États-Unis, à la fin du XIX^e siècle, le pétrole est devenu la première source d'énergie au monde (Trotignon, 2009). En effet, si l'économie du XIX^e s'est édifiée sur le charbon, celle du XX^e repose largement sur le pétrole. Utilisé d'abord essentiellement pour l'éclairage, le pétrole commence à jouer un rôle dans la production de l'énergie au début du XX^e, avec l'essence puis avec le gazole et le fioul. Il permet à lui seul le développement extraordinaire des transports routier et aérien (Durousset, 1999).

Mis à part les carburants comme l'essence et le diesel, l'industrie pétrolière engendre des composés que l'on trouve dans divers produits tels que les engrais, les plastiques, les peintures, les pesticides, les médicaments et les fibres synthétiques (Berg *et al.*, 2008).

Le pétrole est un liquide composé principalement de molécules d'hydrocarbures contenant des atomes de carbones et d'hydrogènes (Shao, 2010). Il résulte de la décomposition lente de la matière organique (Trotignon, 2009), issue d'organismes vivants qui ont vécu il y'a plusieurs milliers d'années. La chaleur et la pression ont aidé a la transformation de ces restes en un mélange d'hydrocarbures (Berg *et al.*, 2008).

Les hydrocarbures pétroliers sont classés en quatre familles principales, composés majoritairement d'hydrocarbures saturés (30 à 70%) , d'hydrocarbures aromatiques (20 à 40%) , d'hydrocarbures polaires (5 à 25%) et d'asphaltènes (0 à 10%). Le pétrole brut est donc, constitué de différentes familles dont la composition chimique change en fonction des origines géographiques et géologiques (Soltani, 2004). Les métaux lourds sont également présents à l'état de traces (Mathé *et al.*, 2012).

Suite au protocole de Kyoto entré en vigueur le 16 avril 2005, de nombreux pays ont engagé leurs efforts pour réduire les émissions de gaz, en particulier le dioxyde de carbone généré par la combustion des combustibles fossiles que sont le pétrole, le gaz naturel et le charbon ; produit et consommé annuellement à hauteur de 3,5, 2,5 et de 2 milliards de tonnes

respectivement (Bocard, 2006). Ces combustibles fossiles sont responsables à 70% de l'émission de gaz à effet de serre dans l'atmosphère (Viterbo, 2012). Les réserves de pétrole s'élèvent à plus de 140 milliards de tonnes et demeure la source d'énergie la plus importante pour les 50 ans à venir (Bocard, 2006).

En dépit de la place stratégique dominante et primordiale qu'occupe l'industrie pétrolière sur la scène mondiale, reste que les dégâts engendrés par ce marché sont à l'image de son importance. En effet, la pollution liée au pétrole passe par tous les stades de l'exploitation depuis le pompage jusqu'au stockage en passant par le transport et le raffinage (Das et Chandran, 2011).

De nombreux effets dévastateurs ont été constatés lors d'accidents conduisant à des catastrophes écologiques sans précédent. Les rejets accidentels d'hydrocarbures d'origine technologique dans les océans, sont de loin supérieurs à ceux dus aux fuites naturelles des gisements sous marins. D'ailleurs, il est estimé à 200 000 t/an les pertes naturelles de pétrole dans l'océan en comparaison à 3 millions de tonnes par an dû à l'activité anthropique (Ramade, 2007).

Alors, quelles seraient les conséquences de cette dépendance excessive *vis-à-vis* du pétrole sur l'homme et son environnement ?

Le rejet des hydrocarbures d'origine pétrolière dans l'environnement constitue l'un des problèmes de pollution les plus inquiétants du fait de leur toxicité sur l'homme et l'environnement (Ould boudia et Hammadi, 2011).

Parmi les aspects les plus évidents sont les grandes catastrophes telles que le déversement du supertanker Exxon Valdez en 1989, qui a heurté Blight Reef et déversé 42 millions de litres de pétrole le long de la cote d'Alaska, aboutissant ainsi au vote en 1990 de loi sur la pollution par les hydrocarbures (Oil Pollution Act). Les accidents tels que le naufrage du Prestige au large des côtes espagnoles en 2002 (Berg et *al.*, 2008) ou l'explosion dans le complexe de la raffinerie de GNLK1 de skikda au niveau national, causant des dégâts enregistrés dans un rayon à plus de 4 Km du complexe (Hadeb et Soukehal) et bien d'autres encore témoignent eux aussi de ces séries de problèmes environnementaux. Parmi les conséquences de ces marées noires la contamination du littoral entraînant l'arrêt de la pêche, mais aussi la disparition de plusieurs espèces vivantes (faune et flore) (Berg et *al.*, 2008).

En plus de leurs effets sur l'environnement, les hydrocarbures et en particulier les hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP) ont aussi un effet néfaste sur la santé humaine par leur caractère toxique, cancérigène et mutagène (Abioye, 2011).

Les métaux lourds sont également des polluants très présents dans la nature. Le Cadmium, le Plomb, le Cobalt, le Cuivre, le Mercure, le Nickel, le Sélénium et le Zinc sont les plus rencontrés (Kavamura et Esposito, 2011). Ils sont présents soit naturellement dans la croûte terrestre ou peuvent résulter des activités anthropiques. L'agriculture, les effluents domestiques et industriels ainsi que l'exploitation minière sont les principales sources de pollutions. En effet, ces activités perturbent les cycles biogéochimiques et cela augmente les émissions atmosphériques qui se déposent par la suite dans les environnements aquatiques et terrestres. La toxicité des métaux peut avoir des conséquences à court et à long terme, en affectant fortement les organismes incluant les êtres humains, par l'accumulation et le transfert dans la chaîne alimentaire. La communauté microbienne est également négativement influencée en agissant sur sa croissance et ses activités, telles que la fixation d'azote ou la respiration cellulaire (Gadd, 2009).

Quelles seraient alors les solutions éventuelles à apporter pour remédier à ce problème de pollution ?

Les réponses méthodologiques et techniques apportées aux problèmes de pollutions dues aux hydrocarbures sont soit d'ordres physico-chimiques ou biologiques. Les méthodes physico-chimiques détruisent la plupart des polluants et sont efficaces à des concentrations élevées de pollution. Toutefois, elles sont polluantes, onéreuses et nécessitent une grande consommation d'énergie (Weidong et al., 2011).

Compte tenu de ces résultats, une attention particulière est portée sur les méthodes biologiques (bioremédiation et phytoremédiation) efficaces, beaucoup plus rentables, respectueuses de l'environnement et applicables aussi bien aux hydrocarbures qu'aux métaux lourds (Abioye, 2011). En effet suite à l'accumulation de la pollution des hydrocarbures, la contamination aux métaux lourds doit être prise en compte (Mathé et al., 2012). La plupart de ces métaux sont toxiques pour les organismes à faible concentration (Khan et al, 2011).

La bioremédiation est une méthode s'appuyant sur la dégradation microbienne du polluant qui implique une minéralisation complète des contaminants organiques, ou la transformation des contaminants complexes en composés plus simples (Das et Chandran,

2011). Elle fait appel à deux approches à savoir la biostimulation où la flore autochtone dégradant le polluant est stimulée par addition de nutriments, d'oxygène, ou autres substrats indispensables à sa croissance, ou en modifiant les conditions environnementales telles que la température et le pH. La deuxième approche est la bioaugmentation qui consiste en l'inoculation par des bactéries connues pour leurs capacités à dégrader le polluant (Singh et al., 2011).

La bioremédiation est une alternative aux problèmes de pollution, mais la toxicité des métaux lourds sur les environnements co-contaminés peut limiter son utilisation. En effet, plusieurs études démontrent l'inhibition de la dégradation microbienne par ces métaux lourds (Sandrin et Hoffman, 2007).

Plusieurs stratégies pour augmenter la biodégradation dans les environnements co-contaminés sont décrites, afin de réduire l'effet de ces métaux. Ces approches impliquent spécialement la réduction de la biodisponibilité et la mobilité du métal. Ceci peut être obtenu en utilisant des agents tels que le carbonate de calcium et le phosphate ou alors, par augmentation de la résistance aux métaux à travers des mécanismes incluant une séquestration intracellulaire ou extracellulaire du métal, la pompe d'efflux ou la production d'agents chélateurs (Sandrin et Hoffman, 2007).

Les bactéries Gram négatives telles que *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Comamonas*, *Variovorax*, *Methylobacterium* et *Flavobacterium* sont des métallo-tolérantes et sont plus tolérantes que les bactéries Gram positives (Piotrowska-Seget et al., 2005).

Le rejet des produits pétroliers dans les milieux marins ou terrestres entraîne une prolifération des microorganismes aptes à se développer sur les hydrocarbures (Ould boudia et Hammadi, 2011). En effet, plusieurs auteurs ont rapporté l'action des microorganismes sur les hydrocarbures reconnaissant leur capacité à les utiliser comme unique source de carbone et d'énergie. Parmi ces microorganismes on retrouve les levures, champignons, algues microscopiques, mais surtout des bactéries appartenant à différents genres (Atlas, 1981). Floodgate a présenté 25 genres bactériens et 27 genres de champignons dégradant les hydrocarbures dans le milieu marin, tandis que Rossert et Bartha ont rapporté 22 genres bactériens et 31 genres fongiques à partir du sol. Les genres; *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacter*, *Nocardia* et *Pseudomonas* sont parmi les genres bactériens les plus répandus. Alors que pour les champignons il s'agit plutôt d'*Aureobasidium*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* (dans le milieu marin), *Mortierella*,

Trichoderma (dans le sol), *Penicillium* et *Aspergillus* (milieu marin et terrestre) (Leahy et Colwell, 1990).

Une éventuelle compréhension de la bioremédiation nécessite celle de la biodégradation qui est un processus complexe dépendant de nombreux paramètres dont la nature et la quantité des hydrocarbures et la microflore dégradante (Atlas, 1981), ainsi que la variabilité des facteurs environnementaux (Atlas, 1981; Solano-Serena et *al.*, 2001)

Lors de la biodégradation, les microorganismes procèdent soit à une minéralisation complète des hydrocarbures générant ainsi du CO₂ et de l'eau (Das et Chandran, 2011), soit à la dégradation partielle des hydrocarbures qui ne sont pas utilisés pour la croissance, dans ce cas il s'agit de Co-métabolisme. Cette intervention permet dans certains cas la dégradation de certains hydrocarbures qui ne sont pas attaqués lorsqu'ils sont fournis comme seule source de carbone, les autres composés servent de substrat de croissance (Solano-Serena et *al.*, 2001).

La dégradation microbienne des hydrocarbures varie fortement selon les fractions pétrolières. La dégradation des composés récalcitrants tels que les résines et asphaltènes se fait par Co-oxydation et dépend de la présence des alcanes de 12 à 18 atomes de carbone (Leahy et Colwell, 1990). Les asphaltènes sont les composés les moins sensibles à la dégradation, car leur structure complexe les rend plus récalcitrants à l'attaque microbienne (Dibble et Bartha, 1979). En revanche, les alcanes linéaires et les hydrocarbures aromatiques sont rapidement métabolisés, tandis que la dégradation des alcanes ramifiés est plus lente, car elle démarre après celle des n- alcanes. Les cycloalcanes sont des composés difficiles à biodégrader, le plus souvent ils le sont par Co-métabolisme (Solano-Serena et *al.*, 2001).

L'un des aspects les plus critiques lors de la bioremédiation des sols contaminés par les hydrocarbures est la biodisponibilité du contaminant pour les microorganismes, limitée par sa solubilité. Ce problème est résolu par l'usage de surfactants naturels et synthétiques (Singh et *al.*, 2011). Beaucoup de bactéries ont la capacité d'émulsionner le pétrole en produisant des agents tensioactifs appelés «biosurfactants» (Rahman et *al.*, 2002). Ces derniers augmentent l'accessibilité des hydrocarbures à l'attaque microbienne et augment donc le taux de biodégradation (Das et Chandran, 2011). Ils peuvent remplacer les substances chimiques traditionnellement utilisées (Barathi et Vasudevan, 2001) qui contrairement à eux, présentent

l'avantage d'être moins toxiques et biodégradables (Rahman et *al.*, 2002) et persistent moins dans l'environnement (Singh et *al.*, 2011).

Plusieurs facteurs peuvent influencer le processus de biodégradation en affectant tout particulièrement la nature et la composition physico-chimique du pétrole, mais aussi l'activité microbienne. Ces paramètres sont principalement la température, le pH, la salinité, les nutriments, l'oxygène et l'activité de l'eau (Leahy et Colwell, 1990).

C'est dans cette perspective que s'inscrit notre travail qui a pour objectif :

- De sélectionner parmi une collection du Laboratoire d'Ecologie Microbienne des souches ayant la capacité de dégrader différents hydrocarbures.
- D'évaluer les concentrations minimales inhibitrices sur différents hydrocarbures.
- De déterminer le pouvoir émulsifiant des différentes souches.
- Compte tenu de l'origine tellurique du pétrole et la présence de métaux lourds dans sa composition, nous nous sommes intéressées à l'évaluation de la tolérance des souches aux différents sels métalliques et à la détermination de leurs concentrations minimales inhibitrices.

Matériel et méthodes

1. Souches microbiennes

Les souches microbiennes utilisées dans cette étude proviennent d'une collection de souches du Laboratoire d'Ecologie Microbienne, elles sont isolées à partir d'un borbier au sein du terminal marin nord de Sonatrach situé dans la wilaya de Bejaia.

2. Détermination de la cinétique de croissance

L'évaluation de la croissance des souches est effectuée selon la méthode de Patel et Desai (1997) (Djerbaoui, 2011). A partir d'une préculture sur milieu liquide M2 (annexe 1), obtenue après 24 H d'incubation, le milieu de culture liquide M1 (annexe 1) reparti dans des erlenmeyers à raison de 100 ml, auxquels sont ajoutés 2% de pétrole brut, estensemencé à raison de 1% puis incubé à 28°C sous une agitation de 180 rpm (Figure 1). Pour déterminer la cinétique de croissance des différentes souches en présence de ce substrat, des prélèvements de 1 ml sont effectués à des intervalles de temps de 24 H pendant 9 jours, leurs densités optiques sont ensuite mesurées à 620 nm.



Figure 1 : Dispositif d'évaluation de la cinétique de croissance

Pour évaluer l'assimilation du pétrole brut, les paramètres cinétiques à savoir, le temps de génération et le taux de croissance sont déterminés pour chacune des souches.

3. Dégradation des hydrocarbures

Ce test est réalisé afin de vérifier la capacité des différentes souches testées à dégrader et à utiliser les hydrocarbures comme seule source de carbone. Le milieu minéral MM2 (annexe 1), exempt de sources de carbone, est additionné de différents hydrocarbures à savoir

le Pétrole brut, Ether de Pétrole, Benzène, Xylène et Hexane à une concentration de 0.1 %. L'ensemencement est réalisé en spot à raison de 10µl à partir d'une suspension bactérienne contenant 10⁶ UFC/ml.

Trois répétitions sont prévues pour chaque souche et pour chaque hydrocarbure. Après incubation à 28°C pendant 5 jours, toute croissance sur le milieu correspondra à la dégradation de l'hydrocarbure correspondant.

4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices pour les hydrocarbures

La recherche des concentrations minimales inhibitrices est réalisée sur milieu minéral MM2 (annexe 1) additionné de différents hydrocarbures à savoir le Pétrole brut, Ether de Pétrole, Benzène, Xylène et Hexane et à différentes concentrations allant de 0.1 à 1%. L'ensemencement est réalisé par dépôt sous forme de spot de 10 µl de suspension bactérienne contenant 10⁶ UFC/ml.

Trois répétitions sont réalisées pour chaque souche sur chaque hydrocarbure et sur chaque concentration. Après incubation à 28°C pendant 5 jours, toute croissance des souches sur les milieux signifie la dégradation des hydrocarbures aux concentrations testées.

5. Test d'émulsion

Pour évaluer la capacité des souches à émulsionner les différents hydrocarbures, nous sommes basés sur la méthode décrite par Barathi et Vasudevan (2001). A 5ml d'une culture bactérienne sont ajoutés 1ml de substrat (Xylène, Hexane, Benzène, Ether de Pétrole et Pétrole brut). Après agitation au vortex pendant 2 minutes, les tubes sont incubés à température ambiante pendant 24 H. Le pouvoir émulsifiant est déterminé par mesure des hauteurs de chacune des phases (annexe 2) et le calcul de l'index (E_{24}) selon la formule suivante :

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

Avec :

- **he** : hauteur de l'émulsion ;
- **ht** : hauteur totale

Un témoin non inoculé est également prévu pour chaque hydrocarbure.

6. Tolérance aux métaux lourds

Les différentes souches sont testées pour leur tolérance aux métaux lourds sur différents sels métalliques à savoir l'acétate de plomb ($\text{Pb}(\text{OOCCH}_3)_2, 3\text{H}_2\text{O}$), sulfate de zinc ($\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$), chlorure de mercure (HgCl_2), sulfate de cadmium ($3\text{CdSO}_4, 8\text{H}_2\text{O}$) et sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$). Afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices, différentes concentrations sont testées. Pour évaluer la sensibilité de ces souches aux différents sels métalliques, nous nous sommes référés aux travaux de Dhakphalkar et Chopade (1994). Toute souche présentant une croissance à des concentrations supérieures aux valeurs critiques (Tableau I) est considérée tolérante.

Tableau I : Concentrations critiques exprimant une tolérance ou une sensibilité aux métaux lourds (Dhakephalkar et Chopade, 1994)

Ions métalliques	Concentrations critiques (Cc) ($\mu\text{g/ml}$)	Concentrations critiques (Cc) (mM)
Hg	20,06	0,1
Cu	635	10
Zn	654	10
Pb	2072	10
Cd	112,4	1

$\text{CMI} > \text{Cc}$: souche tolérante, $\text{CMI} \leq \text{Cc}$: souche sensible

Le test est réalisé sur milieu M2 additionné de différents métaux lourds. Des volumes correspondant aux concentrations adéquates de chaque solution mère de sels métalliques sont ajoutés au milieu M2 (Tableau II).

A partir d'une culture bactérienne obtenue sur milieu liquide M2, un ensemencement en spot à raison de $10\mu\text{l}$ est effectué pour chaque souche sur chaque concentration métallique. Trois répétitions sont prévues pour chaque souche sur chaque sel métallique et sur chaque concentration. Les souches sont ensuite incubées à 28°C pendant 5 jours. Toute croissance sur le milieu indique la tolérance au sel métallique et à la concentration correspondante.

Tableau II: Concentrations et volumes des sels métalliques pour 100 ml de milieu de culture

Cuivre : [CuSO₄, 5H₂O] = 0,5g/ml										
C µg/ml	100	200	300	400	500	600	700	800		
V sm(µl)	200	400	600	800	1000	1200	1400	1600		
V (ml)	99,8	99,6	99,4	99,2	99	98,8	98,6	98,4		
Zinc : [ZnSO₄, 7H₂O] = 0,5g/ml										
C µg/ml	100	200	300	400	500	600	700	800		
V sm(µl)	200	400	600	800	1000	1200	1400	1600		
V (ml)	99,8	99,6	99,4	99,2	99	98,8	98,6	98,4		
Mercure : [HgCl₂]= 0,01g/ml										
C µg/ml	5	10	15	20	25	30	35	40		
V sm(µl)	50	100	150	200	250	300	350	400		
V (ml)	99,95	99,9	99,85	99,8	99,75	99,7	99,65	99,6		
Cadmium : [3CdSO₄, 8H₂O] = 0,1g/ml										
C µg/ml	12,5	25	37,5	50	62,5	75	87,5	100	112,5	125
V sm(µl)	12,5	25	37,5	50	62,5	75	87,5	100	112,5	125
V (ml)	99,875	99,975	99,9625	99,95	99,9375	99,925	99,9125	99,91	99,8875	99,875
Plomb : [Pb(OOCCH₃)₂, 3H₂O] = 0,1g/ml										
C µg/ml	400	800	1200	1600	2000	2400	2800	3200		
V sm(µl)	400	800	1200	1600	2000	2400	2800	3200		
V (ml)	99,6	99,2	98,8	98,4	98	97,6	97,2	96,8		

Sm : Solution mère, **C** : Concentration, **V** : Volume

Résultats et discussion

1. Détermination de la cinétique de croissance

L'évolution de la cinétique de croissance des différentes souches en présence du pétrole brut est représentée dans la figure 2.

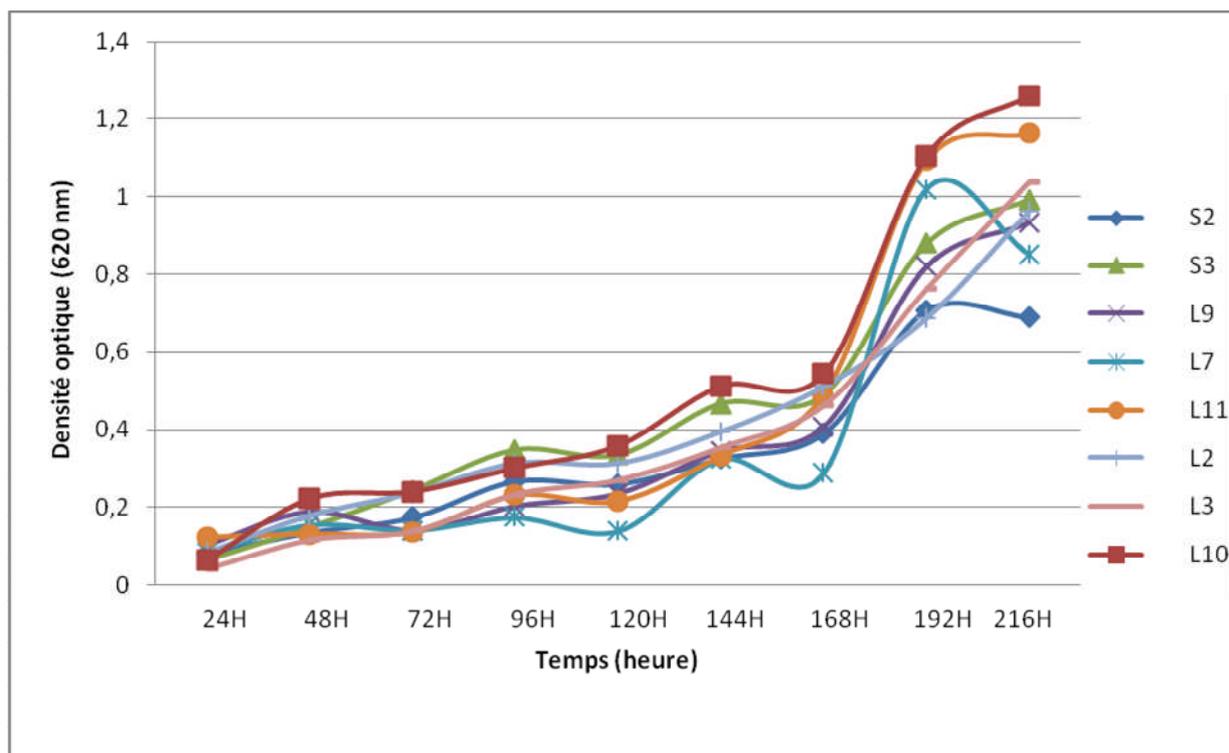


Figure 2 : Cinétique de croissance des différentes souches en présence du pétrole brut comme seule source de carbone

La figure 2 montre que toutes les souches présentent une phase de latence relativement courte, ce qui implique une adaptation rapide au substrat carboné testé. Toutefois, la croissance de ces souches apparaît faible pendant les 07 premiers jours. Ceci pourrait être dû à la complexité structurale des composés chimiques contenus dans le pétrole brut.

Au-delà de 07 jours d'incubation, nous constatons une augmentation très rapide de la croissance dans le cas des souches L10, L11 et L7, ce qui serait dû à la libération de composés intermédiaires plus assimilables. Notons qu'à l'exception de la souche S2, toutes les souches présentent une croissance plus ou moins importante durant toute la durée d'incubation impliquant la dégradation du pétrole et son utilisation comme substrat carboné.

D'après Solano-Serena et ses collaborateurs (2001), la présence de différents types d'hydrocarbures sous forme de mélange dans le Pétrole brut semble améliorer sa dégradation par cométabolisme.

Barathi et Vasudevan (2001) ont constaté l'élévation du nombre de cellules de *Pseudomonas fluorescens* isolée à partir d'un sol contaminé par du Pétrole brut provenant de la raffinerie Madras au Manali (Inde). Selon Shao (2010), le pétrole brut sert de source de carbone et d'énergie pour la croissance bactérienne.

Les paramètres de croissance calculés à partir des résultats de la cinétique de croissance sont représentés dans le tableau III.

Tableau III : Paramètres de croissance

Paramètres Souches	Temps de génération (H)	Taux de croissance
L2	56,37	0,012
L3	33,32	0,020
L7	13,16	0,052
L9	23,82	0,029
L10	23,52	0,029
L11	20,76	0,033
S2	27,9	0,024
S3	28,33	0,024

A l'exception de la souche L2, qui présente le temps de génération le plus long (56,37 heures) correspondant au taux de croissance le plus faible (0,012), les autres souches présentent des temps de génération plus aux moins variables allant de 13,16 à 33,32 heures. La souche L7 ayant le temps de génération le plus court, présente le taux de croissance le plus élevé. Toutefois, en comparant ces résultats à ceux représentés sur la courbe de croissance, on constate que malgré que la souche L7 présente le taux de croissance le plus élevé, sa croissance diminue significativement au-delà de 192 H d'incubation, ce qui serait dû à l'accumulation des produits à effets toxiques, issus de la dégradation du Pétrole brut. Les souches L10 et L11 semblent être plus intéressantes puisque leur croissance reste plus stable après 192 H d'incubation. Ceci dénote la différence entre le métabolisme des souches testées et par conséquent la différence entre ces souches.

En se référant à la gamme définissant les niveaux de croissance, établi par Sathishkumar et ses collaborateurs (2008), nous constatons qu'à l'exception de la souche S2, toutes les souches présentent une excellente croissance (Tableau IV).

Tableau IV : Niveaux de croissance des souches sur le pétrole brut

Souches	Densités optiques	Niveaux de croissance
S2	0,69	Elevée
L10	1,26	Excellente
S3	0,992	Excellente
L9	0,934	Excellente
L7	0,85	Excellente
L11	1,162	Excellente
L2	0,962	Excellente
L3	1,037	Excellente

- 0,21-0,4 : croissance faible, 0,41-0,6 : croissance moyenne,
0,61-0,8 : croissance élevée, > 0,8 : croissance excellente.

2. Dégradation des hydrocarbures

Les résultats du test de dégradation des hydrocarbures sont représentés dans le tableau V.

Tableau V : Dégradation des hydrocarbures

Substrats Souches	Ether de pétrole	Hexane	Xylène	Benzène	Pétrole brut
S2	+	+	+	+	+
L10	++	+	++	++	++
L3	+	+	+	+	+
L11	++	++	++	++	++
L9	+	+	+	+	+
L2	+++	+++	+++	+++	+++
S3	++	++	++	++	+++
L7	+++	+++	+++	+++	+++

+ :croissance faible ++ : croissance moyenne +++ : croissance élevée

On constate que les 8 souches testées présentent une bonne croissance sur l'ensemble des hydrocarbures testés comme unique source de carbone. Ceci reflète leur bonne capacité à dégrader différents substrats (Xylène, Hexane, Benzène, Ether de Pétrole et Pétrole brut) et à

les utiliser pour leur croissance. Selon Solano-Serena et ces collaborateurs (2000), le Benzène, le Xylène ainsi que les alcanes linéaires sont connus pour être facilement dégradables.

Les souches L2 et L7 présentent une meilleure croissance sur l'ensemble des substrats testés tandis que, les souches L10, L11 et S3 présentent une croissance intermédiaire. La croissance des souches S2, L3 et L9 semble être la plus faible.

Cette bonne activité de dégradation est liée à la présence de mécanismes d'adaptation aux pressions sélectives provoquées par la présence de concentrations importantes en hydrocarbures. Trois mécanismes d'adaptation sont cités par Leahy et Colwell (1990) pour expliquer ce phénomène :

- Induction et/ou répression des enzymes spécifiques ;
- Changement génétique ;
- Enrichissement sélectif.

Leahy et Colwell (1990) ont constaté que la dégradation bactérienne du Pétrole brut est meilleure chez des souches provenant d'un site pollué comparée à celles issues d'un site non pollué. Selon Peixoto et coll. (2011), la dégradation des hydrocarbures serait due à une importante capacité enzymatique.

Une dégradation serait encore meilleure en utilisant un consortium bactérien comme l'ont démontré Sathishkumar et coll. (2008), rapportant un taux de dégradation de 72% à une concentration de pétrole brut de 1%, tandis qu'il varie de 43 à 67% pour les souches de *Bacillus sp.*, *Corynebacterium sp.* et *Pseudomonas sp.* testées individuellement.

Le consortium microbien possède une capacité enzymatique beaucoup plus étendue expliquant la dégradation des hydrocarbures complexes, contrairement aux cultures pures caractérisées par la spécificité du substrat. En effet, dans un consortium bactérien les microorganismes qui ne jouent pas un rôle dans la dégradation, joueraient probablement un rôle dans la production de micronutriments ou d'agents tensio-actifs pour la solubilisation des hydrocarbures (Sathishkumar et al., 2008).

3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices pour les hydrocarbures

Les résultats du test d'évaluation de la croissance des différentes souches montrent un bon développement en présence de toutes les concentrations testées et pour l'ensemble des

hydrocarbures. Ainsi, la concentration minimale inhibitrice est supérieure à 1% pour toutes les souches et tous les hydrocarbures testés comme l'indique le tableau VI :

Tableau VI : Dégradation des hydrocarbures à différentes concentrations

Concentrations (%) \ Souches	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	0,60	0,70	0,80	0,90	1
L10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Selon une étude rapportée par Leahy et Colwell (1990), une bonne croissance bactérienne est observée à des concentrations allant jusqu'à 5%. À partir d'une concentration de 10%, aucune augmentation de croissance n'a pu être décelée par contre, une diminution de la croissance microbienne est observée à 15%. Cette diminution de croissance à des concentrations importantes en hydrocarbures est expliquée par une inhibition de l'activité microbienne causée par l'augmentation des niveaux de toxicité.

La capacité de ces souches à croître aux concentrations aussi importantes dénote leur intérêt d'application dans la dépollution des sites contaminés par les hydrocarbures.

4. Test d'émulsion

D'après les résultats obtenus, il en ressort que dans le cas du Pétrole brut, la souche L2 présente un meilleur index d'émulsion qui est de 83,33% (Figure III, Tableau VII).



Figure III : Résultat du test d'émulsion

La souche L11 présente un index d'émulsion plus élevé en présence du Xylène et de l'Hexane (86,66% et 90% respectivement). Dans le cas de l'Ether de Pétrole, les souches L11, L9, L3 et S2 montrent le meilleur index (89,65%). Avec 87,5%, la souche L3 semble avoir le meilleur index d'émulsion en présence du Benzène.

Tableau VII: Index d'émulsion E₂₄ (%)

Substrats Souches	Hexane	Xylène	Benzène	P. Brut	E. Pétrole
L9	83,33	83,87	87,09	77,41	89,65
L10	86,66	83,33	83,33	77,41	86,20
S2	86,20	86,20	82,75	80	89,65
L11	90	86,66	86,66	77,41	89,65
L7	86,66	83,87	83,87	77,41	86,66
L3	87,50	81,25	87,50	81,25	89,65
L2	83,33	80	83,33	83,33	86,66
S3	83,33	80	81,25	81,25	86,66
Témoin	86,66	80,64	83,33	70,96	86,66

La variation dans les valeurs des index d'émulsion pourrait s'expliquer par la variation dans la production de biosurfactants. Ces derniers jouent un rôle primordial dans la solubilisation des hydrocarbures (Bodour et *al.*, 2004) et augmentent leur accessibilité à la dégradation microbienne (Rahman et *al.*, 2002). Après avoir étudié le potentiel émulsifiant des flavolipides isolés à partir de la souche *Flavobacterium sp.*, Bodour et *coll.* (2004) ont rapporté une capacité émulsifiante complète de 100% pour cette souche.

Selon Rahman et *coll.* (2002), la génétique des espèces bactériennes ainsi que les facteurs liés aux conditions environnementales et à la nature des substrats déterminent le potentiel de production des biosurfactants.

Ces observations montrent que grâce à la production de biosurfactants à activité émulsifiante, les souches testées présentent un intérêt tout particulier nous laissons envisager une potentielle application lors de la remédiation des sites pollués par les hydrocarbures.

5. Evaluation de la tolérance aux métaux lourds

Les résultats du test de croissance à différentes concentrations en sels métalliques montrent que, dans le cas du Plomb, toutes les souches poussent à 2000 µg/ml. Au-delà de cette concentration, seule la souche L3 se développe à 2400 µg/ml (Tableau VIII).

Tableau VIII : Tolérance au Plomb

Concentrations ($\mu\text{g/ml}$) Souches	400	800	1200	1600	2000	2400	2800	3200
S2	+	+	+	+	+	-	-	-
L10	+	+	+	+	+	-	-	-
L3	+	+	+	+	+	+	-	-
L11	+	+	+	+	+	-	-	-
L9	+	+	+	+	+	-	-	-
L2	+	+	+	+	+	-	-	-
S3	+	+	+	+	+	-	-	-
L7	+	+	+	+	+	-	-	-

A l'exception des souches S2, S3 et L7 qui ont un maximum de tolérance à 400 $\mu\text{g/ml}$ *vis-à-vis* du Zinc, les autres souches se développent à 500 $\mu\text{g/ml}$. Seule la souche L10 se différencie des autres souches, elle présente une tolérance très importante en se développant sur toutes les concentrations testées (Tableau IX).

Tableau IX: Tolérance au Zinc

Concentrations ($\mu\text{g/ml}$) Souches	100	200	300	400	500	600	700	800
S2	+	+	+	+	-	-	-	-
L10	+	+	+	+	+	+	+	+
L3	+	+	+	+	+	-	-	-
L11	+	+	+	+	+	-	-	-
L9	+	+	+	+	+	-	-	-
L2	+	+	+	+	+	-	-	-
S3	+	+	+	+	-	-	-	-
L7	+	+	+	+	-	-	-	-

Nous constatons dans le cas du Mercure que toutes les souches se développent à une concentration de 5 $\mu\text{g/ml}$ (Tableau X). Au-delà de cette concentration, seules les souches L3 et L10 se distinguent par leur tolérance aux concentrations élevées ; la souche L10 présente une tolérance jusqu'à 35 $\mu\text{g/ml}$ tandis que, la souche L3 présente une tolérance à 40 $\mu\text{g/ml}$.

Tableau X: Tolérance au Mercure

Concentrations ($\mu\text{g/ml}$) Souches	5	10	15	20	25	30	35	40
S2	+	-	-	-	-	-	-	-
L10	+	+	+	+	+	+	+	-
L3	+	+	+	+	+	+	+	+
L11	+	-	-	-	-	-	-	-
L9	+	-	-	-	-	-	-	-
L2	+	-	-	-	-	-	-	-
S3	+	-	-	-	-	-	-	-
L7	+	-	-	-	-	-	-	-

En ce qui concerne le Cadmium, les souches testées présentent une tolérance variable (Tableau XI). Les souches L3 et L10 sont les seules à pousser aux concentrations élevées atteignant 125 $\mu\text{g/ml}$. Les souches L2 et L9 présentent une tolérance modérée en se développant à 87,5 $\mu\text{g/ml}$.

Tableau XI : Tolérance au Cadmium

Concentrations ($\mu\text{g/ml}$) Souches	12,5	25	37,5	50	62,5	75	87,5	100	112,5	125
S2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
L10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L11	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
L9	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
L2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
S3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
L7	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

La plupart des souches se développent à 400 $\mu\text{g/ml}$ dans le cas du Cuivre (Tableau XII). Les souches L9 et L2 présentent une faible tolérance avec une croissance observée à 200 $\mu\text{g/ml}$ tandis que, la souche L3 présente la tolérance la plus élevée en se développant à une concentration de 700 $\mu\text{g/ml}$.

Tableau XII : Tolérance au Cuivre

Concentrations (µg/ml) Souches	100	200	300	400	500	600	700	800
	S2	+	+	+	+	-	-	-
L10	+	+	+	+	-	-	-	-
L3	+	+	+	+	+	+	+	-
L11	+	+	+	+	-	-	-	-
L9	+	+	-	-	-	-	-	-
L2	+	+	-	-	-	-	-	-
S3	+	+	+	+	-	-	-	-
L7	+	+	+	+	-	-	-	-

5.1 Détermination des concentrations minimales inhibitrices pour les métaux lourds

Les résultats de l'évaluation de la tolérance aux sels métalliques nous ont permis de déduire les concentrations minimales inhibitrices représentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau XIII: Concentrations minimales inhibitrices

Métaux Souches	Plomb	Zinc	Mercure	Cadmium	Cuivre
S2	2400	500	10	75	500
L10	2400	> 800	40	>125	500
L3	2800	600	> 40	>125	800
L11	2400	600	10	50	500
L9	2400	600	10	100	300
L2	2400	600	10	100	300
S3	2400	500	10	112.5	500
L7	2400	500	10	87,5	500

La souche L3 présente les concentrations minimales inhibitrices les plus élevées avec la plupart des sels métalliques (Plomb, Mercure, Cadmium et Cuivre) et particulièrement avec les plus toxiques (Tableau XIII). La souche L10 présente quand à elle des concentrations minimales inhibitrices importantes avec le Zinc, le Cadmium et le Mercure (>800, >125 et 40 µg/ml respectivement).

Dans le cas du Cuivre, une concentration minimale inhibitrice de 800 µg/ml est obtenue avec la souche L3.

5.2 Détermination de la tolérance aux métaux lourds

En comparant les concentrations maximales tolérées par ces souches aux concentrations critiques, on constate que seules les souches L3 et L10 présentent une tolérance multiple aux sels métalliques testés. Toutefois, elles diffèrent au niveau de leur tolérance au Zinc, Plomb et Cuivre. La souche L3 est tolérante au Plomb ainsi qu'au Cuivre, tandis que, la souche L10 est tolérante au Zinc (Tableau XIV).

Tableau XIV : Tolérance des souches aux métaux lourds

Métaux Souches	Plomb	Zinc	Mercure	Cadmium	Cuivre
S2	S	S	S	S	S
L10	S	T	T	T	S
L3	T	S	T	T	T
L11	S	S	S	S	S
L9	S	S	S	S	S
L2	S	S	S	S	S
S3	S	S	S	S	S
L7	S	S	S	S	S

T : tolérance, S : sensibilité

A l'exception de la souche L3 (*Enterococcus sp.*) qui est tolérante au Cuivre, les autres souches apparaissent sensibles. La faible tolérance au Cuivre a été rapportée par Hassen et coll. (1998) qui évoquent une tolérance au Cuivre de seulement 0.8 mM (50,8 µg/ml) pour la plupart des souches étudiées, les espèces les plus tolérantes sont *Providencia rettgeri* et *Pseudomonas aeruginosa* avec une CMI de 1.8 (114,3 µg/ml) et 1.6 mM (101,6 µg/ml) respectivement.

Dans le cas du Mercure et du Cadmium, seules les souches L10 (*Kluveromyces*) et L3 (*Enterococcus sp.*) sont tolérantes. Toutefois, cette tolérance reste très faible comparée à celle observée par Chien et coll. (2013) sur *Pseudomonas sp. EJ01* (7 mM) isolée à partir d'une rivière au sud du TAIWAN, connu pour une teneur importante en métaux suite aux rejets industriels.

Concernant le Plomb et le Zinc toutes les souches sont sensibles excepté L10 (*Kluveromyces*) qui est tolérante au Zinc et L3 (*Enterococcus sp.*) au Plomb. La faible tolérance à ces métaux a été constatée par Mathé et coll. (2012) sur des souches isolées d'un sol, situé dans la région de Harghita (Roumanie), contaminé par des hydrocarbures.

La sensibilité des espèces aux métaux s'explique par l'effet toxique de ces derniers. En effet, les métaux lourds exercent généralement une action inhibitrice sur les microorganismes en bloquant des groupements fonctionnels essentiels, en déplaçant les ions métalliques essentiels ou en modifiant les conformations des molécules biologiques actives (Zhang et al., 2010). Ces effets se traduisent par une altération de l'activité et la diversité microbienne du sol (Zhang et al., 2010).

Cependant, il est important de souligner qu'à des concentrations relativement faibles, certains métaux sont essentiels pour les microorganismes (par exemple Co, Cu, Zn et Ni) car, ils servent de cofacteurs pour les métalloprotéines et les enzymes (Hassen et al., 1998). Pour contrebalancer les effets des hautes concentrations des métaux lourds tout en assurant le maintien du rôle biologique des ions essentiels, de nombreux micro-organismes ont développé des mécanismes de résistance (Khan et al., 2011). Parmi ces mécanismes, on cite :

- Exclusion du métal par une barrière de perméabilité ;
- Réduction de la sensibilité des cellules au métal ;
- Transport actif du métal à travers la cellule ;
- Séquestration intracellulaire ou extracellulaire ;
- Détoxification enzymatique (Bruins et al., 2000).

Conclusion

La pollution de l'environnement par les hydrocarbures est un problème majeur. Les effets dévastateurs et les nombreux dégâts engendrés ont permis l'élaboration de techniques permettant d'y remédier. L'un des moyens utilisés est la remédiation par voie biologique « bioremédiation ».

L'objectif fixé par ce travail est la contribution à la biodégradation des hydrocarbures, en utilisant une collection de souches isolées à partir d'un boubier.

L'étude de la cinétique de croissance des différentes souches sur le pétrole brut comme seul substrat carboné a permis d'observer une phase de latence relativement courte correspondant à une adaptation plus ou moins rapide des souches à la source de carbone. Une bonne croissance est particulièrement observée dans le cas des souches L7, L10 et L11.

Le test de dégradation des différents hydrocarbures à différentes concentrations s'est avéré positif pour toutes les souches sur tous les hydrocarbures testés, la concentration minimale inhibitrice est supérieure à 1%.

Le test d'émulsion permettant l'évaluation du caractère émulsifiant des souches a montré une différence des index émulsifiants, ce qui serait dû à la différence dans la production de biosurfactants.

Le test de tolérance aux métaux lourds montre une réponse variable des souches au Plomb, Zinc, Cuivre, Cadmium et Mercure. Les souches L3 et L10 se démarquent des autres souches, la souche L3 est la plus tolérante au Plomb, Mercure, Cadmium et Cuivre avec des concentrations minimales inhibitrices de 2800, >40, >125 et 800 µg/ml respectivement tandis que, la souche L10 présente une tolérance élevée *vis-à-vis* du Zinc, Mercure et Cadmium avec des concentrations minimales inhibitrices > 800, 40, >125 µg/ml respectivement.

Ces résultats montrent une capacité importante de dégradation des hydrocarbures, un potentiel émulsifiant et une tolérance aux métaux lourds élevés *vis-à-vis* des différentes concentrations testées, permettant ainsi d'envisager une éventuelle application dans des sites pollués par les hydrocarbures dans le cadre de la bioremédiation. Toutefois, pour une meilleure application, il est nécessaire de compléter ce travail par des approches plus approfondies, à savoir :

- ✓ Détermination de la composition du pétrole brut ;

- ✓ Une évaluation plus complète de la dégradation des hydrocarbures par des méthodes de dosage ;
- ✓ Un suivi de la cinétique de dégradation des hydrocarbures sur des durées plus longues ;
- ✓ Tester la dégradation des hydrocarbures à des concentrations élevées ;
- ✓ Rechercher les conditions optimales de croissance et de dégradation ;
- ✓ Evaluer la dégradation des hydrocarbures par un consortium microbien ;
- ✓ Production de biosurfactants pour une amélioration de la dégradation des hydrocarbures ;
- ✓ Tester d'autres métaux lourds et d'autres concentrations ;
- ✓ Et enfin, effectuer des essais sur le terrain pour évaluer la faisabilité du traitement.

- Abioye O.P. 2011.** Biological remediation of hydrocarbon and heavy metals contaminated soil in Soil Contamination. Ed. In Tech. Croatia. pp 128-142.
- Atlas R.M. 1981.** Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. Microbiological Review. **45**. 1. pp 108 – 209.
- Barathi S. et Vasudevan N .2001.** Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. Environment International. **26**. pp 413-416.
- Berg L.R., Raven P.H. et Hassenzahl D.M. 2008.** Environnement. Ed. De boek. Bruxelles. 680p.
- Bocard C. 2006.** Marée noire et sols pollués par les hydrocarbures, enjeux environnementaux et traitement des pollutions. Ed. Technip. Paris. pp 1 – 10.
- Bodour A.A., Guerrero-Barajas C., Jiorle B.V, Malcomson M.E., Paul A.K., Somogyi A., Trinh L.N., Bates R.B. et Maier R.M. 2004.** Structure and characterization of flavolipids, a novel class of biosurfactans produced by *Flavobacterium sp.* Strain *MTN11*. App.Environ.Microbial.**70**.1.pp114-120.
- Bruinis M.R., Sanjay K. et Oehmel W.F. 2000.** Microbial resistance to metals in Environment. Environment Ecotoxicology and Environmental Safety. **45**. pp 198-207.
- Chien C.C., Lin B.C. et Wu C.H. 2013.** Biofilm formation and heavy metal resistance by an environmental *Pseudomonas sp.* Biochemical Engineering Journal. pp 1-6.
- Das N. et Chandran P. 2011.** Microbial degradation of petroleum hydrocarbons contaminants. Biotechnology Research International. pp 1-13.
- Dhakephalkar P.K. et Chopade B. A. 1994.** High levels of multiple metal resistances and its correlation to antibiotic resistance in environmental isolates of *Acinetobacter*. BioMetals. **7**. pp 67-74.
- Dibble J.T. et Bartha R. 1979.** Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. Applied and Environmental Microbiology. **37**.4. pp 729-739.
- Djerbaoui A.N. 2011.** Utilisation de souches bactériennes autochtones dans la production de biosurfactants des sols de Hassi Messaoud contaminés par les hydrocarbures. Université kasdi Merbat Ouargla. 62p
- Durousset M. 1999.** Le marché du pétrole. Ed. Marketing Ellipse S.A. Paris. 90 p.
- Gadd G.M. 2009.** Heavy metal pollutant: environmental and biotechnological aspects. Applied Advance. pp 321-334.

- Hadef H., Soukehal B.** urbanisation et risque industriel en Algérie, cas de la ville de Skikda et sa zone petrochimique. Université Jijel. 13p.
- Hassen A., Saidi N., Cherif M. et Boudabous A. 1998.** Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresource Technology*. **64**. pp 7-15.
- Khan M.S., Zaidi A., Goel R. et Musarrat J. 2011.** Biomanagement of metal-contaminated soils. Ed. Springer. Heidelberg London New York. **20**. 515p.
- Kavamura VN. Et Esposito E. 2011.** Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy. *Biotechnology Advanced*. **28**. Pp 61-69.
- Leahy J.G. et Colwell R.R. 1990.** Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Review*. **54**. 3. pp 305-315.
- Mathéa I., Benedekb T., Táncsicsc A., Palatinszkyd M., Lányia S. et Márialigetid K. 2012.** Diversity, activity, antibiotic and heavy metal resistance of bacteria from petroleum hydrocarbon contaminated soils located in Harghita County (Romania). *International Biodeterioration and Biodegradation*. **73**. pp 41-49.
- Ould Boudia A. et Hammadi K. 2011.** Biodégradation du pétrole brut en mer par : *Enterobacter cloacae*, *Esherchia coli* et *Pseudomonas spp.* *Microbial. Ind. San et Environn.* **5.1**. pp 133- 146.
- Piotrowska-seget Z., Cynon M. et Kozdroj J. 2005.** Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and spoil. *Applied Soil Ecology*. **28**. Pp 237-246.
- Pioxoto R.S., Vermelho A.B. et Rosado A.S. 2011.** Petroleum-degrading enzymes: bioremediation and new prospects. *SAGE-Hindawi Access To Research*. Pp 1-7.
- Rahman K.S.M., Rahman T.J., McClean S., Marchant R. et Banat I.M. 2002.** Rhamnolipid biosurfactants production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low cost raw materials. *Biotechnology Progress*. **18** .6. pp 1271- 1281.
- Ramade F. 2007.** Introduction à l'écotoxicologie fondements et applications .Ed. Tec et Doc. Paris.605p.
- Sandrin T.R. et Hoffman D.R . 2007.** Bioremediation of organic and metal co-contaminated environments : effect of metal toxicity, speciation and bioavailability on biodegradation in environmental bioremediation technologies. Springer. Verlag Berlin Heidelberg. pp 1-28.

- Sathishkumar M. Binupriya A.R. Baik S. H. et Yun S.E. 2008.** Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium isolated from hydrocarbon contaminated areas. *Clean Journal*. **36**.1. pp 92 – 96.
- Shao Z. 2010.** Enrichment and isolation hydrocarbon degraders in handbook of hydrocarbon and lipid microbiologie. Ed. Springer. Verlag Berlin Heidelberg. 3785p.
- Singh A., Parmar N. et Kuhad R.C. 2011.** Bioaugmentation, biostimulation and biocontrol. Ed. Springer Heidelberg Dordrecht. London New York. 364p.
- Solano-Serena F., Marchal R., Casaregola S., Vasnier C., Lebeault J.M. et Vandecasteele G.P. 2000.** A *Mycobacterium* strain with extended capacities for degradation of gasoline hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**. 6. pp 2392 – 2399.
- Solano-Serena F., Marchal R. et Vandecasteele G.P. 2001.** Biodégradabilité de l'essence dans l'environnement de l'évaluation globale au cas des hydrocarbures récalcitrants. *Oil & Gaz Science and Technologie*. **56**.5. pp 479-498.
- Soltani M. 2004.** Distribution lipidique et voies métaboliques chez quarte bactéries Gram négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Université Pierre et Marie curie. 284p.
- Trotignon R. 2009.** Comprendre le réchauffement climatique. Ed. Pearson, Paris. 111p.
- Viterbo J. 2012.** Comment réduire l'emprunt environnemental du pétrole ? La recherche. **73**. pp 68-73.
- Weidong D., Yunyang W., Ningning Z., Jiajia F., Zhihuan Z., Lijun C. et Jiming H. 2011.** Status quo of soil petroleum contamination and evolution of bioremediation. *Petroleum Science*. 8. pp 502-514.
- Zhang F.P., Li C.F., Tong L.G., Yue L.X., Li P., Cirend YJ. et Cao C.G. 2010.** Response of microbial characteristics to heavy metal pollution of mining soils in central Tibet, China. *Applied soil Ecology*. 45. pp 144-151.

Annexe n° 01 : Composition des milieux de culture

Milieu de culture M2 (g/L)

Acétate de sodium	5
Tryptone	0.5
Extrait de levure	0.5
Glucose.....	0.5
Saccharose	0.5
Sodium de citrate.....	0.05
Acide malique	0.05
KNO ₃	1
NH ₄ Cl	0.2
KH ₂ PO ₄	0.5
Agar	15
H ₂ O	QSP 1L
pH.....	7.6

Autoclavage à 120 °C /20 min.

Milieu de culture MM2 (g/L)

K ₂ HPO ₄	1
KH ₂ PO ₄	0.2
CaSO ₄	0.05
MgSO ₄	0.5
FeSO ₄	0.09
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
Agar	15
H ₂ O.....	QSP 1L
pH	7.4

Autoclavage à 120°C/ 20 min

Milieu de culture M1 (g/L)

K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄	0.20
NH ₄ Cl ₂	1
CaCl ₂	0.20
FeCl ₃	0.05
KH ₂ PO ₄	1
H ₂ O	QSP 1L
pH	7

Autoclavage à 120 °C/20min.

Annexe n° 02 : Tableaux d'émulsion des différents substrats

Tableau I : Index d'émulsion du Benzène

Phases (cm) Souches	Phase organique	Phase d'émulsion	Total	E ₂₄ %
L9	0,4	2,7	3,1	87,09
L10	0,5	2,5	3	83,33
S2	0,5	2,4	2,9	82,75
L11	0,4	2,6	3	86,66
L7	0,5	2,6	3,1	83,87
L3	0,4	2,8	3,2	87,5
L2	0,5	2,5	3	83,33
S3	0,6	2,6	3,2	81,25
Témoin	0,5	2,5	3	83,33

Tableau II: Index d'émulsion du pétrole brut

Phases (cm) Souches	Phase Organique	Phase d'émulsion	Total	E ₂₄ %
L9	0,7	2,4	3,1	77,41
L10	0,7	2,4	3,1	77,41
S2	0,6	2,4	3	80
L11	0,7	2,4	3,1	77,41
L7	0,7	2,4	3,1	77,41
L3	0,6	2,6	3,2	81,25
L2	0,5	2,5	3	83,33
S3	0,6	2,6	3,2	81,25
Témoin	0,9	2,2	3,1	70,96

Tableau III: Index d'émulsion du Xylène

Phases (cm) Souches	Phase organique	Phase d'émulsion	Total	E ₂₄ %
L9	0,5	2,6	3,1	83,87
L10	0,5	2,5	3	83,33
S2	0,4	2,5	2,9	86,20
L11	0,4	2,6	3	86,66
L7	0,5	2,6	3,1	83,87
L3	0,6	2,6	3,2	81,25
L2	0,6	2,4	3	80
S3	0,6	2,4	3	80
Témoin	0,6	2,5	3,1	80,64

Tableau IV: Index d'émulsion de l'Éther de pétrole

Phases (cm) Souches	Phase Organique	Phase d'émulsion	Total	E₂₄ %
L9	0,3	2,6	2,9	89,65
L10	0,4	2,5	2,9	86,20
S2	0,3	2,6	2,9	89,65
L11	0,3	2,6	2,9	89,65
L7	0,4	2,6	3	86,66
L3	0,3	2,6	2,9	89,65
L2	0,4	2,6	3	86,66
S3	0,4	2,6	3	86,66
Témoin	0,4	2,6	3	86,66

Tableau V: Index d'émulsion de l'Hexane

Phases (cm) Souches	Phase organique	Phase d'émulsion	Total	E₂₄ %
L9	0,5	2,5	3	83,33
L10	0,4	2,6	3	86,66
S2	0,4	2,5	2,9	86,20
L11	0,3	2,7	3	90
L7	0,4	2,6	3	86,66
L3	0,4	2,8	3,2	87,5
L2	0,5	2,5	3	83,33
S3	0,5	2,5	3	83,33
Témoin	0,4	2,6	3	86,66

Tableau VI : Cinétique de croissance des différentes souches en présence du pétrole brut

Temps Souche	24H	48H	72H	96H	120H	144H	168H	192H	216H
S2	0,082	0,136	0,175	0,267	0,26	0,325	0,39	0,707	0,69
L10	0,064	0,222	0,24	0,3	0,358	0,512	0,544	1,105	1,26
S3	0,064	0,149	0,243	0,347	0,334	0,467	0,489	0,879	0,992
L9	0,105	0,19	0,142	0,204	0,236	0,345	0,408	0,82	0,934
L7	0,086	0,156	0,142	0,175	0,14	0,324	0,288	1,02	0,85
L11	0,124	0,132	0,137	0,231	0,216	0,332	0,49	1,093	1,162
L2	0,084	0,179	0,237	0,312	0,312	0,394	0,511	0,686	0,962
L3	0,043	0,117	0,14	0,234	0,27	0,354	0,462	0,761	1,037

Annexes

Conclusion

Matériel & Méthodes

Problématique

Références Bibliographiques

Résumé

Huit souches bactériennes provenant d'un bourbier au sein du Terminal Marin Nord de Sonatrach (wilaya de Bejaia) ont fait l'objet d'une étude pour la caractérisation de la dégradation des hydrocarbures.

Elles montrent une capacité d'utilisation du pétrole brut comme unique source de carbone, elles présentent aussi un potentiel de dégradation des différents substrats carbonés (Xylène, Benzène, Hexane, Ether de Pétrole et Pétrole Brut) et une croissance à des concentrations élevées en hydrocarbures (1%). Leur pouvoir émulsifiant est important et différent selon les souches testées. Les souches L3 et L10 présentent la tolérance la plus importante aux métaux lourds, la souche L3 est la plus tolérante au plomb, mercure, cadmium et cuivre avec des concentrations minimales inhibitrices de 2800, > 40, > 125 et 800 µg/ml respectivement tandis que, la souche L10 présente une tolérance élevée *vis-à-vis* du zinc, mercure et cadmium avec des concentrations minimales inhibitrices > 800, 40, >125 µg/ml respectivement.

Mots clés : Bioremédiation, hydrocarbures, métaux lourds, dégradation, tolérance.

Abstract

Eight bacterial strains from a quagmire in the North Marine Terminal of Sonatrach (wilaya of Bejaia) were studied for the characterization of hydrocarbon degradation. They showed an ability to use crude oil as the only carbon source; they also have the potential for degradation of different carbon substrates (Xylene, Benzene, Hexane, Ether Oil and Crude Oil) and growth at high concentrations of hydrocarbon (1%). Their emulsifying power is important and varies for different strains tested. The strains L3 and L10 are the most important heavy metal tolerance, L3 strain is more tolerant to lead, mercury, cadmium and copper with minimum inhibitory concentrations of 2800, > 40, > 125 and 800 µg / ml respectively, while that the L10 strain has a high tolerance to zinc, mercury and cadmium with minimum inhibitory concentrations > 800, 40 > 125 µg / ml respectively.

Key words : Bioremediation, hydrocarbon, heavy metals, degradation, tolerance.

Résultats
&
Discussion