

Université Abderrahmane MIRA de Bejaia  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences Biologiques de l'Environnement



# Mémoire

Pour l'Obtention du Diplôme d'ingénieur d'Etat en Sciences Biologiques de l'Environnement

**Spécialité: Ecologie et Environnement**

**Option: Pathologie des Ecosystèmes**

***Caractérisation de la flore microbienne de boues  
résiduelles des bacs de pétrole de  
la RTC-SONATRACH***

*Réalisé par :*

M<sup>lle</sup> BENYAHIA Djamila

M<sup>r</sup>. AYADI Mouloud

*Membres de jury :*

Présidente : M<sup>me</sup> ZEBBOUDJ A.

Examinatrice : M<sup>lle</sup> DJOUAD S.

Examinatrice : M<sup>me</sup> BEIHADJ-KEBBI M.

Promoteur : M<sup>r</sup>. BELHADI D.

2011/2012

# Remerciement

*Nous remercions tout d'abord « Dieu » le tout puissant de nous avoir donné le courage et la foi, qui nous a guidés et éclairés notre chemin pour la réalisation et l'aboutissement de notre mémoire.*

*Notre profonde gratitude va à notre promoteur M. BEL HADI pour l'honneur qu'il nous a fait en nous encadrant, pour ses précieux conseils, orientations et la confiance placée en nous, nous en garderons surtout des souvenirs de sa qualité professionnelle et profondément humaine.*

*Nous remercions les examinateurs qui auront à lire et à évaluer ce travail. Leurs remarques et critiques permettront d'améliorer ce travail*

*Nos profondes gratitude et nos remerciements vont également à l'ensemble du personnel du laboratoire de microbiologie, pour leur collaboration et leur aide pendant toute la durée de notre présence au sein de laboratoire.*

*Nos remerciements les plus sincères et les plus chaleureux vont, également, à toutes les personnes qui ont cru en nous et qui nous ont aidés.*

# Dédicaces

*Avec l'aide de dieu, le tout puissant, ce travail est achevé je dédis*

*A ceux qui me sont les plus chère au monde, aux deux êtres qui élumine ma vie :*

*A ma chère maman qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau. Ni sacrifices, ni privations ne l'ont empêché d'accomplir son devoir de mère soucieuse de l'avenir de ses enfants.*

*A mon cher papa qui a su se montrer patient, compréhensif et encouragement, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.*

*A mes chères frères : Abdelghani, Lyes.*

*A mes chères adorables sœurs : Lila, Yasmina.*

*A la mémoire de mon grand-père paternelle et ma grand-mère maternelle.*

*A ma grande mère paternelle que dieu la garde pour toujours.*

*A mes oncles, tentes et leurs familles.*

*A toutes ma famille.*

*A mes amis qu'ils soient proche ou loin, peut-être est- ce leurs patience qui ne fait jamais défaut, ou encore leurs bienveillance qui font de leurs présence un tel cadeau ?*

*A toi mon binôme et toute ta famille et ceux qui sont proche de toi.*

*A tous mes enseignants et mes camarades de la promotion : Ecologie et Environnement.*

*A tout ceux qui ont vécu pour une aidé ou qui sont mort pour que la lumière de la science règne sur terre.*

**DJAMILA**



# *Dédicaces*

*Avec l'aide de dieu, le tout puissant, ce travail est achevé je dédis*

*A ceux qui me sont les plus chère au monde, aux deux êtres qui élumine ma vie :*

*A ma chère maman qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau. Ni sacrifices, ni privations ne l'ont empêché d'accomplir son devoir de mère soucieuse de l'avenir de ses enfants.*

*A mon cher papa qui a su se montrer patient, compréhensif et encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.*

*A mes grands-mères : Yema Tata, Yema Aka et Yema Lili.*

*A mon chère frère : Arab.*

*A mes chères adorables sœurs : Lydia, Fatima, Milina, Tinhinane, Dania et la petite Yousra qui ont toujours crues en moi.*

*A mes oncles, tentes et leurs familles.*

*A toutes ma famille.*

*A mes amis qu'ils soient proche ou loin, peut-être est- ce leurs patience qui ne fait jamais défaut, ou encore leurs bienveillance qui font de leurs présence un tel cadeau ?*

*A toi mon binôme et toute ta famille et ceux qui sont proche de toi.*

*A tous mes enseignants et mes camarades de la promotion : Ecologie et Environnement.*

*A tout ceux qui ont vécu pour une aidé ou qui sont mort pour que la lumière de la science règne sur terre.*

*Mouloud*

# Sommaire

<b>Introduction</b> .....	01
<b>Synthèse bibliographique.</b>	
I. Hydrocarbures et pollution.....	03
I.1 Définition des hydrocarbures.....	03
I.2 Origine des hydrocarbures.....	03
I.3 Composition des pétroles bruts.....	05
I.3.1 Les hydrocarbures saturés.....	05
I.3.2 Les hydrocarbures aromatiques.....	06
I.3.3 Les composés polaires ou résines.....	06
I.3.4 Les asphaltènes.....	06
I.4 Classification des pétroles bruts.....	08
I.4.1 Bruts légers.....	08
I.4.2 Bruts lourds.....	08
I.5 physico-chimiques des hydrocarbures.....	08
I.5.1 Densité.....	08
I.5.2 Point et limite d'ébullition.....	08
I.5.3 Viscosité.....	08
I.5.4 Point d'éclair.....	08
I.5.5 Point d'écoulement.....	09
I.5.6 Solubilité.....	09
I.5.7 La volatilité.....	09
I.5.8 La polarité.....	09
I.6 La pollution par les hydrocarbures.....	10
I.6.1 Définition de la pollution.....	10
I.6.2 Principales sources émettrices d'hydrocarbures.....	11
I.6.3 Evaluation des risques de pollution.....	12
I.7 Devenir des hydrocarbures au contact de l'environnement.....	12
I.7.1 Evaporation.....	12
I.7.2 Solubilisation.....	13

I.7.3	Emulsification .....	13
I.7.4	Sédimentation.....	13
I.7.5	Photo-oxydation .....	13
I.7.6	Pénétration dans les chaînes alimentaires .....	13
II.	Biodégradation des hydrocarbures pétroliers .....	14
II.1	Principe de la biodégradation .....	14
II.2	Les micro-organismes de la biodégradation.....	15
II.3	Cinétique de la biodégradation.....	17
II.4	Voies métaboliques de l'utilisation des hydrocarbures .....	18
II.4.1	Voies métaboliques des n-alcanes.....	18
II.4.2	Oxydation des n-alcanes par le système de dioxygénase..	19
II.4.3	Voies de dégradation des hydrocarbures saturés cyclique	22
II.4.4	Biodégradation des hydrocarbures aromatique	23
II.5	Les facteurs influençant la biodégradation.....	24
II.5.1	La concentration en microorganismes .....	25
II.5.2	Les facteurs biotiques.....	25
II.5.2.1	Les facteurs chimiques.....	25
II.5.2.2	Les facteurs physiques.....	27
II.5.2.3	Autres facteurs.....	28
III.	La bioremédiation des sites pollués par les hydrocarbures .....	29
III.1	Les différentes méthodes biologiques de dépollution .....	29
III.2	Les procédés biologiques .....	30
III.2.1	La phytodépollution .....	30
III.2.2	La bioremédiation .....	32
III.2.3	la biorestauration.....	33
IV.	Matériels et méthodes.	
IV.1	Origine et prélèvement des échantillons .....	35
IV.2	Analyse microbiologique .....	35
IV.2.1	Dénombrement de la microflore totale .....	35

IV.2.2 Isolement et purification des microorganismes .....	36
IV.3 Caractérisation des isolats .....	36
IV.3.1 Caractérisation culturelle et morphologique .....	37
IV.3.2 Caractérisation biochimique .....	37
IV.4 Test de dégradation de différents hydrocarbures .....	39
IV.5 Résistance aux métaux lourds .....	40
IV.6 Test de la cinétique de croissance .....	40

### **Résultats et discussions.**

I. Dénombrement de la flore totale .....	42
I.1 Isolement des microorganismes dégradant le pétrole.....	42
I.2 Caractérisation culturelle et cellulaire .....	42
I.3 Caractérisation biochimique.....	47
I.4 Biodégradation des différents hydrocarbures.....	49
I.5 Résistance aux métaux lourds .....	50
I.6 Cinétique de croissance des différentes souches.....	51
Conclusion.....	55

Références bibliographiques.

Annexes.

# Liste des tableaux

<i>N° du tableau</i>	<i>Intitulé du tableau</i>	<i>N° de Page</i>
<b>I</b>	Solubilité des hydrocarbures	09
<b>II</b>	Caractéristiques des pétroles bruts	10
<b>III</b>	Les différentes espèces microbiennes dégradant les hydrocarbures	16
<b>IV</b>	Principales techniques de décontamination par les plantes	31
<b>V</b>	Principales techniques de décontamination par des microorganismes	34
<b>VI</b>	Concentrations et volumes des sels métalliques testés	40
<b>VII</b>	Dénombrement de la flore totale après 48 heures d'incubation	43
<b>VIII</b>	Dénombrement de la flore totale après 7 jours d'incubation	43
<b>IX</b>	Caractérisation culturale et cellulaire	44
<b>X</b>	Caractères biochimique des différentes souches	48
<b>XI</b>	Dégradation des hydrocarbures	49
<b>XII</b>	Résistance au plomb	50
<b>XIII</b>	Résistance au cadmium	51
<b>XIV</b>	Résistance au Zinc	52
<b>XV</b>	Concentration minimale inhibitrice des différentes souches	53

# Liste des figures

<b><i>N° de la figure</i></b>	<b><i>Intitulé de la figure</i></b>	<b><i>N° de Page</i></b>
<b>01</b>	Coupe géologique synoptique montrant les différents types pièges à hydrocarbures	04
<b>02</b>	Composés hydrocarbonés présents dans le pétrole brut	07
<b>03</b>	Voie métabolique de l'oxydation monoterninale des n-alcane	19
<b>04</b>	Les deux voies métaboliques d'oxydation des n-alcane	20
<b>05</b>	Voie métabolique de l'oxydation subterminale	20
<b>06</b>	Voie métabolique via l'oxydation terminale et subterminale des acides	21
<b>07</b>	Biodégradation des cycloalcanes non substitués	22
<b>08</b>	Voies de dégradation de Benz [a] anthracène par <i>Mycobacterium sp.</i>	24
<b>09</b>	Schéma représentant les différentes formes de phytoremédiation	31
<b>10</b>	Schéma de préparation des suspensions dilution	36
<b>11</b>	Exemple de certains aspects cultureux et cellulaires	46
<b>12</b>	Cinetique de croissance des différentes souches en présence du pétrole brut comme seule source de carbone	54

# Liste des abréviations

<b>ADH</b>	Arginine déhydrogénase
<b>Cd</b>	Cadmium
<b>CMI</b>	Concentration minimale inhibitrice
<b>HAP</b>	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Eau Oxygénée.
<b>KIA</b>	Kligler Hajna
<b>LDC</b>	Lysine décarboxylases
<b>L</b>	boue liquide.
<b>MATE</b>	Ministère d'aménagement du territoire et de l'environnement boue
<b>N<sub>2</sub></b>	diazote.
<b>NR<sup>+</sup></b>	Nitrate Réductase positive.
<b>NR<sup>-</sup></b>	Nitrate Réductase négative.
<b>RM</b>	Rouge de Méthyle.
<b>ODC</b>	Ornithine décarboxylases
<b>ONPG</b>	orthonitrophényle galactoside
<b>OGM</b>	Organismes Génétiquement Modifié
<b>Pb</b>	Plomb
<b>RTC</b>	Région Transport Centre.
<b>S</b>	solide
<b>SM</b>	Solution mère
<b>TMS</b>	Terminal Marin Sud.
<b>TMB</b>	Terminal Marin De Bejaia.
<b>TMN</b>	Terminal Marin Nord.
<b>VP</b>	Voges Proskauer
<b>Zn</b>	Zinc
<b>Lac</b>	Lactose
<b>Glu</b>	Glucose
<b>Cit</b>	Citrate
<b>Ind</b>	Indole
<b>Nit</b>	Nitrite
<b>Vp</b>	Réactif Voges-Proskauer
<b>DN<sub>ase</sub></b>	Enzyme
<b>RTC</b>	Région Transport Centre

# Introduction

## Introduction

Le pétrole étant le plus gros commerce de la planète en valeur et en volume, il est devenu indispensable à la vie quotidienne dans le monde ; la consommation mondiale d'énergie primaire en dépend à 40% (Soltani, 2004). Les fluctuations du prix du pétrole influent, en proportion variable, sur le prix de tous les biens et services, car ils sont tous produits en utilisant du moins indirectement du pétrole. Cette dernière est considérée non seulement comme la matière première pour l'industrie chimique mais également comme source d'énergie la plus demandée et la moins coûteuse (Akmouci-Toumi, 2009).

L'Algérie a aussi été pointée du doigt par sa position de principal producteur d'hydrocarbure sur le pourtour méditerranéen (Tedjani, 2011), pour cela ce secteur engendre une coproduction de matières polluantes qui peuvent causer des nuisances à l'environnement une fois déversées dans le milieu récepteur sans traitement préalable; ce type de rejet engendre d'une manière directe la pollution du sol, caractérisée par des teneurs élevées d'hydrocarbures et de métaux lourds (Boudjema et *al.*, 2009). Ces rejets ou déversements volontaires peuvent entraîner des catastrophes écologiques irréversibles.

Dans un récent rapport de l'agence européenne de l'environnement, l'Algérie rejeterait chaque année près de 10 000 tonnes d'hydrocarbures dans la Méditerranée. Ces rejets seraient principalement dus à des fuites d'exploitation et à des boues toxiques provenant des raffineries, celles-ci seraient concentrées dans les sédiments portuaires. Ceci explique que lorsque ces résidus ne se retrouvent pas stockés à ciel ouvert avec les ordures ménagères, ils sont évacués par les précipitations (Tedjani, 2011).

Le bourbier, en tant que collecteur des produits liquides et solides issus des rejets des bacs pétroliers, représente une grande source de pollution et de danger. Le diagnostic des techniques de traitement utilisées a montré des imperfections majeures pouvant induire des nuisances pour la santé humaine, l'écosystème et l'environnement. En dépit de l'utilisation multiple des procédés physicochimiques dans la restauration des sols pollués par les produits pétroliers, la bioremédiation reste la solution la plus efficace, la plus demandée car la mieux maîtrisée et la moins coûteuse. Il s'agit là d'une technique douce dont le principe repose sur la minéralisation complète des produits pétroliers qui ne génèrent aucun sous-produit toxique ; contrairement aux procédés physicochimique qui consiste souvent en un transfert de la pollution d'un milieu à un autre (Akmouci-Toumi, 2009).

Dans un processus organique de biodégradation des hydrocarbures, l'identification des flores bactériennes autochtones avec des capacités de biodégradation est une étape importante pour envisager un traitement biologique. L'utilisation de telles flores peut réduire les coûts de la biodégradation. Dans cette étude, on s'est fixé comme objectif en premier lieu d'isoler puis identifier les souches microbiennes capables de se développer sur des boues de pétrole. En second lieu, on s'est intéressé à évaluer la capacité des souches isolées à dégrader différents hydrocarbures ajoutés séparément au milieu de culture comme seule source de carbone puis d'évaluer leur cinétique de croissance sur du pétrole brut.

# Synthèse bibliographique

# Chapitre I

## *Hydrocarbures et pollution*

## I. Hydrocarbures et pollution

### I.1 Définition des hydrocarbures

Les hydrocarbures que l'on appelle communément pétrole, huile ou brut, et les fractions pétrolières qui en sont issues sont essentiellement composés de molécules résultant de la combinaison d'atomes de carbone tétravalents et d'atomes d'hydrogène monovalents (Chitour, 1983). Les hydrocarbures sont essentiellement utilisés comme carburants, comme combustibles et comme base pour la fabrication des huiles lubrifiantes, ils constituent aussi la matière première des synthèses pétrochimiques (Lefebvre, 1986). Ils sont aussi utilisés comme source de carbone pour la culture des microorganismes, et se différencient fondamentalement des sucres par l'absence d'oxygène (Champagnat et *al.*, 1974).

Hydrocarbure ou « Pétrole » est tiré du mot latin « pétra oléum » qui veut dire « huile de pierre ». C'est une huile minérale naturelle combustible, de couleur noir très foncé, quelques fois avec des reflets verdâtre et généralement plus léger que l'eau ; il est plus au moins fluide, doué d'une odeur caractéristique plus ou moins prononcée, et d'une densité de 0,8 à 0,95.

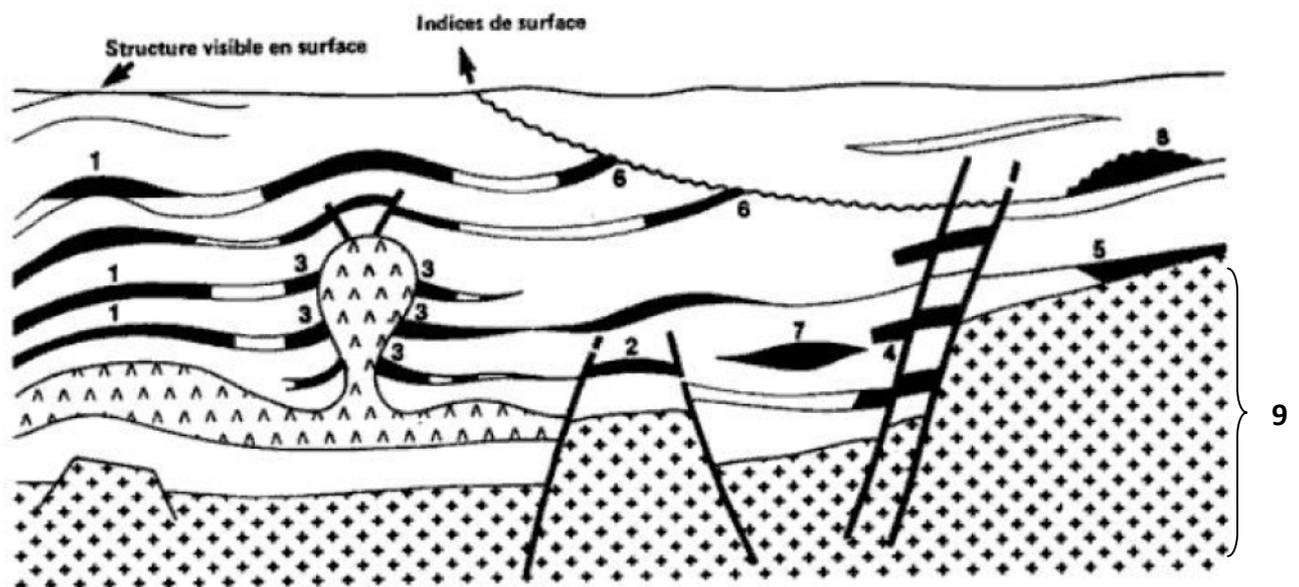
Il est constitué d'un nombre différent de carbone et d'hydrogène, de molécules de taille et de structures différentes, ce qui détermine leur état physique solide, liquide, et gazeux (Tranchmontagne, 1999).

### I.2 Origine des hydrocarbures

Le pétrole s'est formé il ya des millions d'années. Il provient de la transformation naturelle de sédiments organiques (accumulation de débris végétaux et animaux) sous l'action de la température et de la pression. Cette transformation s'opère sur une substance organique nommée kérosène, qui résulte d'une lente dégradation de débris organiques par des bactéries anaérobies. Sous l'effet de la température, les molécules organiques complexes sont rompues en molécules d'hydrocarbures plus petites (molécules formées uniquement de carbone et d'hydrogène) et dans une moindre proportion, en diverses molécules complexes, dont le mélange est appelé pétrole (Nowak, 2000). Le pétrole est contenu dans les roches sédimentaires et migre lentement vers la surface. Parfois, il est piégé par d'autres roches (grès poreux, schistes fracturés, restes calcaires d'anciens récifs) (Mac Donald, 2001).

Un piège rempli d'hydrocarbures peut, suivant les cas, contenir du pétrole seulement, du gaz seulement ou les deux. S'il y a du pétrole et du gaz, le gaz, plus léger, se rassemble au sommet du piège et le pétrole se place en dessous. Il faut retenir que, pour une accumulation de pétrole seul, d'importantes quantités de gaz sont tout de même dissoutes (figure 01).

De plus, il reste toujours un peu d'eau collée aux grains de la roche réservoir, qu'on appelle eau résiduelle. Il existe différents types de pièges. Dans la figure suivante, on distingue deux grandes familles : les pièges structuraux, de loin les plus nombreux, et les pièges stratigraphiques (Fimes et *al.*, 2002).



#### PIEGES STRUCTURAUX

- 1) Anticlinal
- 2) Horst
- 3) Flanc de dôme de sel ou d'argile
- 4) Piège contre faille

#### PIEGES STRATIGRAPHIQUES

- 5) Biseau sédimentaire
- 6) Biseau d'érosion
- 7) L'entaille (de sable ou de grés)
- 8) Récif

9) Socle cristallin ou substratum de la série sédimentaire

**Figure 01** : Coupe géologique synoptique montrant les différents types de pièges à hydrocarbures (Fimes et *al.*, 2002).

Les principales sources d'hydrocarbures sont :

- Le pétrole brut ;
- Le charbon ;
- Les gaz naturels ;
- Les animaux et les plantes ;
- Les schistes bitumineux.

Mais c'est incontestablement le pétrole brut qui reste la source la plus importante (Lefebvre, 1978).

### I.3 Composition des pétroles bruts

Ce sont des mélanges complexes d'hydrocarbures à poids et à structures moléculaires variables. Ils se répartissent en deux groupes chimiques principaux (saturés et aromatiques) et vont des substances simples et hautement volatiles aux paraffines complexes, en passant par les composés asphaltiques non distillables.

L'oxygène, l'azote, le soufre, le vanadium et le nickel, peuvent s'y trouver sous diverses combinaisons.

Certains de ces constituants sont, à température et à pression ambiante, gazeux (méthane, propane). Tous les types d'hydrocarbures sont présents dans le pétrole brut sauf les oléfines ou les alcènes. (Lefebvre, 1978 ; Proskouriakov et Drabkine, 1981). Selon la manière dont les atomes de carbone sont liés les uns aux autres, on distingue quatre groupes d'hydrocarbures (Lefebvre, 1978).

#### I.3.1 Les hydrocarbures saturés

Parmi ces hydrocarbures, on distingue :

- Les alcanes linéaires (*n*-alcanes,  $C_nH_{2n+2}$ ), dont la longueur de chaîne varie de 7 à 40 atomes de carbone, constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier).
- Les alcanes ramifiés : les plus abondants sont les *iso*-alcanes (groupement méthyle en position 2), les autres composés ramifiés antéiso (groupement méthyle en position 3) ou polyramifiés tels que les isoprénoïdes (exemple : pristane, phytane) sont beaucoup moins nombreux. Ces composés se trouvent dans le pétrole brut dans des proportions sensiblement égales à celles des *n*-alcanes.

- Les cycloalcanes : renferment des composés cycliques (à 5 ou 6 atomes de carbone) saturés et le plus souvent substitués. Quelques dérivés polycycliques sont aussi présents et certains d'entre eux tels les stéranes et les triterpanes sont caractéristiques d'un pétrole brut. Cette famille peut représenter entre 30 et 50 % des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut (Soltani, 2004).

### I.3.2 Les hydrocarbures aromatiques

Plusieurs familles d'hydrocarbures aromatiques et polyaromatiques dont le nombre de noyaux varie de 2 à 6 sont présentes dans les pétroles bruts. Ces composés sont dominés par des composés mono -, di- et tri-aromatiques. En général, les hydrocarbures aromatiques sont moins abondants que les alcanes, et ne représentent que 10 à 30 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier. Les composés alkylés sont, la plupart du temps, plus abondants que les molécules parentales dont ils dérivent. Certains cycles aromatiques peuvent être associés à des noyaux (cycle à 5 ou à 6 atomes de carbone) saturés (naphtéoaromatiques) (Soltani, 2004).

### I.3.3 Les composés polaires ou résines

Cette fraction correspond à des molécules hétérocycliques, telles que :

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

Les dérivés soufrés sont dans la plupart des cas plus abondants que les composés oxygénés ou azotés (Soltani, 2004).

### I.3.4 Les asphaltènes

Les asphaltènes correspondent à une classe de composés de hauts poids moléculaires, insolubles dans le pentane ou l'hexane. La structure de ces composés est mal connue du fait de leur composition chimique complexe (à base de cycles aromatiques condensés, de naphtéoaromatiques, de ramifications et d'hétéroatomes comme l'oxygène, l'azote et le soufre).

Les métaux sont également présents, mais à l'état de traces. Les plus abondants sont le vanadium et le nickel, mais du fer, du cuivre et de l'uranium ont également été détectés (Soltani, 2004). Les différents composés hydrocarbonés et les non carbonés présents dans le pétrole sont résumés dans la figure 02.

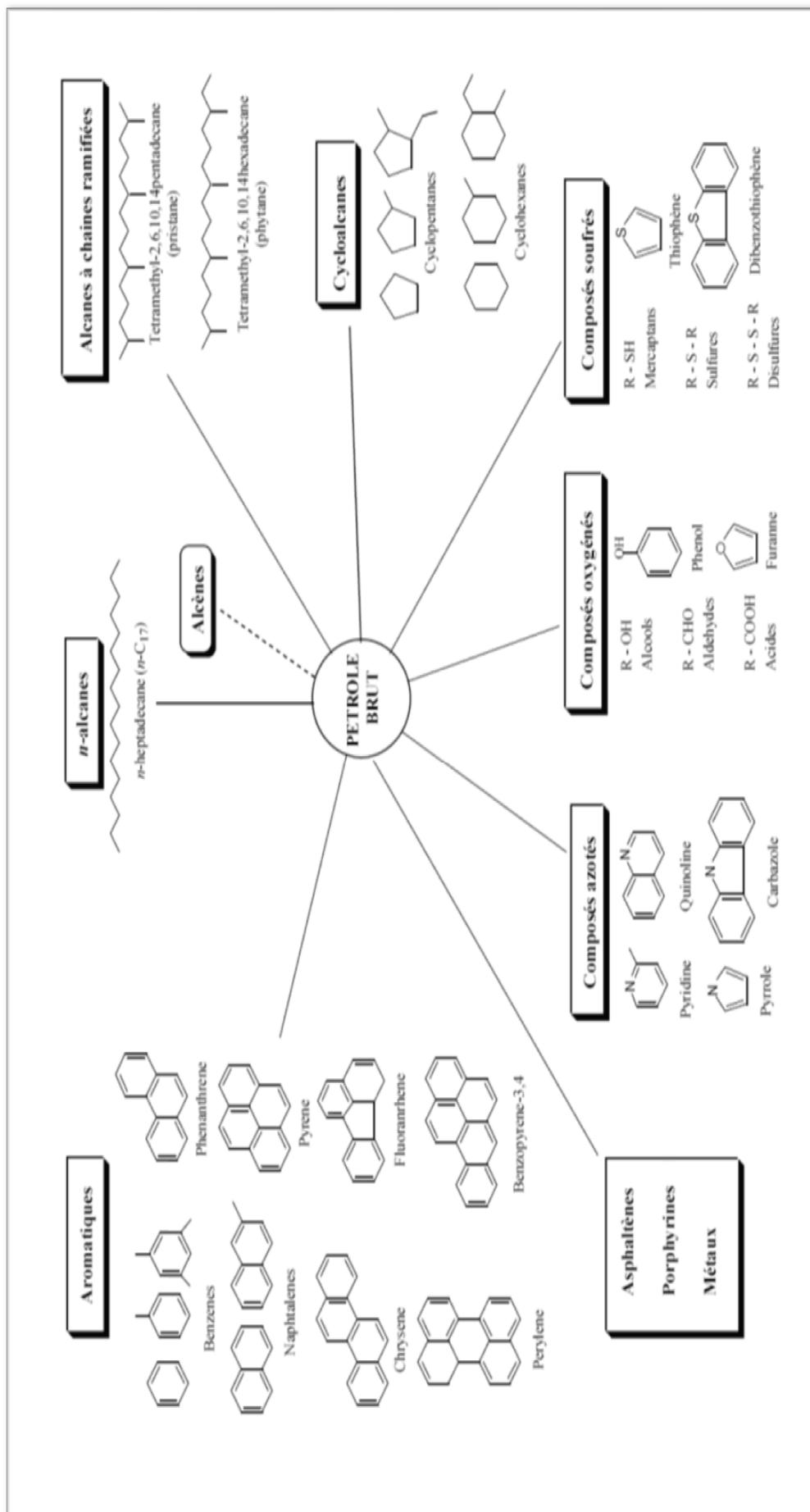


Figure 02 : Composés hydrocarbonés présents dans le pétrole brut (Soltani, 2004).

## I.4 Classification des pétroles bruts

Selon la prédominance des résines et des asphaltènes, les pétroles bruts sont classés en deux catégories : les bruts légers et les bruts lourds.

### I.4.1 Bruts légers

Ils sont généralement très fluides. Ils dégagent une forte odeur, ils possèdent un taux d'évaporation très élevé et sont extrêmement inflammables. Ils renferment une proportion plus élevée de fraction essence, relativement peu de résine et de soufre (Proskouriakov et Drabkine, 1981).

### I.4.2 Bruts lourds

Ils sont moins volatils, peuvent présenter diverses caractéristiques selon leurs provenances. Ils contiennent plus de résine, ces bruts sont une meilleure source de bitume (Proskouriakov et Drabkine, 1981).

## I.5 Physico-chimiques des hydrocarbures

Il est essentiel de connaître les propriétés physiques et chimiques pour être capable d'en déduire son comportement une fois qu'il sera soumis à l'environnement.

**Tableau II** : Caractéristiques des pétroles bruts.

Paramètres physicochimiques	Valeurs
Densité	800 à 900 kg/m <sup>3</sup>
Point d'ébullition	30 à 125 °C
Viscosité cinétique	3 à 100 centistokes à une température de 40 °C (mais peut aller jusqu'à 20 000)
Point d'écoulement	-30 à + 15°C (mais peut baisser ou atteindre 40°C)
Point d'éclair	-18 à 900 °C
Soufre	0,08 à 5%
Paraffine	Jusqu'à 15%
Asphaltène	Jusqu'à 15%
Vanadium	5 à 170 ppm

### **I.5.1 Densité**

La plupart des hydrocarbures sont plus légers que l'eau ( $d < 1$ ). La densité d'un hydrocarbure déterminera sa capacité à flotter, sa tendance à se volatiliser et sa fluidité (Lallemand, 1974).

### **I.5.2 Point et limite d'ébullition**

Elle reflète sa volatilité lorsque la température d'un hydrocarbure augmente, certains composés du pétrole arrivent à leur point d'ébullition et se distillent (Lefebvre, 1978).

### **I.5.3 Viscosité**

La viscosité est représentée par la résistance à l'écoulement. C'est-à-dire que les hydrocarbures à haute viscosité s'écoulent difficilement par contre ceux à faible viscosité sont très fluides. La viscosité est très sensible à la variation de la température (Lefebvre, 1978).

### **I.5.4 Point d'éclair**

Le point d'éclair représente la température à partir de laquelle un produit chauffé émet des vapeurs inflammables (Michel, 2003). Elles reflètent sa volatilité, lorsque la température d'un hydrocarbure augmente. Certains composés de ce produit arrivent à leur point d'ébullition et se distillent (Lefebvre, 1978).

### **I.5.5 Point d'écoulement**

Le point d'écoulement est la température en dessous de laquelle un hydrocarbure ne s'écoule plus. Si la température ambiante est inférieure à son point d'écoulement, le produit se comporte comme un solide (Lallemand, 1974).

### **I.5.6 Solubilité**

Certains composants des hydrocarbures sont solubles dans l'eau. Ce sont généralement les plus volatils qui sont aussi les plus solubles. Bien que la solubilité soit faible par rapport à l'évaporation, elle peut s'avérer importante du point de vue effet toxique sur milieu. Les hydrocarbures aromatiques sont les plus solubles, ce qui accentue leur toxicité (Lacaz, 1980). La solubilité de certains hydrocarbures est présentée dans le tableau suivant :

**Tableau I** : Solubilité des hydrocarbures (Berne, 1991).

Types d'hydrocarbures	Solubilité (mg/l)	Types d'hydrocarbures	Solubilité (mg/l)
<b>Paraffine :</b>		<b>Oleofines:</b>	
- iso pentane	48	- éthène	131
- n-hexane	9,5	- propène	200
- triméthyle pentane -2, 2, 4	2,5	- hexane-1	50
- n-octane	0,7		
<b>Cycloparaffines:</b>		<b>Aromatiques :</b>	
- Cyclopentane	156	- benzène	1780
- Cyclohexane	55	- toluène	515
- Cyclooctane	7,9	- o-xylène	175
		- ethylbenzène	125

### I.5.7 La volatilité

Certaines fractions des hydrocarbures se volatilisent à des températures basses variant entre 5 à 15°C.

### I.5.8 La polarité

Les hydrocarbures sont apolaires ou peu polaires (Berne, 1991).

Les propriétés physico-chimiques du pétrole sont résumées dans le tableau suivant :

## I.6 La pollution par les hydrocarbures

### I.6.1 Définition de la pollution

La pollution peut être définie comme étant une modification défavorable de l'équilibre naturel susceptible de mettre en danger la santé de l'homme, les ressources biologiques, la faune et la flore. Cette modification résulte en totalité de l'action humaine. La pollution consiste en l'introduction dans les différents milieux naturels de grandes quantités d'agents chimiques, ou biologiques entraînant ainsi une altération de l'environnement, de nature à mettre en danger la santé humaine (Lammote et Bourliere, 1983).

Parmi les pollutions les plus redoutables sur l'environnement, la pollution pétrolière qui relève à la fois de la pollution chimique et celle organique. Elle est surtout importante en mer et sur les côtes. La présence des hydrocarbures dans les différents milieux naturels provoque des effets désagréables pour l'homme et elle est la cause de propriétés organoleptiques mauvaises pour les animaux filtrateurs dont plusieurs deviennent de véritables réservoirs de mazout. (Lammote et Bourliere, 1983).

La pollution peut être :

- Diffuse avec un polluant qui pénètre régulièrement dans l'environnement et généralement par petites quantités. Ce type de pollution n'est souvent détecté qu'après l'accumulation du contaminant dans le milieu sur de longues périodes ;
- Brutale lors d'un rejet accidentel sur une courte période (Ballerini et Vandecasteele, 1999).

### **I.6.2 Principales sources émettrices d'hydrocarbures**

Les hydrocarbures sont émis dans l'environnement par des processus naturels ou anthropiques. Il apparaît que les hydrocarbures d'origine anthropique prennent progressivement le pas sur ceux d'origine naturelle. Cette évolution a été mise en évidence grâce à la réalisation de carottes tout autour du globe. Ce phénomène est logiquement accentué aux endroits où l'industrialisation et l'urbanisation sont le plus développées.

#### **a. Les processus naturels**

Les processus de génération des hydrocarbures sont divers. Parmi eux, les feux de forêt et de prairie sont considérés comme les plus importants. Mais, il existe d'autres processus tels que les éruptions volcaniques, l'érosion des roches, les fuites de réservoirs naturels ainsi que la production d'hydrocarbures par les végétaux supérieurs (cires) ou par les algues. La contribution de cette dernière semble, au regard de la littérature, importante. La production de ces végétaux est marquée par la prédominance des *n*-alcanes.

#### **b. Les processus anthropiques**

Deux sources anthropiques sont généralement distinguées : d'une part les sources pétrolières, correspondantes à une pétrogenèse à basse température, et d'autre part les sources pyrolytiques correspondant à des processus de combustion à haute température. La circulation automobile constitue l'une des principales sources d'hydrocarbures puisqu'elle combine les deux processus. Les véhicules émettent des gaz d'échappement provenant de la combustion

incomplète des carburants et sont aussi à l'origine de déversements de produits variés tels que les carburants, les huiles lubrifiantes ou les débris de pneumatiques (Takada et *al.*, 1996).

Le chauffage urbain et les diverses industries employant des processus pyrolytiques (production de coke, craquage catalytique, etc.) constituent aussi des sources importantes d'hydrocarbures en milieu urbain (Aboul-kassim et Simoneit, 2001).

### **I.6.3 Evaluation des risques de pollution**

La nature et le degré de pollution pour chaque site pollué sont très variables. Cependant, il est rare qu'un site pollué crée des dangers et des risques immédiats graves pour les populations avoisinantes. Dans de tels cas, il est indispensable de mettre en œuvre sans tarder les mesures d'urgence qui s'imposent, comme l'élimination des produits, la pose d'une clôture, le confinement des substances (Morgan et Watkinson, 1989).

L'étude des risques d'un site potentiellement pollué, permet de confirmer ou pas la présence de polluants et de situer le contexte environnemental du site, accompagné de l'évaluation simplifiée des risques (ESR) qui vise à classer le site, dans l'une des trois classes suivantes :

- site nécessitant des investigations approfondies (classe 1),
- site à surveiller (classe 2),
- site ne nécessitant pas d'autres investigations dans les conditions d'usage et d'environnement pour lesquelles l'évaluation a été réalisée (classe 3).

Dans le cas d'une pollution notoire avérée, accompagné de l'évaluation détaillée des risques (EDR) qui vise à apprécier l'impact potentiel ou avéré des polluants sur les cibles identifiées pour le site et son environnement (eaux souterraines, santé humaine, bâtiments, faune et flore), en fonction de leur migration dans les milieux ; le cas échéant, l'EDR aboutit à définir les objectifs des travaux de dépollution (Bellier et Massart, 1979).

Le pétrole est une source de pollution des environnements marins et terrestres, qui peut influencer les équilibres écologiques. Dans le but de mieux adapter les traitements de dépollution, il faut d'abord connaître le devenir du pétrole dans ces environnements (Soltani, 2004).

### **I.7 Devenir des hydrocarbures au contact de l'environnement**

Une fois les hydrocarbures en contact avec l'environnement, ils subissent un ensemble de processus dont on peut citer :

### **I.7.1 Evaporation**

Les composants des hydrocarbures répandus s'évaporent à des taux divers et sont transportés et dilués par les processus atmosphériques (Chaplin et *al.*, 2002). L'évaporation est généralement le principal processus d'altération au cours des premiers jours qui suivent un déversement. L'évaporation peut être responsable de la perte d'un à deux tiers de la masse d'un déversement en l'espace de quelques heures. En général, les molécules de faible poids moléculaire s'évaporent plus rapidement que celles de poids moléculaire élevé qui persistent dans le sol (Abu-Kassim et Simoneit, 2001).

### **I.7.2 Solubilisation**

Les composés aromatiques sont nettement plus solubles que leurs homologues saturés. La solubilité des hydrocarbures dans l'eau augmente avec la polarité des composés. Il est important de noter que ces hydrocarbures solubles sont de loin les plus dangereux pour l'environnement. Ils sont difficiles à éliminer et sont absorbés par la faune et la flore (Begbeg, 2008).

### **I.7.3 Emulsification**

Ce facteur est très important dans les processus conduisant à la disparition du pétrole de la surface de la mer. Les deux types d'émulsions eau dans le pétrole et pétrole dans l'eau peuvent se former (Lacaze, 1980).

### **I.7.4 Sédimentation**

La sédimentation est le passage du pétrole de la surface vers le fond, elle se présente lorsque la densité des résidus goudronneux excède celle de l'eau de mer (Lacaze, 1980 ; Smets, 1983).

### **I.7.5 Photo-oxydation**

La photo-oxydation s'observe en surface, mais aussi dans les vapeurs atmosphériques. Elle touche plus particulièrement les composés aromatiques (non volatiles et photo sensibles).

### **I.7.6 Pénétration dans les chaînes alimentaires**

La pénétration des hydrocarbures pétroliers dans les chaînes alimentaires marines est clairement démontrée par leurs teneurs importantes dans de nombreuses espèces aquatiques. Le pétrole peut être absorbé directement par les organismes ou indirectement par l'intermédiaire d'une nourriture contaminée. Après ingestion il sera, selon les cas stocké, métabolisé ou excrété. Les hydrocarbures s'accumulent dans les zones riches en lipides endogènes (Lacaze, 1980).

## Chapitre II

### *Biodégradation des hydrocarbures pétroliers*

## II. Biodégradation des hydrocarbures pétroliers

En principe, la biodégradation des hydrocarbures est une oxydation biochimique opérée par des micro-organismes. La biodégradation met en jeu des processus d'oxydation qui aboutissent à la formation des hydrocarbures de poids moléculaires plus faibles, appelée bioconversion. Mais aussi à la formation de gaz carbonique, d'eau, de sels minéraux et de biomasse lorsque la réaction est complète (Pelmont, 1994 ; Goyer *et al.*, 1995).

Ce procédé peut donc convertir un composé inoffensif en composé toxique, changer une substance immédiatement métabolisable en substance difficile à détruire, ou altérer la toxicité du composé.

La biodégradation primaire, tant qu'à elle, est utilisée pour indiquer une simple transformation, alors que le terme de biodégradation partielle signifie n'importe quelle transformation entre la biodégradation primaire et la minéralisation. La transformation la plus avantageuse serait la dégradation totale du composé toxique (Crady, 1985).

### II.1 Principe de la biodégradation

La biodégradation correspond à l'élimination complète par les microorganismes ou les végétaux d'un composé comme seuls rejets des produits simples tels que H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub> ou encore de l'acétate et d'autres produits de fermentation. Elle est souvent mise en évidence par la production de gaz carbonique radioactif.

La biotransformation consiste généralement en une transformation d'un corps ou polluant donné en d'autres corps chimiquement différents. Ces corps dérivés peuvent être non toxique ou moins toxiques que le produit original.

La biodégradation des hydrocarbures pétroliers apparaît comme le remède dans la lutte que l'on se propose de mener contre la pollution. Elle fait intervenir des enzymes présentes chez les bactéries (*Pseudomonas*, *Mycobacterium*, etc.) qui sont susceptibles d'altérer ces molécules afin de faciliter leur élimination ou leur dégradation ultérieure. Parmi ces enzymes, on cite les oxygénases qui favorisent les réactions d'hydroxylations donnant ainsi naissance à des groupements hydroxyles (Chelouah et Ghanem, 1998 ; Labrecque, 2003).

La première étape conduit à la formation de longues chaînes d'acides carboxyliques et elle est suivie par la rupture enzymatique de ces molécules qui formera de l'acide acétique, et le cycle bien connu de l'acide citrique fait apparaître le dioxyde de carbone et de l'eau (Belabas, 1999).

Cependant, toutes les espèces n'attaquent pas tous les hydrocarbures ; parmi ces derniers les aliphatiques sont les plus rapidement attaqués, les naphéniques sont un peu moins vite attaqués, enfin les aromatiques sont les plus résistants (Chelouah et Ghanem, 1998).

En résumé la biodégradation mène au même résultat que l'oxydation chimique ou la combustion. Parallèlement à cette réaction, la transformation des acides aminés en protéines et l'apparition de nouvelles cellules engendrent la croissance de la microflore pendant le processus de biodégradation (Belabas, 1999).

Les composés organiques subissent deux types de transformations : dans la première, la fraction du composé est oxydée sous forme d'eau et de gaz carbonique et ce, dans une réaction productrice d'énergie. Cette réaction est aérobie puisque les bactéries utilisent l'oxygène comme agent oxydant. Dans la seconde, le composé est synthétisé sous forme de nouvelles cellules bactériennes dans une réaction consommatrice d'énergie. L'énergie produite dans la réaction d'oxydation est la source de l'énergie de synthèse. Les composés organiques procurent aussi une source de carbone pour les nouvelles cellules (Goyer *et al.*, 1995).

## II.2 Les microorganismes de la biodégradation

Les microorganismes impliqués dans les phénomènes de biodégradation des hydrocarbures sont appelés « **Hydrocarbonoclastiques** » (Goyer *et al.*, 1995).

Plusieurs espèces de microorganismes ont la capacité de dégrader ces composés (Sirvins et Tramer, 1985). Plus de deux cents microorganismes (bactéries, levures, champignons) ont été reconnus capables de transformer (métaboliser) en produits de dégradation les hydrocarbures, ce sont, pour la plupart des espèces aérobies (Tableau III).

Il est admis que les microorganismes dégradants les hydrocarbures possèdent les mécanismes enzymatiques nécessaires à leur oxydation. Leur action initiale est due à des enzymes oxygénases spécifiques qui provoquent la rupture des hydrocarbures. L'efficacité de cette action dépend donc, en grande partie, de la quantité d'oxygène moléculaire disponible, outre l'oxygène d'autres corps sont nécessaires à l'action des bactéries (Lacaze, 1980 ; Sirvins et Tramer, 1985 et Goyer *et al.*, 1995). En effet, les données récentes en microbiologie et en physiologie de la biodégradation des contaminants indiquent que les microorganismes capables de réaliser ces réactions possèdent le matériel génétique nécessaire à l'induction des enzymes (Goyers *et al.*, 1995).

Selon Servins et Trampler (1985) et Magot et *al.* (1994), les espèces bactériennes les plus fréquentes appartiennent aux genres suivants : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Actinomycètes* et *Nocardia*.. Cependant, d'autres microorganismes sont capables de dégrader les hydrocarbures notamment les levures (*Rhodotorula*, *Candida*, *Torulopsis*, *Cryptococcus*, *Pichia* et *Hansenula*) et les moisissures (*Fusarium*, *Aspergillus* et *Penicillium*) (Champagnat et Adrian, 1974).

**Tableau III** : Les différentes espèces microbiennes dégradant les hydrocarbures(Champagnat et Adrian, 1974).

Genre	Espèces	Hydrocarbures
<b>Bactéries</b>		
Pseudomonas	<i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas oleovorans</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas testosteroni</i> <i>Pseudomonas alcaligenes</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> <i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	Nitrochlorobenzène Nitrobenzène Octane Hexadécane Naphtalène Nitrobenzène 4-Nitrobenzène Nitrobenzène 4-chlorobenzène 1,4-Dichlorobenzène 1,2-Dichlorobenzène 1,2,4-Trichlorobenzène 1,2,4,5-Tétrachlorobenzène
Rhodococcus	<i>Rhodococcus sp.</i>	3-Nitrochlorobenzène 4- Nitrochlorobenzène 1,3-Dinitrobenzène Benzène
Mycobacterium	<i>Mycobacterium vaccae</i>  <i>Mycobacterium</i>	2,4,6-Trinitrotoluène Toluène, chlorobenzène, benzène et éthylbenzène.  Hydrocarbures aromatiques et hydrocarbures aliphatiques
Acinetobacter	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter sp.</i>	n-alcane Naphtalène n-alcane
Comamonas	<i>Comamonas testosteroni</i>	Phénantrène, anthracène Nitrobenzène et naphtalène

Suite du tableau III :

Genre	Espèces	Hydrocarbures
Nitrosomonas Methylosinus	<i>Comamonas acidovorans</i>	Alcane chloré Methane, ethane, ethène Trichloroéthylène
	<i>Nitrosomonas europae</i> <i>Methylosinus trichosporium</i> <i>OB3b</i>	1,4-Dichlorobenzène 1,3-Dichlorobenzène
Alcaligenes	<i>Alcaligenes sp.</i>	N-alcane HAP
Xanthomonas Cycloclasticus	<i>Xanthomonas maltophilia</i> <i>Cycloclasticus oligotrophus RBI</i>	
<b>Champignons</b>		
Phanerochaete	<i>Phanerochaete sordida</i>	HAP
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	HAP, creosote Phenanthrène Benzo[A]Pyrène
Pleurotus	<i>Pleurotus ostreatus</i>	HAP
Trametes	<i>Trametes versicolor</i>	Benzo[a]pyrène, Anthracène
Aspergillus	<i>Aspergillus flavipes</i>	HA, asphltène, résines
Penicillium	<i>Penicellium javanicum</i>	HA, asphltène, résines
Graphium	<i>Graphium putredinis</i>	HA, asphltène, résines
Eupenicillium	<i>Eupinecillium javanicum</i>	HA, asphltène, résines
Emericella	<i>Emericella nidulans</i>	HA, asphltène, résines
Cycloclasticus	<i>Cycloclasticus oligotrophus RBI</i>	HA, asphltène, résines

### II.3 Cinétique de la biodégradation

Les cinétiques de biodégradation des hydrocarbures sont généralement de type logarithmique (Merzouk, 2001). Mais il est apparu au cours d'expériences de biodégradation du pétrole brut Saoudien et du pétrole brut arabe léger Koweïtien par une microflore mixte d'un rejet urbain de la ville de Marrakech (Maroc) une cinétique particulière, des fluctuations du pourcentage de biodégradation sont apparues lorsque plusieurs extractions sont faites dans la même journée, ce qui a poussé ces auteurs à reprendre la cinétique d'une manière plus précise. En effet, après de nombreux essais de biodégradation dans diverses conditions, ils constatent toujours vers la 3<sup>ème</sup> semaine (entre le 15<sup>ème</sup> et 20<sup>ème</sup> jour) un palier, ou même une diminution du pourcentage de biodégradation qui ne peut s'expliquer que par une soudaine élévation de la quantité de matière organique extractible par le chloroforme (Merzouk, 2001).

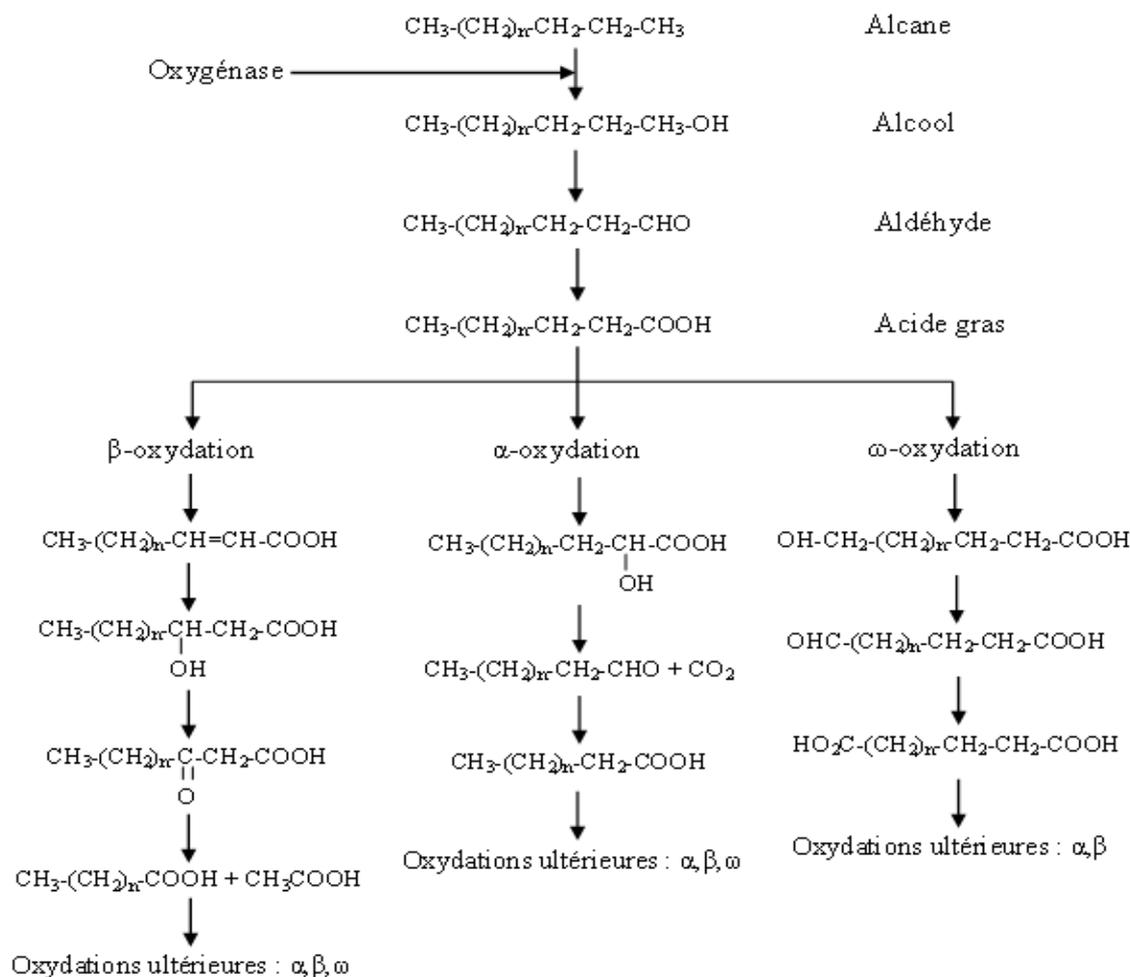
## II.4 Voies métaboliques de l'utilisation des hydrocarbures

Selon Champagnat et Adrien, 1974, deux cas peuvent se présenter

- ✓ L'hydrocarbure est transformé en un ou plusieurs composés intermédiaires à partir desquels sont élaborés les constituants de la cellule. L'hydrocarbure est alors la source de carbone et d'énergie.
- ✓ L'hydrocarbure subit une transformation chimique, sans qu'il participe à la croissance des microorganismes.

### II.4.1 Voies métaboliques des n-alcane

Les n-alcane à courte chaîne moléculaire, tel le n- nonan, ne sont pas toujours assimilés, mais peuvent être oxydés. Seule quelques bactéries ont la capacité de croître sur des alcane plus courts que le n- octane alors que les n-alcane dont le nombre de carbone est supérieur à 9, sont les hydrocarbures les plus facilement dégradables par un très grand nombre de genres bactériens. Plusieurs modes d'attaque des n-alcane ont été décrits (figure 03). Ils font intervenir l'oxygène moléculaire (Atlas,1981).

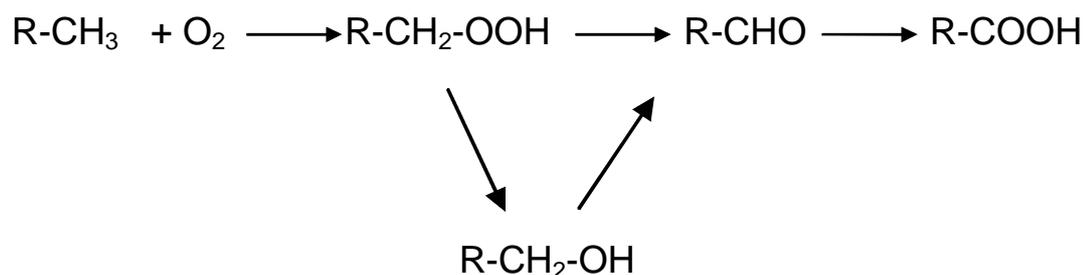


**Figure 03:** Voie métabolique de l'oxydation monoterminale des n-alcane (Venosa et Zhu, 2003)

#### II.4.2 Oxydation des n-alcane par le système de dioxygénase

Cette voie métabolique d'oxydation des n-alcane a été proposée pour la première fois par Finnerty (1988) pour les bactéries du genre *Acinetobacter*. Les n-alcane sont oxydés par une dioxygénase conduisant à la formation d'un n-alkyl-hydroperoxyde, qui sera à son tour oxydé en aldéhyde puis en acide. Chez d'autres souches, une étape supplémentaire dans la voie métabolique d'oxydation des n-alcane a été démontrée: il s'agit de la formation d'un alcool à partir du n-alkyl-hydroperoxyde, qui est ensuite oxydé en aldéhyde (Finnerty, 1990).

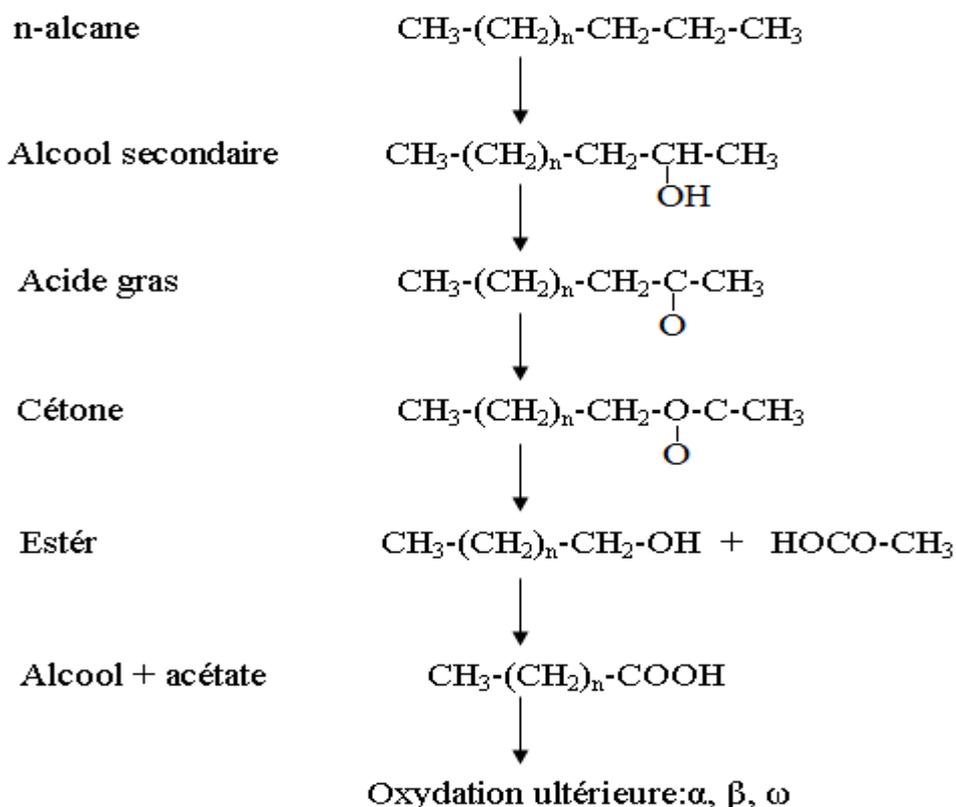
La figure suivante montre ces deux voies métaboliques:



**Figure 04 :** Les deux voies métaboliques d'oxydation des n-alcanes.

### a. Oxydation subterminale

Dans certains cas, l'oxydation peut être subterminale, ce qui conduit à la formation d'un alcool secondaire puis à une cétone. La dégradation ultérieure d'une cétone, par incorporation d'un atome d'oxygène, conduit à la formation d'un ester qui est hydrolysé en alcool et en acide, comme le montre la figure suivante :

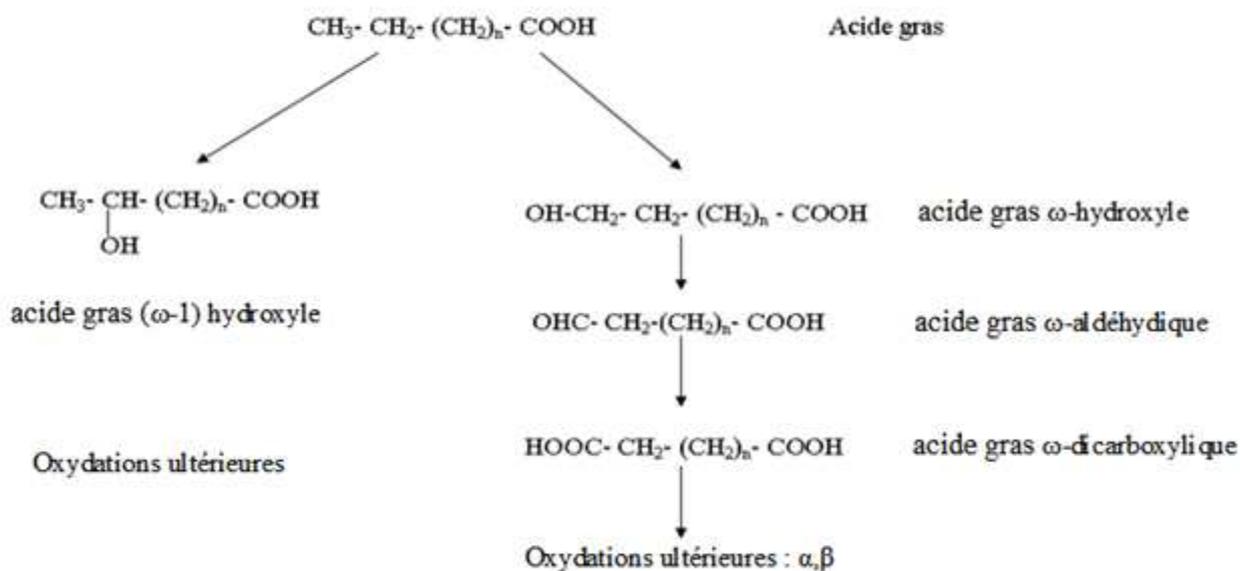


**Figure 05 :** Voie métabolique de l'oxydation subterminale (Klug et Markovetz, 1971)

### b. Oxydation diterminale

Après oxydation de l'acide gras, une deuxième oxydation peut se produire au niveau du groupement méthyle- $\omega$  pour donner un di-acide. La formation de 1- $\omega$ -alcane-diol et de dialdéhyde n'a pas été observée (Van Hamme et al., 2003).

L'oxydation subterminale de l'acide gras peut également se produire pour donner le ( $\omega$ -1)-hydroxy-acide de même longueur de chaîne que le n-alcane (figure 06).



**Figure 06 :** Voie métabolique via l'oxydation terminale et subterminale des acides (Bertrand et Mille, 1989 ; Soltani, 2004)

### c. Biodégradation des alcanes ramifiés

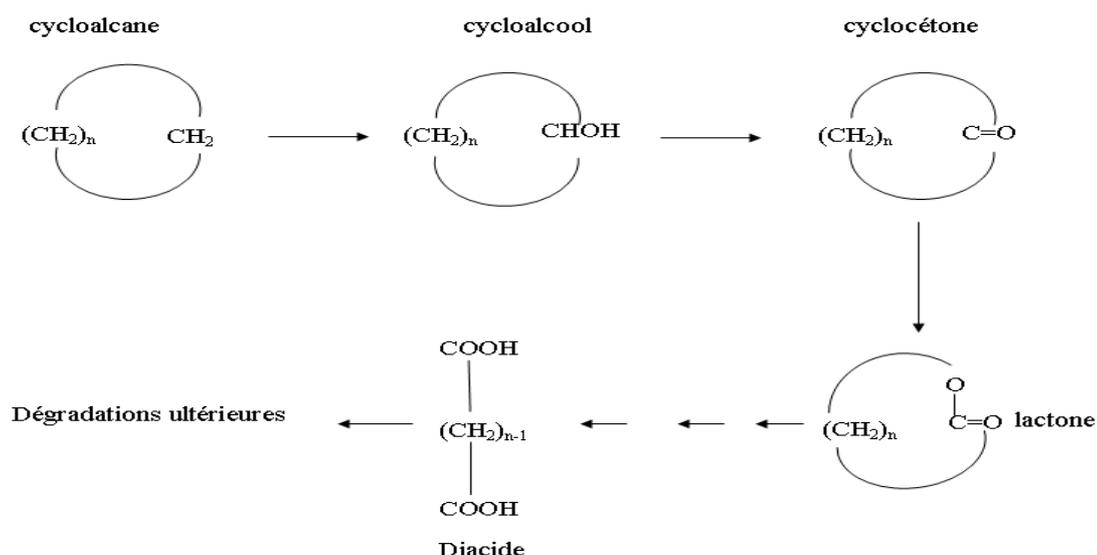
Les alcanes ramifiés sont généralement moins sensibles à la biodégradation, ce qui peut provoquer leur accumulation dans l'environnement. La présence d'un groupement méthyle en position  $\beta$  va empêcher la  $\beta$ -oxydation, ce qui nécessite l'intervention d'un autre mécanisme comme l' $\alpha$ -oxydation ou une oxydation à l'autre extrémité. Chez certaines bactéries, la voie métabolique passe alors par la voie dite de "citronellol", c'est le cas de *Pseudomonas citronellolis* capable de dégrader le 2-octane, le 3,6-diméthyl-octane et le 2,6-diméthyl-décane (Fall et al., 1979). Par contre, une ramification en  $\alpha$  n'empêche pas une  $\beta$ -oxydation (Rentani et Giusti, 1986), c'est ce qui explique la biodégradation des composés polyramifiés de type isoprénique tels que le pristane (2, 6, 10, 14-tétraméthyl pentadécane) (Alvarez, 2003).

L'oxydation des alcanes ramifiés commencent généralement par le groupement méthyle terminal le plus éloigné de la ramification et l'acide gras formé est ensuite incorporé dans les lipides cellulaires par  $\beta$ -oxydation, la dégradation peut se poursuivre jusqu'à la ramification ou une  $\omega$ -oxydation sera alors nécessaire pour une minéralisation complète de l'alcane.

La présence de deux groupement méthyles chacun en position  $\beta$  des extrémités de la chaîne hydrocarbonée (ramifié antéiso) bloque la dégradation des alcanes linéaires (Van hamme et *al.*, 2003). Berekaa et Steinbuchel (2000) ont isolé deux souches de *Micobacterium* : *Micobacterium ratisbonense* et *Micobacterium fortuitum*, capables d'utiliser l'alcane ramifié (squalane) (2, 6, 10, 15, 19, 23-hexaméthyltétracosane) et son hydrocarbure parent insaturé, comme unique source de carbone. Une partie du mécanisme de dégradation de ce composé correspond à celle du pristane et une autre correspond à la voie de Citronellol.

#### II.4.3 Voies de dégradation des hydrocarbures saturés cycliques

L'accumulation de ces composés dans l'environnement, montre leurs caractères relativement réfractaires aux attaques microbiennes. Cependant, un grand nombre de microorganismes incluant les champignons, les algues et essentiellement les bactéries sont capables de les dégrader (Dutta et Haryama, 2001). Les cycloalkanes non substitués peuvent être oxydés et transformés en lactones hydrolysables, conduisant ultérieurement à un diacide (figure 07)



**Figure 07:** Biodégradation des cycloalcanes non substitués (Bertrand et Mille, 1989).

## II.4.4 Biodégradation des hydrocarbures aromatiques

### a. Biodégradation des hydrocarbures monocycliques

La biodégradation des hydrocarbures aromatiques par les microorganismes est très importante pour l'élimination de ces composés des systèmes aquatiques et terrestres. Les procaryotes et les eucaryotes ont des capacités enzymatiques qui leurs permettent d'oxyder les composés aromatiques (Van Hamme et *al.*, 2003).

La biodégradation des hydrocarbures aromatiques apparait comme un processus essentiellement aérobie, l'étape initiale de ce processus est une réaction directe d'oxydation par l'oxygène de l'air faisant intervenir des oxygénase, cette réaction initie alors des voies permettant une dégradation complète (minéralisation) en CO<sub>2</sub> et une croissance microbienne. Elle peut aussi conduire à une dégradation partielle et donc à l'accumulation de métabolites. Dans ce cas, l'hydrocarbure n'est pas un substrat de croissance et sa dégradation n'intervient que par co-métabolisme, le microorganisme concerné est alors un dégradeur mais pas un minéralisateur (Bouchez et *al.*, 1996).

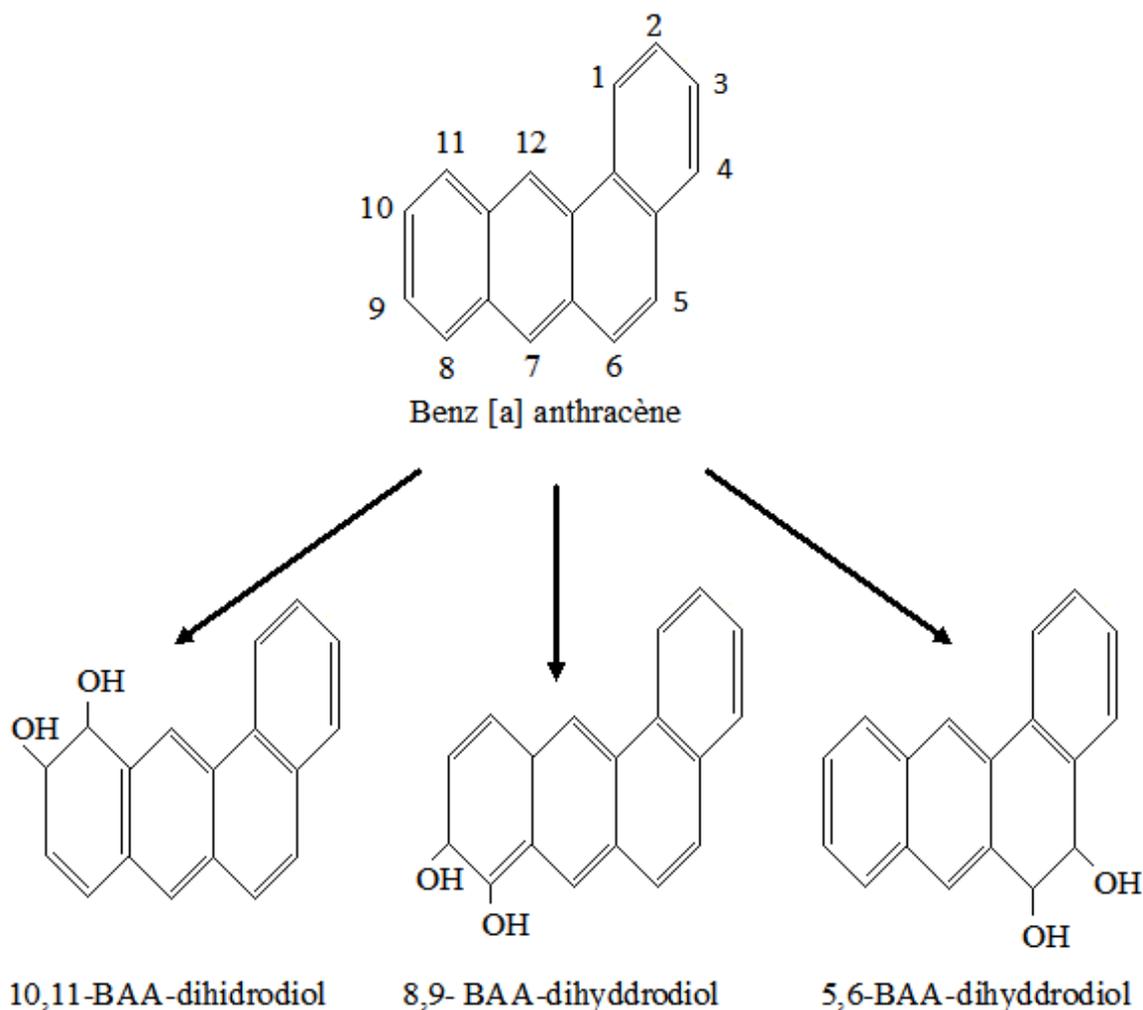
### b. Biodégradation des hydrocarbures polycycliques

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont des substances potentiellement mutagènes et cancérigènes présentes à des concentrations variables dans l'atmosphère, les sols, les eaux et les sédiments (Van Hamme et *al.*, 2003).

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques, issus de processus naturels ou anthropiques, sont des polluants organiques persistants du fait de leur inertie chimique et de leur résistance à la biodégradation (Van Hamme et *al.*, 2003).

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques de trois anneaux benzéniques ou moins sont entièrement biodégradés par des bactéries hétérotrophes qui peuvent les utiliser comme seule source de carbone et d'énergie, tandis que l'utilisation par des microorganismes des HAP de quatre noyaux benzéniques. Puisque les HAP de plus de quatre noyaux ne peuvent généralement être utilisés comme seule source de carbone et d'énergie, l'oxydation biologique semble s'effectuer par le biais de la co-oxydation (figure 08) (Schneider et *al.*, 1996).

Les hétérocycliques, qui renferme dans leur cycle un autre atome que le carbone, peuvent également être dégradés par des microorganismes (Grosser et *al.*, 1995).



**Figure 08:** Voies de dégradation de Benz [a] anthracène par *Mycobacterium sp.* (Schneider et *al.*, 1996).

## II.5 Les facteurs influençant la biodégradation

La biodégradation a fait l'objet de plusieurs études et pour la comprendre, il faut savoir qu'elle n'est pas seulement dépendante du type de structure des composés organiques, mais elle se déroule sous l'influence de plusieurs facteurs (Sirvens et Tramer, 1985 ; Goyer et *al.*, 1995).

La biodégradation va être soumise à différents facteurs abiotiques et biotiques dont l'action conjointe ou décalée dans le temps, sera responsable de sa disparition plus ou moins rapide (Bianchi et *al.*, 1989).

### II.5.1 La concentration en microorganismes

La biodégradation naturelle des hydrocarbures est influencée par de nombreux facteurs. Le premier de ces facteurs est la faible concentration en microorganismes capables de métaboliser les hydrocarbures, car plus la concentration en microorganismes est importante, plus la biodégradation sera importante (Van Hamme et *al.*, 2003).

### II.5.2 Les facteurs abiotiques

Selon (Brooijman et *al.*, 2009), les réactions chimiques (oxydation, hydro oxydation) de biodégradation des hydrocarbures catalysées par les enzymes des bactéries dépendent aussi de la souche bactérienne.

#### II.5.2.1 Les facteurs chimiques

##### a. Eléments nutritifs

Le facteur probablement le plus limitant est la teneur en élément nutritifs. Comme tout organisme vivant, les micro-organismes nécessitent l'apport de carbone et de différents macro et micro-nutriments permettant aux activités métaboliques de se produire. A l'inverse, une carence en nutriments aura pour effet de ralentir considérablement les processus de dégradation (Goyer et *al.*, 1995).

En effet, il faut rappeler que les bactéries se multiplient par bipartition et s'effectue selon une progression géométrique. Cependant l'appauvrissement du milieu en élément nutritifs ainsi que la formation de substances toxiques font que la croissance bactérienne ne peut se poursuivre indéfiniment (Sirvins et Trampler, 1985).

Les hydrocarbures contiennent du carbone et de l'hydrogène avec de petite quantité d'azote et de soufre, mais pas de phosphate. Ces micro-organismes doivent trouver ces éléments dans leur environnement pour effectuer les différentes activités métaboliques de la croissance (Rosenberg, 1993).

Le carbone joue un rôle prééminent dans l'édification des molécules organiques de la matière vivante (sucres, lipides, protéines, acide nucléiques). L'azote également (protéines, acide nucléiques) joue un rôle primordial dans la formation de la biomasse. Bien que limitée, la demande en phosphore reste essentielle pour répondre aux besoins de la cellule bactérienne en ATP et la synthèse des protéines et des acides nucléiques (Das et Chandra, 2010).

Pour réajuster le déséquilibre qui se crée après un déversement dans le sol entre le carbone d'un côté et l'azote et le phosphore de l'autre côté, il est nécessaire d'ajouter un fertilisant composé de corps simples qui peuvent être assimilés sans transformation digestive par les organismes, donc ils favorisent la croissance des populations des bactéries (Khaznadji et Houara, 2000).

### **b. L'oxygène**

L'oxygène est un élément essentiel à la dégradation aérobie, et sert d'un facteur limitant de la biodégradation (Goyer et *al.*, 1995). L'efficacité des enzymes oxygénases qui provoquent la rupture des hydrocarbures dépend en grande partie de la quantité d'oxygène moléculaire. (Rosenberg, 1993 ; Lacaze, 1980).

En effet, le terrain à dépolluer doit être labouré jusqu'à une profondeur de 1m afin d'assurer une aération d'où l'apport d'oxygène qui est nécessaire au métabolisme microbien (Khaznadji, Houara, 2000).

### **c. Le pH**

Selon Leahy et Colwell (1990), le pH du sol est très variable, de l'ordre de 2,6 à 11. La plupart des bactéries hétérotrophes et champignons préfèrent un pH proche de la neutralité.

Les pH extrêmes vont donc influencer négativement la capacité des populations microbiennes à dégrader les hydrocarbures. Pour augmenter les valeurs de pH, on peut procéder au chaulage (adjonction de chaux : oxyde de calcium) et lorsque on veut le diminuer, on procède à l'ajout de la même façon des produits acidifiants ou encore des composés soufrés (Goyer et *al.*, 1995).

### **d. Emulsifiants ou dispersants**

Ce sont des substances qui favorisent la dispersion d'une substance. Ils activent la désorption des hydrocarbures, ce qui augmente les surfaces de contact des hydrocarbures avec les bactéries. Cependant, il existe des bactéries qui secrètent souvent leurs propres agents émulsifiants. Ces derniers sont appelés les « surfactants » ou émulsifiants (Pelmont, 1995).

Le rôle naturel des émulsifiants est d'augmenter la croissance des bactéries sur les hydrocarbures par deux mécanismes :

- Augmentation de la zone de surface des hydrocarbures.
- Désorption des bactéries des gouttes de pétrole utilisées (Rosenberg, 1993).

### e. La concentration en hydrocarbures

Les concentrations élevées d'hydrocarbures peuvent inhiber la biodégradation par limitation des nutriments et d'oxygène. L'effet toxique exercé par certains hydrocarbures volatiles pendant que la plupart des microorganismes meurt à des concentrations de solvants organiques très faibles (0.1%), *Pseudomonas*, *Actinomycètes*, et *Nocardia sp*, peuvent assimiler les solvants organiques à une concentration de 0.3% (Merzouk, 2001).

## II.5.2.2 Les facteurs physiques

### a. La température

La température varie sur une très large gamme suivant les conditions climatiques et géographiques et l'on sait que l'activité biologique des microorganismes est très sensible aux variations de la température (Sirvens et Tramer, 1985).

Elle agit sur :

- L'état physiologique et la composition chimique du pétrole
- La vitesse de la biodégradation
- La composition de la communauté microbienne.

En effet, la biodégradation déclinera avec la baisse de la température en raison d'une réduction de la croissance microbienne et d'un ralentissement du métabolisme microbien, et l'augmentation de la température favorisera la dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques de faible poids moléculaire (2 à 4 noyaux).

En générale, on peut situer la température optimale de dégradation biologique aux alentours de 27°C. Cette température peut varier en fonction des hydrocarbures impliqués ainsi que la population microbienne autochtone du milieu (Goyer et *al.*, 1995).

### b. Humidité du sol

La présence d'eau dans le sol est essentielle à la biodégradation puisqu'elle permet aux microorganismes de se mouvoir à travers les macro-agrégats des sols et d'activer les processus métaboliques de ceux-ci. L'eau permet également aux hydrocarbures aromatiques polycycliques de se solubiliser relativement, augmentant ainsi leurs biodisponibilités aux microorganismes.

Par contre un excès d'eau entraînera des conditions d'anaérobie dues à l'absence de diffusion de l'oxygène causé par la saturation en eau du milieu. Ces conditions extrêmes

d'humidité seront alors défavorables à la croissance microbienne, à l'opposé une carence en eau aura des effets d'inhibition sur l'activité bactérienne (Colin, 2000).

### II.5.2.3 Autres facteurs

#### a. Type de matrice

Dans les sols argileux, les différents éléments permettant la biodégradation (air, nutriments) ne peuvent pas bien circuler dans ce milieu. Par contre, si les sols sont des graviers grossiers, l'eau qui apporte l'oxygène et les nutriments se draine très rapidement à cause de la porosité du sol et par conséquent ne peuvent pas créer les conditions optimales de biodégradation (Colin, 2000).

#### b. Effet de l'exposition préalable et adaptation

Les communautés microbiennes sont sujettes à des expositions préalables aux hydrocarbures à des niveaux d'activité différents tels que :

- Les endroits d'activité d'exploitation, de transport, de pétrole et des ports ;
- Les endroits de nettoyage et des réservoirs ;
- Les effluents des déchets industriels.

Ces différentes expositions augmentent considérablement le potentiel d'oxydation des hydrocarbures des communautés microbiennes. Cela s'explique par un phénomène appelé adaptation (Merzouk, 2001).

#### c. Le facteur temps

La dégradation des composés organiques est sous l'influence de facteur temps (Goyer et *al.*, 1995).

D'autres facteurs doivent avoir une influence sur la dégradation (Merzouk, 2001) :

- Composition du milieu ;
- Présence d'autres sources de carbone que les hydrocarbures ;
- Existence de prédateur se nourrissant au détriment des bactéries ;
- Nature du pétrole.

## Chapitre III

### *La bioremédiation des sites pollués par les hydrocarbures*

### III. La bioremédiation des sites pollués par les hydrocarbures

#### III.1 Les différentes méthodes biologiques de dépollution

Certains polluants ont contaminé les sols dans les décharges ou des installations industrielles, lorsque le risque pour les écosystèmes et l'homme est très élevé la dépollution s'impose. Il existe certes des méthodes physico-chimiques permettant la décomposition des polluants. Les plus utilisées sont l'incinération et les méthodes de décomposition chimique. Elles sont très efficaces pour certains types de contaminants présents dans le milieu, mais présentent des inconvénients. Les interventions sont lourdes et onéreuses et laissent en général un sol stérile. La bioremédiation, procédés biologiques employés pour éliminer les polluants industriels qui contaminent le cycle biogéochimique des substances naturelles, est une option avantageuse pour diminuer la pression exercée sur l'environnement (Weidong et *al.*, 2011).

La nécessité de dépolluer les sites contaminés a conduit au développement de nouvelles technologies de l'environnement, qui ont pour objectif de détruire les composés xénobiotiques plutôt que de les accumuler dans des décharges (Jemal, 2002).

Le but de la dépollution des sols est de restituer les sites dans un état aussi proche que possible de l'état antérieur à la pollution. En outre, la ou les techniques de traitement des sols ne doivent pas être plus polluantes que le résultat de la dépollution. C'est-à-dire qu'il ne doit pas y avoir de transfert de pollution (Geoffrey et Perchet, 2008).

Les techniques de dépollution doivent répondre à certains critères :

- enlever ou neutraliser les matières incriminées ;
- peser aussi peu que possible sur les ressources mises en œuvre (eau, air, énergie) ;
- ne pas provoquer d'émissions secondaires (eau et air du processus) contenant des polluants ;
- obtenir un taux important de recyclage du matériau traité ;
- minimiser la quantité et le danger potentiel des matières résiduelles ;
- ne pas produire de nouvelles substances toxiques par l'enlèvement ou le transfert de celles déjà existantes (Geoffrey et Perchet, 2008).

La dépollution des sites contaminés par des sources de pollution variées est contrainte par différents facteurs. Toutefois, la dépollution d'un site encore en activité sera beaucoup plus contraignante que celle d'un site fermé (Legrand, 2006).

Les traitements proposés peuvent être définis en trois grandes familles :

- les procédés « *in situ* », réalisés dans le sol en état ;

- les procédés « on site », traitements sur place des sols excavés ;
- les procédés « hors site » ou « off site » ou « *ex-situ* », nécessitant l'évacuation.

Ces différents procédés sont dépendants d'un facteur de temps, sachant que les traitements « *in situ* » demandent un temps plus long que ceux réalisés hors site. Enfin, le type de traitement choisi dépendra également de la nature du ou des polluants, certains d'entre eux présentant la caractéristique d'être biodégradables et d'autres non (Geoffrey et Perchet, 2008).

Ainsi, trois méthodologies peuvent s'appliquer pour le traitement de polluants non biodégradables :

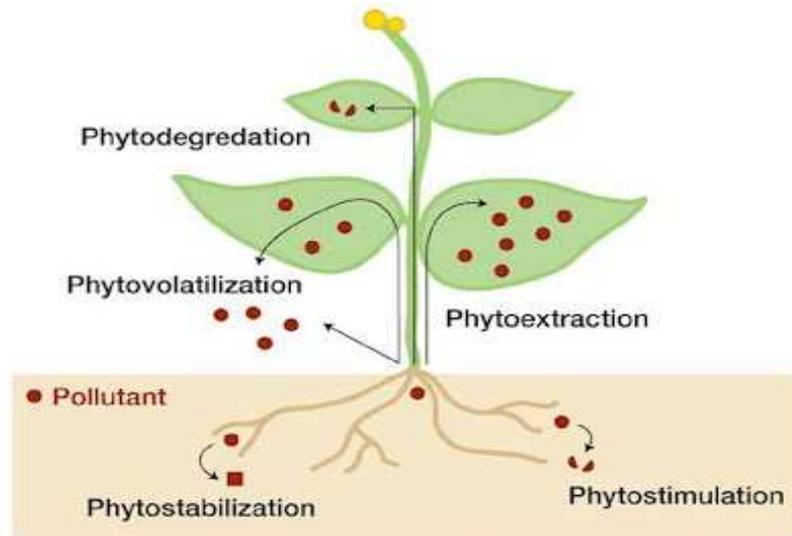
- Les traitements physico-chimiques ;
- Les traitements thermiques ;
- Les méthodes de confinement.

## III.2 Les procédés biologiques

Des méthodes biologiques s'appuient sur le métabolisme et l'activité des communautés de bactéries, champignons, végétaux supérieurs, pour évacuer, dégrader ou stabiliser les polluants.

### III.2.1 La phytodépollution

La phytodépollution utilise des plantes afin de dépolluer le sol et l'eau du sol en tirant avantage des capacités des plantes pour extraire, accumuler et/ou dégrader les constituants de leur environnement. La bioremédiation assistée par les plantes, assimilée parfois à un type de phytoremédiation implique l'interaction des racines et des microorganismes associés aux systèmes racinaires. Cette technique permet de dépolluer les sols contenant des concentrations élevées en composés organiques (Miller, 1996). La technique de phytodépollution est une technologie de dépollution qui semble efficace vis-à-vis d'un large spectre de polluants organiques et inorganiques. Elle peut être utilisée sur des substrats solides (sols pollués), liquides (eaux contaminées) ou gazeux (air chargé en composés nocifs volatils) (Pilon-Smits, 2005). Les principaux mécanismes de phytodépollution sont la phyto-extraction, la phyto-dégradation, la rhyzo-dégradation et la phyto-stabilisation (Vila, 2006). Le schéma ci-dessous présente brièvement les différentes formes de phytoremédiation.



**Figure 09** : Schéma présentant les différentes formes de phytoremédiation.

Le principal inconvénient de la phytodépollution est la durée du traitement qui peut s'étendre sur plusieurs dizaines d'années (Geoffrey et Perchet, 2008).

Les principales techniques de décontamination par les plantes utilisées dans la phytoremédiation sont brièvement expliquées dans le tableau IV.

**Tableau IV** : Principales techniques de décontamination par les plantes.

<b>Phyto-extraction</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- extraction par la plante (rhizosphère) des polluants du sol</li> <li>- translocation dans la plante (racines, tiges, feuilles, fruits)</li> <li>- récolte des plantes et incinération /Co-incinération</li> <li>- récupération partielle de métaux lourds (traitement mâchefers)</li> </ul>
<b>Phyto-stabilisation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- stabilisation par réduction de la mobilité et biodisponibilité des polluants</li> <li>- limitation du transfert vers d'autres compartiments (nappe, atmosphère)</li> <li>- réduction du potentiel de dispersion des polluants</li> <li>- aide à la restauration d'une couverture végétale</li> </ul>
<b>Phyto-dégradation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- dégradation de polluants par voie métabolique en molécules moins toxiques</li> <li>- intégration dans les tissus de la plante</li> <li>- réduction ou élimination de résidus toxiques</li> </ul>
<b>Phyto-volatilisation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- extraction du polluant du sol par le végétal</li> <li>- relargage atmosphérique par évapotranspiration du polluant initial ou transformé</li> <li>- meilleurs résultats avec des espèces à forte évapotranspiration</li> </ul>
<b>Rhizo-dégradation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- dégradation du polluant par les racines (processus interne) et l'activité microbienne associée (processus externe)</li> <li>- possibilité de traitements plus profonds</li> <li>- complémentaire aux traitements biologiques (phytostimulation)</li> </ul>

### III.2.2 La bioremédiation

La bioremédiation est basée sur l'utilisation de souches microbiennes (bactéries et/ou champignons) et consiste à utiliser ces dernières afin de dégrader des contaminants (Boopathy, 2000).

La bioremédiation est utilisée depuis un peu plus de dix ans afin d'éliminer divers composés anthropogéniques ou d'origine naturelle présents dans l'environnement. Cette technique a de multiples applications, incluant le nettoyage des eaux du sol, du sol et de boues industrielles. Il existe des micro-organismes capables de dégrader efficacement des polluants comme les produits pétroliers, les huiles et les graisses, les hydrocarbures mono et polycycliques, les biphénylpolychlorés, etc. En plus d'éliminer les composés ayant des effets néfastes pour l'environnement, cette technique permet de diminuer les coûts d'assainissement (Kulkarni et *al.*, 2007). Les microorganismes ont besoin de nutriments et de source carbonée pour fournir l'énergie nécessaire à leur croissance et leur survie.

La bioremédiation doit faire face à un environnement hétérogène dans lequel la plupart du temps, le contaminant est présent en association avec des particules du sol, dissous dans la solution du sol, etc. Pour cette raison, la bioremédiation se doit d'avoir une approche pluridisciplinaire, prenant ainsi en compte la microbiologie, l'ingénierie, l'écologie, l'écotoxicologie, la pédologie et la chimie (Geoffrey et Perchet, 2008).

Plusieurs méthodes utilisent les microorganismes comme principal acteur de la bioremédiation (Ballerini et *al.*, 1998). Tout comme les autres traitements, les procédés de bioremédiation peuvent être regroupés en 2 sous parties, la première consacrée aux traitements de dépollution « *in situ* », la seconde aux traitements « hors site ».

#### a. Les traitements « *in situ* ».

Les traitements « *in situ* » s'imposent dans les cas où les polluants ont pénétré profondément dans les sols, et sont répartis sur des surfaces importantes, rendant l'excavation trop coûteuse. Ces traitements visent à activer les processus de biodégradation et à améliorer l'accessibilité des microorganismes à l'oxygène (Ballerini et *al.*, 1998).

#### b. Les traitements hors site

Les traitements hors site peuvent être utilisés dans le cas où les contaminants n'ont pas pénétré trop profondément, les sols peuvent alors être excavés puis traités. L'utilisation de ces

procédés hors site permet la plupart du temps une réduction des durées de traitement (Ballerini et *al.*, 1998).

### III.2.3 La biorestauration

La biorestauration est une technique de réhabilitation d'un site pollué qui utilise des micro-organismes indigènes ou exogènes (autochtones ou allochtones) pour dégrader partiellement ou totalement des polluants organiques présent dans l'eau ou le sol. La biorestauration consiste en la mise en œuvre de ces micro-organismes qui dégradent directement (le polluant et le substrat de croissance) ou indirectement (par cométabolisme) le polluant organique concerné (Boopathy, 2000).

La biorestauration peut être définie en termes généraux comme l'utilisation des êtres vivants pour rétablir l'équilibre naturel de la matière d'un espace perturbé par l'action humaine. Il existe dans la nature une large gamme de microorganismes qui se trouvent dans le milieu de façon naturel et qui peuvent décomposer des substances, y compris des hydrocarbures, sous des formes moins complexes. Ce processus de biodégradation est caractéristique de tous les systèmes environnementaux (Abdelly, 2006).

La biorestauration est une technique qui, dans des conditions climatiques et géographiques données, peut s'avérer utile pour éliminer les nappes d'hydrocarbures.

La biorestauration comporte de nombreuses techniques. L'une d'entre elles consiste à enrichir le milieu pollué en macronutriments type N, P, ou K, en vue de favoriser ou d'augmenter la présence de bactéries et autres microorganismes. La dégradation de l'hydrocarbure est ainsi accélérée par l'action de ces microorganismes qui utilisent ces composés comme source de nutriments et d'énergie, tout en transformant les composants toxiques et mutagènes du pétrole en produits non toxiques. Elle est efficace lorsque la teneur dans le sédiment n'est pas supérieure à 10g/kg.

Le succès de la technique dépend de l'existence sur le site contaminé de bactéries possédant les capacités métaboliques appropriées, de la teneur adéquate en oxygène et en nutriments tels le phosphore et l'azote et d'un pH entre 6 et 9.

Le processus de restauration est si lent qu'il est généralement utilisé après un nettoyage mécanique de la pollution ou sur des sites qui n'exigent pas un nettoyage immédiat.

L'avantage par rapport à d'autres méthodes est qu'il détruit les hydrocarbures toxiques sans les déplacer dans un autre milieu. Le procédé consiste soit d'une addition de micro-organismes spécialisés présélectionnés, et il s'agit alors de *bioaugmentation*, ou de la

stimulation de microorganismes indigènes grâce à des supplémentations spécifiques, et il s'agit dans ce cas de *biostimulation*. Dans les deux cas, l'addition d'oxygène, de substrats et de nutriments minéraux peut être nécessaire pour obtenir les meilleurs taux de biodégradation (Boopathy, 2000).

Quand le site est restauré, les additions cessent et la population microbienne revient à la densité initiale.

Les principales techniques de décontamination utilisant les microorganismes dans les traitements *in situ* ou *ex-situ* des sols, boues, effluents liquides pollués par métaux, solvants, hydrocarbures (HAP), explosifs et produits phytosanitaires sont résumés dans le tableau V.

**Tableau V** : Principales techniques de décontamination par des microorganismes (Cadière, 2006).

<b>Biodégradation</b>	utilisation de la capacité de certains microorganismes à transformer le polluant en substrat (source de carbone, d'énergie); la biodégradation totale d'un composé organique s'appelle la minéralisation
<b>Bio-immobilisation</b>	utilisation de la capacité de certains microorganismes (essentiellement des bactéries) à immobiliser un /plusieurs composants présents à l'état soluble
<b>Biolixiviation</b>	solubilisation par les microorganismes et entraînement dans la phase aqueuse de polluants fixés ou piégés dans le sol
<b>Injection d'eau Oxygénée</b>	injection d'eau oxygénée (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) et éventuellement de nutriments dans la zone insaturée via des galeries construites, puis récupération de l'eau dans des puits de pompage
<b>Biorestauration</b>	ajout de nutriments (azote/phosphore) pour stimuler la croissance des microorganismes indigènes et favoriser la dégradation des polluants
<b>Bio-augmentation</b>	introduction dans le sol contaminé de microorganismes allochtones capables de traiter les polluants présents
<b>Bio-stimulation</b>	ré-ensemencement de populations prélevées sur le site, dont la croissance a été stimulée en laboratoire ou dans des bioréacteurs installés sur site

# Partie pratique

# Chapitre IV

## *Matériels et méthodes*

Cette étude a été réalisée au laboratoire de microbiologie. Elle a pour but la caractérisation microbiologique d'un borbier résiduel des bacs de pétrole. En effet, après les opérations de transport du pétrole, un volume important de boue a été formé au fond des bacs, ce dernier sera rejeté et déversé dans les borbiers, après l'accumulation successive de ces boues dans les borbiers, ces derniers présentent un risque de pollution pour l'environnement.

## **IV.1 Origine et prélèvement des échantillons**

L'échantillonnage est réalisé au niveau d'un site pollué par le pétrole « borbier » au sein du Terminal Marin Nord (TMN) de TRC-SONATRACH situé dans la wilaya de Bejaïa.

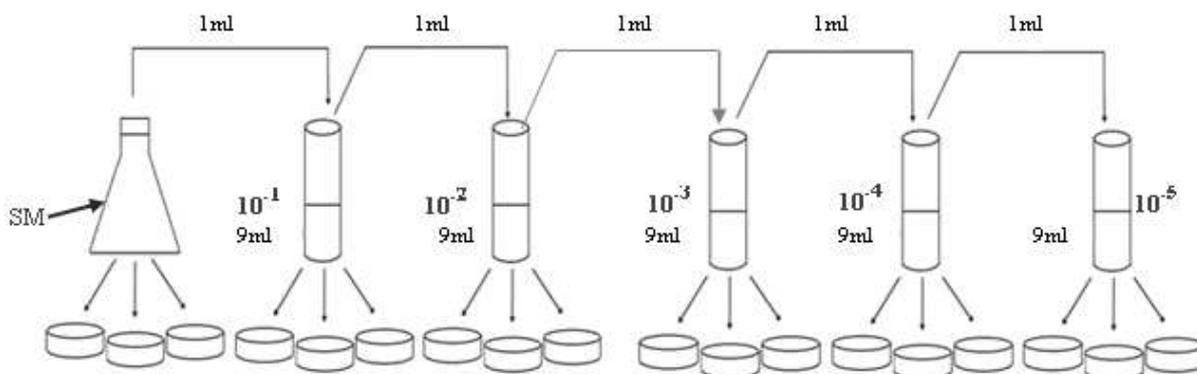
Deux échantillons ( $\approx 1\text{kg}$ ) sont prélevés à partir de deux borbiers. Le premier correspond à un mélange de boue sèche et de sol, tandis que le 2<sup>ème</sup> correspond à des boues fluides.

Une quantité de pétrole brut a été prélevé dans un bac de pétrole pour usage ultérieur comme composé dans les différents tests à faire.

## **IV.2 Analyse microbiologique**

### **IV.2.1 Dénombrement de la microflore totale**

Ce dénombrement concerne la flore mésophile aérobie. A partir d'un échantillon aliquote, des suspensions dilution sont préparées dans 100 ml d'eau distillée stérile avec un rapport de 1/10 (m/v). Les solutions ainsi préparées sont mises sous agitation à 180 tours/mn pendant 1 heure pour une meilleure extraction de la microflore. Des dilutions décimales ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$ ) sont en suite réalisées dans de l'eau distillée stérile (figure10). A partir de chaque suspension dilution obtenue, trois boites de pétri contenant le milieu de culture gélosé M<sub>2</sub> (annexe) sont ensemencées par étalement de 0,1 ml. Les boites sont ensuite incubées à 28°C pendant 5 jours. Après incubation, les colonies obtenues sont dénombrées à l'aide d'un compteur de colonie.



**Figure 10 :** Schéma de préparation des suspensions dilution.

Le nombre de germes par gramme de boue est déterminé en calculant la moyenne arithmétique des résultats obtenus et en tenant compte des facteurs de dilution, selon la formule :

$$N_c = \sum C / [N_1 + 0,1N_2] d \cdot V$$

$N_c$  : nombre des microorganismes en UFC /ml ;

$C$  : nombre des colonies dénombrées ;

$N_1$  et  $N_2$  : nombre de boîtes dénombrées dans la première dilution (varie de 0 à 3) ;

$V$  : volume prélevé (0,1 ml) ;

$d$  : dilution.

#### IV.2.2 Isolement et purification des microorganismes

Après dénombrement de la microflore totale, les colonies présentant des caractéristiques macroscopiques différentes sont isolées et purifiées par repiquage successif.

Les souches ainsi isolées et purifiées sont conservées à 4°C dans des tubes à essai contenant le milieu  $M_2$  incliné pour usage ultérieur.

#### IV.3 caractérisation des isolats

L'identification des souches isolées est réalisée en se basant sur les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques.

### IV.3.1 Caractérisation culturelle et morphologique

#### a. Aspect macroscopique

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation.

- La forme des colonies : rondes irrégulières ;
- La taille des colonies par la mesure du diamètre : punctiforme ou non punctiformes ;
- La chromogénèse : Couleur de la colonie ;
- L'élévation : convexe, concave, plate ;
- L'opacité : opaque, translucide ou transparente ;
- La surface : lisse, rugueuse, sèche, dentelée.

#### b. Aspect microscopique

La coloration des microorganismes est souvent réalisée avant les observations microscopiques et ceci pour une meilleure observation de la forme et la dimension des cellules, une identification et différenciation d'organismes semblables et une mise en évidence des détails de la structure cellulaire (Gram, forme des cellules et arrangement cellulaire).

### IV.3.2 Caractérisation biochimique

Cette approche nous oriente sur le métabolisme suivi par ces microorganismes et les enzymes qu'ils possèdent. Ces tests ont été réalisés en utilisant les « Galeries » traditionnelles pour les souches microbiennes.

#### a. Recherche de la catalase

A l'aide d'une anse de platine, une goutte de la suspension bactérienne est déposée sur une lame de verre puis émulsionnée dans une goutte d'eau oxygène à 10 volumes. La présence de la catalase se manifeste par une effervescence.

#### b. Recherche du nitrate réductase

A une culture de bouillon nitraté de 24 heures d'incubation à 28°C, on ajoute 3 gouttes de NR1 puis 3 gouttes de NR2. Après agitation, on obtient, soit une coloration rose ou rouge indiquant la réduction des nitrates en nitrites (nitrate réductase positive NR<sup>+</sup>) soit aucun

changement de la couleur du milieu. Dans ce cas, on ajoute une pincée de poudre de Zinc (réducteur des nitrates), on agite et on incline les tubes de culture en position presque horizontale. Après cinq minutes :

- Si le milieu devient rose ou rouge, il reste des nitrates, donc ces derniers n'ont pas été réduits par les bactéries : nitrate réductase négative (NR<sup>-</sup>).
- Si le milieu reste incolore, il ne reste plus de nitrates, les bactéries les ont réduits au-delà du stade nitrites : nitrate réductase positive très active (NR<sup>+</sup>).

### c. Métabolisme des Glucides

A partir des cultures des souches purifiées, une suspension bactérienne chargée et préparée dans 5ml d'eau physiologique stérile. Le milieu Clark et Lupes est ensuite ensemencé puis incubé à 28°C pendant 24 heures. Après incubation, on répartit le contenu du tube dans des tubes stériles. Dans l'un des tubes, on verse quelque goutte de VP1 puis quelque goutte de VP2 et dans l'autre on ajoute quelques gouttes du réactif rouge de méthyle.

Dans le premier cas, la lecture s'effectue après dix minutes, et la réaction positive se manifeste par une coloration rouge du milieu. Dans le deuxième cas, la lecture est immédiate et la réaction positive se traduit par une coloration rouge.

### d. Recherche de la $\beta$ – Galactosidase

Pour la recherche la  $\beta$  – Galactosidase, on prépare une suspension dense de la culture bactérienne à étudier dans un tube à essai stérile contenant 0.5 ml d'eau physiologique à laquelle on ajoute un disque orthonitrophényle galactoside (ONPG). La lecture s'effectue après 2, 4, 6, 8, 10, 12 puis après 24 h d'incubation.

La présence d'une  $\beta$ -galactosidase se manifeste par le virage de la couleur de la suspension bactérienne au jaune citron.

### e. Utilisation des sucres

À partir des suspensions bactériennes préparées auparavant, le milieu Kligler Hajna est ensemencé en réalisant une piqure centrale dans le culot puis des stries serrées sur la pente. Les tubes sont fermés légèrement sans visser les bouchons. Après 24 heures d'incubation à 28°C, le virage au jaune de la pente de la gélose indique l'oxydation du lactose tandis que le jaunissement du culot indique que la souche fermente le glucose. Le noircissement du milieu dans la zone joignant la pente et le culot montre que la souche produit de l'H<sub>2</sub>S est la

présence de bulles d'air, refoulement ou le craquement de la gélose indique la production de gaz.

#### **f. Utilisation du citrate comme seule source de carbone**

La pente de la gélose au citrate de Simmons estensemencée par stries longitudinales à partir d'une suspension bactérienne, puis incubée à 28°C pendant 48 h. La croissance bactérienne sur le milieu indique la présence d'une citrate perméase. Cependant, s'il n'y a pas de développement, la bactérie ne possède pas cette enzyme.

#### **g. La recherche des décarboxylases : ODC, LDC, ADH**

La mise en évidence de ces activités enzymatiques s'effectue sur un milieu liquide exempt de protéine et de peptones et contenant un indicateur coloré (Bouillon de Moeller). Trois tubes contenant chacun un acide aminé (Argénine, Ornithine ou Lysine) et un tube témoin sans acide aminé sontensemencés par trois à quatre gouttes d'une suspension bactérienne dense préparée dans de l'eau physiologique stérile. Après incubation à 28°C pendant 24h, l'activité enzymatique se traduit par le virage vers l'alcalinité de l'indicateur.

#### **h. Production d'indole**

Le bouillon eau peptonée exempt d'indole estensemencé avec trois à quatre gouttes d'une suspension bactérienne dense. Après incubation à 28°C pendant 24h, quelques gouttes du réactif de Kovacs sont ajoutées au milieu. Après agitation, la présence d'indole se manifeste par l'apparition d'un anneau rouge en surface.

### **IV.4 Test de dégradation de différents hydrocarbures**

Ce test consiste à mettre en évidence la capacité des souches identifiées à utiliser différents hydrocarbures comme source de carbone. Cette approche nous permet de sélectionner les souches les mieux adaptées aux milieux utilisés.

Ce test est réalisé dans le milieu minéral M2 exempt de source de carbone auquel on a ajouté les différents hydrocarbures suivants : Pétrole brut, Hexane, Benzène, Ether de pétrole, Xylène. L'ensemencement est réalisé en spots à raison de 10 µl. Trois répétitions sont prévues pour chaque souche et sur chaque hydrocarbure.

Après incubation, à 28°C pendant 48h l'apparition d'une croissance indique la capacité des souches à dégrader les hydrocarbures utilisés et par conséquent son utilisation comme seule source de carbone.

Au terme de ce test, les souches assimilant plus de substrats carbonés sont retenues pour la suite du travail.

#### IV.5 Résistance aux métaux lourds

Les souches sélectionnées dans le test précédant sont testées pour leur résistance à différents métaux lourds à savoir Zn, Pb et Cd, ainsi différentes concentrations en sels métalliques sont testées. Ceci permet également de déterminer leur Concentration minimale inhibitrice.

**Tableau VI :** Concentration et volume des sels métalliques testés.

Métaux [C] mg/l	Cd		Pb		Zn	
	[C]	V (ml)	[C]	V (ml)	[C]	V (ml)
1	12,5	0,023	400	0,59	100	0,07
2	25	0,046	800	1,18	200	0,14
3	50	0,091	1600	2,36	400	0,28
4	100	0,183	2400	3,54	800	0,56
5	200	0,368	3200	4,72	1600	1,12
6	400	0,731	4000	5,90		
7			4800	7,08		

Les différentes boîtes sontensemencées par spots de 10µl puis incubées à 28°C pendant 48 heures.

La croissance des bactéries signifie leurs résistances au métal et à la concentration correspondante

#### IV.6 Détermination de la cinétique de croissance

Le test vise à déterminer l'évolution de la croissance microbienne en utilisant comme seule source de carbone le pétrole brut. Ainsi, la source de carbone que contient le milieu M2

est remplacée par du pétrole brut à 1%. Le milieu estensemencé à partir d'une préculture de 24 heures sur milieu M2. Les volumes des précultures ajoutées sont calculés de telle sorte à avoir une charge initiale équivalente à environ  $10^6$  cellules/ml.

Pour évaluer la cinétique de croissance, des prélèvements de 1 ml sont effectués à des intervalles de temps de 24 heures. Puis dilué au 1/10 dans de l'eau physiologique stérile. Le nombre de bactéries est ensuite déterminé par comptage sur la cellule de Malassez.

# Chapitre V

## *Résultats*

# Résultats et discussions

## I. Dénombrement de la flore totale

Les résultats du dénombrement sur gélose M2 pour les différents échantillons des bourbiers (liquide et solide) sont présentés dans les tableaux VII et VIII.

On remarque que les deux échantillons contiennent une charge microbienne assez importante. Le nombre de microorganismes présent dans l'échantillon solide après 48h d'incubation ( $1,47 \times 10^6$  UFC/g) est plus important que celui de l'échantillon liquide ( $1,16 \times 10^5$  UFC/g). Après sept jours d'incubation, on constate que le nombre de microorganisme est plus élevé. Ceci est dû à l'apparition de colonies correspondant aux souches à croissance lente.

La présence d'une charge microbienne importante dans l'échantillon de boues liquides présume la présence d'une flore autochtone voir même extrémophile se développant au dépend de la matière organique (essentiellement du pétrole) quelle contiennent.

### I.1 Isolement des microorganismes dégradant le pétrole

En se basant sur l'ensemble des caractères culturaux 9 souches sont isolées et purifiées à partir de l'échantillon solide et 11 à partir de l'échantillon de boue liquide.

### I.2 Caractérisation culturelle et cellulaire

L'ensemble des caractères macroscopiques et microscopiques étudiés sur les 20 souches isolées sont présentés dans le tableau IX :

**Tableau VII:** Dénombrement de la flore totale après 48 heures d'incubation

	SM			$10^{-1}$			$10^{-2}$			$10^{-3}$			$10^{-4}$			N(UFC/ml)	N(UFC/g)
<b>boue Liquide</b>	ND	ND	207	100	142	85	17	27	33	15	5	2	0	0	0	$1,16 \cdot 10^4$	$1,16 \cdot 10^5$
<b>boue Solide</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	81	187	173	4	8	4	1	1	0	$1,47 \cdot 10^5$	$1,47 \cdot 10^6$

ND : non dénombrable (>300 colonies)

N : nombre de cellules

**Tableau VIII :** Dénombrement de la flore totale après 7 jours d'incubation

	SM			$10^{-1}$			$10^{-2}$			$10^{-3}$			$10^{-4}$			N(UFC/ml)	N(UFC/g)
<b>boue Liquide</b>	ND	ND	ND	136	173	145	26	36	41	16	6	5	1	0	0	$1,66 \cdot 10^4$	$1,66 \cdot 10^5$
<b>boue Solide</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	227	116	188	9	21	10	2	2	3	$1,77 \cdot 10^5$	$1,77 \cdot 10^6$

ND : non dénombrable (>300 colonies)

N : nombre de cellules

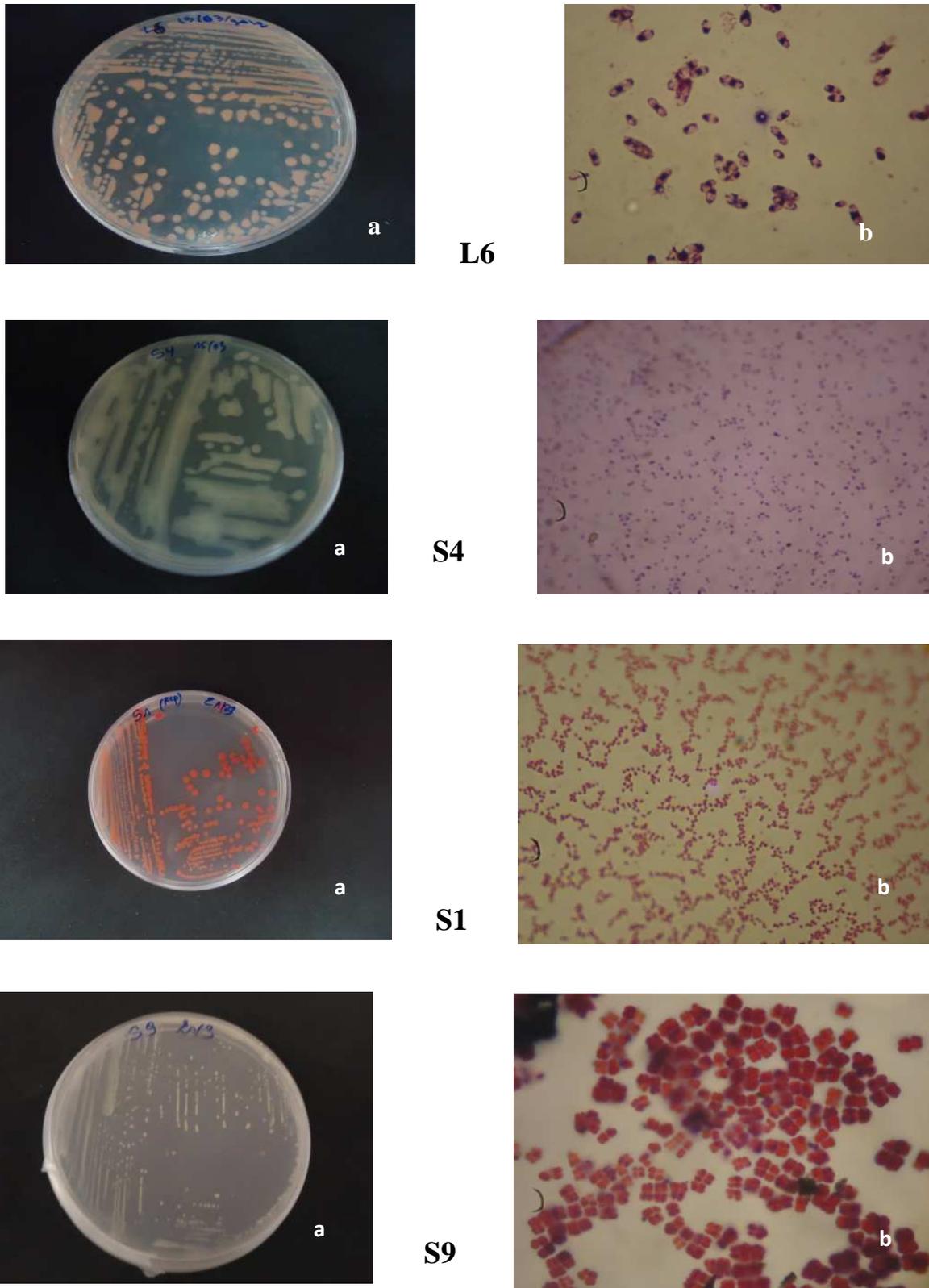
**Tableau IX :** Caractérisation culturelle et cellulaire

Souches	Caractères cultureux						Caractères cellulaires		
	des colonies	Diametre	Couleur	Aspect	Durée d'apparition	Type de croissance	Gram	Formes des cellules	Arrangement
S (1)	Régulier	1 à 2 mm	Rouge	Convexe, lisse	48 heures	Rapide	+	Cocci	En amas
S (2)	irrégulier	2 mm	Crème à centre opaque	Platte, Rugueuse	48 heures	Rapide	+	Bacille	Paire et en chainette
S (3)	Irrégulier	2,5 à 3 mm	Beige, translucide	Platte, lisse	48 heures	Rapide	+	Bacille	Paire et en chainette
S (4)	Irrégulier	3 mm	Beige, translucide	Bombée, lisse	48heures	Rapide	+	Cocci	Isolée
S (5)	Régulier	4 mm	Beige, translucide	Bombée, lisse	48 heures	Rapide	-	Cocci	Isolée et en amas
S (6)	Régulier	1 mm	Beige, translucide	Concave, lisse	48heures	Rapide	+	Bacille	Chainette
S (7)	Irrégulier	< 1 mm	Crème	Rugueuse, bombée	48 heures	Rapide	+	Bacillie	Isolée en paire et en chainette
S (8)	Régulier	7 mm	Crème à blanchatre Pigment vert	Platte, lisse	7 jours	lente	-	Bacille	Isolée
S (9)	Régulier	1 mm	Jaune citron	bombée , lisse	7 jours	Lente	+	Cocci	En tetrad
L (1)	Irrégulier	1 mm	Blanchâtre	Platte, rugueuse, centre opaque	48 heures	Rapide	+	Bacille	Isolée et en chainette

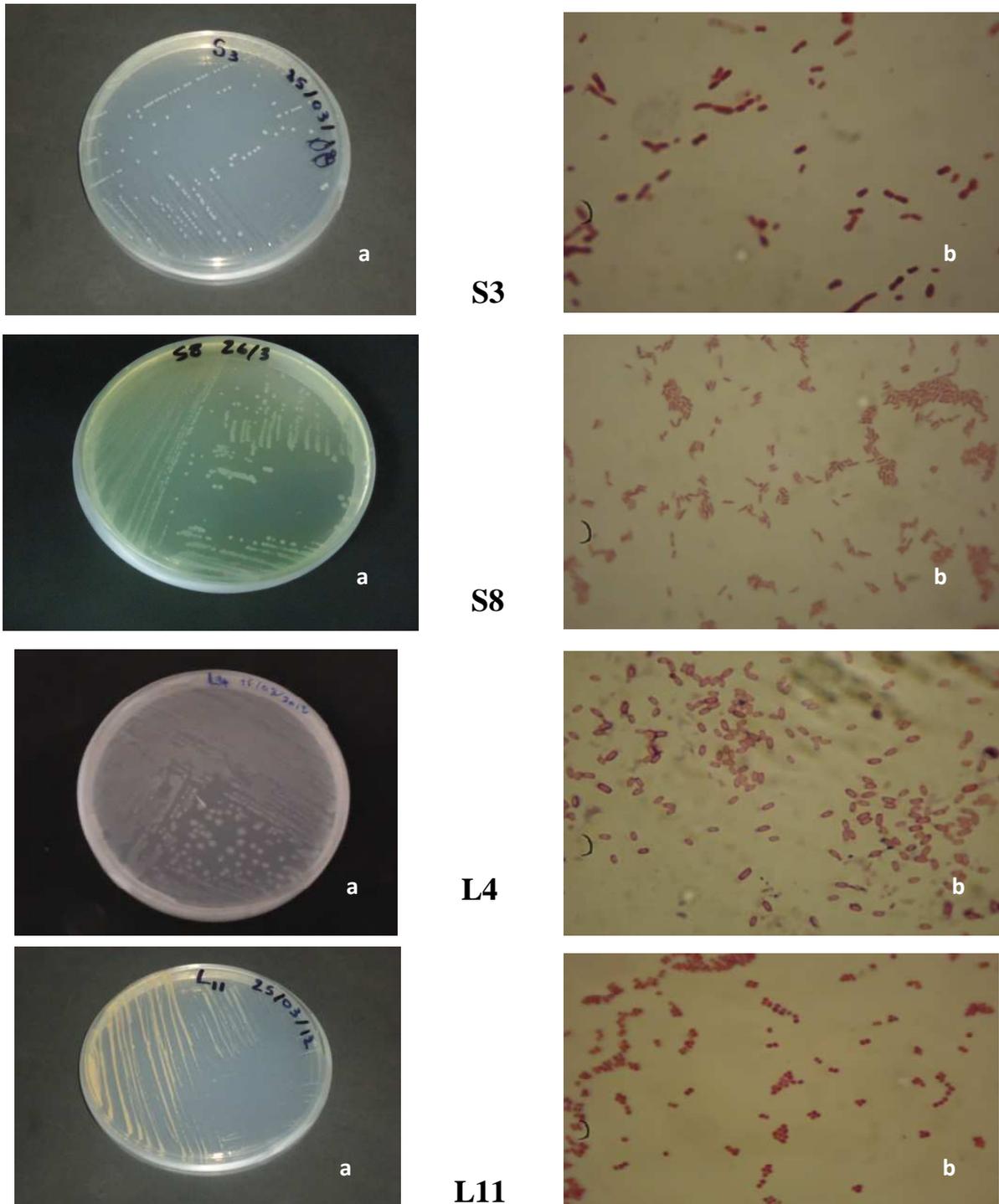
*Résultats et discussions*

L (2)	régulier	1 mm	Beige translucide opaque	Convexe, lisse	48 heures	Rapide	-	Bacille	Isolée
L (3)	Régulier	1 mm	Beige, translucide	Convexe, lisse	48 heures	Rapide	+	Cocci	Isolée
L (4)	Irrégulier	3 mm	Blanchâtre, centre opaque	Platte, rugueuse	48 heures	Rapide	+	Coccobacille	Isolée
L (5)	Régulier	3,5 mm	Beige, translucide	Convexe, lisse	48 heures	Rapide	+	Cocci	Isolée et en amas
L (6)	Régulier	Punctiforme	Rose	Bombée, lisse	48 heures	Rapide	/	Levure	/
L (7)	Régulier	3 mm	Crème	Concave, rugueuse	48 heures	Rapide	+	Bacille	En chaînette
L (8)	Irrégulier	3 mm	Centre blanc+halo Claire	Centre convexe, rugueuse	48 heures	Rapide	+	Coccobacille	Isolée
L (9)	Régulier	3 mm	Jaune, centre opaque	Platte, lisse +centre bombée	7 jours	Lente	+	Cocci	Isolée et en amas
L (10)	Régulier	1 mm	Noir	Bombée, lisse, gluante	7 jours	Lente	/	Levure	/
L (11)	Régulier	3,5 mm	Orange, opaque	Convexe, lisse	12 jours	Lente	+	Cocci	Diplocoque en tétrade ou grappe

D'après les résultats que nous avons obtenus (tableau IX), on constate la présence d'une importante diversité microbienne dans les échantillons de boue (liquide ou sèche) (figure 11)



**Figure 11:** exemple de certains aspects cultureux (a) et cellulaire(microscopique) (b) (Gx100)



**Figure 11:** Exemple de certains aspects cultureux (a) et cellulaires(microscopique) (b) (Gx100) (suite)

### I.3 Caractérisation biochimiques

Les résultats des tests biochimiques sont regroupés dans le tableau X.

Tableau X : Caractères biochimiques des différentes souches

Caractères Souches	Lac	Glu	H <sub>2</sub> S	Gaz	Cit	Ind	Nit	VP	RM	LDC	ADH	ODC	DN <sub>ase</sub>	ONPG	Cat	Espèces
L <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	<i>Bacillus novalis</i>
L <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>Bacillus firmus</i>
L <sub>3</sub>	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	<i>Enterococcus malodoratus</i>
L <sub>4</sub>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	<b>N.I.</b>
L <sub>5</sub>	-	+	-	-	+	-	+	/	+	+	-	+	-	+	+	<b>N.I.</b>
L <sub>6</sub>	-	-	-	-	-	-	-	/	/	-	-	-	-	-	+	<b>(levures)</b>
L <sub>7</sub>	-	-	-	-	-	-	+	-	/	-	-	-	+	-	+	<i>Bacillus firmus</i>
L <sub>8</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	<b>NI</b>
L <sub>9</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	<b>N.I.</b>
L <sub>10</sub>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	<b>(levures)</b>
L <sub>11</sub>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	<b>N.I.</b>
S <sub>1</sub>	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Rhodococcus sp.</i>
S <sub>2</sub>	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	<i>Bacillus vireti</i>
S <sub>3</sub>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>Bacillus badius</i>
S <sub>4</sub>	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	<b>N.I.</b>
S <sub>5</sub>	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>Enterobacter cancerogenius</i>
S <sub>6</sub>	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	<b>N.I.</b>
S <sub>7</sub>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	<i>Bacillus soli</i>
S <sub>8</sub>	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
S <sub>9</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Peidococcus sp.</i>

I.N : Non Identifié

Sur la base des caractères biochimiques obtenus, certaines souches peuvent être identifiées à l'échelle du genre ou de l'espèce.

Les souches L1, L2, L7, S3, S6 et S7 sont affiliées au genre *Bacillus* en se basant sur la morphologie des cellules en forme de bacille à Gram+ et la présence de la catalase. La souche S8 est identifiée comme appartenant au genre *Pseudomonas*. Celle-ci forme des colonies crèmes à blanchâtres à aspect lisse et brillantes avec une pigmentation verte correspondant à pyocyanine. En plus de ces caractères, elle à une forme bacillaire à Gram négatif, catalase, ADH, citrate nitrate positives. Ces caractéristiques nous permettent de conclure qu'il s'agit de *Pseudomonas aeruginosa* (figure 11).

#### I.4 Biodégradation de différents hydrocarbures

Les résultats du test de biodégradation des différents hydrocarbures sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau XI: Dégradation des hydrocarbures

Hydrocarbur Souche	Hexane	Benzène	Pétrole brut	Ethér de pétrole	Xylène
L 1	+	+	-	-	-
L 2	+	+	+	+	+
L 3	-	-	-	-	-
L 4	-	+	+	+	+
L 5	-	+	+	-	-
L 6	+	+	+	+	+
L 7	+	+	+	+	+
L 8	+	+	+	+	+
L 9	+	+	+	+	+
L 10	+	+	+	+	+
L 11	+	+	+	+	+
S 1	+	+	+	+	+
S 2	+	+	+	-	+
S 3	+	+	+	+	+
S 4	+	+	+	+	-
S 5	-	-	-	-	-
S 6	-	-	-	-	-
S 7	-	-	+	+	-
S 8	-	-	+	-	-
S 9	+	+	+	+	+

La moitié des souches isolées montrent une bonne croissance sur l'ensemble des hydrocarbures testés comme substrat carboné. Ceci permet de les retenir comme candidates pour une éventuelle application dans la biodégradation des polluants organiques et par conséquent leur utilisation dans les procédés de bioremediation des sites pollués par les hydrocarbures.

Il y a lieu de signaler également que le nombre de souches provenant des boues liquides ayant une large gamme de dégradation est plus important que celui des souches provenant de l'échantillon de boues solides. Cette différence d'activité serait due au développement de mécanismes d'adaptation aux pressions sélectives générées par la présence de concentrations importantes en hydrocarbures dans l'échantillon de boue liquide.

### I.5 Resistance aux métaux lourds

L'étude de la tolérance des souches retenues aux métaux lourds montrent que dans le cas du plomb (tableau XII), toutes les souches se développent à la concentration de 800µg/ml, tandis que seules les souches S1 et S4 poussent à 1600µg/ml et la souche L6 se développe à 2400µg/ml.

**Tableau XII** : Résistance au plomb

Concentration (µg/ml) Souches	400	800	1600	2400	3200	4000	4800
<b>S1</b>	+	+	+	-	-	-	-
<b>S3</b>	+	+	-	-	-	-	-
<b>S4</b>	+	+	+	-	-	-	-
<b>S8</b>	+	+	-	-	-	-	-
<b>S9</b>	+	+	-	-	-	-	-
<b>L2</b>	+	+	-	-	-	-	-
<b>L6</b>	+	+	+	+	-	-	-
<b>L7</b>	+	+	-	-	-	-	-
<b>L8</b>	+	+	-	-	-	-	-
<b>L11</b>	+	+	-	-	-	-	-

Dans le cas du test de tolérance des souches au cadmium (tableau XIII), on constate que les souches S1 et L6 se développent sur le milieu M2 quelque soit la concentration en

cadmium testé, tandis que la plupart des souches sont inhibées à des concentrations de 25µg/ml.

**Tableau XIII : Résistance au cadmium**

Concentrations (µg/ml) Souches	12,5	25	50	100	200	400
	<b>S1</b>	+	+	+	+	+
<b>S3</b>	+	-	-	-	-	-
<b>S4</b>	+	+	+	-	-	-
<b>S8</b>	+	+	+	-	-	-
<b>S9</b>	-	-	-	-	-	-
<b>L2</b>	+	-	-	-	-	-
<b>L6</b>	+	+	+	+	+	+
<b>L7</b>	+	-	-	-	-	-
<b>L8</b>	+	-	-	-	-	-
<b>L11</b>	-	-	-	-	-	-

En ce qui concerne la tolérance au Zinc (tableau XIV), seules deux souches (S1 et L6) poussent à 400µg/ml. En tenant compte de l'ensemble des métaux lourds, on remarque que la réponse des différentes souches est plus ou moins variable, toute fois, les souches S1 et L6 sont les plus tolérantes.

**Tableau XIV** : Résistance des souches au Zinc

<b>Concentration (µg/ml)</b> <b>Souches</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>400</b>	<b>800</b>	<b>1600</b>
<b>S1</b>	+	+	+	-	-
<b>S3</b>	+	+	-	-	-
<b>S4</b>	+	+	-	-	-
<b>S8</b>	+	+	-	-	-
<b>S9</b>	+	-	-	-	-
<b>L2</b>	+	+	-	-	-
<b>L6</b>	+	+	+	-	-
<b>L7</b>	-	-	-	-	-
<b>L8</b>	+	+	-	-	-
<b>L11</b>	-	-	-	-	-

De façon générale, les effets toxiques des métaux lourds sur les microorganismes du sol dépendent de leur disponibilité biologique. Les microorganismes ont développés plusieurs mécanismes pour immobiliser, mobiliser, ou transformer les effets des métaux lourds (Gremion, 2003).

Selon Gillet et *al.* (1998), l'effet des métaux lourds dépend de la durée de l'exposition, de la dose et du type de métal utilisé.

En regroupant les résultats obtenus dans les trois tableaux précédents, on déduit les concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour chaque souche et chaque métal. Les valeurs des CMI ainsi obtenues sont portées dans le tableau suivant :

**Tableau XV :** Concentrations minimales inhibitrices des différentes souches

Métaux Souches	Plomb	Cadmium	Zinc
S 1	2400	>400	800
S 3	1600	25	400
S 4	2400	100	400
S 8	1600	100	400
S 9	1600	<12,5	200
L 2	1600	25	400
L 6	3200	>400	800
L 7	1600	25	<100
L 8	1600	25	400
L 11	1600	<12,5	<100

Les souches S1, L6 présentent les CMI les plus élevées de plus de >400µg/ml, et 800µg/ml respectivement vis-à-vis du cadmium et du Zn.

Dans le cas du plomb, la souche L6 présente la CMI la plus élevée (3200µg /ml)

### I.6 Cinétique de croissance des différentes souches

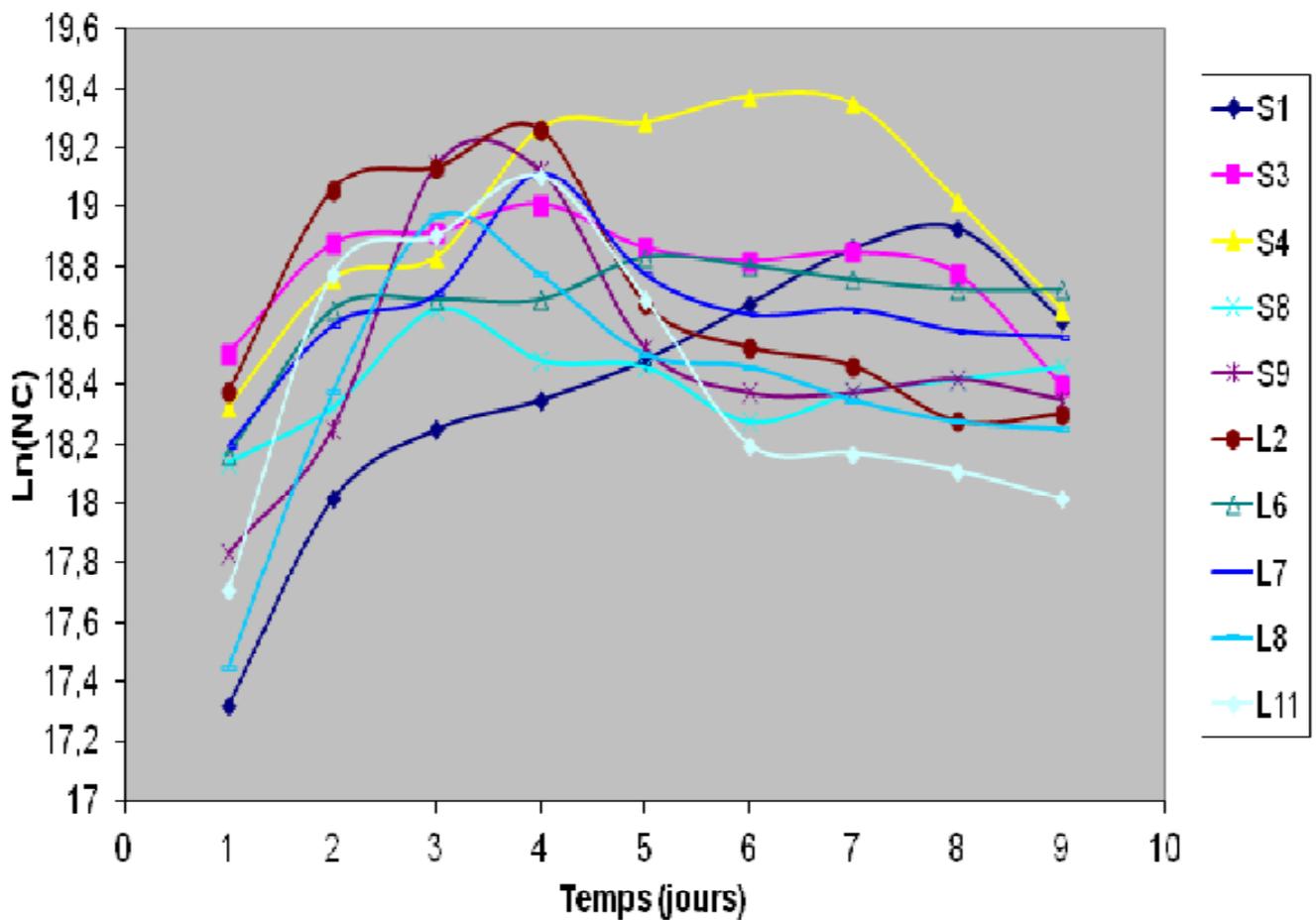
A travers les résultats obtenus, on constate que les souches bactériennes étudiées montrent une phase de latence très courte. Ce résultat démontre une adaptation plus ou moins rapide des souches à la source de carbone utilisée.

Les courbes de croissance de la figure12 montre que la vitesse de croissance et par conséquent celle de la dégradation du pétrole brut est très importante pendant les premières 48 heures. Le nombre de microorganismes est maximal au bout de 3 jours d'incubation dans le cas des souches S8, S9, et L8. Les souches S3, L2, L7 et L11 présentent des vitesses de croissance semblables et atteignent leur maximum au 4<sup>ème</sup> jour. Les souches L6 et S1 ayant un profil de dégradation des différents hydrocarbures important, montrent une croissance importante, qui s'étale sur toute la durée d'incubation, elles atteignent leur maximum de croissance après 5 et 8 jours respectivement.

On constate également que la plupart des souches présentent une bonne croissance sur toute la durée de l'incubation, leur croissance apparait stationnaire. Ceci serait dû à la lenteur dans les processus impliqués dans la biodégradation de cet hydrocarbure. Cette capacité

importante de dégradation serait due à la diversité dans les hydrocarbures qui compose le pétrole brut.

D'après Solano et *al.* (2001), la biodégradation est plus rapide et efficace quant il s'agit d'un mélange. Ceci est probablement dû à une dégradation par cometabolisme.



**Figure 12 :** cinétique de croissance des différentes souches en présence du pétrole brut comme seule source de carbone

# Conclusion

---

## Conclusion

Ce travail avait pour objectif de démontrer la possibilité d'un traitement biologique sur des boues de pétrole en utilisant la flore microbienne autochtone. Pour mener à bien ce travail, nous avons réalisé d'une part la caractérisation et la sélection microbiologique de souches dégradant les hydrocarbures et d'autre part, la cinétique de croissance de ces isolats au pétrole brut ainsi que leur tolérance aux métaux lourds.

Les deux échantillons contiennent une charge microbienne assez importante toutefois le nombre de microorganismes présents dans l'échantillon solide est plus élevé que celui retrouvé dans l'échantillon liquide.

En se basant sur l'ensemble des caractères culturels, 9 souches sont isolées et purifiées à partir de l'échantillon solide et 11 à partir de l'échantillon de boue liquide. L'identification sur la base de l'ensemble des caractères a permis d'affilier les souches L1, L2, L7, S3, S6 et S7 au genre *Bacillus* tandis que, la souche S8 est identifiée comme appartenant au genre *Pseudomonas*.

Le test de biodégradation montre que le nombre de souches provenant des boues liquides ayant une large gamme de dégradation est plus important que celui des souches provenant de l'échantillon de boues solides. Cette différence d'activité serait due au développement de mécanismes d'adaptation aux pressions sélectives générées par la présence de concentrations importantes en hydrocarbures dans l'échantillon de boue liquide.

L'étude du profil de résistance aux métaux lourds montre que la réponse des différentes souches est plus ou moins variable, toutefois, les souches S1 et L6 sont les plus tolérantes, elles présentent les CMI les plus élevées de plus de  $>400\mu\text{g/ml}$ , et  $800\mu\text{g/ml}$  respectivement vis-à-vis du cadmium et du Zinc. Dans le cas du plomb, la souche L6 présente la CMI la plus élevée ( $3200\mu\text{g/ml}$ ).

Le suivi de la cinétique de croissance montre une phase de latence très courte ce qui est dû à l'adaptation plus ou moins rapide des souches à la source de carbone utilisée.

Ces résultats permettent de conclure que les boues de pétrole contiennent une flore autochtone avec un pouvoir important de dégradation du pétrole brut et une tolérance assez élevée vis-à-vis de différentes concentrations en métaux lourds. Ceci laisse envisager la possibilité d'une application dans le cadre de la bioremédiation basée sur la biodégradation microbienne de polluants organiques par des souches autochtones.

En perspective, il serait souhaitable de compléter ce travail par :

- des tests de caractérisation plus diversifiées pour une identification complète des souches isolées ;
- des essais de dégradation de différents hydrocarbures allant des plus simples au plus complexes ;
- des études de cinétique de dégradation des hydrocarbures ;
- la recherche des conditions optimales de croissance et de dégradation ;
- des essais sur différentes concentrations en hydrocarbures et en particulier le pétrole brut.

# Références bibliographiques

# Références bibliographiques

- Abdely C. 2006.** Biorestauration et bioremediation /Phytoremediation. Université de Tunis. 232.32p.
- Abu-Kassim T.A.T. et Simoneit B.R.T. 2001.** Pollutant-solid phase interaction, Mechanisms, chemistry and modeling. Ed, spring. Germany. 234P.
- Akmouci-Toumi S. 2009.** Contribution à l'étude des boues de forages, isolement et evaluation de la capacite de quelques souches microbiennes à dégrader le gasoil. Mémoire de magister. Boumerdes. 159p.
- Al-Hadhrami M.N., Lapin-scott H.M. et Fisher P.J. 1995.** Bacterial and n-alkane degradation within Omani crude oil and a mousse. *Marine pollution bulletin*, 30.06. pp. 403-408.
- Alvarez H.M., 2003.** Relationship between  $\beta$ -oxidation pathway and the hydrocarbon-degrading profile in Actinomycetes bacteria. *International Biodeterioration and biodegradation* 52. pp.35-42.
- Atlas R.M ., 1981.** Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbial. Rev.* 45. pp. 180- 209.
- Ballerini D. et Vandecasteele J.P. 1999.** La restauration par voie biologiques des sols contaminés par les polluants organiques en biotechnologie. Tec & Doc. France. pp.835-865.
- Ballerini D., Gatellier C. et Vogel T. 1998.** Techniques de traitement par voie biologique. Ademe Editions. Angers. 247p.
- Begbeg A. 2008.** Importance des considérations environnementale dans l'étude des performances des additifs utilisés dans les fluides de forage. Univ de Boumerdes. 50p.
- Belabas F. 1999.** Biodégradation des hydrocarbures pétroliers. Mémoire de DES de chimie industriel, université de Bejaia.65p.
- Bellier M. et Massart Y. 1979.** L'impact environnemental et l'évaluation des risques écologiques et sanitaires. pp.172-173.
- Berekaa M.M. and Steinbüchel A. 2000.** Microbial degradation of the multiply branched alkane 2, 6, 10, 15, 19, 23-hexamethyltetracosane (squalane) by *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium ratisbonense*. *Applied and Environmental Microbiology* 66, pp.4462-4467.
- Berne F. 1991.** Traitement des eaux. Ed, Masson. Paris. pp.14-20
- Bertrand J.C. et Mille G. 1989.** Devenir de la matière organique exogène. Un modèle: les hydrocarbures, Microorganismes dans les écosystèmes océaniques. Ed. Masson, Paris, pp. 343-385.
- Boopathy, R. 2000.** Bioremediation of explosives contaminated soils. *Int Biodeter Biodeg.* 46 Pp. 29-36.

**Bouchez M., Blanchet D., Haeseler F. et Vandecasteele J.P., 1996.** Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement – Propriétés, origines, devenir. Revue de l'Institut Français du Pétrole. **51**. 3.

**Boudjema A., Guettaia S., Bouanania A. et Baba Hamed K. 2009.** Elaboration de la carte de vulnérabilité par méthode drastic : cas de la nappe du moi-pliocene a Hassi-messaoud, nord-est Algérien. 8. Ed. Communication science&technologie. 6p.

**Cadiere F. 2006.** Traitement biologique des sols pollués, recherche et innovation. Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie.Ed, ADEME par l'ADIT - Société Nationale d'Intelligence Stratégique. Angers. pp.16-17.

**Champagnat A. et Adrian J. 1974.** Pétrole et protéine. Ed, Dion. pp. 32-35.

**Chaplin B.P., Delin G.N., Baker R.J. and Lahvis M.A. 2002.** Long-term evolution of biodegradation and volatilization Rates in crude oil contaminated aquifer. *Bioremediation Journal*.**6**. 3. pp. 237-255.

**Chelouah F. et Ghanem Y. 1998.** Isolement et sélection de souches bactériennes métabolisant le pétrole brut. Mémoire d'ingénieur, université de Bejaia.

**Chitour. 1983.,** Raffinage de pétrole brut. Ed, Office des publications universitaires, Pp.34-39.

**Colin F. 2000.,** La pollution des sols et sous sols par les hydrocarbures et les solvants chlorés.

**Crady C.P.L. 1985.** Biodégradation: its measurement and microbiological basis. *Biotechno. Bioeng.* 27. pp. 660-674.

**Das N. et Chandran P. 2010.** Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants. *Rev. Bio. tech res. Int.* article ID 941810. India. 31p.

**Dutta T.K. and Harayama S. 2001.** Biodegradation of n-alkylcycloalkanes and n-alkylbenzenes via new pathway in *Alcanivorax* sp. Strain MBIC 4326. *Applied and Environmental Microbiology* 64, pp.1970-1974.

**Fall R.R., Brown J.L. and Schaeffer T.L. 1979.** Enzyme recruitment allows the biodegradation of recalcitrant branched hydrocarbons by *Pseudomonas Citronellolis*. *Applied and Environmental Microbiology* 38, pp.715-722.

**Finnerty W.R. 1988.** Assay methods for long-chain alkane oxidation in *Acinetobacter*. *Methods in Enzymology* 188. tome a. pp. 10-14.

**Finnerty W.R. 1990.** Primary alcohols dehydrogenase from *Acinetobacter*. *Methods in Enzymology*. 188, tome b. pp. 14-18.

**Fismes J., Schwartz C., Bispo A., Caussanel J.P., Empereur-Bissonnet P., Hulot C., Jagu C., Jourdain M.J., Marot F., Morel J.L., Perrin-Ganier C. 2002.** Contamination des végétaux exposés à des sites pollués par des substances organique,.325p.

**Geoffrey M., et Perchet T. 2008.** Etude de bioremediation de sediments contaminés par des composés organiques nitres persistant. Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de toulouse. 2595. pp. 27-33.

**Goyer S., Jaouich A., Morency M. and Couillard D. 1995.** Site remediation technologies for contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (pah's). *Vecteur environnement*. **28**, 1, pp. 43-51.

**Grosser R.J., Warshwsky D. et Vestal J.R. 1995.** Mineralization of polycyclic and N-heterocyclic aromatic compounds in hydrocarbon-contaminated soils. *Environmental toxicology and chemistry*.14,n°03, Pp.3756-382.

**Jemal F. 2002.** Bioremédiation. *Revue H.T.E*, 122. pp.45

**Khaznadj M. et Houara A. 2000.** Biodégradation des sols contaminés par les hydrocarbures. Rapport de 4<sup>ème</sup> journée scientifique et technique. Alger du 16 au 19 avril 2000, cession C 11. 848.

**Khodja M. 2008.** Les fluides de forage : étude des performances et considérations environnementale. Thèse de docteur de l'institut national polytechnique de Toulouse. 288p.

**Klug M.J. and Markovetz A.J. 1971.** Utilization of aliphatic hydrocarbons by Microorganisms. *Advances in Microbiology Physiology* 5, pp. 1-43.

**Kulkarni S. V., Palande A. S, and Deshpande M. V. 2007.** Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons in Soils. 195p.

**Labrecque M.E. 2003.** Etude de la capacité de deux souches de levures de dégrader le xylène. Thèse de magistère. Université Laval de France. 90 p.

**Lacaze J. 1980.** La pollution en milieu marin. pp.1-18.

**Lallemand G. 1974.** Information sur le pétrole. Ed, Technique. Paris. 229p.

**Lammote M. et Bourliere F., 1983.** Problèmes de l'écologie, vol 4 .Ed, Masson, pp. 215.

**Lefebvre G. 1978.** Chimie des hydrocarbures. Ed, technique. Paris. pp. 9-60.

**Lefebvre G. 1978.** Notion de chimie du pétrole. Ed, technique. France.123 p.

**Lefebvre G. 1986.** Notion de chimie du pétrole, Ed, technique. Paris. pp. 41.

**Legrand, C., Solerieu, M., Goglio, E. 2006.** Traitement des sites et des sols pollués. Territorial Editions. Voiron. 85p.

**Leahy J.G. et Collwell R.R. 1990.** Microbial degradation of hydrocarbon in the environnement. *Microbial. Rev* 54, pp 305-315.

**Mac Donald., 2001.** Les marées noires naturelles. *Pour la science*. 280. pp.62-66.

**Marot F., Morel J.L., Perrin-Ganier C. 2002** Contamination des végétaux exposés à des sites pollués par des substances organiques. Communication présentée à la Première rencontre nationale de la recherche sur les sites et sols pollués, bilan et perspectives, 12-13 décembre 2002, Paris. Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie, Angers. pp. 234-236.

**MATE. 1996.** Définition du Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement.

**Merzouk H. 2001.** Isolement et sélection des souches bactériennes dégradant les hydrocarbures pétroliers (cas de fraction saturés). Thèse de magister université de Bejaia. p. 485.

**Michel M. 2003.** Les pollutions marines accidentelles. Au-delà du pétrole brut, les produits chimiques et autres déversement en mer. Revue annales des Mines, Responsabilité & Environnement, Ed. Ifremer, Centre de Nantes, Département « Biogéochimie et Ecotoxicologie ». pp.70-92.

**Miller R. 1996.** Phytoremediation. Technology Overview Report, GWRTAC Series. 345p.

**Morgan P. et Watkinson R.J. 1989.** Hydrocarbon degradation in soils and methods for biotreatment. *Biotechnologie*. **8**. pp.305-335.

**Nowak M., 2000.** Le pétrole. Ed, La Recherche 330. pp. 68-71.

**Pelmont J. 1995.** Bactéries et environnement. Ed: Office des publications universitaire. **2**. pp.733-756.

**Pilon-smits E. 2005.** Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*. **56**. pp 15-39.

**Proskouriakov V., et Drabkine A. 1981.** La chimie du pétrole et du gaz. Ed, Mir Moscou. Moscou. 416 p.

**Rontani J.F. and Giusti G. 1986.** Study of the biodegradation of poly-branched alkanes by a marine bacterial community. *Marine Chemistry* **20**. pp.197-205.

**Rosenberg E., 1993.** Exploiting microbial growth on hydrocarbons- new markets .**11**. pp.423.

**Schneider J. , Grosser R. et Javasimhulu K. 1996.** Degradation of pyrene ,ben[a]anthracene, and benzo[a]pyrene by mycobacterium sp. Strain RJG 11-135, isolated from a former coal gasification site. *Applied and environmental microbiology*. **62**. **01**. pp.13-19.

**Sirvins A. et Trampler B. 1985.** La biodégradation des hydrocarbures. *Recherche*. **16**. 171, pp.1345-1352.

**Smets H. 1983.** Les marées noires diminuent. *Recherche*. **14**. 149. pp.144-145.

**Soltani M. 2004.** Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse de Doctorat de l'université de Paris 6. pp.16-19.

**Solano-Serena F., Marchal R. et Vandecasteele J. P. 2001.** Biodégradabilité de l'essence dans l'environnement: de l'évaluation globale au cas des hydrocarbures récalcitrants, Ed, Oil & Gas Science and Technology . *IFP*. **56** .**5**. pp. 479-498.

**Susarla S., Media V.F., Mc Cutcheon S.C. 2002.** Phytoremediation : an ecological solution to organic chemical contamination. *Ecol. Eng.* **18**. pp. 647-658.

**Takada S., Nakamura M. et Matsueda T. 1996.** Degradation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans by the white rot fungus *Phanerochaete sordid* YK-624. *Applied and environmental microbiology*. **62**. **12**. pp.4323-4328.

**Tedjani K. 2011.** Le portail de la Nature et de l'écologie en Algérie. *Revue de web écologique "Nouara"*.

**Tranchmontagne J. 1999.** Essais de biodégradation sur des sols contaminés par les hydrocarbures, rapport présenté comme exigence de la maîtrise en science de l'environnement. Rap 12 71. pp. 26-31.

**Venosa A.D et Zhu X. 2003.** Biodégradation of Crude Oil Contaminating Marine Shoreline and Freshwater Wetlands. *Spil.Sci.Technol .Bul 8: pp.163-178.*

**Van Hamme J.D. , Sing A. et Ward O.P. 2003,** Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol.Mol.Bio.Rev.67:Pp.503-549.*

**Vila, M. 2006.** Utilisation de plantes agronomiques et lacustres dans la dépollution des sols contaminés par le RDX et le TNT : approches en laboratoire. Toulouse. 204 p.

**Weidong D. Yunyang W. Ninaging Z. Jiajia F. Zhihuan Z. Lyun C and Jiming H. 2011.** Status quo of petroleum contamination and evolution of bioremediation. Berlin. 31p.

**Zenati K. 2009.** Etude de la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds de souches

d'entérobactéries isolées de l'environnement hospitalier. Thèse magistère .université de Bejaïa. Algérie .93p.

**Zhongqi H.E. et Spain J.C. 1997.** Studies of the catabolic pathway of degradation of nitrobenzene by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* J 445 : Removal of the Amino group from 2-Aminomuconic semialdehyde. *Applied and environmental microbiology.* **63.** pp.4839-4843.

# Annexes

## Annexe n° 01 : Composition des milieux

### ✓ Milieu de culture M<sub>2</sub>

Acétate de sodium.....	5g
Tryptone.....	0,5g
Extrait de levure.....	0,5g
Glucose.....	0,5g
Saccharose.....	0,5g
Sodium de citrate.....	0, 05g
Acide malique.....	.0,05g
KNO <sub>3</sub> .....	1g
NH <sub>4</sub> CL.....	0,2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0, 5
Gélose.....	15g
pH.....	7, 6

### ✓ Milieu de culture minéral MM<sub>2</sub>

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,8g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,2g
CaSO <sub>4</sub> .....	0,05g
MgSO <sub>4</sub> .....	0,5g
FeSO <sub>4</sub> .....	0,09g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	1g
Agar.....	15g
pH.....	7,4

✓ **Milieu de culture citrate de Simmons**

Sulfate de magnésium.....	0,2g/l
Phosphate mono-ammonique.....	1g/l
Phosphate bipotassique.....	1g/l
Citrate de sodium.....	2g/l
Chlorure de sodium.....	5g/l
Bleu de bromothymol.....	0,08g/l
Agar.....	15g/l
pH.....	6,6

✓ **Milieu de culture Clark et Lubs**

Peptone tryptique ou polypeptone.....	5 à 7 g/l
Glucose.....	5g/l
Phosphate bipotassique.....	5g/l

✓ **Milieu de culture d'urée indole**

Tryptophane.....	0,3g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	0,1g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ .....	0,1g
$\text{NaCl}$ .....	0,5g
Urée.....	2g
Alcool a 95°.....	1ml
Rouge de phénol à 1%.....	0,25m
Eau distillée.....	100ml
pH.....	7,2

## Résumé

Dans ce travail, nous nous sommes proposé lieu de caractériser la flore microbienne présente dans les boues de pétrole provenant d'un bourbier au sein du terminal Marin Nord de SONATRACH (wilaya de Béjaia) et d'évaluer la capacité de cette microflore à dégrader le pétrole brut. 20 souches ont été isolées à partir de deux échantillons de boues. La caractérisation microbiologique a permis de distinguer entre autres des espèces appartenant aux genres *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Pediococcus* et *Rhodococcus*. La plupart de ces souches présentent une capacité d'utilisation de différents hydrocarbures comme seule source de carbone et présentent une tolérance plus au moins variable aux métaux lourds.

**Mots clés :** pétrole, biodégradation, bioremédiation, bourbier.

## Abstract

In this work, we proposed place to characterize the microbial flora present in oil muds coming from a mud pit within Marin the Northern terminal of SONATRACH (wilaya of Béjaia) and to evaluate the capacity of this microflora to degrade crude oil. 20 strains were isolated starting from two samples from muds. The microbiological characterization made it possible to distinguish inter alia species belonging to the kinds *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Pediococcus* and *Rhodococcus*. The majority of these stocks have a capacity of use of various hydrocarbons like only source of carbon and present a tolerance at least variable to heavy metals.

**Key words:** oil, biodegradation, bioremediation, mud pit