

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر وتهيئة الساحل

Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'état en

Sciences de la Mer

Option: Biotechnologie marine

Thème

**ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES BACTERIES
DEGRADANT LES DIFFERENTES FRACTIONS DU
PETROLE (Cas d'étude : port de la Madrague, Ain Benian)**

Présenté par :

OUAZANE Fatma

Soutenu le 27/09/2022 devant le jury composé de :

M ^{me} MAOUEL Djamila	Maitre de Conférence B	ENSSMAL	Présidente
M. KADA Mohamed	Maitre-Assistant A	ENSSMAL	Examineur
M ^{me} CHAOU Nadia	Maitre-assistante A	ENSSMAL	Examinatrice
M ^{me} DJAHNIT Nora	Maitre de Conférence B	ENSSMAL	Promotrice

Promotion: 2022

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر وتهيئة الساحل

Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domain : Science de la nature et de la vie.

Filière : Hydrobiologie Marine et Continentale.

Spécialité : Biotechnologie marine.

Thème

**ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES BACTERIES
DEGRADANT LES DIFFERENTES FRACTIONS DU
PETROLE (Cas d'étude : port de la Madrague, Ain Benian)**

Présenté par :

OUAZANE Fatma

Soutenu le 27/09/2022 devant le jury composé de :

M ^{me} MAOUEL Djamila	Maitre de Conférence B	ENSSMAL	Présidente
M. KADA Mohamed	Maitre-Assistant A	ENSSMAL	Examinateur
M ^{me} CHAOU Nadia	Maitre-Assistante A	ENSSMAL	Examinatrice
M ^{me} DJAHNIT Nora	Maitre de Conférence B	ENSSMAL	Promotrice

Promotion: 2022

REMERCIEMENTS

A l'issue de la rédaction de ce mémoire, je suis convaincue que le travail de mémoire de fin d'études est loin d'être un travail solitaire. C'est avec très grand plaisir que je souhaite remercier tous ceux qui m'ont aidé ou soutenu pendant la préparation de mon mémoire.

Tout d'abord, je voudrais exprimer mes remerciements les plus profonds et sincères à ma promotrice, madame DJAHNIT Nora, d'avoir accepté la direction de ce travail, d'avoir cru en mes capacités. Puisse-t-elle trouver mes sincères remerciements pour son soutien attentif et bienveillant.

Je tiens aussi à remercier énormément la présidente de jury madame MAOUEL Djamila et tous les membres du jury, je vous remercie vivement de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger mon travail.

Je remercie aussi l'ensemble des enseignants ainsi que tous les employés de l'ENSSMAL qui de près ou de loin m'ont apporté leur précieuse aide et leur soutien moral. Je remercie profondément, tout le corps technique du laboratoire de l'école, en particulier monsieur MAATOUK Youcef et madame Houda pour leur aide précieuse, leur gentillesse, leur bonne humeur, leur patience et ceci malgré mon tempérament parfois fatigant.

Dédicaces

À mes très chers parents

Merci de m'avoir guidé et orienté, pour l'amour et le dévouement par les quels vous m'entourez. La réalisation de ce travail n'aurait pas été possible sans votre soutien moral et affectif, Merci de me comprendre même dans les moments les plus difficiles.

À mon cher papa BEN ALI

Nulle dédicace ,aucun mot ,ne saurait exprimer réellement mon profond amour et mon respect, ma reconnaissance pour tous les sacrifices que tu as prodigué pour ma formation, ma réussite ,rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être, votre chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort, Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation, je souhaite que vous trouviez en moi source de fierté.

À celle qui m'est la plus chère au monde MAMAN NAIMA

Qui a su partager chaque moment de mon existence avec son intarissable tendresse, à celle à qui je dois le meilleur de moi-même. C'est à toi MAMAN, que je dédie aujourd'hui le fruit de ton dévouement, en espérant être à la hauteur de tes sacrifices. Chère maman NAIMA Tu es l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

À mes chères et uniques sœurs

Je dédie ce travail qui n'aurait pas pu être réalisé sans le soutien de mes très chères sœurs NESRIN, SABIRA, SABRINA, CHAMSE, WIAME, SERINE.

À tous mes amis et ma famille

Je tiens particulièrement à exprimer fortement ma gratitude et mes sincères sentiments respectueux à mon cher ami YULE SUN qui m'a encouragé, Une amitié qui n'a cessé de grandir au fil du temps. Je lui souhaite une vie pleine de bonheur, gloire et de victoire et succès.

Je remercie également les membres de ma famille d'avoir consacré leur temps et leur personne pour mon bien être et les personnes que j'ai rencontrées par le biais de ce mémoire, merci pour votre support et vos encouragements.

Je tiens à remercier infiniment tous mes collègues et amis particulièrement SALHI WARDIA, MILISA, IKRAM, AIMEN pour leur agréable compagnie, et aussi de m'avoir aidé chacun à sa manière.

Je tiens enfin à remercier, sans exception, tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont aidé et soutenu afin d'accomplir ce présent travail. J'en oublie certainement encore et je m'en excuse.

Supporté par vous tous, j'ai pu achever ce présent travail.

Table des matières

Introduction générale	12
CHAPITRE I: Etude bibliographique	15
Partie I. Le pétrole brut.....	15
I.1 Définitions, Origine et formation du pétrole.....	15
I.2 Classification du pétrole	15
I.3 Les propriétés physiques du pétrole.....	16
I.3.1 Densité	16
I.3.2 Viscosité.....	17
I.3.3 La solubilité	17
I.4 Les constituants du pétrole.....	17
I.5 Importance du pétrole	18
I.6 Exploitation pétrolifère	18
I.6. 1 Exploitation pétrolifère dans le monde	18
I.6. 2 Exploitation pétrolifère en Algérie	19
Partie II: Les hydrocarbures, et procédés de remédiation	20
II.1 Origine des hydrocarbures dans le milieu marin	20
II.1.1 Origines naturelles.....	20
II.1.2 Origines anthropiques.....	21
II.2 Classification	22
II.2.1 Hydrocarbures aliphatiques	22
II.2.2 Hydrocarbures aromatiques	23
II.2.2.1 Hydrocarbures monoaromatiques.....	23
II.2.2.2 Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	24
II.2.2.3 Composés polaires.....	24
II.3 La pollution pétrolière	25
II.3.1 Impacts des déversements d'hydrocarbures sur la vie marine.....	26
II.3. 2 Pollution par les d'hydrocarbures en mer Méditerranée et en Algérie	26
II.4 Procédés de remédiation.....	26
II.4.1 Gestion de lutte contre les déversements des hydrocarbures.....	26
II.4.2 Réhabilitation biologique des sites pollués par hydrocarbures.....	27
II.4.2.1 La phytobioremédiation.....	27
II.4.2.2 La bioremédiation microbienne.....	27
Partie III: Les bactéries hydrocarbonoclastes et mécanismes d'action	29
III.1 Les bactéries marines dégradant les hydrocarbures pétroliers	29
III.2 Réponse des bactéries hydrocarbonoclastes à la pollution pétrolière	29

III.3 Biodégradation microbologique des polluants hydrocarbonés	30
III.4 Facteurs influençant la biodégradation en mer.....	31
III.4.1 Effet du pH.....	31
III.4.2 Effet de la température	31
III.4.3 Effet de l'oxygène	32
III.4.4 Effet de la salinité.....	32
III.4.5 La composition du pétrole.....	33
III.5 Les Biosurfactants	33
III.5.1 Définition	33
III.5.2 Classification.....	34
III.5.3. Production de biosurfactants	34
III.5.4 Applications des biosurfactants.....	34
CHAPITRE II: Matériel et méthodes.....	37
II.1 Présentation de la zone d'étude	37
II.1.1 Situation géographique Baie d'El Djamila.....	37
II.1.2 Situation géographique de port d'El Djamila.....	38
II.2 Echantillonnage	38
II.3 Mesure in situ des paramètres physico-chimiques	39
II.3.1 Potentiel Hydrogène « pH »	39
II.3.2 Salinité et température	40
II.3.3 La matière en suspension (MES).....	40
II.3.4 la teneur en oxygène dissous	40
II.4 Culture et Isolement des bactéries marines hydrocarbonoclastes.....	41
II.5 Caractérisations biochimiques des bactéries isolées.....	45
II.5.1 Coloration de Gram	45
II.5.2 Test oxydase	45
II.5.3 Test catalase.....	46
II.6 Test des productions de Biosurfactants	47
II.6.1 Indice d'émulsifications E24	47
II.6.2 Drop collapse test	48
II.6.3 Test de déplacement	48
II.7 Test de l'halotolérance.....	48
II.8 La croissance des bactéries sur différentes sources de carbone.....	49
II.9 La croissance bactérienne sur différentes mesures des paramètres du pH et de la température	49

Chapitre III : Résultats et Discussion	51
III.1 Paramètres physico-chimiques des échantillons	51
III.2 Caractérisation morphologiques des bactéries isolées	52
III.3 Caractérisation biochimique des souches bactériennes isolées	54
III.3.1 Coloration de Gram.....	54
III.3.2 Test de l'oxydase.....	55
III.3.3 Test de la catalase.....	56
III.4 Teste de production de Biosurfactants	58
III.4.1 Indice d'émulsifications E24.....	58
III.4.3 Teste de déplacement	60
III.5 Test de l'halotolérance	62
III.6 La croissance des bactéries sur différentes sources de carbone	64
III.7 La croissance bactérienne sur différentes mesures de pH	66
III.8 La croissance bactérienne sur différentes de température	67
Conclusion et perspective	70
Références bibliographiques	73

Liste des figures

Figure 1. Composition d'un pétrole brut léger (a) et d'un pétrole brut lourd (b) de la mer du Nord (Head et al., 2006).	16
Figure 2. Evolution de la consommation mondiale de pétrole de l'année 2020 (l'AIE, 2020). 18	
Figure 3. Production primaire du pétrole (Rapport annuel SONATRACH, 2019).	19
Figure 4. Structure moléculaire de base des principaux hydrocarbures pétroliers (Colombano et collab., 2008).	25
Figure 5. Représentation schématique d'une micelle de biosurfactant (Gabet, 2004).	33
Figure 6. Position géographique de la baie d'El Djamila (Google Earth Pro, 2021).	37
Figure 7. Situation géographique et localisation du port la Madrague (Google Earth, 2021). 38	
Figure 8. Stations de prélèvement du port d'El Djamila.	39
Figure 9. Représentation des étapes de la prération du mileu ONR7a Agar	43
Figure 10. Ajout de pétrole pour l'enrichissement bactérien	43
Figure 11. les etapes de la culture bactérienne.	44
Figure 12. Etapes du test d'oxydas (Singleton, 1999).	46
Figure 13. Lecture des résultats du test d'oxydase (Singleton, 1999).	46
Figure 14. Lecture du résultat du test de la catalase (Guiraud, 1998).	47
Figure 15. Schéma du test d'effondrement de la goutte (Djahnit, et al., 2019).	48
Figure 16. quelques aspects macroscopiques des souches étudiées.	54
Figure 17. Aspect d'un résultat du test d'oxydase.	56
Figure 18. Formation de bulles lors d'un test catalase positif.	57
Figure 19. Histogramme représentant l'indice d'émulsification E24.	59
Figure 20. Photos représentant les résultats du drop collapse test sur microplaque.	60
Figure 21. Histogramme montrant la croissance bactérienne en fonction de la concentration en NaCl.	63
Figure 22. Histogramme représentant la croissance de chaque bactérie en fonction des différentes sources de carbone.	65
Figure 23. Histogramme représentant la croissance bactérienne selon différentes mesures de pH.	67
Figure 24. Histogramme représentant la croissance bactérienne selon différentes mesures de température.	68

Liste des tableaux

Tableau 1. Composition élémentaire des hydrocarbures pétroliers (Speight, 2014).....	17
Tableau 2. Avantages et limites de la technique de biodégradation (Philp et Atlas, 2005).	29
Tableau 3. Application des biosurfactants dans différents domaines (Banat et al., 2000; Santos et al., 2016).	35
Tableau 4. Principaux paramètres physico-chimiques des échantillons.....	51
Tableau 5. Signification des codes de chaque souche bactérienne	52
Tableau 6. Caractères macroscopiques des souches sur milieu ONR7a solide.....	53
Tableau 7. Résultats de la coloration de Gram.	55
Tableau 8. Résultats du test oxydase.	55
Tableau 9. Résultats du test catalase.	57
Tableau 10. Pourcentage d'émulsifications E24.	58
Tableau 11. Résultat du Drop Collapse Test.	60
Tableau 12. Résultat du test de déplacement.....	61
Tableau 13. Les résultats des méthodes de détection et quantification des biosurfactants.	62
Tableau 14. La croissance bactérienne en fonction de la concentration en NaCl.	62
Tableau 15. Croissance bactérienne selon le type d'hydrocarbure.	64
Tableau 16. Résultats montrent la croissance bactérienne selon la mesure de pH.....	66
Tableau 17. Résultats de la croissance bactérienne selon la mesure de température.	67

Liste des abréviations

API: American Petroleum Institute.

AIE : Agence internationale de l'énergie.

DO: oxygène dissous.

FMI : Fond Monétaire International.

GPL: Groupements polaires.

HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques.

JORA: Journal officiel de la République Algérienne.

MES: Matière en suspension.

Oxi: Oxymètre.

PDG: Président-directeur général.

REMPEC: Regional Marine Pollution Emergency Response Centre for the Mediterranean Sea.

USEPA: United States Environmental Protection Agency.

USD: Dollar américain ou dollar US.

UV: Ultraviolet.

WTW: Wissenschaftlich Technische Werkstätten.

Unités de mesure

L, ml, µl : Litre, millilitre, microlitre.

Cst : Centistokes, Unité de mesure de la viscosité cinématique.

Mb: million de baril.

Pas : Pascal.

°C : degré Celsius.

b/j : barils par jour.

g/cm³: gramme par centimètre cube.

µg/l: microgramme par litre.

m/Pas : mètre par pascalle.

Mb: million de baril.

USD: Dollar américain ou dollar US.

Mds: millions de dollars.

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Depuis plusieurs décennies, les activités humaines engendrent une production de plus en plus importante de substances polluantes, potentiellement toxiques, pouvant être déversées accidentellement ou non dans l'environnement. Ainsi, les risques pour la santé publique et le bon fonctionnement des écosystèmes sont de plus en plus importants et préoccupants.

Le pétrole est devenu, à partir des années 50, la première source d'énergie dans le monde. Il satisfait plus de 30 % des besoins énergétiques. L'Algérie exporte 540 000 barils/jour sur une production totale d'environ 1,35 million de barils par jour en moyenne. Une légère augmentation par rapport à l'année précédente. Un pic à 2 millions de barils par jour a été enregistré en 2007. Elle figure parmi les plus grands producteurs de pétrole d'Afrique. Septembre 2020, deux oléoducs d'El Oued en Algérie, séparés de 500 mètres, reliant respectivement Hassi Messaoud à Skikda et à Béjaïa, ont déclenché un spectaculaire incendie, puis un déversement de pétrole, notamment dans l'oued Ittel. Sonatrach, le groupe pétrolier et gazier gestionnaire des oléoducs, a expliqué dans un communiqué que les deux fuites sont dues aux «mauvaises conditions météorologiques».

La pollution pétrolière est une conséquence directe et inévitable de l'exploitation massive du pétrole. Tant que le pétrole sera exploité, l'ensemble des écosystèmes seront fortement menacés par la pollution. Sous l'influence de l'exploitation pétrolière accrue et le manque de vigilance face à la toxicité du produit, de nombreux navires pétroliers ont échoué en mer (Amoco Cadiz, Exxon Valdez, Erika, Prestige...) déversant d'importantes quantités de pétrole **(Mascarelli, 2010)**.

Chaque année, plus de 400 000 tonnes de pétrole sont délibérément déversées dans l'océan du fait des déballastages et dégazages. La mer méditerranée est particulièrement vulnérable à cette pollution, ses conséquences sur la faune et la flore sont à la fois physique (étouffement des habitats, engluement) et toxique (contamination des organismes par processus chimique) **(Fingas et Fieldhouse, 2012)**.

Les hydrocarbures sont une cause de mortalité et de morbidité pour les organismes vivants. Il est donc nécessaire de lutter contre ce problème. Afin de préserver et de restaurer l'environnement et d'éliminer ces polluants, il est donc nécessaire de développer des méthodes fiables et efficaces de dépollution. Les méthodes physiques et chimiques sont appliqués afin d'immobiliser les hydrocarbures et de les détruire pour réduire leurs impacts sur la santé et sur l'environnement. La plupart de ces techniques sont coûteuses et non respectueuses de l'environnement **(Azubuike et al., 2016)**. Toutefois, une approche

biologique par bioremédiation peut être envisagée. Elle utilise le pouvoir épurateur des microorganismes de l'environnement, et présente l'avantage d'être peu invasive et moins onéreuse. Les recherches actuelles s'orientent vers l'élimination des hydrocarbures, incluant les HAPs, par des bioprocédés dont l'intérêt de ces nouvelles techniques réside surtout dans l'aspect non polluant et l'absence de sous-produits chimiques.

La biodégradation par les microorganismes est considérée comme le mécanisme principal par lequel la plupart des polluants xénobiotiques, notamment les hydrocarbures sont éliminés de l'environnement (**Nikitha et al., 2017**).

Le présent travail vise à apporter des connaissances sur les caractéristiques des bactéries marines hydrocarbonoclastes et leur capacité de dégradation du pétrole brut et ses différentes fractions à partir de bactéries isolées de l'eau de mer et des sédiments contaminés par les hydrocarbures, et d'étudier la capacité de ces souches à produire des biosurfactants dans des conditions favorables à leur croissance.

Afin de présenter le contexte de l'étude et les principaux résultats obtenus, on a réalisé ce modeste mémoire qui s'articulera autour de trois grands chapitres.

Le premier chapitre (I), est une synthèse bibliographique divisée en trois grandes parties. Une description du pétrole brut comme première partie, Les hydrocarbures pétroliers, La pollution pétrolière et leur impact sur la vie marine, gestion de lutte contre les déversements des hydrocarbures et réhabilitation biologique des sites pollués par hydrocarbures. Dans la deuxième partie, et la troisième partie nous donnons des généralités sur les bactéries hydrocarbonoclastes, leurs mécanismes d'action, la biodégradation, ainsi que leurs propriétés. Le deuxième Chapitre (II), Matériels et Méthodes, expose les protocoles utilisés dans notre travail.

Résultats et Discussion, correspond au dernier chapitre (III) qui est consacré à la présentation et à la discussion de tous les résultats obtenus et leur discussion.

Enfin, Une conclusion générale ainsi que des perspectives envisagées pour continuer les travaux initiés finalisent ce manuscrit.

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I: Etude bibliographique

Partie I. Le pétrole brut

Au sens strict, le pétrole brut (c'est-à-dire extrait) fait référence à un mélange extrêmement complexe d'hydrocarbures de poids moléculaire faible ou élevé. C'est un terme utilisé pour distinguer divers fluides riches en hydrocarbures. En matière de composition, il représente un mélange de nombreuses molécules gazeuses, organiques, liquides, solides et de divers hydrocarbures en fraction considérable entre 65% et 95% , Le pétrole brut extrait des plates-formes pétrolières ne peut pas être utilisé directement, c'est pourquoi il doit être raffiné avant de pouvoir être utilisé dans diverses applications pour produire des produits tels que l'essence, le diesel, le carburateur, l'asphalte, les cires, les huiles lubrifiantes, les goudrons, le kérosène et le GPL (Soltani, 2004).

I.1 Définitions, Origine et formation du pétrole

Le pétrole, appelé " huile " ou "pétrole brut", est un combustible fossile qui s'est formé il y a environ 20 à 350 millions d'années. Il provient de la décomposition des organismes marins, principalement du plancton, qui sont enfouies sous d'autres couches sédimentaires et dans les dépôts de matière organique animale et végétale (Tissot et Welte, 1984). peut se trouver ensuite piégé dans des formations géologiques particulières, appelées « roches réservoirs » constituant les gisements pétrolifères exploités de nos jours, (Sayed et al., 2021).

C'est une roche carbonée, composée d'un grand nombre de molécules, d'atomes d'hydrogène et de carbone appelés hydrocarbures, Cependant, les composés pétroliers peuvent être divisés en quatre fractions principales : les hydrocarbures aliphatiques, les hydrocarbures aromatiques, les résines et les Asphaltènes (Head et al., 2006). Varie en fonction de leur densité, de leur fluidité, de leur teneur en soufre et des différentes classes d'hydrocarbures.

I.2 Classification du pétrole

L'origine géographique est l'un des critères de classification du pétrole brut. Cependant, afin d'établir des comparaisons entre différents sites, d'autres critères existent. Le plus important est de mesurer la viscosité et la teneur en soufre du pétrole brut. En fonction de la viscosité, quatre types de dépôts sont définis :

- **Les gisements de pétrole léger** : l'aspect se rapproche de celui du gazole. Les gisements sahariens présentent cette caractéristique.
- **Les gisements de pétrole moyen** : dans ce cas la viscosité est intermédiaire entre le pétrole léger et le pétrole lourd. Il s'agit par exemple des gisements du Moyen-Orient.
- **Les gisements de pétrole lourd ou extra-lourd** : le pétrole brut ne coule pratiquement pas à température ambiante, Exemple : Les gisements d'Amérique du sud.

Plus le pétrole brut est visqueux, plus il est "lourd". Cette caractéristique est importante pour déterminer la rentabilité de l'exploitation minière. En fait, les huiles à faible viscosité ou légères sont plus faciles à extraire que les huiles plus lourdes (figure 1), (Head et al., 2006).

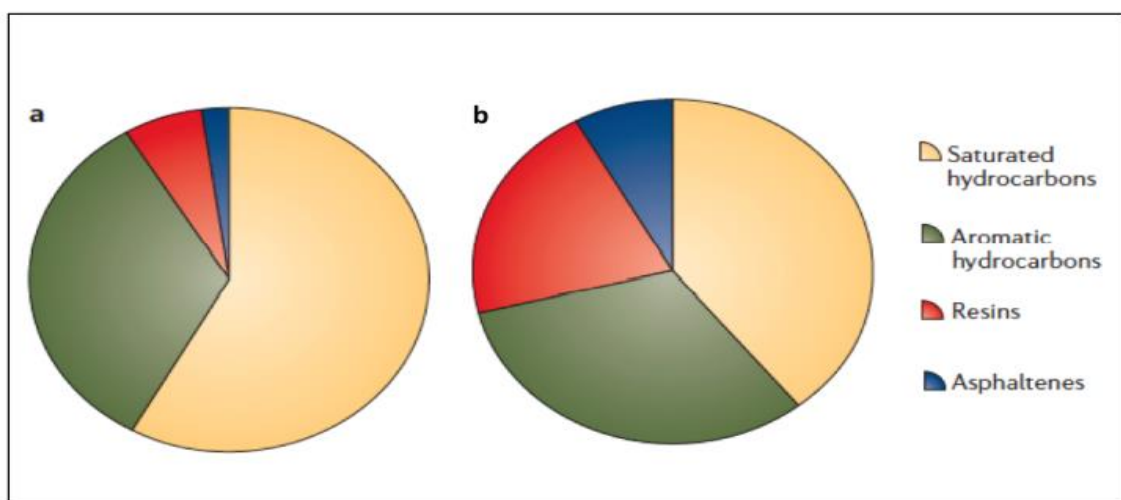


Figure 1. Composition d'un pétrole brut léger (a) et d'un pétrole brut lourd (b) de la mer du Nord (Head et al., 2006).

La teneur en soufre distingue les pétroles bruts, notamment doux (à faible teneur en soufre) que l'on trouve en Afrique, ou les sulfures dans le cas contraire que l'on trouve en Amérique du Nord. La mesure est utilisée dans l'étape de raffinage, où la faible teneur en soufre la favorise

I.3 Les propriétés physiques du pétrole

I.3.1 Densité

La densité du pétrole dépend de la densité de ses constituants, elle détermine la flottabilité et fait la distinction entre les hydrocarbures légers et lourds, elle est indispensable pour indiquer la flottabilité des hydrocarbures dans l'eau en cas de déversement. Les hydrocarbures ont tendance à s'écouler, Lorsque leur densité devient supérieure à celles de l'eau douce (1,0

g/cm³) ou marine (1,03 g/cm³). La majorité d'entre eux possèdent des densités comprises entre 0,7 et 0,99 g/ml à 15 °C et par conséquent, flottent sur l'eau (**Hassaine, 2015**).

I.3.2 Viscosité

La viscosité représente la résistance à l'écoulement et est mesurée en centistokes (Cst). Elle diminue lorsque la température augmente, elle augmente par l'évaporation des composés volatils, l'oxydation photochimique et surtout par la formation d'émulsions inverses qui modifient le comportement initial du produit. En fin de compte, la viscosité affecte l'évaporation et l'émulsifications des hydrocarbures (**Hassaine, 2015**).

Plus le pourcentage de composés légers est élevée, plus pourcentage d'Asphaltènes et de la Viscosité est faible, C'est le cas des pétroles légères tels que le diesel et l'essence, qui ont des Viscosité de 0.5et 2.0 mPas⁻¹ respectivement à 15°C (**Fingas, 2011**)

I.3.3 La solubilité

Donne une idée de la capacité des molécules organiques à se dissoudre dans l'eau. Son ordre de grandeur est : µg/l (faible solubilité) ; mg/l (moyenne solubilité) ; g/l (forte solubilité). En général, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ont une faible solubilité, 30 mg/l pour les composés légers et 10-4 mg/l pour les composés plus lourds (**Hassaine, 2015**). Les hydrocarbures les plus solubles sont principalement des composés aromatiques légers comme le benzène. Dans certains cas, les hydrocarbures, une fois dissous, peuvent être toxiques pour la vie marine même à des concentrations extrêmement faibles (**Fingas, 2013**).

I.4 Les constituants du pétrole

Le pétrole est un mélange des molécules d'hydrocarbures composée d'atomes de carbone et d'hydrogène et de molécules contenant également d'autres atomes, principalement de l'azote, l'oxygène et du soufre. Il contient des milliers de molécules différentes qu'il va falloir fractionner et transformer chimiquement pour obtenir des produits utilisables (**Speight, 2014**).

Tableau 1. Composition élémentaire des hydrocarbures pétroliers (Speight, 2014).

Eléments	Pourcentage%
Carbone	85-90
Hydrogène	10-14
Sulfure	0.2-3
Oxygène	1-1.5

Nitrogène	<0.1-2
Métaux	<1

I.5 Importance du pétrole

Le pétrole est la plus importante source d'énergie au monde pour l'industrie pétrochimique et la vie quotidienne. Les produits à base de pétrole sont la principale source d'énergie, Il satisfait plus de 30 % des besoins énergétiques. C'est la principale matière première des carburants qui alimentent les transports.

Selon l'Agence Internationale de l'Energie (AIE), la demande augmente chaque année d'un million de barils-jour alors que la déplétion qui désigne la diminution des réserves de pétrole et hydrocarbures atteint les 2 millions de barils, (AIE, 2020) (figure 2).

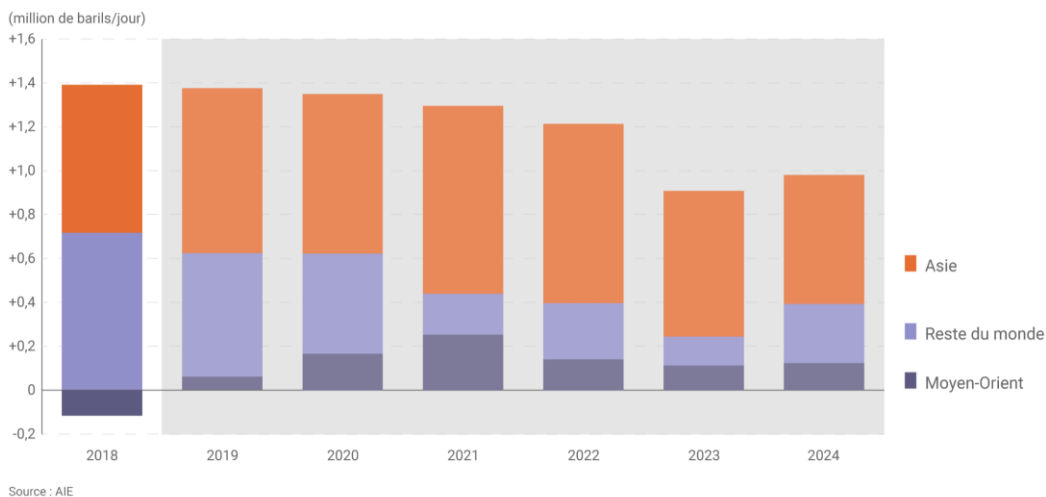


Figure 2. Evolution de la consommation mondiale de pétrole de l'année 2020 (l'AIE, 2020).

I.6 Exploitation pétrolière

I.6.1 Exploitation pétrolière dans le monde

Selon le Fonds Monétaire International (FMI), en décembre 2019, l'économie mondiale venait de conclure une croissance de l'exploitation pétrolière moyenne de 3,3% et une perspective de progression de 0,3% de plus pour l'année 2020. Ces prévisions devaient également s'accompagner d'une hausse de la consommation globale de pétrole brut, passant ainsi de 100 millions de barils par jour (b/j) en 2019 à 101,5 millions de barils en 2020.

Toutefois, l'annonce de l'apparition d'un virus de type coronavirus à Wuhan allait ébranler les prévisions des économistes et mettre à mal toute l'industrie pétrolière.

Le prix du Brent sur l'année 2019 s'est situé en moyenne autour des 65\$ par baril. Suite à la propagation du virus hors de Chine, touchant quasiment tous les pays dans les premiers mois de

l'année 2020, les mesures de confinement et le ralentissement de l'économie mondiale ont conduit à une récession de l'économie et à une chute vertigineuse des prix du pétrole, (FMI, 2019).

I.6. 2 Exploitation pétrolière en Algérie

Les travaux de recherche et de prospection ont commencé en Algérie en 1948 dans le bassin du Chélif à Oued Gueterini. Les nombres et les bilans représentés dans la figure 3, d'exploitation pétrolière et le ménagement des déchets sont ceux de l'année 2019 dans différentes raffineries et sites d'exploitation du pétrole en Algérie.

La production de pétrole brut s'est stabilisée autour de 48,3 Millions Tonnes au même niveau que celui atteint en 2018, La contribution des gisements exploités en partenariat représente 40% de ce volume, soit 19,6 Millions Tonnes (figure 3).

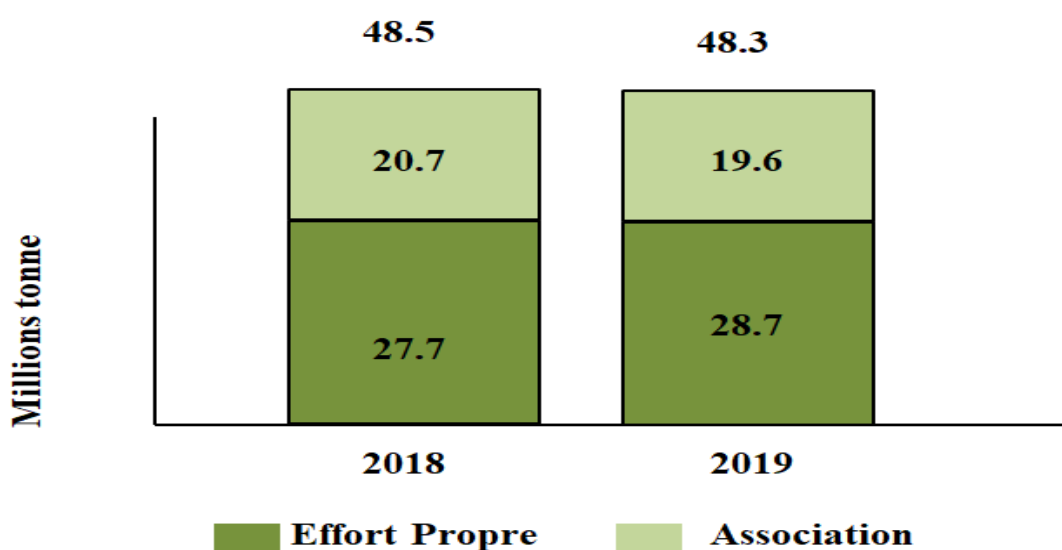


Figure 3. Production primaire du pétrole (Rapport annuel SONATRACH, 2019).

En 2021, Sonatrach avait réussi à réaliser des exportations en hydrocarbures d'une valeur dépassant 34,5 milliards USD (contre 20 Mds USD en 2020), tandis que les recettes réalisées sur le marché national s'élèvent à 2,5 Mds USD. Les recettes de la société avaient augmenté de 70% en 2021, comparativement à l'année 2020, grâce à l'augmentation de ses exportations en hydrocarbures, Les quantités globales de production de Sonatrach ont enregistré un taux de croissance de 5% fin 2021, Le PDG du groupe Sonatrach, Toufik Hakkar, relève que les quantités exportées ont augmentée de 19% durant l'année écoulée.

Concernant l'année 2022, le PDG de Sonatrach a affirmé la détermination de Sonatrach à poursuivre son plan visant à développer les capacités nationales de production, en vue de répondre aux besoins internes qui enregistrent une croissance annuelle de 5%, ainsi qu'aux

engagements contractuels avec les différents partenaires, notamment en Europe et en Asie, (SONATRACH, 2019).

Partie II: Les hydrocarbures, et procédés de remédiation

Les pétroles bruts sont des mélanges extrêmement complexes de composés non-hydrocarbonés et d'hydrocarbures, Sont omniprésents dans les milieux naturels, qu'ils soient sous leur forme saturée, insaturée ou aromatique, ramifiés ou non (Saliot, 1969)

A ce jour, les recherches se sont essentiellement centrées sur l'étude des HAPs (hydrocarbures aromatiques polycycliques) car ils représentent un problème pour la remédiation des écosystèmes et un risque pour la santé humaine. Cependant, les hydrocarbures aliphatiques sont des contaminants significatifs qui sont aussi à prendre en considération. Par exemple, la pollution par le pétrole au Royaume Uni est dominée par le gazole qui peut contenir jusqu'à 90 % d'hydrocarbures aliphatiques, majoritairement des alcanes de 14 à 20 atomes de carbone (Stroud et al., 2007).

II.1 Origine des hydrocarbures dans le milieu marin

Les hydrocarbures pétroliers arrivent dans l'environnement à partir de diverses sources naturelles et anthropiques (60 % des hydrocarbures rencontrés dans l'environnement marin sont d'origine anthropique), l'origine anthropique prédomine l'origine naturelle.

II.1.1 Origines naturelles

Ils résultent de processus biogéochimiques qui induisent la formation de pétrole et de gaz naturel qui, par la suite, peut suinter au travers de failles dans les formations géologiques. La majorité du méthane qui est libérée par ces mécanismes dans le milieu marin est oxydée par les microorganismes dans la colonne d'eau et seulement 1 à 10 % atteint l'atmosphère (Mau et al., 2007). Une autre partie des hydrocarbures naturels est produite par les plantes, animaux et microorganismes qui synthétisent des composés dont la structure chimique varie en fonction des organismes considérés. Par exemple, les microorganismes photosynthétiques, des bactéries hétérotrophes et certaines espèces de zooplancton et de macrophytes produisent du pristane, des alcanes terpénoïdes saturés et du phytane alors que, le phytoplancton marin synthétise des alcanes linéaires (n-alcanes) avec une prédominance des n-C15, n-C17 et n-C21 (Blumer et al., 1971).

Cependant, les hydrocarbures trouvés dans les milieux naturels sont aussi issus l'activité anthropique, qui entraîne une pollution de nombreux écosystèmes, qu'elle soit chronique (rejets industriels et urbains, apports agricoles, combustion de produits pétroliers, charbon, bois...) ou ponctuelle (accidents de marées noires) .A titre d'exemple, il a été estimé qu'1,3 million de tonnes de pétrole sont déversées chaque année dans l'environnement marin et le devenir de ce pétrole dans le milieu dépend de sa propre composition et des conditions climatiques, L'élimination est gouvernée par des facteurs abiotiques (dispersion, évaporation, dissolution, émulsifications...) et biotiques (biodégradation) (**McGenity et al.,2010**).

Suintements naturels : Certaines zones des mers côtières sont exposées aux Suintements sous-marins, ce sont des phénomènes causés par la remontée d'hydrocarbures fossiles des gisements situés sous le plateau continental dans les zones à activités sismiques importantes. Le Suintement naturel le plus important à ce jour est celui situé à Santa Barbara Chanel, Californie, USA, qui libère quotidiennement 170000m³ de gaz naturel (CH₄) et 16 0001 de pétrole (**Kim et al.,2003 ; Mau et al.,2007**).

Origine biogénique : Les hydrocarbures sont biosynthétisés par les organismes vivants terrestres et aquatiques, la destruction de ces espèces libère des consistances visqueuses dans les sédiments et dans le fond (**Soltani,2004**).

Origine diagénétique : La majorités des hydrocarbures saturés et aromatiques se sont formés par transformation de la matière organique enfouie dans les sédiments (**Widdel et Rabus,2001**).

Est le résultat de la combinaison de plusieurs processus biologique, chimique et physique qui peuvent accélérer la maturation de la matière organique déposée à la surface des sédiments sous forme de pétrole brut (**Cojan et Renard, 1997**).

II.1.2 Origines anthropiques

L'activité anthropique est considérée comme la source majeure d'introduction des hydrocarbures dans l'environnement.

Les activités pétrolières : Les activités pétrolières causent des contaminations chroniques des points de rejets souvent marins et aussi peuvent engendrent des déversements accidentels au cours des différentes processus d'activités pétrolières (9000 trajets de pétroliers, transportant plus de 400 millions de tonnes de pétrole brut en 2006).

D'après certaines études, En Méditerrané, environ 0,1% du pétrole brut transporté est délibérément déversé dans la mer chaque année à la suite d'opérations de nettoyage des citernes (**kluser et al., 2006**).

Les activités industrielles en général : Les rejets domestiques et industriels des stations d'épuration contiennent des quantités importantes en hydrocarbures suite à leur utilisation tant que matière première et de sources d'énergie pour divers produits tout au long de la chaîne industrielle (**Lipiatou et Saliot, 1991**).

Le dégazage : Les pollutions dues aux vidanges des moteurs, aux huiles et résidus de fuel concernent en effet tous les types de navires : transport de passagers et bateaux de pêche, transport de cargaison. Compte tenu de l'utilisation d'un fuel brut de bas de gamme pour la propulsion du navire (**Laurent et Castellanet, 2003**).

Les accidents pétroliers : Le premier accident a été celui du pétrolier Torrey Canyon (1967) qui déversa plus de 119 000 tonnes de pétrole brut, qui souillèrent de 180 km de côtes anglaises et françaises. De nombreux accidents s'en suivirent, issues à la fois du transport et de la prospection du pétrole, (**Milinkovitch, 2011**).

Récemment le déversement de pétrole dans le Golfe du Mexique, le 20 Avril 2010. Une explosion que la catastrophe écologique la plus lourde causée par le pétrole brut, selon retraite a eu lieu à la plateforme pétrolière "Deep Horizon". Depuis le site de forage était dans une zone où il y avait des réserves de bien-être animal, les effets de la pollution causée par ce déversement accueille de grandes populations d'oiseaux d'eau qui a été sévèrement touchées. Il a été constaté que la teneur en oxygène a diminué de près d'un tiers dans l'eau, ainsi qu'un contraste extrêmement élevé la proportion de méthane (les hydrocarbures) était dans l'eau, (**Mascarelli, 2010**).

II.2 Classification

Les composés pétroliers peuvent être classés en quatre familles principales qui sont présentes en proportions variables selon l'origine : les hydrocarbures saturés (30 à 70 %), les hydrocarbures aromatiques et poly-aromatiques (20 à 40 %), les composés polaires (5 à 25 %) et les asphaltes (0 à 10 %) (**Soltani, 2004**).

II.2.1 Hydrocarbures aliphatiques

Les Hydrocarbures aliphatiques sont des Composés formés d'atomes de carbone et d'hydrogène, mais peuvent également contenir de l'azote, d'oxygène du chlore et soufre. Une molécule aliphatique peut être acyclique ou cyclique, saturée ou insaturée, linéaire ou ramifiée. Reliés uniquement par une liaison simple. Les hydrocarbures saturés peuvent s'unir en des chaînes linéaires ou ramifiées d'environ 25 atomes de carbone ou moins. Facilement biodégradables, bien que leur biodégradabilité diminue avec la longueur de la chaîne (**Chikere et al., 2011**). Appelés également « paraffines », diffèrent des autres hydrocarbures par le fait que leurs atomes ne sont liés que par des liaisons simples. Ils sont beaucoup plus

légers que les autres hydrocarbures et en général, ils représentent entre 30 et 50% des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut (**Tissot et Welte, 1978**).

Les alcanes linéaires (n-alcanes, C_nH_{2n+2}), dont la longueur de leur chaîne varie de 7 à 40 atomes de carbone. Ils constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40% des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier), les alcanes ramifiés et les cycloalcanes. Ils sont la famille des molécules composées uniquement de carbone et d'hydrogène. On distingue généralement les molécules linéaires et ramifiées (alcanes) des molécules cycliques (cyclanes). Dans l'environnement, les alcanes présentent une stabilité assez élevée, surtout les alcanes ramifiés dont le carbone tertiaire ou quaternaire conduit à une certaine récalcitrance vis-à-vis des micro-organismes. Cependant, grâce à leur faible solubilité et leur tendance à se lier à la phase solide du fait de leur hydrophobicité, les alcanes ne se trouveront qu'en faible quantité dans la phase aqueuse et seront stabilisés dans les sédiments de l'aquifère. Les aliphatiques sont des composés non polaires et hydrophobes, comparés aux hydrocarbures aromatiques polycycliques, leurs température de vaporisation peuvent être relativement importantes et sont directement influencées par la longueur de leur chaîne carbonée. Par conséquent, ces propriétés font que ces polluants organiques sont peu lessivables et volatilissables (**Stroud et al., 2007**).

II.2.2 Hydrocarbures aromatiques

Les hydrocarbures aromatiques sont répartis en deux familles d'hydrocarbures insaturés : les hydrocarbures aromatiques monocycliques (HAM), et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Les HAP sont reconnus comme étant toxiques pour les organismes aquatiques et plusieurs pays ont établi des critères de qualité des sédiments pour ces derniers. 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 (**Wang Hai et Frenklach 1994**). En plus de leur présence dans les pétroles, les hydrocarbures aromatiques sont présents dans divers environnements, comme les sols et les sédiments (**Kim et al., 2013**).

II.2.2.1 Hydrocarbures monoaromatiques

Ils se trouvent surtout dans l'essence et les carburants des avions et sont largement répandus dans les synthèses industrielles, forment une des plus grandes classes de composés présents dans l'environnement avec les hydrocarbures chloro-aromatiques (**Paralovo et al., 2016**).

Parmi les hydrocarbures monoaromatiques (benzène, toluène, éthylbenzène et les xylènes), désignés sous le sigle de BTEX, sont des composés inflammables, volatils, cancérigènes et

neurotoxiques et sont classifiés comme polluants prioritaires selon l'Agence Américaine de Protection de l'Environnement (**Hazrati et al., 2016**).

II.2.2.2 Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des composés organiques hydrophobes issus de la combustion incomplète des matières carbonées, peuvent représenter jusqu'à 60% du pétrole brut. Les (HAP) de faible poids moléculaire (1 à 3 cycles) représentent 90% des hydrocarbures aromatiques dans le pétrole brut. Ces composés présentent des cycles multiples et ceux présentant 4 cycles ou plus résistent davantage à la biodégradation. Ils sont sensibles à la photo-oxydation et sont considérés comme polluants prioritaires selon l'USEPA (United States Environmental Protection Agency), les (HAP) sont des polluantes ubiquistes détectés dans tous les écosystèmes, des régions polaires aux tropiques (**Wilcke,2007**).

II.2.2.3 Composés polaires

Ça correspond à des molécules hétérocycliques, Ce sont, en général, des constituants mineurs d'un pétrole brut à l'exception des pétroles très lourds ; les dérivés soufrés sont dans la plupart des cas plus abondants que les composés oxygénés ou azotés (**Bertrand et al., 1989**).

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

Les résines : sont des composés très polaires, responsables des qualités adhésives du pétrole et ayant un caractère aromatique très marqué. Ils sont solubles dans les solvants organiques, tels que le n-heptane et dans l'eau, ce qui est à l'origine de leur biodisponibilité et leur toxicité vis-à-vis des organismes en cas de déversement en milieu marin (**Melbye et al., 2003**).

Les Asphaltènes: Les Asphaltènes se regroupent dans une classe des composés de hauts poids moléculaires, insolubles dans le pentane ou l'hexane, Composés polaires responsables de la viscosité et de la densité élevée du pétrole (**Bianchi et al., 1988**). Les Asphaltènes et les résines peuvent également être complexés à des métaux lourds, tels que le nickel et le vanadium, généralement présents à l'état de trace dans le pétrole, Leurs structure est mal connue à cause de leur composition chimique complexe (**Tissot et Welte, 1984**).

Ces deux fractions contiennent la plupart des hétéro-éléments présents dans le pétrole, constituent une faible partie de pétrole brut 1à5% du pétrole léger alors qu'un pétrole lourd peut contenir plus de 25% d' Asphaltènes et 20% de résines (**Soltani,2004**).

Alors ils contiennent principalement des molécules composées d'atomes de carbone et d'hydrogène. Il s'agit donc d'alcane non cycliques (ou paraffines), des cycloalcanes (ou naphènes), d'alcènes (ou oléfines) et d'hydrocarbures aromatiques (Colombano et collab., 2008).

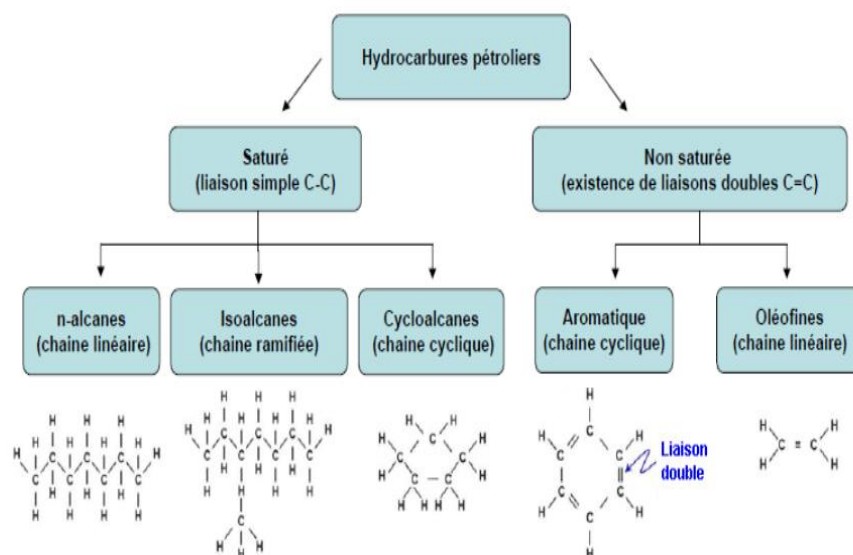


Figure 4. Structure moléculaire de base des principaux hydrocarbures pétroliers (Colombano et collab., 2008).

II.3 La pollution pétrolière

La pollution est une modification (dégradation, altération) défavorable du milieu naturel qui apparaît comme le sous-produit de l'action anthropique.

L'un des problèmes environnementaux majeurs est la pollution hydrocarbonée résultante dans la majorité des cas, des activités industrielles pétrochimiques (La pollution causée par l'industrie pétrolière est dû aux fuites et des déversements accidentels qui se produisent régulièrement pendant le processus d'exploration, la production, le raffinage, le transport et le stockage du pétrole et de ses extraits). Ce type de pollution a été discutée comme l'un des principaux défis crucial dans les écosystèmes aquatiques, vu le caractère toxique des composés pétroliers, qu'ils appartiennent à la famille des produits neurotoxiques, génotoxiques et cancérigènes qui menace toute les formes de la vie. Alors cette notion de pollution est toute relative. On peut considérer qu'il y a pollution par les hydrocarbures si elle affecte les populations animales et végétales qui lui sont utiles, et lorsque l'action de ceux-ci peut être considérée comme néfaste aux conditions de vie de l'homme (Bertrand et Mille, 1989).

II.3.1 Impacts des déversements d'hydrocarbures sur la vie marine

La pollution pétrolière est une conséquence inévitable et directe de la massive exploitation du pétrole. Tant que le pétrole sera exploité, l'ensemble des écosystèmes seront fortement menacés par la pollution. Avec le temps, les sources de pollution se sont diversifiées. Sous l'influence de l'exploitation pétrolière accrue et le manque de vigilance face à la toxicité du produit, de nombreux navires pétroliers ont échoué en mer (Amoco Cadiz, Exxon Valdez, Erika, Prestige...) déversant d'importantes quantités de pétrole. Le flux total des hydrocarbures pétroliers entrant en mers à travers les différentes sources est de l'ordre de 1.300.000 tonnes par ans. En milieu marin tous les niveaux trophiques, Les organismes planctoniques sont vulnérables à la contamination par les hydrocarbures et relativement sensibles aux effets toxiques d'une exposition aux hydrocarbures, en particulier aux fractions solubles dans l'eau et aux petites gouttelettes d'hydrocarbures (ITOPF, 2011).

II.3. 2 Pollution par les d'hydrocarbures en mer Méditerranée et en Algérie

La mer Méditerranée est fortement exposée à plusieurs sources de pollution par les hydrocarbures, en particulier lie au trafic maritime ainsi que sa situation géographique et compte tenu de la localisation de la plus parts des payes producteurs et consommateurs de pétrole, placés sur le côtés sud et nord du bassin (Amer et al., 2015).

Depuis 1977, un grand nombre d'accidents estimé à 659 ont entraîné le déversement d'environ 310 000 tonne de pétrole des quels au moins 120 000 tonnes sont de substances nocives depuis 1988 (REMPEC, 1977).

En Algérie, selon le journal officiel de la République Algérienne du 08octobre 2006 (JORAn⁰ 63), 500 million du tonnes/an d'hydrocarbures sont transportées au total en mer Méditerranée, ce qui correspond au transit de 1800 pétroliers par an.

En outre, plus de 50 millions de tonnes d'hydrocarbures empruntent chaque année les terminaux pétroliers des principaux ports algériens (Bejaia, Skikda,Arzew), avec d'importance fuites en principaux portes algériens (10 000tonnes/ an) .

II.4 Procédés de remédiation

II.4.1 Gestion de lutte contre les déversements des hydrocarbures

Comme nous l'avons mentionné avant, la pollution par les hydrocarbures provoque des impacts très néfastes et des dommages très importants qui affectent aussi bien les activités économiques que les écosystèmes. C'est pourquoi il est nécessaire donc d'éliminer ces polluants ou de les rendre moins toxique par des techniques et méthodes de dépollution associant éventuellement à des traitements pouvant être physiques, chimiques et biologiques

(Miyasaka et al., 2006). Afin de réduire les impacts de déversement des hydrocarbures, plusieurs opérations de lutte ont été prises en considération. Ces opérations sont fortement conditionnées par les conditions météorologiques, la nature du pétrole incriminé (léger ou lourd) et la proximité de sites sensibles à Protéger (productions aquacoles, sites touristiques...).

Dans certaines circonstances, il est possible de confiner les déversements en mer à l'aide de barrières flottantes et de récupérer une partie des hydrocarbures échappés à l'aide d'écumeurs (ANPE, 2012).

II.4.2 Réhabilitation biologique des sites pollués par hydrocarbures

L'efficacité limitée et les coûts croissants des traitements de Réhabilitation non biologique traditionnels de la pollution hydrocarbonée ont incité au développement de la technologie verte, (Farhadain et al., 2008). Cette technologie est basée notamment sur les capacités de remédiation biologique des plants et des micro-organismes pour le nettoyage biologique des polluants

II.4.2.1 La phytobioremédiation

À partir d'ensembles des techniques technologiques appelées "phytobioremediation", qui sont basées sur l'utilisation des plantes, les polluants sont immobilisés, réduits ou dégradés. Ces techniques peuvent également s'appliquer au traitement des polluants organiques, par accumulation ou volatilisation, absorption de ces composés (Salt et al., 1998 ; Milton et al., 2007). Elle peut se faire à l'aide des espèces végétales tels que : *Avena fatua*, *Brassica naspus*, *Selenastrum*, *Capricoruntum capricoruntum*, une algue verte qui peut dégrader le fluoranthène, le pyrène (Lei et al., 2007) et le Benzo(a) Pyrène (Cerniglia, 1993; Juhasz et Naidu, 2000). En terme de biodégradation, les plantes possèdent également des enzymes capables de métaboliser certains HAPs (Chroma et al., 2002).

II.4.2.2 La bioremédiation microbienne

Au cours des trois dernières décennies les transformations microbiennes des hydrocarbures cycliques ont reçu beaucoup d'attention. Les voies métaboliques de divers aromatiques, cycloalcanes dans différents microorganismes ont été élucidées, et la génétique de plusieurs de ces voies a été clarifiée. La toxicité de ces composés vis-à-vis des microorganismes est très importante dans la dégradation microbienne des hydrocarbures (Sikkema et al., 1995).

La vitesse de biodégradation est plus élevée pour les hydrocarbures saturés, viennent ensuite les hydrocarbures aromatiques légers, les hydrocarbures aromatiques à haut poids moléculaire, les composés polaires ayant la vitesse de dégradation la plus faible.

A- Définition

La bioremediation est une dépollution biologique efficace pour purifier les environnements contaminés par des produits polluants dangereux. Elle est définie comme étant la réduction de la complexité des composés chimiques catalysée biologiquement. Lorsque la biodégradation est terminée, le processus est appelé « minéralisation », Cette méthode est réalisée par des microorganismes ayant le potentiel de digérer ces polluants et de les transformer en des composants moins dangereux et moins complexe. La bioépuration est possible pour les hydrocarbures pétroliers ainsi que la transformation du pétrole et les déchets d'exploitation C'est une technique innovante dans laquelle les microorganismes atténuent, dégradent ou réduisent les polluants organiques dangereux en composés inoffensifs tels que CO₂, H₂O et biomasse sans nuire à l'environnement (**Ron et Rosenberg, 2014**).

B- Avantages de la bioremédiation

La biodégradation est basée sur les capacités enzymatiques de certains microorganismes à activité hydrocarbonoclastes, l'avantage c'est d'être plus convenable pour la nature et économique, mieux acceptée par l'environnement que les procédés physico-chimiques, Très efficace pour la dépollution (**Bossard et al., 1984 ; Desai, 1997**). La biodégradation est peut-être la technologie la plus respectueuse de l'environnement et la plus propre appliquée pour traiter la contamination par le pétrole brut et ses dérivés dans divers environnements. Ainsi, elle semble d'être le moyen le plus désirable pour traiter la contamination des sols. Elle peut également être utilisée dans de larges zones contaminées. Des techniques de bioremédiation in situ ont été utilisées avec succès pour traiter les solvants chlorés, les colorants, les métaux lourds et les sites pollués par les hydrocarbures (**Roy et al., 2015**). Cette méthode convient également aux traitements des eaux marines contaminées. Puisque le pétrole brut a des caractéristiques hydrophobes, il a tendance à s'étendre sur une grande surface. La manipulation des grandes zones contaminées par traitement physico-chimique est très chère, donc la biodégradation semble être la plus rentable des technologies disponibles, (**Philp et Atlas, 2005**).

Tableau 2.Avantages et limites de la technique de biodégradation (Philp et Atlas, 2005).

Avantages	Limites
Respect l'environnement	Solubilité du pétrole brut
Applicable dans divers environnement	Quantité de biomasse nécessaire pour l'application des larges surfaces
Les résidus décomposés peuvent être utilisés comme fertilisants	Disponibilité des nutriments
Efficace en termes d'élimination des contaminants	Exigence d'experts dans le domaine de la bioremédiation de pétrole brut

Partie III: Les bactéries hydrocarbonoclastes et mécanismes d'action

III.1 Les bactéries marines dégradant les hydrocarbures pétroliers

Une goutte d'eau de mer peut contenir des milliers de bactéries marines. Ces minuscules créatures ont des fonctions différentes. Parmi elles se trouvent des bactéries hydrocarbonoclastes, qui sont caractérisées par leur capacité à utiliser le carbone du pétrole comme seule source de carbone et d'énergie et à biodégrader les hydrocarbures pétroliers. Ces micro-organismes font l'objet de recherches et d'applications pour les marées noires **(Engelhardt et al., 2001)**.

Divers genres bactériens dégradant le pétrole habitent les milieux marins. Ces bactéries ont souvent été isolées par leur capacité à dégrader des alcanes ou des composés aromatiques tels que le toluène, naphthalène et phénanthrène. **(Yakimov et al., 2007)**.

Une liste de 79 genres bactérien ont été identifié par leur pouvoir de dégrader ou transformer les hydrocarbures, **(Engelhardt et al., 2001)**.Ce sont des bactéries du genre *Alcanivorax*, *Cycloclasticus*, *Marinobacter*, *Neptunomonas*, *Oleiphilus* et *Oleispira* appartenant au γ -*Protéobactéries*, et du genre *Planococcus* au sein des bactéries à Gram positif. Ces bactéries utilisent exclusivement les hydrocarbures comme source d'énergie et de carbone et ont un métabolisme hautement spécialisé et sont donc considérées comme des bactéries « hydrocarbonoclastes professionnelles » ou spécialisées dans la dégradation des hydrocarbures **(Harayama et al., 2004)**.

III.2 Réponse des bactéries hydrocarbonoclastes à la pollution pétrolière

L'introduction de pétrole ou de ses composants dans l'eau de mer peut entraîner la prolifération de bactéries hydrocarbonoclastes qui sont présentes à des niveaux faibles ou indétectables avant un événement de pollution, **Atlas (1991)**.

Il a été déterminé que les micro-organismes dégradant les hydrocarbures représentent moins de 0,1 % des communautés bactériennes dans les écosystèmes non contaminés, mais ce nombre peut atteindre 1 à 10 % de la population totale dans les environnements contaminés par les hydrocarbures pétroliers. Ainsi, les réponses microbiennes aux déversements d'hydrocarbures comprennent des altérations des communautés microbiennes présentes dans l'environnement affecté, qui consistent en plusieurs espèces dégradant les hydrocarbures qui coexistent et partagent les mêmes ressources (Yakimov et al., 2004, 2005). Toutes les espèces bactériennes ne présentant pas un taux similaire de dégradation des hydrocarbures, la biodégradation des différents composés entraîne une variation des sources de carbone disponibles dans le milieu au fur et à mesure du processus de biodégradation.

Cette évolution constante des sources de carbone disponibles entraîne elle aussi une modification de la diversité au sein de la communauté microbienne indigène au cours du temps. Il existe donc une réelle écologie bactérienne du site pollué.

L'introduction de ces derniers facilite la prolifération des bactéries hydrocarbonoclastes et donc stimule la biodégradation du polluant. Dans des essais in-situ, après contamination, la dominance de genres affiliés aux γ - et α -protéobactérie et aux *Bacilli* a été observée (Head et al., 2006 ; Coulon et al., 2007 ; Dubinsky et al., 2013).

III.3 Biodégradation microbiologique des polluants hydrocarbonés

En milieu marin, La biodégradation des hydrocarbures est un facteur déterminant de leur devenir, Il s'agit d'une décomposition, et d'une dégradation moléculaire des substances organiques sous l'action des microorganismes (Leahy et Colwell, 1990). Essentiellement réalisée par le métabolisme des microorganismes hétérotrophes, qu'il soit respiratoire ou fermentatif, et peut avoir lieu en aérobiose et en anaérobiose.

La biodégradation du pétrole par les bactéries marines est un phénomène bien établi, bien que mal connu, et est considérée comme le mécanisme le plus efficace pour l'élimination de ce polluant. Les composés les plus simples du pétrole brut peuvent être dégradés par une grande variété de bactéries alors que la capacité à dégrader des composés complexes (tels que les HAP, les résines et les asphaltènes) est présente dans très peu d'espèces.

Une espèce bactérienne se spécialise dans l'utilisation de quelques hydrocarbures en tant que source alimentaire préférée et en consortium, un effet synergique se produit (Sugiura et al., 1997; Peressutti et al., 2003; Varjani et al., 2013, 2015).

Les bactéries aptes à biodégrader les hydrocarbures sont:

- Apte à se reproduire rapidement suite à un entreposage de longue durée.
- Génétiquement stable.

- Apte à biodégrader une vaste étendue de polluants pétroliers chronique.
- Activité enzymatique et croissance des bactéries dans des conditions environnementales optimales.
- Aucun effet secondaire néfaste et produits finaux non toxiques.
- La majorité des souches bâtonnets à Gram négatif.
- 32% des bactéries mobiles, filamenteux.

III.4 Facteurs influençant la biodégradation en mer

L'efficacité de la biodégradation dépend de divers facteurs, à savoir :

Les caractéristiques des polluants : Composition chimiques, type, disponibilité, longueur des hydrocarbures, dispersion en phase aqueuse et volatilisation.

Les conditions environnementales, telles que le pH, la température, la salinité, disponibilité en oxygène et facteurs nutritionnels (source de carbone et d'azote et d'autres nutriments) (Chandra et al., 2013; Varjani et al., 2015).

III.4.1 Effet du pH

Les fluctuations du pH varient de façon moindre dans les écosystèmes marins. La plupart des bactéries et des champignons capables de dégrader les hydrocarbures nécessitent un pH neutre sont généralement des neutrophiles (Leahy et Colwell, 1990 ; Margesin et schinner, 2001).

En général, Le métabolisme microbien est influencé par un pH extrêmement faible ou élevé (Leahy et Colwell, 1990). La dégradation de 40 % du phénanthrène a été effectuée à pH 5,5 par *Burkholderia cocovenenans* Selon Bamforth et Singleton (2005), Cependant, la dégradation des hydrocarbures à pH neutre dans les mêmes conditions était de 80 %. Le pH approprié dépend des micro-organismes utilisés pour les bioremédiations environnementales.

III.4.2 Effet de la température

La température affecte souvent la biodégradation et les hydrocarbures en affectant leur comportement physico-chimique, mais affecte également la physiologie et la diversité des micro-organismes naturels. À basse température, la viscosité des hydrocarbures augmente, empêchant l'émulsification et la volatilisation des composés toxiques de faible poids moléculaire tels que les alcanes, limitant la biodégradation microbienne due à un métabolisme microbien réduit (Leahy, 1990 ; Head et al., 2006). Tous les micro-organismes ont un intervalle de tolérance et température de croissance optimale caractéristique.

L'augmentation de la solubilité de l'oxygène à des températures extrêmes, limitant la poursuite de la biodégradation microbienne aérobie. Le mode vie des bactéries marines dégradantes les

hydrocarbures prospère au milieu des conditions de température modérée comprise entre 20 et 40°C avec un optimum de croissance entre 30 et 37°C (**Boopathy, 2000**).

III.4.3 Effet de l'oxygène

La concentration en oxygène est définie comme le taux variable limite de dégradation des hydrocarbures dans l'environnement. La disponibilité en oxygène est un facteur particulièrement important dans la biodégradation des hydrocarbures (**Cerniglia, 1993**).

Le catabolisme des hydrocarbures aliphatiques ou aromatiques par les bactéries et les champignons s'effectue par l'oxydation des hydrocarbures et par les oxygénases qui nécessitent la présence d'oxygène. Les conditions de confinement de l'oxygène ne sont généralement pas présentes dans les couches supérieures de la colonne d'eau (**Leahy 1990 ; Juhasz et Naidu, 2000**). Cependant, des zones hypoxiques peuvent apparaître dans les eaux profondes (comme celles du détroit de Laurent) et limiter la biodégradabilité. La dégradation des hydrocarbures pétroliers est plus efficace en conditions aérobies qu'en conditions anoxiques (**Widdel et Rabus, 2001**). Les conditions aérobies sont, par suite, nécessaires pour cette voie d'oxydation microbienne des hydrocarbures dans l'environnement. Le problème de la limitation de l'oxygène moléculaire dans les couches superficielles des colonnes d'eau est inexistant, en effet la concentration en oxygène est suffisamment élevée pour assurer l'activité des microorganismes hydrocarbonoclastes. Théoriquement, 3,5 g d'oxygène sont nécessaires pour l'oxydation complète de 1 g de pétrole (**Soltani, 2004**). La dégradation anaérobie des hydrocarbures par les microorganismes peut se produire mais à des vitesses négligeables et son importance écologique est considérée comme moindre.

III.4.4 Effet de la salinité

Dans les milieux océaniques La salinité moyenne est de l'ordre de 3,5 % avec un intervalle de variation se situe en général entre les limites de 3,3% et 3,7%. Ces concentrations en sels sont compatibles avec la croissance des microorganismes hydrocarbonoclastes (**Bertrand et Mille, 1989**). D'après l'étude de Bertrand et collaborateurs (1993) sur l'influence de la concentration en chlorure de sodium sur la biodégradation des hydrocarbures par deux communautés microbiennes, ils ont trouvé que la biodégradation est maximale pour une concentration de 0,4 M et diminue lentement pour des valeurs supérieures et inférieures à celle-ci.

III.4.5 La composition du pétrole

L'aptitude des bactéries hydrocarbonoclastes à la consommation du pétrole brut comme source de carbone dépend de la composition qualitative et quantitative de chaque fraction, Les hydrocarbures cycliques sont plus difficilement dégradables que les deux séries précédentes à cause de leur toxicité suite à l'interaction avec la membrane cellulaire des microorganismes (Sikkema et al., 1995).

Selon Ratledge (1978), Les composés saturés sont plus rapidement dégradés que les insaturés et les composés ramifiés. Les hydrocarbures aliphatiques sont assimilés par une grande variété de microorganismes par apparte les composés aromatiques. La non accumulation des hydrocarbures cycliques dans l'environnement, implique des phénomènes non conventionnels de dégradation tel que l'intervention des phénomènes de co-oxydations impliquant plusieurs souches microbiennes dont l'équipement enzymatique est complémentaire (Bertrand et al., 1983; Leahy et Colwell, 1990).

III.5 Les Biosurfactants

III.5.1 Définition

Les surfactants (Surface Active Agents) sont des agents à activité de surface (tensioactifs), synthétisés chimiquement ou par voie biologique (biosurfactants). Ces molécules de haute énergie se répartissent à l'interface entre liquides non miscibles réduisant ainsi l'énergie libre du système et formant des microémulsions des solutions aqueuses ou des mélanges d'hydrocarbures,(Neu, 1996) (figure 5).

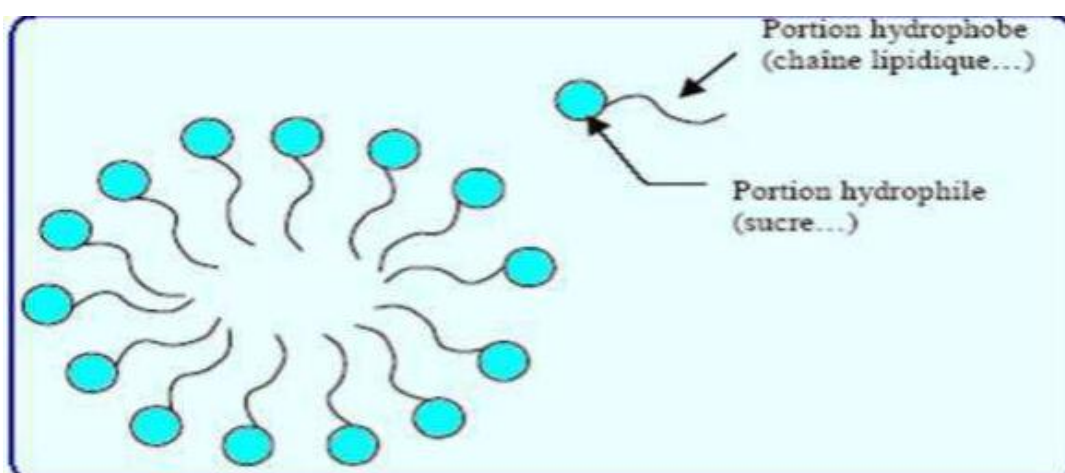


Figure 5. Représentation schématique d'une micelle de biosurfactant (Gabet, 2004).

III.5.2 Classification

Les biosurfactants sont généralement catégorisés par leur composition chimique, ainsi que leur origine microbienne (**Rosenberg et al., 1999**) ont suggéré que les biosurfactants peuvent être divisés en deux catégories :

- Biosurfactants de faible masse moléculaire, qui abaissent efficacement la tension superficielle et interfaciale.
- Biosurfactants de masse moléculaire élevée, qui sont plus efficaces comme agents stabilisateurs d'émulsion.

III.5.3. Production de biosurfactants

De nombreuses bactéries sont capables de produire une large gamme de produits extracellulaires aux propriétés et applications multiples, connus sous le nom des biosurfactants, qui augmentent l'adhérence des cellules au substrat (**Banat, 1995**).

Les biosurfactants sont l'un de ces composés amphiphiles extracellulaires produits par les bactéries, les levures et les champignons, (**Marchant et Banat, 2012**). En particulier lorsqu'ils sont cultivés sur des substrats hydrophobes.

Leur mécanisme d'action réside dans l'accumulation à l'interface de composés non miscibles, réduisant la tension superficielle et en augmentant leur surface; cela conduit à une biodisponibilité plus élevée qui facilite la dégradation des polluants (**Batista et al., 2006**).

et de permettre aux microorganismes de se développer sur des substrats insolubles, et rendant ce dernier plus accessible aux cellules (**Mata Sandoval et al., 2000**).

Les genres bactériens connus pour leur production des biosurfactants comprennent: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Acinetobacter*, *Thiobacillus*, *Halomonas* (**Bodour et al., 2003; Mnif et al., 2011**). Bien que la régulation de nombreuses espèces produisent des biosurfactants leur synthèse est encore mal connue, sauf pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* qui sont les bactéries les plus étudiées (**Banat et al., 2000**).

III.5.4 Applications des biosurfactants

Les biosurfactants sont largement utilisés dans de nombreux domaines d'application tels que l'agriculture, la production alimentaire, la chimie, l'industrie pharmaceutique et les cosmétiques en raison de leur sécurité et de leur potentiel, Leur utilisation dans les

cosmétiques (les crèmes antirides, crèmes hydratantes, et les cosmétiques de nettoyages) a également augmenté, **(Banat et al., 2000; Santos et al., 2016)**.

Il a été utilisé comme alternative aux tensioactifs chimiques ces dernières années et devrait trouver de nombreuses applications environnementales et industrielles telles que la récupération assistée du pétrole, la détergence, la bioremédiation des polluants, la solubilisation et la dispersion **(Rodrigues et al., 2006)**.

Dans le domaine environnemental, les biosurfactants sont capables de solubiliser les composés xénobiotiques, améliorant leur biodégradabilité permettant ainsi leur élimination des sites contaminés **(Mulligan, 2005)**. Les principales utilisations sont la bioremédiation des sites contaminés par les hydrocarbures, la dispersion des nappes de pétrole et une meilleure récupération du pétrole **(Gassara et al., 2017)**. Bien qu'utilisés dans de nombreux domaines, les biotensioactifs voient une utilisation de plus en plus prometteuse dans les techniques de remédiation des sites contaminés **(Ron et Rosenberg, 2014)**.

Tableau 3. Application des biosurfactants dans différents domaines (Banat et al., 2000; Santos et al., 2016).

Domaine	Application
Environnement	Bioremédiation : Opérations de nettoyage des déversements d'hydrocarbures.
Pétrole	Récupération améliorée de pétrole (MEOR)
Exploitation minière	Opérations de nettoyage des métaux lourds
Aliments	Solubilisation des huiles aromatisées, Amélioration de la texture des produits à base de matières grasses.
Médicaments	Agents antiadhésifs, antifongiques, antibactériens, antiviraux, cicatrisants.
Cosmétiques	Nettoyant, Préparation des crèmes hydratantes dermatologiquement compatibles, les crèmes antirides.
Chimie	Détergent domestique et industriel, Peinture, textile agent de mouillage.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE II: Matériel et méthodes

II.1 Présentation de la zone d'étude

II.1.1 Situation géographique Baie d'El Djamila

La baie d'El Djamila est une baie relativement fermée se situant à une quinzaine de kilomètre à l'Ouest du chef-lieu d'Alger, et à proximité des agglomérations touristiques : Sidi Fredj, Le Club des Pins et la forêt de Bainem, ayant presque une ouverture de l'ordre de 6Km de côte, Elle représente le quart oriental de la baie de Bou Ismail, **(Rabehi,et al., 2011)**

Il s'agit d'une côte sableuse basse dont le rivage est oriente Sud-Ouest-Nord Est, limitée de :

- La côte Est par le Rass Acrata ($2^{\circ}53'42.792''\text{E}$ et $36^{\circ}48'5.796''\text{N}$)
- La côte Ouest par la presqu'île de Sidi Fredj ($2^{\circ}50'54.744''\text{E}$ et $36^{\circ}45'43.092''\text{N}$)
- La pleine de Mitidja au sud
- la Méditerranée occidentale au Nord

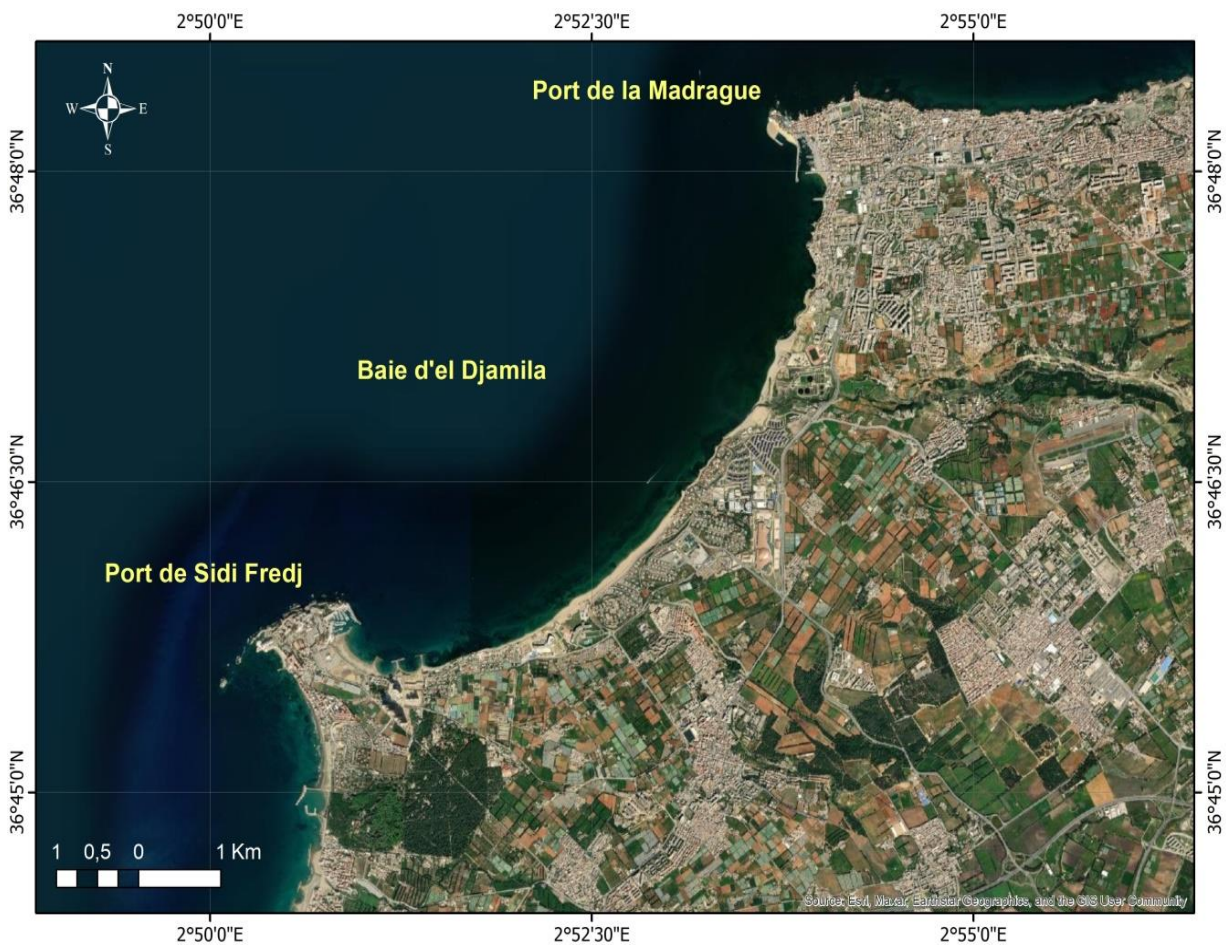


Figure 6. Position géographique de la baie d'El Djamila (Google Earth Pro, 2021).

II.1.2 Situation géographique de port d'El Djamila

Le port d'El Djamila (la Madrague) est implanté à 18Km à l'Ouest d'Alger, dans la côte Est de la baie d'El Djamila, avec une orientation NNE SSW, elle appartient administrativement à la commune de Ain Benian dans la wilaya d'Alger.



Figure 7. Situation géographique et localisation du port la Madrague (Google Earth, 2021).

II.2 Echantillonnage

La sélection de la zone de prélèvement est portée sur le port d'El Djamila (Madrague) en partie à cause de sa contamination par les hydrocarbures et constitue ainsi un modèle de sélection réaliste pour démontrer et comprendre les mécanismes impliqués dans la réponse bactérienne à cette pollution chronique, et un transport commode, (figure 8).

La sortie sur terrain s'est déroulée le mercredi 20 avril 2022, deux sites différents ont été sélectionnés pour prélever des échantillons d'eau et de sédiments, ainsi que pour mesurer les paramètres physico-chimiques de l'eau tels que (pH, demande en oxygène, conductivité, température).

Les échantillons de sédiments ont été prélevés sur le même site à l'aide d'une benne de type Van Veen (Duncan et associés KC Scientific Instrument Corporation de KC Denmark).



Figure 8. Stations de prélèvement du port d'El Djamila.

Pour l'examen microbiologique l'échantillonnage été réalisé dans des conditions pour éviter la contamination avec l'air, les échantillons d'eau ont été prélevé dans des flacons en verre stériles d'une capacité d'un litre. Les échantillons ont été prélevés manuellement à une profondeur d'environ 30 cm sous la surface de l'eau, en tenant la bouteille dans une main, près du fond puis insérée dans l'eau, le goulot vers le bas, la bouteille est légèrement inclinée pour expulser l'air et poussée vers l'avant pour éviter toute contamination. Le bouchon est ensuite remis. Après le prélèvement, les échantillons ont été immédiatement expédiés au laboratoire dans une glacière (4°C).

II.3 Mesure in situ des paramètres physico-chimiques

II.3.1 Potentiel Hydrogène « pH »

Le pH a été mesuré par voie électrochimique à l'aide d'un pH-mètre « WTW pH315i » qui comprend une électrode sélective en verre qui est mise en contact avec la solution en question, en l'immergeant dans le flacon d'échantillon. Le pH mètre est également équipé d'un thermomètre.

II.3.2 Salinité et température

La salinité représente la proportion des sels minéraux dissous dans l'eau de mer, la masse de sels contenue dans 1 kg d'eau de mer. On l'évalue en mesurant la conductivité car elle n'est pas accessible par une méthode de mesure directe (**Aminaut et Chauss Pied, 1983**). On l'exprime en psu, unité pratique de salinité, qui équivaut approximativement à 1mg/g de sels, L'équipement utilisé était un conductimètre de la marque Wissenschaftlich Technische Werkstätten « WTW Cond 197i » à une conductivité comparable au niveau de chlorure de l'eau de mer normale, La température, une des descriptions de base de la connaissance environnement marin, est mesurée simultanément avec la mesure de la salinité.

II.3.3 La matière en suspension (MES)

La méthode de filtration sur membrane est utilisée afin de mesurer la quantité des MES dans les échantillons d'eau de mer. Cette méthode implique de faire passer de l'eau à travers un filtre afin de retenir toutes les particules de taille supérieure à 0,45 µm. Ensuite le filtre est séché et pesé après filtration sous vide.

La différence de poids entre les deux pesées permet de connaître la masse sèche totale de MES dans le volume d'eau correspondant, Le dispositif de filtration est composé d'un erlenmeyer, d'un support filtre, d'un entonnoir gradué et d'une pompe à vide. Pour les deux stations, on a filtré un volume de 910 ml d'eau de mer à travers un filtre Wattman de porosité 0,45µm.

la pesée différentielle du filtre avant et après passage à l'étuve à 105°C pendant 2 heures permet de connaître le poids de la matières retenues (**Rodier et al., 2009 in Kada, 2012**).

Avec:

P_i = le poids initial avant filtration

P_f = le poids finale après filtration

V = le volume de l'eau filtré

$$\text{MES} = \frac{\text{P}_f - \text{P}_i}{V}$$

II.3.4 la teneur en oxygène dissous

L'oxygène dissous est la quantité d'oxygène gazeux O₂ dissous dans l'eau, l'O₂ pénètre dans l'eau par absorption directe de l'atmosphère, est un paramètre important qui gouverne la majorité des processus biologiques des écosystèmes aquatiques, se dissout plus facilement dans l'eau plus froide que dans l'eau plus chaude. La température et le volume d'eau en mouvement affectent les niveaux d'oxygène dissous. La teneur en oxygène dissous exprimée

en mg d'O₂/l, a été mesuré par un Oxymètre « WTW Oxi 197i», (Aminaut et Chaussied, 1983).

II.4 Culture et Isolement des bactéries marines hydrocarbonoclastes.

Une fois au laboratoire, les échantillons d'eau et de sédiment ont été utilisé comme inoculum pour l'enrichissement dans un milieu de culture spécifique ONR7a, un milieu synthétique dont la composition imite celle de l'eau de mer mais qui manque à lui seul d'une source principale de carbone, ce dernier est un milieux sélectif que pour le groupement des bactéries hydrocarbonoclastes, en présence des hydrocarbures comme source de carbone l' ONR7a permet la culture des bactéries qui sont aptes à dégrader les hydrocarbures (Dyksterhouse et al., 1995). La composition du milieu est la suivante:

Solution 1 :

NaCl	22.8 gr
Na ₂ SO ₄	3.98 gr
KCl	0.72 gr
NH ₂ Cl	0.27 gr
TRIS	1.3 gr
NaBr (0,83 gr dans 10 ml)	1.3 gr
NaHCO ₃ (1,55 gr dans 50 ml)	1 ml
H ₃ BO ₃ (1,35 gr dans 50 ml)	1 ml
NaF (0,13 gr dans 50 ml)	1 ml
Na ₂ HPO ₄ (4,45 gr dans 50 ml)	1 ml
Volume Final	600 ml

- Transférer les constituants solides dans un bécher contenant de l'eau distillée (50 ml moins que le volume final) et remuer avec un agitateur magnétique jusqu'à solubilisation complète.
- Ajouter tous les éléments traces sous hotte à flux chimique.
- Ajuster le pH à 7,6 tout on ajoute quelques gouttes de HCl.

- Porter au volume final (600 ml).
 - Autoclaver à 121⁰ C pendant 15 mn.
- Pour le milieu solide: ajouter 15 gr d'agar-agar directement dans la solution 1.

Solution 2 :

MgCl ₂ , 6H ₂ O	11.18 gr
CaCl ₂ , 2H ₂ O	1.46 gr
SrCl ₂ , 6H ₂ O (1,2 gr dans 50 ml)	1 ml
Volume final	300 ml

- Transférer les constituants solides dans un bécher contenant de l'eau distillée (30 ml moins que le volume final) et remuer avec un agitateur magnétique jusqu'à solubilisation complète
- Ajouter tous les éléments traces sous hotte à flux chimique.
- Porter au volume final (300 ml).
- Autoclaver à 121⁰ C pendant 15mn.

Solution 3 :

FeCl ₂ , 4H ₂ O (0,1 gr dans 50 ml)	1 ml
Volume finale	100 mml

- Déplacer sous hotte chimique la quantité désirée de solution de FeCl₂ dans un flacon contenant 99ml de l'eau distillée stérile.
- Après Stérilisation des deux solutions (solution1 et 2) préparées on passe à la filtration
- filtrer à travers le filtre de 0,22 µm directement la solution 3 dans la solution 2 puis verser le tout dans la solution 1 (figure 9).

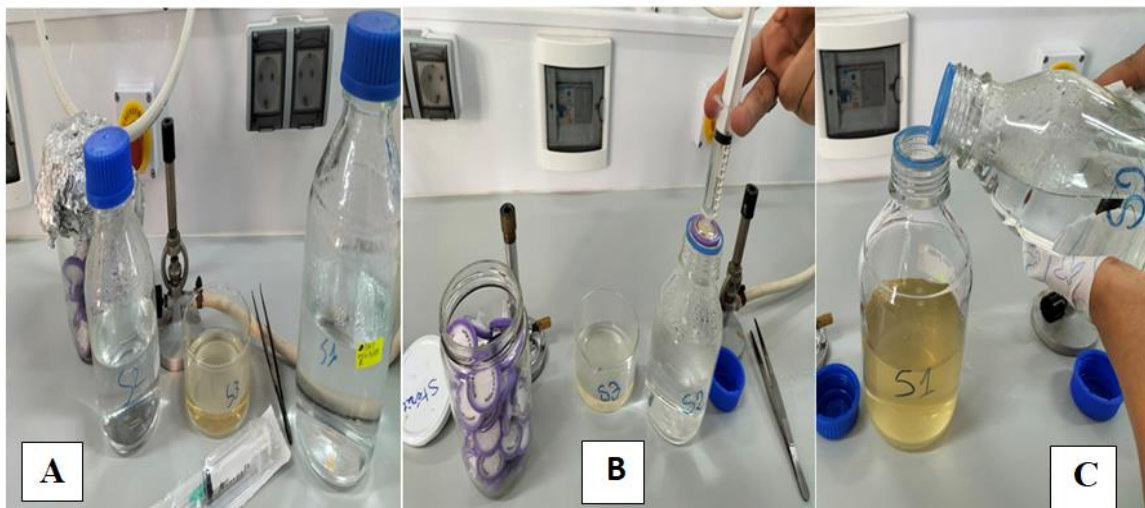


Figure 9. Représentation des étapes de la préparation du milieu ONR7a Agar

II.4.1. Enrichissement

L'échantillon prélevé d'eau et de sédiments est utilisé comme inoculum dans le milieu ONR7a préparés en solution liquide pour l'enrichissement.

A. Pour les échantillons de sédiments :

Dans des flacons contenant 100 ml d'ONR7a, on ajoute 5g de sédiments et 1% (V/V) de pétrole brut (1ml) comme unique source de carbone et d'énergie. Les flacons sont ensuite déposés dans un bain marie agitateur réglé à 30°C pendant une semaine. Un contrôle négatif est également préparé, dans un flacon contenant le milieu et le pétrole brut mais sans échantillon de sédiment et est incubé dans les mêmes conditions.

B. Pour les échantillons d'eau de mer :

Dans des flacons contenant 100 ml d'ONR7a, on ajoute 5ml d'eau de mer prélevée et (1ml) de pétrole brut, 1% (V/V) par rapport au volume de milieux de culture. Les flacons sont ensuite déposés dans un bain marie agitateur réglé à 30°C pendant une semaine. Un contrôle négatif est également préparé, dans un flacon contenant le milieu et le pétrole brut mais sans échantillon d'eau de mer et est incubé dans les mêmes conditions.



Figure 10. Ajout de pétrole pour l'enrichissement bactérien

II.4.2. Isolement

Après l'étape d'enrichissement les inoculum sont utilisées comme suspension pour la culture bactérien en milieu ONR7a Agar. Après la période d'incubation, on étale à l'aide d'un râteau dans des boîtes de pétri, contenant le milieu ONR7a Agar, 100 µl de suspension bactérienne de chaque échantillon (eau de mer et sédiment). Un embout contenant du pétrole brut est placé sur le couvercle de la boîte de pétri. Les boîtes sont ensuite bien fermées à l'aide d'un papier parafilm, afin d'éviter l'évaporation du pétrole. Toutes les boîtes sont ensuite incubées dans une étuve à 30°C jusqu'à prolifération bactérienne.

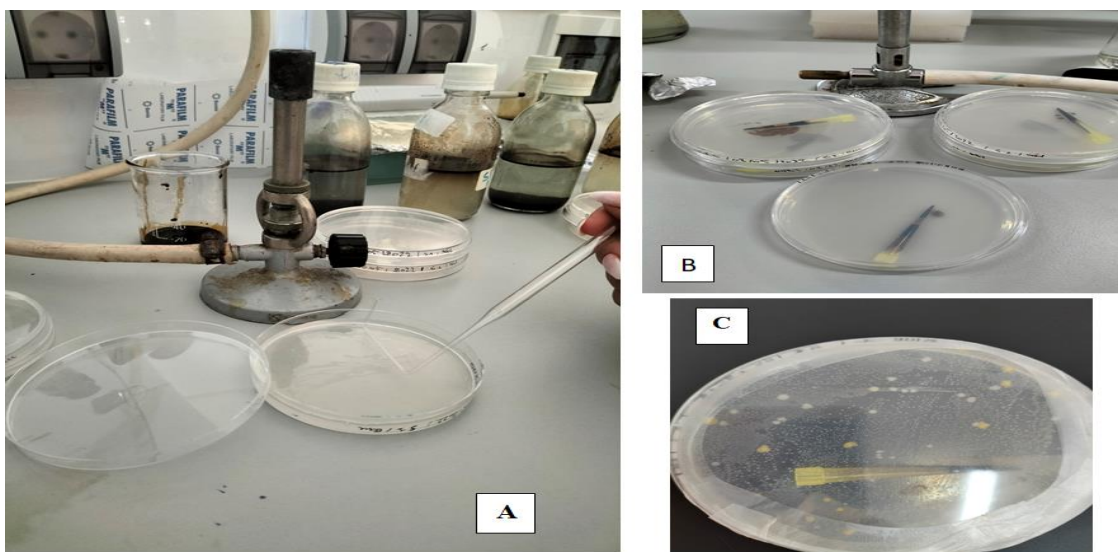


Figure 11. les étapes de la culture bactérienne.

II.4.3. Purification

Après incubations, on a obtenu plusieurs colonies phénotypiquement différentes. Ces colonies ont fait l'objet de repiquages successives afin d'obtenir des colonies pures.

A partir des différentes boîtes, des colonies ont été sélectionné puis repiquées dans de nouvelles boîtes contenant le milieu ONR7a Agar frais, le pétrole brut a été ajouté et les boîtes ont été incubées dans les mêmes conditions que l'étape d'enrichissement. Cette étape a été répétée, jusqu'à l'obtention de colonie pures.

Les bactéries purifiées obtenues à partir des boîtes de pétri, ont fait l'objet d'un criblage pour confirmer leur capacité à dégrader les hydrocarbures et à les utiliser comme source de carbone et d'énergie. Ceci a été réalisé par la cultivation de chaque isolat dans le milieu ONR7a additionné de pétrole brut (1%, v/v) comme unique source de carbone et d'énergie. Les cultures ont été incubées à 30°C avec agitation. La consommation des hydrocarbures est indiquée par la variation de la turbidité.

II.5 Caractérisations biochimiques des bactéries isolées

II.5.1 Coloration de Gram

C'est un test qui permet de distinguer deux groupes bactériens Gram+ et Gram-, tout on base sur la coloration donc par leur aptitude à fixer le violet de gentiane ou la fuschine. Les bactéries peuvent donc être groupées en deux catégories selon la méthode de coloration de Gram. Colorer le frottis thermofixé avec une solution de violet de gentiane pendant une minute, Rincez rapidement le frottis taché avec la solution d'iodure de Lugol et laissez-le là Une minute. Le frottis est ensuite décoloré plusieurs fois avec de l'alcool à 95% pendant quelques secondes jusqu'à ce que l'excès de colorant soit éliminé, puis rincez immédiatement à l'eau claire robinet. Le frottis est ensuite traité avec un colorant en solution Fushine, rincé Tapotez et séchez rapidement.

Après le traitement, examinez la lame au microscope optique (Objectif 100X en immersion) **(Singleton et Sainsbury, 1984).**

Lecture

Les bactéries à Gram positif apparaissent alors violettes et les bactéries à Gram négatif se recolorent en rose.

II.5.2 Test oxydase

Principe

Les tests d'oxydase détectent un type spécifique de chaîne respiratoire qui se termine par Chaîne a dû cytochrome c et oxydases apparentées. Les bactéries avec cette chaîne peuvent oxyder les composés chimiques (N-N-diméthyl-p-phénylènediamine). Les électrons sont transférés de ce réactif au cytochrome c et de là à l'oxygène par l'oxydase. Ainsi oxydé, Les réactifs sont fortement violets **(Singleton, 1999).**

Technique

- Placer le disque d'oxydase de manière aseptique à l'aide d'une pince flambée au centre d'une lame de verre propre.
- Mouiller la plaque oxydase avec une goutte d'eau distillée stérile.
- Recueillir des colonies bactériennes sur gélose (cultures fraîches) avec une pipette Pasteur et l'étaler sur le disque

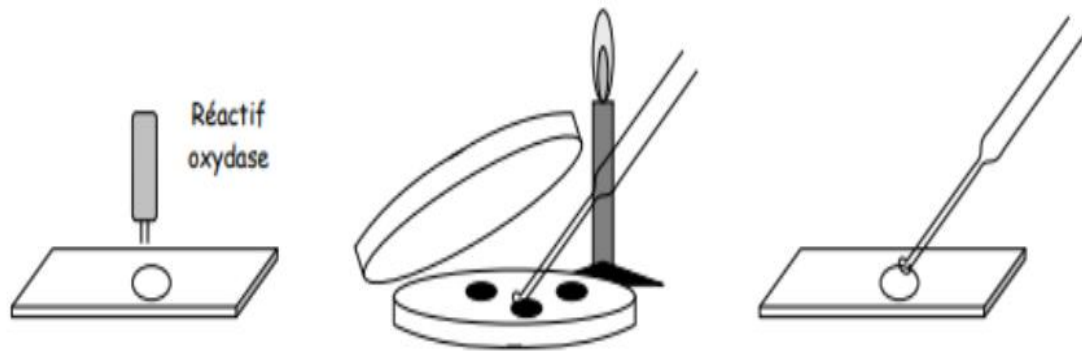


Figure 12. Etapes du test d'oxydas (Singleton, 1999).

Lecture

Les espèces positives à l'oxydase deviennent bleues/violettes en 10 secondes (Singleton, 1999)

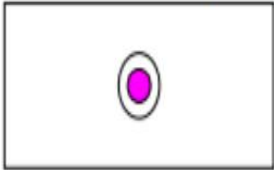

Tâche rose violette	Pas de tâche rose violette
La bactérie possède l'activité oxydase, elle est dite :	La bactérie ne possède pas l'activité oxydase, elle est dite :
Oxydase + 	Oxydase - 

Figure 13. Lecture des résultats du test d'oxydase (Singleton, 1999).

II.5.3 Test catalase

Principe

La catalase est une enzyme contenant du fer qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est converti en eau et en oxygène. Synthétisée par la plupart des bactéries aérobie, elle élimine le peroxyde d'hydrogène produit au cours du métabolisme aérobie. Un test de catalase est utilisé pour détecter la production de cette enzyme pour une souche donnée (Singleton, 1999).

Technique

A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, déposer une goutte d'eau oxygénée à 10% au centre d'une lame propre et dégraissée.

- Retirer les colonies à l'aide d'une anse stérile.
- Les colonies se dissocient dans une même goutte d'eau oxygénée.

Lecture

Un dégagement excessif de gaz sous forme de mousse ou de bulles indique une décomposition de peroxyde d'hydrogène, ce dernier est transformé en oxygène gazeux par l'action de la catalase (Guiraud, 1998).

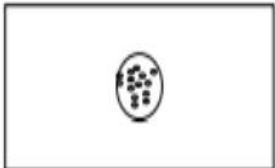
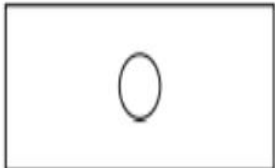
Bulles d'oxygène	Pas de bulle
La bactérie possède la catalase, elle est dite :	La bactérie ne possède pas la catalase, elle est dite :
Catalase + 	Catalase - 

Figure 14. Lecture du résultat du test de la catalase (Guiraud, 1998).

II.6 Test des productions de Biosurfactants

Les bactéries ayant la capacité de dégrader les hydrocarbures ont la propriété de les émulsionner en solution pour produire des tensioactifs tels que les biosurfactants. Les cellules adhèrent à la matrice, réduisant la tension interfaciale entre les phases aqueuse et organique, augmentant ainsi la biodisponibilité et la biodégradation des hydrocarbures (Batista et al., 2006).

II.6.1 Indice d'émulsifications E24

L'indice d'émulsifications (E24) des différentes cultures bactériennes a été déterminé en ajoutant 2 ml d'éther de pétrole au même volume de suspension bactérienne. Après une agitation par le vortex pendant 2 minutes, le mélange a été maintenu à température ambiante pendant 24 heures avant la mesure. L'activité émulsifiante est calculée comme le pourcentage de la hauteur de la couche d'émulsion divisée par la hauteur totale de la colonne de liquide (Hassanshahian et al., 2012) comme suite :

$$E24 = \frac{\text{Hauteur couche émulsionnée}}{\text{Hauteur totale de la colonne}} * 100$$

II.6.2 Drop collapse test

Test d'effondrement de goutte a été réalisé en ajoutant 7 μl de pétrole brute dans chaque puits d'une plaque de microtitration à 96 puits. Le couvercle est équilibré 1 heure à température ambiante, puis ajouter 20 μl de culture bactérienne de chaque isolat à surface pétrole. Après une minute d'incubation, Si la goutte s'effondre, cela indique la présence de surfactant (résultat positif); si elle reste perlée, ceci indique l'absence de tensioactif (réaction négative). L'eau distillée stérile a utilisé comme contrôle négatif (**Bodour et Miller-Maier 1998; Mahjoubi et al., 2013**

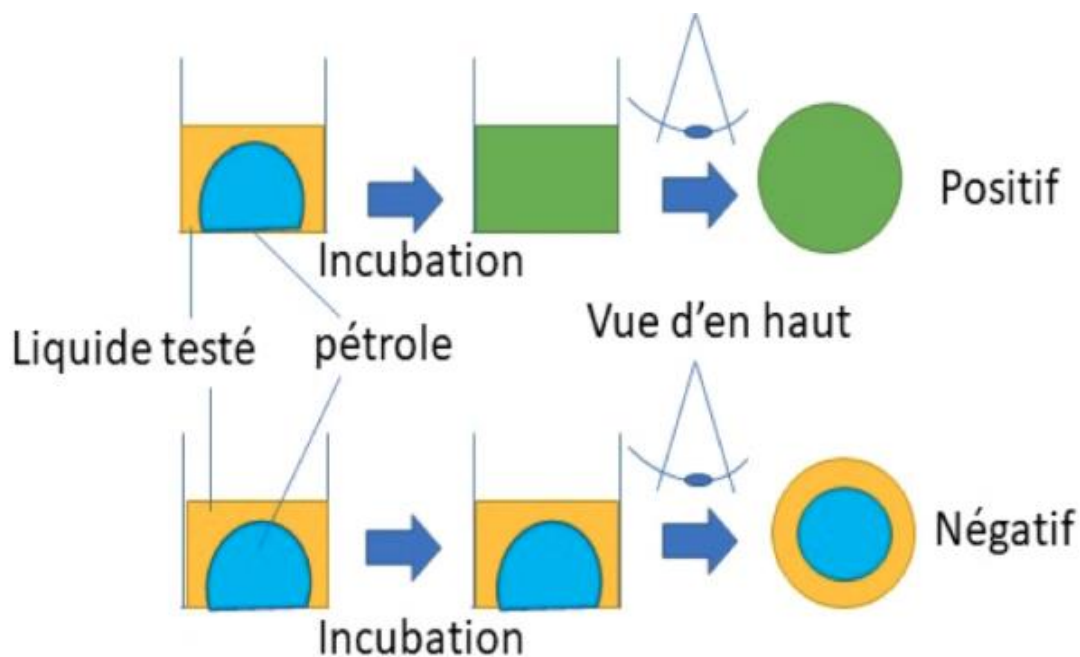


Figure 15. Schéma du test d'effondrement de la goutte (Djahnit,et al., 2019).

II.6.3 Test de déplacement

Mettre 20 ml d'eau distillée dans une boîte de Pétri vide (90 mm), 10 μl d'huile brute est ajouté à la surface de l'eau pour former une fine couche d'huile à la surface. L'étape suivante consiste à étaler 10 μl de la culture bactérienne à la surface de l'huile.

Mesurer le diamètre de la zone claire entourant la suspension bactérienne. Plus le diamètre est grand, plus le rendement en biosurfactant est important (**Cappello et al., 2016**).

II.7 Test de l'halotolérance

Dans le but d'étudier la capacité des souches à s'adapter à différentes concentrations de salinité, 5 milieux ONR7 ont été préparés en faisant varier les concentrations de NaCl de 10

g/L à 20, 30, 40 à 50 g/L. Inoculer ensuite 100 μL de chaque suspension bactérienne dans le tube à essai contenant 5 ml de milieu ONR7, et ajouter 50 μL d'hexadécane $\text{C}_{16}\text{H}_{34}$.

Les souches sont ensuiteensemencées dans les 5 milieux et les tubes placés dans un bain-marie agitateur pendant 10 jours à 30°C. Un blanc est préparé pour être utilisé comme témoin négatif et est soumis aux mêmes conditions. À la fin de l'incubation ; l'absorbance des échantillons a été mesurée à une longueur d'onde de 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (UV-Visible JASCO V-730).

II.8 La croissance des bactéries sur différentes sources de carbone

Dans un tube à essai stérile,ensemencer 100 μL de suspension bactérienne dans 5 ml de milieu ONR7a, puis ajouter 50 μL d'hydrocarbure (1% v/v). Dans cette étude, 4 sources de carbone différentes ont été utilisées, deux composés aliphatiques étaient l'hexadécane et l'octadécane, et les deux autres composés aromatiques étaient le benzène et le toluène.

Des blancs ont été préparés pour chaque source de carbone et les tubes ont été soumis aux mêmes conditions. Les tubes ont ensuite été placés dans un bain-marie agitateur à une température de 30°C pendant une semaine. A la fin de cette période, l'absorbance par rapport au blanc est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (UV-Vis JASCO V-730) à une longueur d'onde de $\lambda = 600$.

II.9 La croissance bactérienne sur différentes mesures des paramètres du pH et de la température

Afin d'étudier la capacité des souches bactériennes à s'adapter aux différentes variations du pH et de la température, différents milieux ONR7 ont été préparés en faisant varier les valeurs du pH (4.5, 7.5 et 10.5) et de la température d'incubation (4, 20, 30 et 40 °C).

100 μL de chaque suspension bactérienne sont inoculées dans des tubes à essai contenant 5 ml de milieu, 50 μL d'hexadécane $\text{C}_{16}\text{H}_{34}$ sont additionnés ensemencer les souches dans 5 milieux. Les tubes sont placés dans un bain-marie agitateur pendant une semaine à 30°C pour l'étude de la variation du pH et aux différentes températures (4, 20, 30 et 40 °C) pour l'étude de la variation de la température.

Un blanc est préparé pour être utilisé comme témoin négatif et est soumis aux mêmes conditions. Finalement L'absorbance des échantillons a été mesurée à une longueur d'onde de $\lambda = 600$ nm à l'aide d'un spectrophotomètre (UV-Visible JASCO V-730).

Chapitre III

Résultats et Discussion

Chapitre III : Résultats et Discussion

III.1 Paramètres physico-chimiques des échantillons

Afin d'évaluer la qualité des eaux et des sédiments marins du port d'El Djamila (la Madrague), des échantillons d'eau de mer (2 échantillons) et de sédiment (2 échantillons) ont été prélevés durant le mois d'Avril 2022, une détermination d'un certain nombre de paramètres physico-chimiques, a été établie.

Les paramètres physico-chimiques testés sont le pH, la salinité, la température (T°), et la matière en suspension (MES) sont récapitulés dans le tableau.

Tableau 4. Principaux paramètres physico-chimiques des échantillons.

Paramètres	pH	T°C	Salinité psu	Oxygène dissous mg/l	MES mg/l
Station 1	8.22	19.9	34.6	4.8	30.2
Station 2	8.20	21.2	34.6	4.7	28.4

- Les valeurs du pH dans l'ensemble des deux stations sont comprises entre 8,20 et 8,22. Ces valeurs sont homogènes par rapport à la valeur moyenne dans les eaux méditerranéennes qui est de 8,2 et par rapport à la valeur moyenne dans les eaux de surface obtenues par (Oussadit et Saadi, 2012). qui ont trouvé une moyenne du pH de 8,24. Cependant ces résultats restent dans les limites fixées par la législation algérienne pour les eaux de mer (pH de 6 à 8) (JORA, 2006). avec une température de 19.9 C° dans la station 1 et de 21.2 C° pour la station 2, reflétant les conditions météorologiques des périodes saisonnières printanières
- Les salinités en surface ont été égales à 34.6 psu au niveau des deux stations. Ces valeurs sont inférieures comparés aux salinités de l'eau de mer et à celles obtenues par (Kina et Rahal, 2009). Qui ont trouvé une moyenne de 36,75± 0,63psu. Ceci est peut-être à un effet de dilution survenu à cause des journées pluvieuses avant la sortie.
- Les teneurs moyennes en matière en suspension (MES) au niveau du port varient entre 28.4 et 30.2 mg/l. Ces valeurs obtenues sont très faibles comparées à celles obtenues habituellement au niveau des ports qui sont chargés en MES. Nous suspectons un dysfonctionnement au niveau de la balance utilisée pour la pesée des filtres, du fait que l'échantillon a été chargé en matière en suspension (observation visuelle).
- En surface, les résultats trouvés pour la teneur en oxygène dissous, exprimée en mg d'O₂/l, sont comprises entre 4.7 mg/l (station 2) et 4.8 mg/l (la station 1). Selon (Kina et Rahal,

2009), en hiver les teneurs en oxygène dissous sont plus faibles que celle obtenu de l'automne et ne présente pas une grande variation entre celle qui ont obtenu en surface et en profondeur. Malgré la faible profondeur ces teneurs reste inférieure par rapport à la valeur minimum (8.04 mg/l) obtenu en surface dans l'étude de (Kina et Rahal, 2009), Ce qui ne concorde pas avec nos résultats.

III.2 Caractérisation morphologiques des bactéries isolées

Les étapes d'enrichissement et de purification nous ont permis d'obtenir une collection de 71 souches bactériennes provenant des échantillons contaminés d'eau de mer et de sédiments (48 souche de l'échantillon non d'élué 10^{-2} en totale) et (23 souche de l'échantillon d'élué 10^{-4} en totale) dans les deux stations, pendant une période d'incubation allant de 72h à une semaine jusqu'à 20 jours, une température de 30°C sur du milieu de culture ONR7 Agar. Parmi cette collection, 12 souches bactériennes ont été sélectionnées pour une identification plus poussée. Cette sélection basée sur le fait que ces bactéries avait bien poussé au départ, car certain bactéries n'arrive pas à pousser dû à un stress lors du transport de l'échantillon, pour chaque station on a sélectionné deux souches bactérienne de l'échantillon sédiment, quatre souches de l'échantillon d'eau de mer (deux souches pour l'échantillon d'eau non d'élué 10^{-2} et l'échantillon d'eau d'élué 10^{-4}), (tableau 5).

Tableau 5. Signification des codes de chaque souche bactérienne

Code de la souche	Source, Signification	Station
SS1B	Sédiment, souche bactérienne 1	Station 2
SS2B	Sédiment, souche bactérienne 2	Station 2
ES1B	Eau de mer, souche bactérienne 1	Station 1
ES2B	Eau de mer, souche bactérienne 2	Station 1
ES3B	Eau de mer, souche bactérienne 3	Station 2
ES4B	Eau de mer, souche bactérienne 4	Station 2
ES5B	Eau de mer, souche bactérienne 5	Station 2
ES6B	Eau de mer, souche bactérienne 6	Station 2
SS3B	Sédiment, souche bactérienne 3	Station 1
SS4B	Sédiment, souche bactérienne 4	Station 1
ES7B	Eau de mer, souche bactérienne 7	Station 1
ES8B	Eau de mer, souche bactérienne 8	Station 1

On a étudié l'aspect morphologique et la couleur des colonies qui se sont formées. Les caractères morphologiques des isolats sélectionnés sont résumés dans le tableau 6.

La majorité des souches sélectionnées ont un aspect circulaire crémeux, avec un contour régulier et sont convexe avec des tailles qui varient de petites à moyennes (diamètre entre 0,9 et 1.8 mm), à croissance relativement lente.

Tableau 6. Caractères macroscopiques des souches sur milieu ONR7a solide

Code de la souche	Aspect morphologique	Couleur	Diamètre (mm)
SS1B	Circulaire, contour régulier, convexe, opaque	Jaune	1.0 mm
SS2B	Circulaire, contour irrégulier, convexe, translucide	Transparente	1.2 mm
ES1B	Circulaire, contour régulier, convexe, opaque, lisse	Blanche	1.3 mm
ES2B	Circulaire, contour régulier, convexe, opaque, lisse	Blanche	1.0 mm
ES3B	Circulaire, contour régulier, convexe, opaque	Jaunâtre	1.5 mm
ES4B	Circulaire, contour régulier, convexe, opaque	Beige	1.8 mm
ES5B	Circulaire, contour régulier, convexe, opaque, lisse	Jaune	1.7 mm
ES6B	Circulaire, contour régulier, convexe, opaque	Beige	1.7 mm
SS3B	Circulaire, contour régulier, convexe, opaque, lisse	Jaune	1.1 mm
SS4B	Circulaire, contour régulier, convexe, opaque	Blanche	1.0 mm
ES7B	Circulaire, contour régulier, convexe, opaque, lisse	Jaune	1.1 mm
ES8B	Circulaire, contour régulier, aplati, opaque	Orangé-rouge	1.2 mm

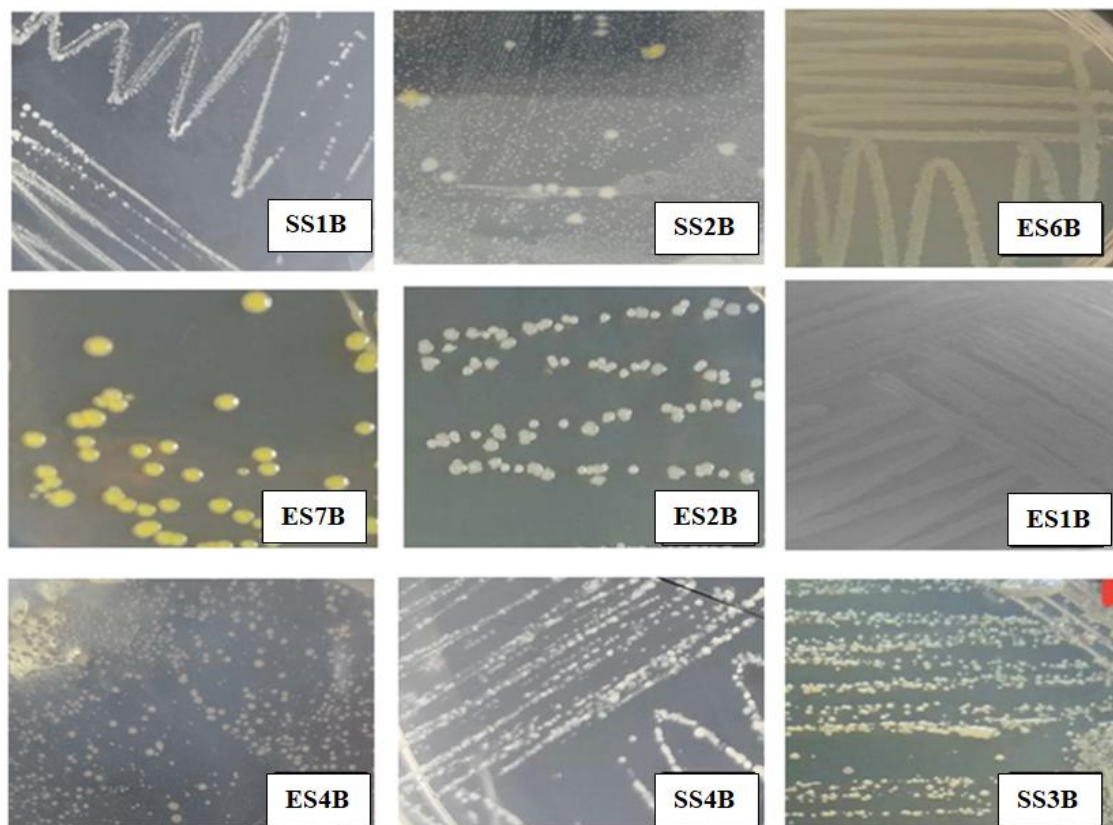


Figure 16. quelques aspects macroscopiques des souches étudiées.

III.3 Caractérisation biochimique des souches bactériennes isolées

Cet ensemble d'expériences est dans le but d'étudier les différents mécanismes qui permettent aux bactéries de non seulement survivre dans le milieu marin, mais aussi de se défendre contre les différents forme de la pollution par les hydrocarbures. L'objectif étant de mettre en évidence ce qui permet à de telles bactéries d'être performantes dans la dégradation des hydrocarbures dans le milieu marin par rapport à d'autres.

III.3.1 Coloration de Gram

Toutes les souches bactériennes sélectionnées (12 souches) sont des Gram – (tableau 7). Cette étude a montré la prédominance des bactéries Gram négatif ce qui est en accord avec les résultats décrits dans la littérature (Juhasz et Naidu, 2000 ; Hagström et al., 2002; Roling et al., 2002 ; Chouari, 2003; Margesin et al., 2003; Gargouri et al., 2012; M'Rassi, 2014). Selon Pelmont (1995) les bactéries aptes à biodégrader les hydrocarbures sont majoritairement des bacilles Gram négatif. Ces bactéries sont moins sensibles aux composés toxiques que les bactéries à Gram positif (**Stancu et grifoll, 2011**).

Tableau 7. Résultats de la coloration de Gram.

Code de la souche	Résultat du test Gram	Forme
SS1B	-	Bacille
SS2B	-	Cocci
ES1B	-	Bacille
ES2B	-	Cocci
ES3B	-	Bacille
ES4B	-	Bacille
ES5B	-	Bacille
ES6B	-	Bacille
SS3B	-	Bacille
SS4B	-	Bacille
ES7B	-	Bacille
ES8B	-	Bacille

III.3.2 Test de l'oxydase

La recherche de l'oxydase est un des critères les plus utilisés pour l'identification des bactéries, surtout celle des bacilles à Gram négatif. Le test consiste à démontrer la capacité des bactéries testées à oxyder la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine, en sa forme oxydée rose pourpre à l'aide d'une enzyme appelée phénylène diamine oxydase. Pour ce test on a obtenus des résultats positifs pour les souches SS1B, SS2B et ES1B, ES7B, même pour les souches ES4B et SS3B, SS4B. Contrairement aux bactéries, ES2B, ES3B, et aux bactériennes ES5B, ES6B, ES8B, qui ont montrées l'incapacité à oxyder le dérivés méthylés du paraphénylène diamine ce qui a résulté en un test négatif, tableau 8.

Tableau 8. Résultats du test oxydase.

Code de la souche	Résultat du test Oxydase
SS1B	+
SS2B	+
ES1B	+
ES2B	-

ES3B	-
ES4B	+
ES5B	-
ES6B	-
SS3B	+
SS4B	+
ES7B	+
ES8B	-

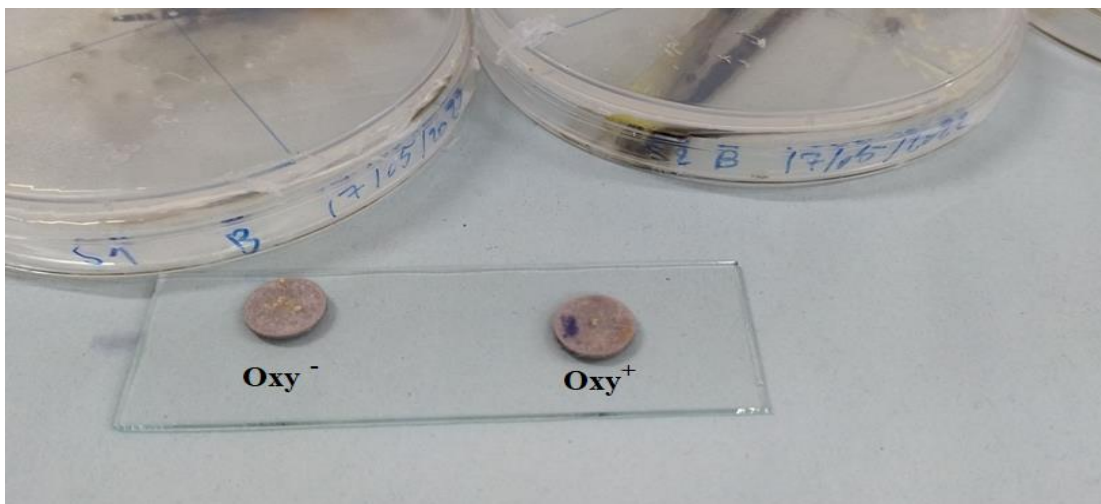


Figure 17. Aspect d'un résultat du test d'oxydase

III.3.3 Test de la catalase

Le tableau (09) résume les résultats obtenus pour ce test par les douze bactéries sélectionnées, Le résultat revient positif pour la plupart des souches à l'exception des souches SS1B, ES2B, ES6B ce qui signifie que ces trois bactéries n'ont pas la capacité de produire l'enzyme catalase.

La présence de l'enzyme catalase chez une souche bactérienne pure, permet une première orientation dans l'identification de celle-ci, car du fait de la production de l'oxygène par la catalase, elle est absente chez les bactéries anaérobies strictes.

Ce test est donc utile pour différencier entre les bactéries aérobies et anaérobies obligatoires,

Tableau 9. Résultats du test catalase.

Code de la souche	Résultat du test Catalase
SS1B	-
SS2B	+
ES1B	+
ES2B	-
ES3B	+
ES4B	+
ES5B	+
ES6B	-
SS3B	+
SS4B	+
ES7B	+
ES8B	+



Figure 18. Formation de bulles lors d'un test catalase positif.

III.4 Teste de production de Biosurfactants

De nombreuses bactéries sont capables de produire une large gamme de produits extracellulaires aux propriétés et applications multiples, connus sous le nom des biosurfactants, qui augmentent l'adhérence des cellules au substrat (**Banat, 1995**).

Les biosurfactants sont l'un de ces composés amphiphiles extracellulaires produits par les bactéries, les levures et les champignons, en particulier lorsqu'ils sont cultivés sur des substrats hydrophobes. Leur mécanisme d'action réside dans l'accumulation à l'interface de composés non miscibles, réduisant la tension superficielle et en augmentant leur surface; cela conduit à une biodisponibilité plus élevée qui facilite la dégradation des polluants (**Batista et al., 2006**). Plusieurs méthodes différentes sont utilisées pour étudier les biosurfactants, parmi eux on a choisi trois méthodes différentes qui ont pour objectif, la mise en évidence et la quantification des biosurfactants produits par les micro-organismes. Dans cette étude, la capacité à produire des biosurfactants a été vérifiée avec ces méthodes: le test d'effondrement des gouttes « drop collapse test », le teste de déplacement et l'activité d'émulsification (E24).

III.4.1 Indice d'émulsifications E24

L'indice d'émulsification E24 et l'activité d'émulsification sont des tests de dépistage pour mesurer la capacité d'émulsification de toute molécule tensioactive avec différents hydrocarbures (**Jagtap et al., 2010**).

Tableau 10. Pourcentage d'émulsifications E24.

Code de la souche	Pourcentage d'émulsification (%)
SS1B	0
SS2B	42
ES1B	0
ES2B	50
ES3B	45
ES4B	33
ES5B	14
ES6B	14
SS3B	14
SS4B	14
ES7B	40
ES8B	9

Selon les résultats obtenus on s'aperçoit que la souche ES2B est la plus active en terme de production de biosurfactants de toutes nos bactéries avec un indice d'émulsification de 50 %, suivie par les souches ES3B, SS2B, ES7B qui ont montrées des pourcentage d'émulsification de 45,42,40% respectivement, et 33% pour la souche bactérienne ES4B.

Les souches ES5B, ES6B, SS3B, SS4B ont manifesté un pourcentage d'émulsification moyen de 14% respectivement, et la souche ES8B montre une activité plus faible avec un pourcentage d'émulsification égale à 9%. En parallèle on trouve que les bactéries SS1B et ES1B n'ont pas la capacité d'émulsifier les molécules tensioactives, et ne présentent aucune activité d'émulsification.

Cet indice augmente avec la production de biosurfactant et le taux de croissance bactérienne, ce qui représente la capacité de dégradation de la bactérie (Ebadi et al., 2021).

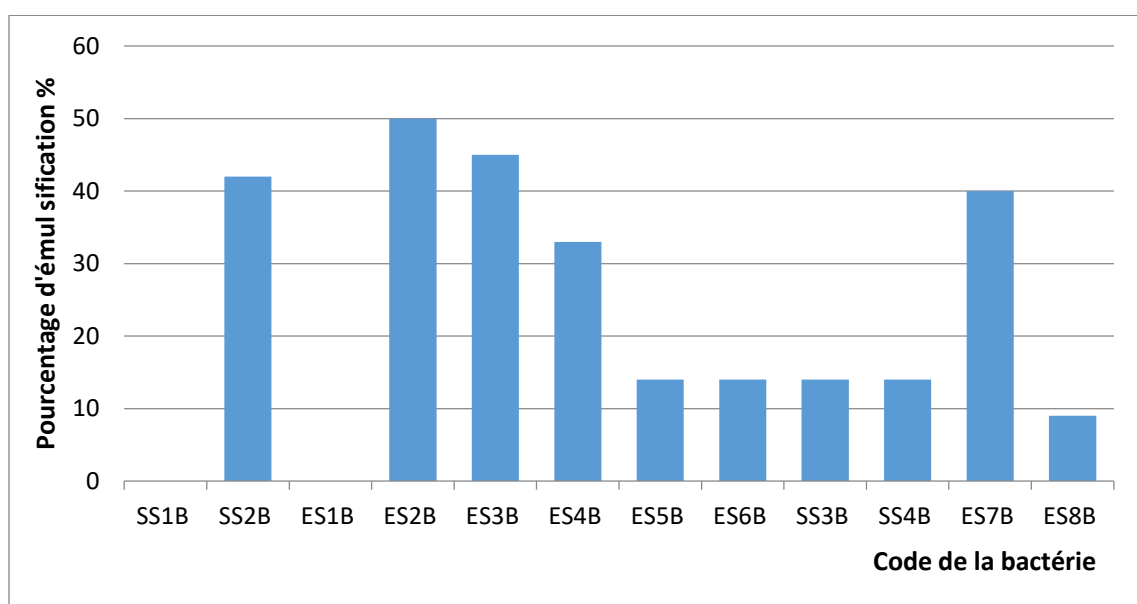


Figure 19. Histogramme représentant l'indice d'émulsification E24.

III.4.2 Drop collapse teste

La méthode du drop collapse est une méthode sensible à la présence des biosurfactants et facile à réaliser, elle nécessite qu'un petit volume (~5µl) de culture bactérienne ou de solution de biosurfactants pour tester la propriété du tensioactif.

Parmi les 12 souches examinées, 5(41,6%) étaient positives pour le « Drop collapse test », Les résultats trouvés du drop collapse test étaient positifs pour les puits contenant les bactéries SS2B, ES2B, ES3B, ES4B, ES7B à l'exception du blanc qui est dépourvu de suspension bactérienne et les puits contenant les bactéries SS1B, ES1B, ES5B, ES6B, SS3B, SS4B,

ES8B ce test ne permet qu'une mise en évidence et non pas la quantification des biosurfactants.

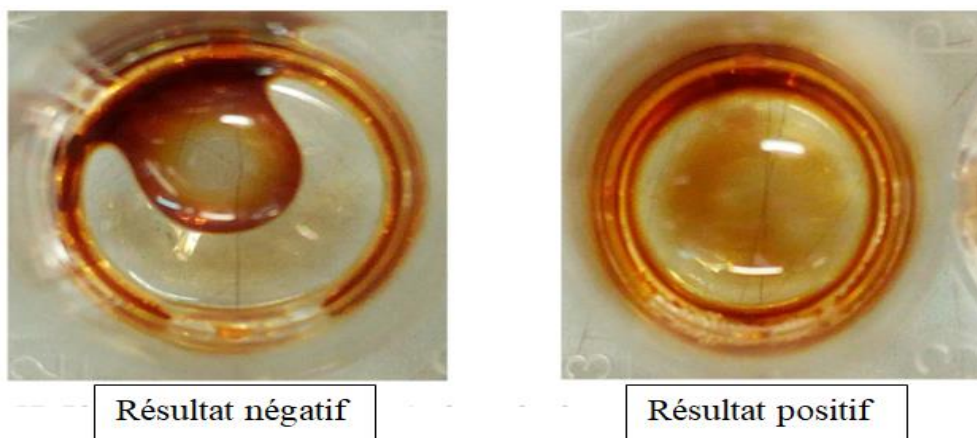


Figure 20. Photos représentant les résultats du drop collapse test sur microplaque.

Tableau 11. Résultat du Drop Collapse Test.

Code de la souche	drop collapse
SS1B	-
SS2B	+
ES1B	-
ES2B	+
ES3B	+
ES4B	+
ES5B	-
ES6B	-
SS3B	-
SS4B	-
ES7B	+
ES8B	-
Témoin	-

III.4.3 Teste de déplacement

La méthode de « déplacement de pétrole » a été utilisée pour quantifier la production des biosurfactants par les bactéries hydrocarbonoclastes, et détecter la faible production de biosurfactants. Ce test consiste à détecter le diamètre de la zone claire qui est proportionnelle à la concentration en biosurfactant (Youssef et al., 2004).

Cette méthode elle est très simple à réaliser et ne nécessite pas d'équipement spécialisé ou de produits chimiques, mais elle s'est avérée plus rapide et plus fiable que les autres méthodes (Zhao et al., 2011).

Les résultats obtenus au cours de ce test montrent qu'on a cinq bactéries qui ont dépassé les 1 cm de diamètre, qu'on considère comme étant de fortes productrices de biosurfactants, ces bactéries sont SS2B, ES2B, ES3B, ES4B, ES7B. Les bactéries hautement productrices ayant montré un diamètre de 2 cm ou plus lors du test de déplacement d'huile étaient ES2B, ES3B, ES7B. Nos résultats indiquent également que les différentes bactéries isolées, ne produisent pas la même quantité de biosurfactant. En fait, plusieurs isolats négatifs au drop collapse test, ont été révélés positifs par la méthode de déplacement de pétrole tel qu'ES5B, ES6B et SS3B, SS4B, (tableau 12).

Tableau 12. Résultat du test de déplacement.

Code de la souche	Déplacement (cm)
SS1B	0,3
SS2B	1,7
ES1B	0
ES2B	2,3
ES3B	2
ES4B	1,4
ES5B	0,9
ES6B	0,5
SS3B	0,7
SS4B	0,6
ES7B	2,1
ES8B	0
Témoin	0

Les résultats obtenus par ces trois méthodes de détection et quantification des biosurfactants, montrent que les souches bactériennes SS2B, ES2B, ES3B, ES7B sont les plus performantes en terme de production des biosurfactants,(tableau 13). Nos résultats sont en corroboration les uns avec les autres, on n'a pas eu de résultats contradictoires entre ces tests ce qui est en accord avec les résultats obtenus par (Thavasi et al.,2011).

Dans certaines recherches, il a été trouvé que des résultats contradictoires pouvaient être enregistrés entre différentes méthodes de détection et de quantification des biosurfactants. Cela pourrait expliquer par le fait que certaines cellules bactériennes agissent elles-mêmes comme des biosurfactants et présentent une hydrophobie cellulaire élevée, mais ne produisent pas de biosurfactants extracellulaires (Hommel, 1994).

Tableau 13. Les résultats des méthodes de détection et quantification des biosurfactants.

Code de la souche	Pourcentage d'émulsification (%)	drop collapse	Déplacement (cm)
SS1B	0	-	0,3
SS2B	42	+	1,7
ES1B	0	-	0
ES2B	50	+	2,3
ES3B	45	+	2
ES4B	33	+	1,4
ES5B	14	-	0,9
ES6B	14	-	0,5
SS3B	14	-	0,7
SS4B	14	-	0,6
ES7B	40	+	2,1
ES8B	9	-	0

III.5 Test de l'halotolérance

Nos résultats obtenus indiquent que pour la majorité de nos bactéries ont un optimum de croissance dans les milieux dont la concentration en NaCl est de (30 g/L), et qu'en s'éloignant de ce optimum que ça soit en augmentant ou en réduisant la salinité du milieu, on observe une diminution de la croissance bactérienne, (tableau 14). À l'exception des bactéries SS2B, ES6B, ES8B respectivement, pour lesquelles le maximum de croissance a été enregistré à (30-40 g/L) de NaCl.

Tableau 14. La croissance bactérienne en fonction de la concentration en NaCl.

Code de la souche	Longueur d'onde à $\lambda = 600$ nm (7 jours d'incubation)				
	10 g/L	20 g/L	30 g/L	40 g/L	50 g/L
SS1B	0,088	0,189	0,333	0,21	0,089

SS2B	0,075	0,301	1,023	0,757	0,111
ES1B	0,154	0,189	0,342	0,089	0,051
ES2B	0,284	0,695	1,208	0,433	0,171
ES3B	0,331	0,802	1,012	0,566	0,584
ES4B	0,155	0,667	0,766	0,221	0,217
ES5B	0,188	0,332	0,366	0,22	0,065
ES6B	0,227	0,442	0,554	0,312	0,021
SS3B	0,093	0,266	0,235	0,195	0,098
SS4B	0,021	0,311	0,666	0,114	0,065
ES7B	0,198	0,573	0,812	0,245	0,261
ES8B	0,065	0,192	0,326	0,276	0,004
Témoin	0,001	0,01	0,002	0,011	0,002

En parallèle, une faible croissance bactérienne dans les milieux supplémentés de 10 g/L de NaCl pour toutes les bactéries testées, figure 21.

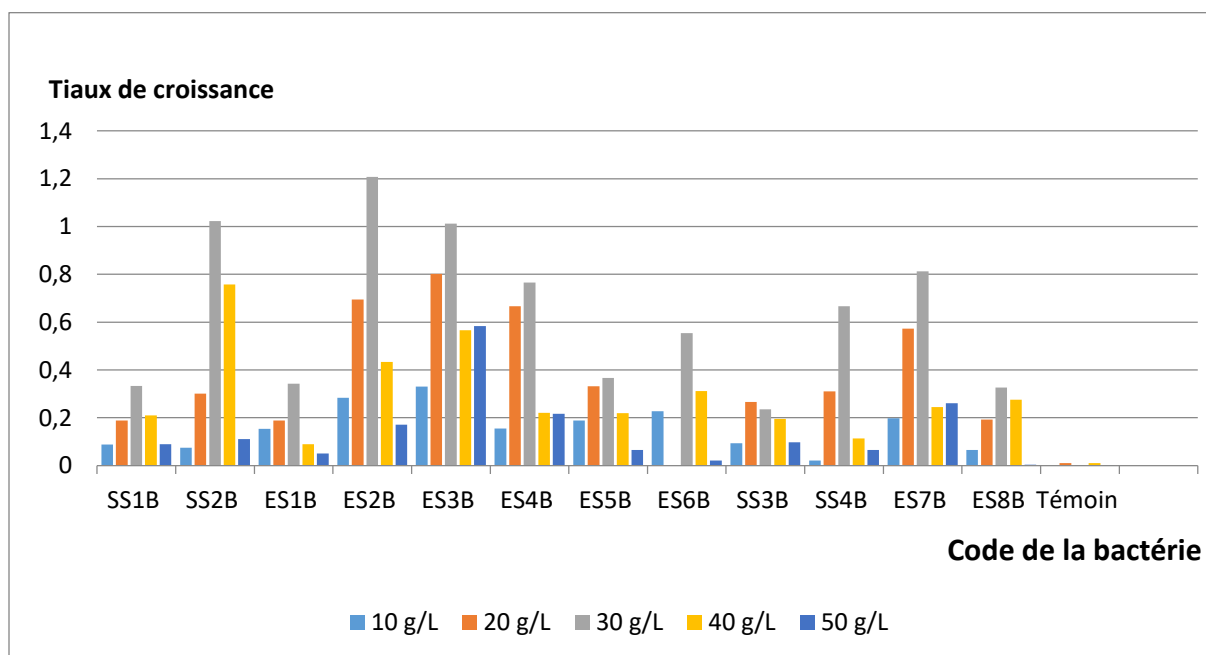


Figure 21. Histogramme montrant la croissance bactérienne en fonction de la concentration en NaCl.

Ces résultats sont logiques, du fait que ces taux de salinité se rapproches le plus de la salinité de l'eau de mer, qui est en moyenne de 35 PSU. Mais trop de NaCl a un effet toxique sur les bactéries, ce qui explique les faibles croissances obtenues dans les milieux dont la concentration en NaCl est de 50 g/L mais une croissance qui est tout de même présente ($DO > 0,1$). En revanche, le fait que ces bactéries ont pu pousser dans les différentes

concentrations de salinité, signifie qu'une solution de bioremédiation peut être élaborée quel que soit la salinité du milieu contaminé, en ajustant la composition des bactéries de façon à ce qu'elle corresponde à la salinité du milieu. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Bertrand et al (1993)**, **Reichelet et Baumann (1974)**, **Batouche et Boucedra (2021)**.

III.6 La croissance des bactéries sur différentes sources de carbone

Dans le but d'identifier si la composition des hydrocarbures avait un effet sur la croissance et le rendement des bactéries hydrocarbonoclastes, on a inoculé les bactéries dans des tubes à essais contenant un de ces 4 hydrocarbures comme unique source de carbone : l'hexadécane, l'octacosane, le toluène et le benzène. L'hexadécane et l'octacosane étant des alcanes à chaîne linéaire, ils sont définis en tant qu'hydrocarbures aliphatique, leurs formules chimiques sont respectivement $C_{16}H_{34}$ et $C_{28}H_{58}$.

Alors que le benzène et le toluène sont des hydrocarbures aromatiques, ces derniers ont un cycle benzène, qui est aussi appelé un anneau aromatique. Leurs formules chimiques sont respectivement C_6H_6 et C_7H_8 , tableau 15.

Tableau 15. Croissance bactérienne selon le type d'hydrocarbure.

Code de la souche	Longueur d'onde à $\lambda = 600$ nm (7jours d'incubation)			
	Héxadécane	Octacosane	Benzène	Toluène
SS1B	0,297	0,36	0,099	0,008
SS2B	0,819	0,62	0,169	0,102
ES1B	0,574	0,467	0,098	0,012
ES2B	0,807	0,36	0,102	0,063
ES3B	0,729	0,593	0,125	0,169
ES4B	0,636	0,285	0,101	0,123
ES5B	0,471	0,265	0,094	0,036
ES6B	0,665	0,313	0,025	0,022
SS3B	0,456	0,213	0,003	0,053
SS4B	0,636	0,32	0,084	0,078
ES7B	1.021	0,532	0,11	0,156
ES8B	0,125	0,111	0,039	0,032

Témoin	0,002	0,012	0,04	0,001
--------	-------	-------	------	-------

Selon les résultats de la densité optique obtenue après la période d'incubation à 30°C, il est assez clair que chacune des bactéries montre une croissance spécifique à chaque type d'hydrocarbure utilisé en tant que source de carbone unique.

Les bactéries montrent une croissance accrue (0.8 comme un maximum de croissance) dans les milieux où la source de carbone est un alcane à chaîne linéaire l'hexadécane. Alors que les souches ES7B et ES8B semblent préférer l'octadécane comme source de carbone.

Par contre on a observé une croissance réduite de toutes les bactéries sur les milieux ayant du benzène comme unique source de carbone. Néanmoins, les bactéries ES3B et ES7B ont montrées une croissance dans les milieux contenant des hydrocarbures aromatiques, croissance de 0.2 dans les milieux contenant du toluène, comme par exemple la bactérie SS2B qui a montré une bonne croissance dans les milieux contenant du benzène comme source de carbone, figure 22.

Ces résultats sont compatibles avec ceux trouvés par **Rajaei et al (2013)**, qui indiquent que les hydrocarbures aromatiques posent souvent des problèmes lors de la bioremédiation car ils sont beaucoup plus résistants à la biodégradation, qui peut être dû à l'expression de gènes spécifiques responsables de la dégradation des alcanes, et l'absence des gènes responsables de la dégradation des Hydrocarbures aromatiques chez ces bactéries.

Alors que la majorité des bactéries hydrocarbonoclastes, sont capables d'utiliser les hydrocarbures aliphatiques comme source de carbone et d'énergie, est le cas dans notre étude.

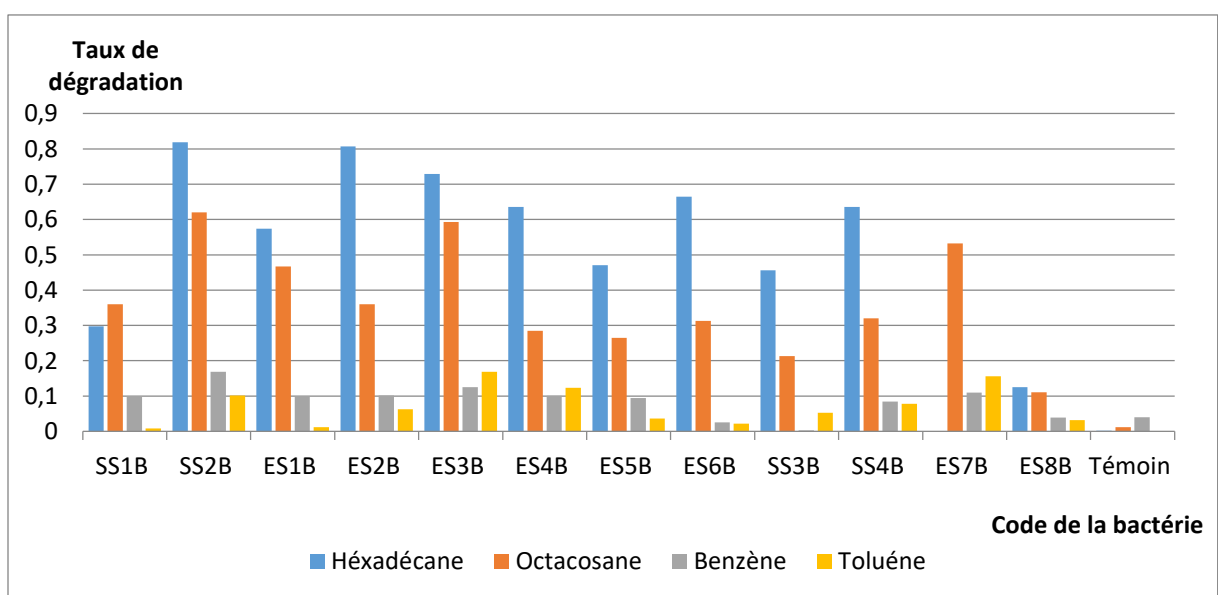


Figure 22. Histogramme représentant la croissance de chaque bactérie en fonction des différentes sources de carbone.

III.7 La croissance bactérienne sur différentes mesures de pH

Les résultats obtenus au niveau de cette étude, indiquent que tous les bactéries ont différents optimums de croissance, pour un pH est autour de la neutralité. Un maximum de croissance qui dépasse les 0.8 pour la bactérie ES3B dans pH =7.5, et à fur et à mesure qu'en s'éloignant de ces optimums que ça soit en augmentant ou en réduisant le pH du milieu, on observe une diminution de la croissance bactérienne, (tableau 16).

Tableau 16. Résultats montrent la croissance bactérienne selon la mesure de pH.

Code de la souche	Longueur d'onde à $\lambda = 600$ nm (7jours d'incubation)		
	pH=4,5	pH=7,5	pH=10,5
SS1B	0,141	0,34	0,003
SS2B	0,118	0,573	0,008
ES1B	0,138	0,15	0,066
ES2B	0,114	0,802	0,051
ES3B	0,34	0,866	0,015
ES4B	0,058	0,664	0,001
ES5B	0,144	0,433	0,003
ES6B	0,152	0,228	0,003
SS3B	0,065	0,594	0,016
SS4B	0,12	0,026	0,021
ES7B	0,111	0,816	0,072
ES8B	0,097	0,466	0,024
Témoin	0	0,001	0,002

On arrive aussi à remarquer que la bactérie SS4B semble préférer la croissance dans le milieu acide pH=4.5. Par contre, aucune croissance n'a été observée pour le blanc qui est dépourvu de bactérie, figure 23.

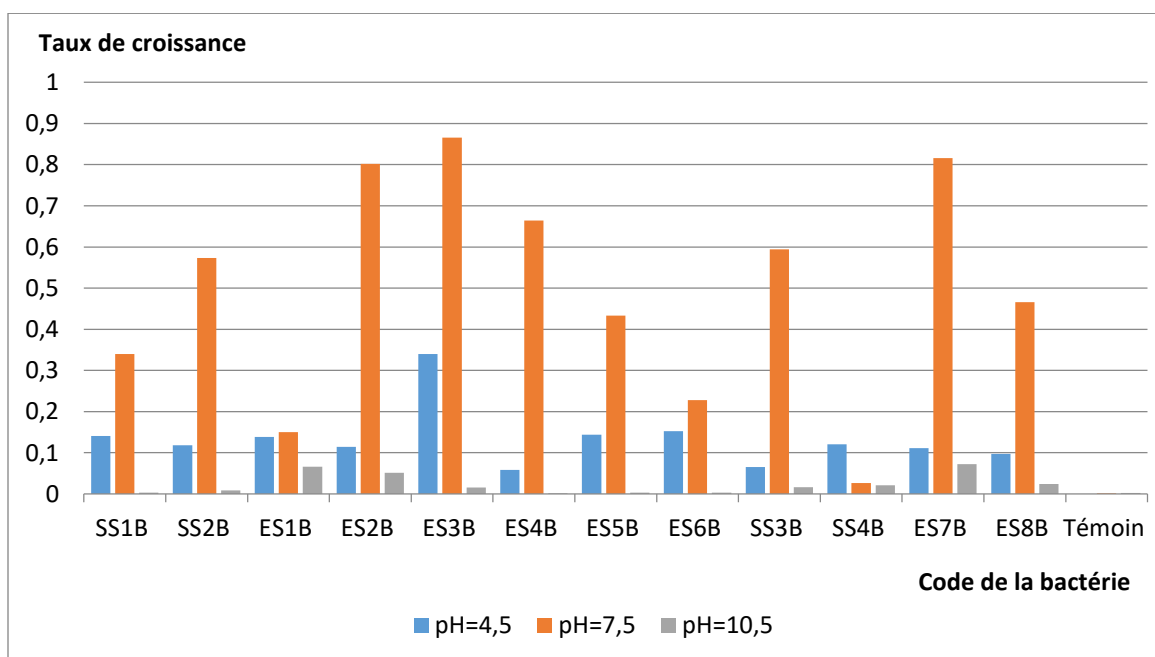


Figure 23. Histogramme représentant la croissance bactérienne selon différentes mesures de pH.

III.8 La croissance bactérienne sur différentes de température

Nos résultats obtenus, indiquent que la majorité des bactéries ont un optimum de croissance dans le milieu ou la température d'incubation est de 30 C°, tableau 17.

Tableau 17. Résultats de la croissance bactérienne selon la mesure de température.

Code de la souche	Longueur d'onde à $\lambda = 600$ nm (7jours d'incubation)			
	4°C	20°C	30°C	40°C
SS1B	0,167	0,169	0,199	0,017
SS2B	0,088	0,169	0,573	0,403
ES1B	0,021	0,049	0,594	0,221
ES2B	0,199	0,14	0,667	0,199
ES3B	0,002	0,649	0,695	0,33
ES4B	0,009	0,125	0,816	0,233
ES5B	0,087	0,125	0,85	0,111
ES6B	0,047	0,34	0,768	0,308
SS3B	0,03	0,189	0,351	0,199
SS4B	0,001	0,229	0,25	0,032

ES7B	0,001	0,324	1,124	0,233
ES8B	0,001	0,024	0,148	0,125
Témoin	0	0,001	0,001	0,001

On arrive aussi à remarquer que la croissance bactérienne est faible au fur et à mesure qu'en s'éloignent de cet optimum que ça soit en augmentant ou en réduisant la température du milieu, on observe une diminution de la croissance bactérienne.

En parallèle la bactérie ES3B, tolère aussi de croître dans une température de 20°C (dépassé 0.6 taux de croissance). Par contre, aucune croissance n'a été observée pour le blanc qui est dépourvu de bactérie, figure 24.

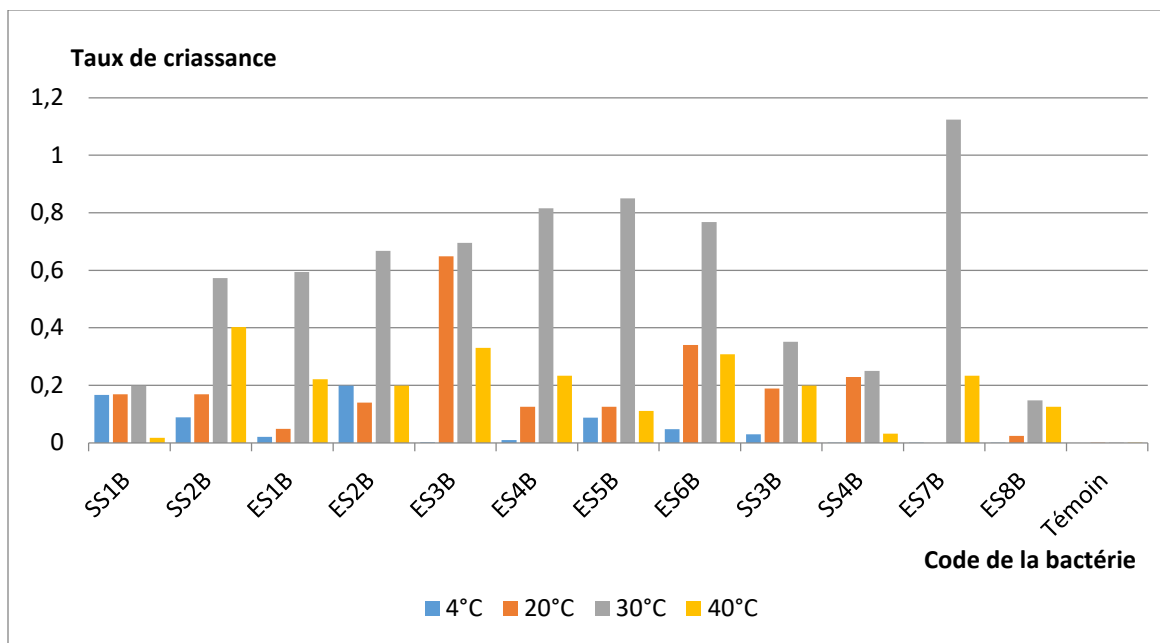


Figure 24. Histogramme représentant la croissance bactérienne selon différentes mesures de température.

CONCLUSION ET PERSPECTIVE

Conclusion et perspective

Le milieu marin côtier subit de nombreuses pollutions provenant de rejets directs (effluents urbains et industriels, déversements de pétrole...) et indirects (apports fluviaux et atmosphériques). Le littoral algérien y compris les ports souffre d'une pollution presque généralisée par les hydrocarbures pétroliers qui menace sérieusement les ressources naturelles existantes dans la région, car L'Algérie est l'un des trois principaux producteurs de pétrole en Afrique et ses côtes ont été fortement contaminées au cours des dernières années, menaçant le fonctionnement des écosystèmes.

La contamination des écosystèmes par le pétrole brut devient un problème environnemental majeur auquel sont confrontés les pays producteurs de pétrole en raison de sa forte exploitation, son raffinage, son stockage, transport ainsi que les accidents. De nombreux efforts ont été déployés pour isoler les bactéries dégradant les hydrocarbures dans les sédiments et l'eau de mer contaminés en mer Méditerranée. Ces recherches ont confirmé la présence de communautés microbiennes dégradant les hydrocarbures et présentent un fort potentiel de bioremédiation. Ces bactéries hydrocarbonoclastes se nourrissent typiquement des hydrocarbures, elles ont la capacité de produire des surfactants naturels qui stimulent l'accès à la source de carbone complexe pour un bon processus de bioremédiation de l'écosystème pollué.

L'objectif de notre travail visait à isoler des bactéries ayant la capacité de dégrader les hydrocarbures à partir d'une zone contaminée et de déterminer des critères que possèdent ces bactéries, et de suivre la production et la caractérisation des biosurfactants.

Notre étude a été menée sur des échantillons de sédiments et d'eau de mer de surface contaminées par les hydrocarbures provenant du port de plaisance et de pêche (la Madrague) de la ville de Ain Benian, Les prélèvements ont été réalisés au cours de la période Avril 2022 (quatre échantillons au total)

Le présent travail a porté sur l'isolement et la caractérisation des bactéries hydrocarbonoclastes. Les travaux de recherche ont été menés sur 71 souches bactériennes au totale avec l'examen de 12 souches.

Plusieurs points de conclusion peuvent être tirés:

- La majorité des souches utilisées sont des bacilles à Gram négatif appartenant aux différentes souches bactériennes.
- Selon les trois tests de mise en évidence et quantification des biosurfactants, les résultats montrent que toutes les souches bactériennes utilisées possèdent le pouvoir de produire les biosurfactant à des quantités différentes d'une bactérie à une autre.

- La croissance bactérienne en présence de différent type d'hydrocarbure, montre que la majorité des bactéries sont capables d'utiliser ces hydrocarbures comme unique source de carbone. Les hydrocarbures aliphatiques sont rapidement et facilement biodégradés par rapport aux hydrocarbures aromatiques.
- Nos résultats obtenus par cette étude, indiquent que pour la majorité de nos bactéries ont un optimum de croissance dans les milieux dont la concentration en NaCl est de 30 g/L, dans les milieux où le pH est autour de la neutralité. Un optimum de croissance ou la température d'incubation est de 30 C°, et qu'en s'éloignant de ces optimums, on observe une diminution de la croissance bactérienne.
- Les bactéries SS2B, ES2B, ES3B, ES7B pourraient être utilisées dans la biodégradation, car elles ont montré qu'elles sont les plus performantes dans nos tests.

A l'issue de notre travail de recherche, les principales perspectives de recherche qui pourraient être mises en œuvre afin de compléter, approfondir et renforcer les résultats obtenus, seraient de plusieurs types :

- Pour d'approfondir cette étude il serait intéressant d'effectuer une étude d'identification et classification taxonomique des souches bactériennes et d'étudier leur pouvoir de biodégradation.
- Dans le but d'améliorer la production des biosurfactants, il serait intéressant de faire une expression hétérologue des gènes codant pour la synthèse des biosurfactants dans différents systèmes d'expression. Le séquençage des génomes complets des souches isolées, permettra d'identifier les gènes responsables de la biodégradation et la production des biosurfactants.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

Amer, R.A., Mapelli, F., et al. (2015). Bacterial diversity and bioremediation potential of the highly contaminated marine sediments at El-Max district (Egypt, Mediterranean Sea). *BioMed research international*, p.p.200-212.

Aminaut, A., Chaussepied, M., (1983). Manuel des analyses chimiques en milieu marin. Paris: Centre National pour l'Exploitation des Océans, p.p.383-395.

AIE. (2020). Les quatre nouveaux piliers de la politique économique face aux crises énergétique et climatique. [En ligne]. [Consulté le 10/05/2022]. Disponible sur le web: <https://www.connaissancedesenergies.org/laie-publie-ledition-2020-de-ses-key-world-energy-statistics-220218>.

ANPE. (2012). Manuel de procédures du pniu pour lutter contre les évènements de pollution marine. Rapport d'activité. document non publié. Alger: ANPE.

Atlas, R. M., (1991). Microbial hydrocarbon degradation—bioremediation of oil spills. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 52(2), p.p. 149-156.

Azubuiké, C. C., Chikere, C. B., Okpokwasili, G. C., (2016). Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11), p.p.1-18.

B

Bamforth, S.M., Singleton, I., (2005). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80(7), p.p.723-736.

Banat, I.M., (1995). Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. *Bioresource technology*, 51(1), pp.1-12.

Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S., (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, 53(5), p.p.495-508.

Banat, I.M., De Rienzo, M.A.D., Quinn, G.A., (2014). Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(24), p.p.9915-9929.

- Batista, S.B., Munteer, A.H., Amorim, F.R., Totola, M.R., (2006).** Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource technology*, 97(6), p.p.868-875.
- Batouche, A., Boucedra, N., (2021).** Caractérisation des bactéries marines dégradant les différentes fractions du pétrole. Mémoire de fin d'études. p.62-64.
- Bertrand, J.C., Caumette, P., et al. (1989).** Anaerobic biodegradation of hydrocarbons. *Science Progress (1933-)*, 73(3 (291)), p.p.333-350.
- Bertrand, J.-C., Mille, G.,(1989).** Devenir de la matière organique exogène. Un modèle: les hydrocarbures. *Microorganismes dans les écosystèmes océaniques*. Paris :Masson, Chapitre, 13, p.p.343-385.
- Bertrand, J.C., Bianchi, M., et al. (1993).** Hydrocarbon biodegradation and hydrocarbonoclastic bacterial communities composition grown in seawater as a function of sodium chloride concentration. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 168(1), p.p.125-138.
- Bianchi, A., Jacq, V., Bensoussan, M.,(1988).** La géochimie organique des sédiments marins profonds. Mission Orgon I. 1974 (Mer de Norvège). 1.4. Distribution des populations bactériennes hétérotrophes dans les sédiments et dans les eaux proches du fond en mer de Norvège. *Rev. Inst. Fr. Pet.*, 30: p.p.204-211.
- Blumer, M., (1957).** Removal of elemental sulphur from hydrocarbon fractions. *Anal. Chem.*, 29: p.p.1039-1041.
- Blumer, M., Guillard, R.R.L., Chase, T., (1971).** Hydrocarbons of marine phytoplankton. *Mar. Biol.*, 8: p.p.183-189.
- Britton, L.N., (1984).** Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. *Microbial degradation of organic compounds.*, p.p.89-129.
- Bodour, A.A., Miller-Maier, R.M., (1998).** Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 32(3), p.p.273-280.
- Bodour, A.A., Drees, K.P., Maier, R.M.,(2003).** Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Applied and environmental microbiology*, 69(6), p.p. 3280-3287.
- Boopathy, R.,(2000).** Factors Limiting Bioremediation Technologies. *Bioresource Technology*. [En ligne]. [Consulté le 10/05/2022]. Disponible sur le web: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00144-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00144-3).
- Bossard, I., Bartha, R.,(1984).** The fate of petroleum in soil ecosystems. In: Atlas, R.M. (Ed.), *Petroleum Microbiology*. New York: Macmillan, p.p. 440-445.

Bouaziz. T., Djerrai.N.,(2010). Etude des caractéristiques physicochimiques et Bactériologiques des eaux de mer et des sédiments dans le port de plaisance de Sidi Fredj. Mémoire d'ingénieur. Environnement marin. Alger : ENSSMAL. p.p. 35-39.

C

Cappello, S., Volta, A., et al. (2016). Oil-degrading bacteria from a membrane bioreactor (BF-MBR) system for treatment of saline oily waste: Isolation, identification and characterization of the biotechnological potential. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 110, p.p.235-244.

Cerniglia, C.E., (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current opinion in biotechnology*, 4(3), p.p.331-338.

Chandra, S., Sharma, R., Singh, K.,Sharma, A., (2013). Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. *Annals of microbiology*, 63(2), p.p.417-431.

Chikere, C.B., Chikere, B.O.,Okpokwasili, G.C., (2011). Bioreactor-based bioremediation of hydrocarbon-polluted Niger Delta marine sediment, Nigeria. *3 Biotech*, 2(1), p.p.53-66.

Chouari, R., Le Paslier, D., et al. (2003). Molecular evidence for novel planctomycete diversity in a municipal wastewater treatment plant. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(12), p.p.7354-7363.

Chroma, L., Mackova, M., et al. (2002.) Enzymes in plant metabolism of PCBs and PAHs. *Acta biotechnologica*, 22(1-2), p.p.35-41.

Cojan I., Renard M., (1997). Sédimentologie. Paris: Dunod, p. 481.

Colombano, S., V. Guerin, A. Saada, D. Hiez ,H. Bomer.,(2008). Journée Technique d'information et de retour d'expérience de la gestion des sols pollués. Les Diagnostiques - Objectifs, enjeux & moyens. IN Gouvernement de France, ministère de l'Écologie, du Développement durable et de l'Énergie.[En ligne]. [Consulté le 01/07/2022]. Disponible sur le web:http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/etude_de_cas_TAUW.pdf.

Coulon, F., McKew, B.A., Osborn, A.M., McGenity, T.J. ,Timmis, K.N.,(2007). Effects of temperature and biostimulation on oil-degrading microbial communities in temperate estuarine waters. *Environmental Microbiology*, 9(1), p.p.177-186.

D

- Desai, J.D., Banat, I.M., (1997).** Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular biology reviews*, 61(1), p.p.47-64.
- Deziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lepine, F., Bisailon, J., (1997).** Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and environmental microbiology*, 62(6), p.p.1908-1912.
- Djahnit, N., Chernai, S., (2019).** Isolation, characterization and determination of biotechnological potential of oil-degrading bacteria from Algerian centre coast. *Journal of applied microbiology*, 126(3), p.p. 780-795.
- Dubinsky, E.A., Conrad, M.E., et al .(2013).** Succession of hydrocarbon-degrading bacteria in the aftermath of the Deepwater Horizon oil spill in the Gulf of Mexico. *Environmental science & technology*, 47(19), p.p.10860-10867.

E

- Ebadi, K., Zarei, M., Sanati, A. M. (2021).** Optimization of Crude Oil Biodegradation by *Brevibacterium* sp. Isolated from the Native Sponges of the Persian Gulf. *Iranian Journal of Biotechnology*, 19(2), p.2690.
- Engelhardt, M.A., Daly, K., Swannell, R.P.J., Head, I.M., (2001).** Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading, Gram-positive bacterium, isolated from intertidal beach sediment, and description of *Planococcus alkanoclasticus* sp. nov. *Journal of Applied Microbiology*, 90(2), p.p.237-247.
- EPA. (1999).** Method 3510c: Separatory Funnel Liquid-Liquid Extraction Part of Test Methods for Evaluation Solid Waste, Physical/Chemical Methods. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency. [En ligne]. [Consulté le 10/06/2022]. Disponible sur le web: [2001 OIG Reports | US EPA](#).
- EPA.(2001).** Method 3510c: Separatory Funnel Liquid-Liquid Extraction Part of Test Methods for Evaluation Solid Waste, Physical/Chemical Methods. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency. [En ligne]. [Consulté le 10/06/2022]. Disponible sur le web: [Residual Risk Report to Congress 1999 | US EPA](#).

F

- Farhadian, M., Vachelard, C., Duchez, D., Larroche, C., (2008).** In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: a review. *Bioresource technology*, 99(13), p.p.5296-5308.
- Fernandez-Linares, L., Acquaviva, M., Bertrand, J.C., Gauthier, M., (1996).** Effect of sodium chloride concentration on growth and degradation of eicosane by the marine halotolerant bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. *Systematic and Applied Microbiology*, 19(1), p.p.113-121.
- Fingas, M., Fieldhouse, B. (2011).** Studies on water-in-oil products from crude oils and petroleum products. *Marine pollution bulletin*, 64(2), p.p. 272-283.
- Fingas, M., Fieldhouse, B. (2012).** Studies on water-in-oil products from crude oils and petroleum products. *Marine pollution bulletin*, 64(2), p.p. 272-283.
- Fingas, M., Fieldhouse, B. (2013).** Studies on water-in-oil products from crude oils and petroleum products. *Marine pollution bulletin*, 64(2), p.p. 272-283.
- FMI. (2019).** La consommation et la production de pétrole au plus haut en 2019. [En ligne]. [Consulté le 01/05/2022]. Disponible sur le web: [FMI's 2019 M&A Trends for Engineering and Construction | FMI \(fmicorp.com\)](https://www.fmicorp.com/en/2019-m-a-trends-for-engineering-and-construction).

G

- Gabet S., (2004).** Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. Thèse de doctorat. Chimie et Microbiologie de l'eau. France: université de Limoges, p.177.
- Gargouri, B., Aloui, F., Sayadi, S., (2012).** Reduction of petroleum hydrocarbons content from an engine oil refinery wastewater using a continuous stirred tank reactor monitored by spectrometry tools. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 87(2), p.p.238-243.
- Gassara, F., Suri, N., Voordouw, G. (2017).** Nitrate-mediated microbially enhanced oil recovery (NMEOR) from model upflow bioreactors. *Journal of hazardous materials*, 324, p.p.94-99.
- Gibson, T.D., Subramanian, V., (1984).** Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In: Gibson, T.D. (Ed.), *Microbial degradation of organic compounds*. New York: Marcel Dekker, p.p. 181-252.

Gottschalk, G.,Knackmuss, H.J., (1993). Bacteria and the biodegradation of chemicals achieved naturally, by combination, or by construction. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 32(10), p.p.1398-1408.

Guiraud, J.P., 1998. *Microbiologie Alimentaire*. Paris: Dunod,p.250.

H

Hagström, Å., Pommier, T., Rohwer, F., Simu, K., Svensson, D.,Zweifel, U., (2002). Bioinformatics reveal surprisingly low species richness in marine bacterioplankton. *Appl Environ Microbiol*, 67, p.p.3628-33

Harayama, S., Kasai, Y., Hara, A., (2004). Microbial communities in oilcontaminated seawater. *Current opinion in biotechnology*, 15(3), p.p.205-214.

Hassaine, A., (2015). Biodégradation des Hydrocarbures (Pétrole brut et Kérosène) par la Microflore Microbienne des Eaux de la région de Skikda. Thèse de doctorat.Biologie Végétale. ANNABA : Université badji mokhtar, p.189.

Hassanshahian, M., Emtiazi, G.,Cappello, S., (2012). Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Marine pollution bulletin*, 64(1), p.p.7-12

Hazrati, S., Rostami, R., Farjaminezhad, M., Fazlzadeh, M., (2016). Preliminary assessment of BTEX concentrations in indoor air of residential buildings and atmospheric ambient air in Ardabil, Iran. *Atmospheric Environment*, 132, p.p.91-97.

Head, I. M., Jones, D. M., Röling, W. F., (2006). Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, 4(3), p.p. 173-182.

Heider, J., Spormann, A.M., Beller, H.R.,Widdel, F.,(1998). Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*, 22(5), p.p.459-473.

Hommel, R.K., Stegner, S., Kleber, H.P.,Weber, L., (1994). Effect of ammonium ions on glycolipid production by *Candida (Torulopsis) apicola*. *Applied microbiology and biotechnology*,42(2-3), p.p.192-197.

I

IPIECA-IOGP. (2015). In-situ burning of spilled oil. IPIECA-IOGP Good Practice Guide Series, Oil Spill Response Joint Industry Project (OSR-JIP). [En ligne]. [Consulté le 01/06/2022]. Disponible sur le web: <https://www.oilspillresponseproject.org>.

ITOPF.(2011). Effects of Oil Pollution on the Marine Environment. Rapport d'activité. document non publié.France: ITOPF.

J

- Jagtap, S., Yavankar, S., Pardesi, K., Chopade, B. (2010).** Production of bioemulsifier by *Acinetobacter* sp. from healthy human skin of tribal population. *Ind. J. Expt. Biol*, 48, p.p. 70- 76.
- Ji, Y., Mao, G., Wang, Y., Bartlam, M., (2013).** Structural insights into diversity and n-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. *Frontiers in microbiology*, 4, p.58.
- Journal officiel de la république algérienne., (2006).** Valeurs limites des paramètres de rejets d'effluents liquides industriels N°26 : 24 Rabie Elaouel 427.
- juhasz, A.L., Naidu, R., (2000).** Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo [a] pyrene. *International biodeterioration & biodegradation*, 45(1-2), p.p.57-88.

K

- Kada. M., (2012).** Détection de la résistance bactérienne aux antibiotiques dans l'environnement marin, influence des apports anthropiques. Mémoire d'ingénieur. *Biotechnologie marin*. Alger : ENSSMAL, p .77.
- Kim, E.J., Oh, J.E., Chang, Y.S., (2003).** Effects of forest fire on the level and distribution of PCDD/Fs and PAHs in soil. *Science of the Total Environment*, 311(1-3), p.p.177-189.
- Kim, K.-H., Jahan, S.A., Kabir, E., Brown, R.J.C. (2013).** A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment International*, 60, p.p.71-80.
- Kina, H., Rahal, N., (2009.)** Caractérisation physicochimique et sels nutritifs des eaux de la baie d'El Djamila. Mémoire d'ingénieur. environnement. Alger: ENSSMAL, p.p.26-31.
- Kluser, S., Richard, J.P., et al. (2006).** illegal oil discharge in European Seas.

L

- Laurent, E.N., Castellonet, F., (2003).** Rapport sur la pollution marine par hydrocarbures et les dégazages sauvages en Méditerranée.
- Leahy, J.G., Colwell, R.R., (1990).** Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological reviews*, 54(3), p.p.305-315.
- Lei, A.P., Hu, Z.L., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., (2007).** Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species. *Bioresource technology*, 98(2), p.p.273-280.

Li, J., Deng, M., Wang, Y., Chen, W. (2010). Production and characteristics of biosurfactant produced by *Bacillus pseudomycoloides* BS6 utilizing soybean oil waste. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 112, p.p.72-79.

Lipiatou, E., Saliot, A., (1991). Fluxes and transport of anthropogenic and natural polycyclic aromatic hydrocarbons in the western Mediterranean Sea. *Marine Chemistry*, 32(1), p.p.51-71.

M

Mahanty, B., Pakshirajan, K., Dasu, V. (2006). Production and properties of a biosurfactant applied to polycyclic aromatic hydrocarbon solubilization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 134(2), p.p.129-141.

Mahjoubi, M., Jaouani, A., et al. (2013). Hydrocarbonoclastic bacteria isolated from petroleum contaminated sites in Tunisia: isolation, identification and characterization of the biotechnological potential. *New biotechnology*, 30(6), p.p.723- 733.

Margesin, R., Schinner, F., (2001). Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied microbiology and biotechnology*, 56(5-6), p.p.650-663.

Margesin, R., Spröer, C., Schumann, P., Schinner, F., (2003). *Pedobacter cryoconitis* sp. nov., a facultative psychrophile from alpine glacier cryoconite. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(5), p.p.1291-1296.

Marchal, N., Bourdon, J.I., Bimet, P., (1988). *Le laboratoire de bacteriologie medicale.* Paris: Doin, p.201.

Marchant, R., Banat, I.M. (2012). Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends in Biotechnology*, 30(11), p.p. 558-565.

Martin, P. (2012). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*, 276(5309), p.p.75-81.

Mascarelli, A., (2010). Deepwater Horizon: after the oil. *Nature News*, 467(7311), p.p.22-24.

Mata Sandoval, J.C., Karns, J., Torrents, A. (2000). The influence of surfactants and biosurfactants on the bioavailability of hydrophobic organic pollutants in subsurface environments. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 16(4), p.117.

Mau, S., Valentine, D.L., Clark, J.F., Reed, J., Camilli, R., Washburn, L., (2007). Dissolved methane distributions and air-sea flux in the plume of a massive seep field, Coal Oil Point, California. *Geophysical Research Letters*, 34(22), p.p.123-128.

McGenity, T.J. (2010). Halophilic Hydrocarbon Degraders. in: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, (Ed.) K.N. Timmis, Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg, p.p. 1939- 1951.

- Milinkovitch, T., (2011).** Stratégie de lutte contre les catastrophes pétrolières et risque environnemental associé : évaluation de la toxicité d'un dispersant en milieu côtier chez *Liza* sp. France: Université de La Rochelle, p.217.
- Milton, C., (2007).** Caractérisation des communautés procaryotiques impliquées dans la bioremédiation d'un sol pollué par des hydrocarbures et développement d'outils d'analyse à haut débit. Thèse de doctorat. Génomique et écologie microbienne. France: université Blaise Pascal, p. 441.
- Miyasaka, T., Asami, H., Watanabe, K., (2006).** Impacts of bioremediation schemes on bacterial population in naphthalene-contaminated marine sediments. *Biodegradation*, 17(3), p.p.227-235.
- Mnif, S., Chamkha, M., Labat, M., Sayadi, S. (2011).** Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria. *Journal of applied microbiology*, 111(3), p.p.525-536.
- Morikawa M., Daido H., Takao T., Satoru M., Shimonishi Y., Imanaka T., (1993).** A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. *Journal of Bacteriology*, vol, 175, p.p. 6459-6466.
- M'rassi, A.G., Bensalah, F., Gury, J., Duran, R., (2014).** Isolation and characterization of different bacterial strains for bioremediation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(20), p.p.15332-15346.
- Mulligan, C.N.(2005).** Environmental applications for biosurfactants. *Environmental pollution*, 133(2), p.p.183-198.

N

- Neu T.R., (1996).** "Significance of Bacterial Surface-active Compounds in Interaction of Bacteria with Interfaces." *Microbiological Reviews* 60 (1), p.p.151–166.
- Nikitha, T., Satyaprakash, M., Vani, S. S., Sadhana, B., Padal, S. B., (2017).** A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Their transport, fate and biodegradation in the environment. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 6(4), p.p. 1627-1639.
- Nikolopoulou, M., Kalogerakis, N., (2009).** Biostimulation strategies for fresh and chronically polluted marine environments with petroleum hydrocarbons. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 84(6), p.p.802-807.

O

Oussadit, M.K., Saadi, A.M., (2012). Contribution à l'étude et suivi des paramètres de pollution: Observation et modélisation dans la baie d'El Djamila. Mémoire d'ingénieur en environnement. Alger: ENSSMAL, p.49-55

P

Paralovo, S.L., Borillo, G.C., et al. (2016). Observations of atmospheric monoaromatic hydrocarbons at urban, semi-urban and forest environments in the Amazon region. *Atmospheric Environment*, 128, p.p. 175-184.

Philip, J., Atlas, M., (2005). Bioremediation: Applied Microbial Solutions for Real world Environmental Cleanup. American society for Microbiology (ASM) Press, Washington, DC, p.p.78-105.

Peressutti, S.R., Alvarez, H.M., Pucci, O.H., (2003). Dynamics of hydrocarbon-degrading bacteriocenosis of an experimental oil pollution in Patagonian soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52(1), p.p.21-30.

R

Rabehi, W., Rahal, F., (2011). Aménagement du port d'El Djamila, avantages et inconvénients et comportements des structures. Mémoire d'ingénieur en génie civil. Spécialité aménagement du littoral. Alger: ENSSMAL, p.p 54-55.

Rajaei, S., Seyedi, S. M., Raiesi, F., Shiran, B., Raheb, J. (2013). Characterization and Potentials of Indigenous Oil-Degrading Bacteria Inhabiting the Rhizosphere of Wild Oat (*Avena Fatua* L.) in South West of Iran. *Iranian Journal of Biotechnology*, 11(1), p.p. 32-40.

Ratledge, C., (1978). Degradation of aliphatic hydrocarbons. *Developments in biodegradation of hydrocarbons*, 1, p.p.1-46.

Reichelt, J. L., Baumann, P., (1974). Effect of sodium chloride on growth of heterotrophic marine bacteria. *Archives of microbiology*, 97(4), p.p. 329–345.

REMPEC. (1977). Regional Marine Pollution Emergency Response Centre for the Mediterranean Sea. [En ligne]. [Consulté le 01/07/2022]. Disponible sur le web: <http://www.rempec.org>.

Rodier, J., Legube, B., Merlet, N., Brunet, R., (2009). L'analyse de l'eau, eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer: *Analyse de l'eau*, 100(4), p.200.

- Rodrigues, L., Banat, I.M., Teixeira, J., Oliveira, R. (2006).** Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(4), p.p.609-618.
- Rodrigues L. R, Teixeira J.A, Henny C, van,(2006).** Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*,49,p.p.78-85.
- Röling, W.F., Milner, M.G.,et al.(2002).** Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Applied and environmental microbiology*, 68(11), p.p.5537-5548.
- Ron, E.Z.,Rosenberg, E., (2014).** Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. *Current Opinion in biotechnology*, 27, p.p.191-194.
- Rosenberg, E., Ron, E. Z.,(1999).** High-and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, 52(2), p.p. 154-162.
- Roy, S., Hens, D., Biswas, D., Biswas, D.,Kumar, R.,(2015).** Survey of petroleumdegrading bacteria in coastal waters of Sunderban Biosphere Reserve. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(6), p.p.575-581.

S

- Saliot A., (1969).** Contribution de l'étude des substances organiques dissoutes dans l'eau de mer. Paris: Fac. Sci, p.106.
- Saliot, A.,(1981).** Natural Hydrocarbons in Sea Water Alain Saliot. Vol.,31, p.p. 327-374.
- Salt, D.E., Smith, R.D.,Raskin, I., (1998).** Phytoremediation. Annual review of plant biology. Vol.,49, p.p.643-668.
- Santos, D., Rufino, R., Luna, J., Santos, V., Sarubbo, L., (2016).** Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), p.401.
- Sayed Suzan,S., Samah,K., Amany,O., Shazly A., (2021).** Excessive Daytime Sleepiness among Chronic Kidney Disease Patients. *SVU-IJMS*, 4(2),p.p.303-312.
- Sikkema, J., de Bont, J.A.,Poolman, B.,(1995).** Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological reviews*, 59(2), p.p.201-222.
- Singh, P., Patil, Y., Rale, V., (2007).** Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. *Journal of Applied Microbiology*, 59(1),p.11.
- Singleton P.,Sainsbury D.,(1984).** *Bactériologies*.Paris:MASSON,p.158.
- Singleton, P., (1999).** *Bactériologie*. Paris:Dunod,p.356.

- Soltani, M.,(2004).** Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Doctorat en Chimie Analytique .France: université Paris 6, p.284.
- Spormann, A.M.,Widdel, F.,(2000).** Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation*, 11(2-3), p.p.85-105.
- Speight, J.G., (2014).**The Chemistry and Technology of Petroleum. 5th Edition, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL.
- Stancu, M.M.,Grifoll, M.,(2011).** Multidrug resistance in hydrocarbon-tolerant Gram-positive and Gram-negative bacteria. *The Journal of general and applied microbiology*,57(1), p.p.1-18.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W.,(2002).** Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1),p.p. 187-209.
- Stroud, J.L., Paton, G.I.,Semple, K.T.,(2007).** Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil: implications for biodegradation and bioremediation. *Journal of Applied Microbiology*, 102(5), p.p.1239-1253.
- Sugiura, K., Ishihara, M., Shimauchi, T.,Harayama, S., (1997).** Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environmental Science & Technology*, 31(1), p.p.45-51.
- Suzan S. Sayeda , Samah Kotbb , Amany Omar a, Shazly Ahmed., (2021).** Excessive Daytime Sleepiness among Chronic Kidney Disease Patients, *SVU-IJMS*, 4(2),p.p. 303-312.
- Sonatrach. (2019).** Baisse du chiffre d'affaires et des bénéfices en 2019. [En ligne].
[Consulté le 01/07/2022]. Disponible sur le web: [Sonatrach : Baisse du chiffre d'affaires et des bénéfices en 2019 \(algerie-eco.com\)](http://www.algerie-eco.com).

T

- Tarayre, C., (2012).** Bioremédiation de sols pollués aux hydrocarbures. Ed. Univ. Eur., p.116.
- Thavasi, R., Sharma, S.,Jayalakshmi, S., (2011).** Evaluation of screening methods for the isolation of biosurfactant producing marine bacteria. *J. Pet. Environ. Biotechnol. S*, 1, p.p.1-6.
- Tissot, B., Welte, D., (1978).** Petroleum formation and occurrence: A new approach to oil and gas exploration.London: Springer,p.123.
- Tissot, B., Welte, D., (1984).** Petroleum formation and occurrence: A new approach to oil and gas exploration.London: Springer,p.12.

V

- Van Der Meer, J.R., De Vos, W.M., Harayama, S., Zehnder, A.J., (1992).** Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 56(4), p.p.677-69.
- Varjani, S.J., Upasani, V.N., (2013).** Comparative studies on bacterial consortia for hydrocarbon degradation. *Eng. Technol*, 2(10), p.123.
- Varjani, S.J., Rana, D.P., Jain, A.K., Bateja, S., Upasani, V.N., (2015).** Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 103, p.p.116-124.
- Varjani, S.J., Srivastava, V.K., (2015).** Green technology and sustainable development of environment. *Renewable Res. J.* 3 (1), p.p.244-249.

W

- Wang, H., Frenklach, M. (1994).** Transport properties of polycyclic aromatic hydrocarbons for flame modeling. *Combustion and Flame*, 96(1), p.p. 163-170.
- Widdel, F., Rabus, R., (2001).** Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current opinion in biotechnology*, 12(3), p.p.259-276.
- Wilkes, H., Buckel, W., Golding, B.T., Rabus, R., (2016).** Metabolism of hydrocarbons in n-alkane-utilizing anaerobic bacteria. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 26(1-3), p.p.138-151.
- Wilcke W., (2007).** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in soil - a Review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163, p.p. 229-248.

Y

- Yakimov, M.M., Denaro, R., et al. (2005).** Natural microbial diversity in superficial sediments of Milazzo Harbor (Sicily) and community successions during microcosm enrichment with various hydrocarbons. *Environmental microbiology*, 7(9), p.p.1426-1441.
- Yakimov, M.M., Giuliano, L., et al. (2004).** *Thalassolituus oleivorans* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(1), p.p.141-148.

Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Golyshin, P.N., (2007). Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current opinion in biotechnology*, 18(3), p.p.257-266.

Youssef, N., Simpson, D.R., et al. (2004). In situ biosurfactant production by *Bacillus* strains injected into a limestone petroleum reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(4), p.p.1239-1247.

Z

Zhao, Z., Selvam, A., Wong, J.W.C., (2011). Synergistic effect of thermophilic temperature and biosurfactant produced by *Acinetobacter calcoaceticus* BU03 on the biodegradation of phenanthrene in bioslurry system. *Journal of hazardous materials*, 190(1-3), p.p.345-350.

Annexes

Annexe 1: Coloration de Gram

Différentes étapes de cette coloration:

- Préparer et fixer un frottis bactérien à la chaleur du bec bunsen
- Coloration par le violet de gentiane, laisser agir pendant 1mn après rincer à l'eau de robinet.
- Ajouter du Lugol (solution d'iode iodo-iodurée): étaler le Lugol et laisser agir 20 secondes. Rincer avec l'eau.
- Décoloration de l'alcool: verser goutte à goutte l'alcool sur la lame, et surveiller la décoloration (5à10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous filet d'eau.
- Recoloration à la fuchsine. Laisse agir de 30 secondes à 1mn. Rinçage à l'eau puis séchage.
- Observer avec une goutte d'huile à immersion, objectif 100 (grossissement $\times 100$)
- Les bactéries à Gram positif se colorent en violet alors que les bactéries à Gram négatif se colorent en rose.

يشكل التلوث النفطي خطرا على النظام البيئي البحري للسواحل، حيث يعتبر هذا الاخير مشكلة بيئية رئيسية. الساحل الشمالي للجزائر هو مثال على نظام بيئي يخضع للتلوث النفطي. حيث أظهرت التركيبة الفيز وكيميائية لمياه البحر المأخوذة من منطقة (ميناء عين بنيان) وجود ملوثات دقيقة عضوية وغير عضوية. الهدف من هذه الدراسة هو معايرة الخصائص التي تسمح للبكتيريا البحرية بتحليل وتفكيك الهيدروكربونات. حيث تم عزل واختبار 12 صنف بكتيري في هذه الدراسة من مجموعة 71 سلالة بكتيرية معزولة. أظهرت الخصائص الكيميائية الحيوية للسلاسل بأن 82% من البكتيريا المستخدمة تحمل غرام - ، جميع السلاسل التي تم اختبارها هي ذات كاتالاز وأوكسيداز إيجابي باستثناء السلاسل SS1B, ES2B, ES6B التي تكون سلبية الكاتالاز بما في ذلك بكتيريا ES2B, ES3B, ES5B, ES6B, ES8B على التوالي التي تحمل أوكسيداز سلبي. وأظهرت غالبية العزلات إنتاجا كبيرا من المواد الخافضة للتوتر السطحي الأحيائي مع أنشطة استحلاب مهمة مفيدة في التحلل البيولوجي وتكوين الأغشية الحيوية ، حيث يزداد هذا المؤشر مع إنتاج الفاعل بالسطح الحيوي ومعدل نمو البكتيريا ، والذي يمثل قدرة البكتيريا على التحلل. كانت النتائج التي تم الحصول عليها لاختبار انهيار السقوط إيجابية بالنسبة للبكتيريا SS2B, ES2B, ES3B, ES4B, ES7B، باستثناء كل من بكتيريا SS1B, ES1B, ES5B, ES6B, SS3B, SS4B, ES8B حيث يسمح هذا الاختبار فقط بالكشف عن المواد الخافضة للتوتر السطحي الحيوي وليس بتحديد كميا. تظهر النتائج التي تم الحصول عليها خلال اختبار الإزاحة أن لدينا خمسة بكتيريا اعتبرت منتجة قوية للخافضات للتوتر السطحي الحيوي، وكانت الأنواع العالية الإنتاجية التي أظهرت قطرا يتجاوز ال2 سم أثناء اختبار إزاحة الزيت هي ES2B, ES3B, ES7B.

يظهر النمو البكتيري في وجود أنواع مختلفة من الهيدروكربونات أن غالبية البكتيريا قادرة على استخدام هذه الهيدروكربونات كمصدر وحيد للكربون. الهيدروكربونات الأليفاتية قابلة للتحلل بسرعة وبسهولة مقارنة بالهيدروكربونات العطرية.

الكلمات المفتاحية: النفط الخام ، البكتيريا البحرية ، المعالجة البيولوجية ، التحلل الحيوي ، الهيدروكربونات.

ABSTRACT

Pollution of coastal marine ecosystems by Crude oil is a major environmental problem. The North coast of Algeria is an example of a polluted ecosystem affected by petroleum pollution. The physico-chemical characterization of the seawater taken from the harbor "Madrague" in city of Ain Benian, showed a heavy contamination by organic and inorganic micropollutants. The aim of this work was to investigate the criteria that allow a marine bacterium to degrade hydrocarbons. 12 strains bacterial were selected in this study from a collection of 71 strains isolated.

The biochemical characterization of the strains showed that 82% of the bacteria used are Gram⁻, all the strains tested are catalase and oxidase positive exception of SS1B, ES2B, and ES6B strains which are catalase negative and, also for ES2B, ES3B, ES5B, ES6B, ES8B strains respectfully are oxidase negative. The majority of the isolates showed significant biosurfactants production with important emulsification activities useful in biodegradation. The results found for the drop collapse test were positive for the wells containing bacteria SS2B, ES2B, ES3B, ES4B, ES7B with the exception of the blank which is devoid of bacterial suspension and the wells containing bacteria SS1B, ES1B, ES5B, ES6B, SS3B, SS4B, ES8B. This test only allows detection and not the quantification of biosurfactants.

The results obtained during the displacement test show that we have bacteria which were considered to be strong producers of biosurfactants, the highly productive species which showed a diameter of 2 cm or more during the oil displacement test were ES2B, ES3B, and ES7B. Bacterial growth in the presence of different types of hydrocarbons shows that the majority of bacteria are able to use these hydrocarbons as the sole carbon source. Aliphatic hydrocarbons are rapidly and easily biodegraded compared to aromatic hydrocarbons. Our overall results suggest that the obtained bacterial isolates may constitute potential candidates for bioremediation and can be useful for biotechnological applications.

Key words: Crude oil, Marine bacteria, Hydrocarbonoclastes, strains, Biosurfactants, Harbours, Marine pollution, Hydrocarbons, Biodegradation.

RESUME

La pollution pétrolière des écosystèmes marins possède un problème environnemental majeur. La côte nord de l'Algérie est un exemple d'écosystème pollué soumis à cette pollution, la caractérisation physico-chimique de l'eau de mer prélevée dans le port « la Madrague » de la ville d'Ain Benian, a montré une forte contamination par des micropolluants organiques et inorganiques.

L'objectif de ces travaux était d'étudier les critères qui permettent à une bactérie marine de dégrader les hydrocarbures, 12 souches bactériennes ont été sélectionnées dans cette étude parmi une collection de 71 souches isolées.

Nos résultats de caractérisation biochimique des souches ont montré que 82% des bactéries utilisées sont Gram-, toutes les souches testées sont catalase et oxydase positives à l'exception des souches SS1B, ES2B, ES6B qui sont catalase négatives et les souches ES2B, ES3B, ES5B, ES6B, ES8B qui sont respectueusement oxydases négatives. Ainsi une production importante de biosurfactants été remarquée pour la majorité des isolats avec une activité d'émulsification importantes utiles à la biodégradation. Au cours de test drop collapse nos résultats obtenus étaient positifs pour les puits contenant les bactéries SS2B, ES2B, ES3B, ES4B, ES7B à l'exception du blanc qui est dépourvu de suspension bactérienne et les puits contenant les bactéries SS1B, ES1B, ES5B, ES6B, SS3B, SS4B, ES8B. Ce test ne permet que la détection et non la quantification des biosurfactants.

Lors du test de déplacement nos résultats montrent que nous avons des bactéries qui ont été considérées comme de forts producteurs de biosurfactants, ces bactéries étaient ES2B, ES3B, ES7B. Qui ont montré un diamètre de 2 cm ou plus lors de l'essai de déplacement d'huile.

La croissance bactérienne en présence de différents types d'hydrocarbures montre que les hydrocarbures aliphatiques sont rapidement et facilement biodégradables par rapport aux hydrocarbures aromatiques. Nos résultats globaux suggèrent que les isolats bactériens obtenus peuvent constituer des candidats potentiels pour la bioremédiation et peuvent être utiles pour des applications biotechnologiques.

Mots clés: Pétrole brut, Bactéries marines, Bioremediation, Biodégradation, souche, Biosurfactants, Marine pollution, hydrocarbures.