

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 EN SCIENCES DE LA MER

Spécialité : ENVIRONNEMENT

Thème :

LES EFFETS DES PARAMÈTRES PHYSICOCHIMIQUES SUR
L'ACTIVITÉ DES BACTÉRIES MARINES
HYDROCARBONOCLASTES

Présenté par :

- BOUKABARA Amira
- BOUCHAKOUR-ERRAHMANI Fedwa

Soutenu le 14/09/2017 devant la commission du jury suivant :

Mme MEKHAZNI.F	Maître assistant	Présidente
Mme CHERNAIS	Maître de conférence	Promotrice
Melle DJAHNIT.N	Doctorante	Co-promotrice
Mr KADA.M	Maître assistant	Examineur

Promotion : 2016/2017

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions Dieu « Tout Puissant » de nous avoir accordé la force, le courage et les moyens afin de pouvoir accomplir ce modeste travail.

Nous remercions chaleureusement Mme. CHERNAI.S d'avoir proposé ce thème et accepté de nous encadrer et pour son aide, ses orientations, ses conseils et ses corrections sérieuses pour ce travail.

Ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de notre chère co-promotrice Mlle. DJAHNIT Nora, on la remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

Nous voudrions également remercier Mme. MEKHAZNI.F pour avoir accepté de présider notre jury.

Nous tenons à remercier Mr. KADA.M pour accepter d'examiner ce manuscrit et pour ses précieux conseils.

Nous remercions également les personnels du laboratoire Microbiologie : Mr DJERRAI N., M^{me} ZAIIDI Y. M^{me} CHIOUKH S., et M^{me} GUERROUMI H.

Nous remercions tous nos amis en particulier les étudiants qui nous ont aidé durant la réalisation de ce mémoire : Mlle BELAMRANIA.D., Mlle AIOUAZ.A., Mr KHERCHOUF.K.

Dédicaces

Je dédie ce modeste Travail accompagné d'un profond amour :

À MA CHÈRE TATA WARDA,

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je te remercie pour tout le soutien et l'amour que tu me portes depuis mon enfance

À la mémoire de mes chers parents

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation.

À mes Adorables Frères : AMIR, OUSSAMA ET ILYES

En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès.

À mes amies de toujours : MIMI ET TCHIKOU

En souvenir de notre sincère et profonde amitié et les moments agréables que nous avons passés ensemble.

À mon binôme, mon âme sœur FEDWA

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour toi. Mon ange et ma fidèle sœur dans les moments les plus délicats de cette vie mystérieuse. Je te dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite <3.

Aux environnementalistes et enssmaliens: DJIBOUKI, SIHEM, ABLA, HANNAN, WISSEM,

En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

AMIRA

Je dédie le fruit de ce modeste travail :

A mes très chers parents

Affables, honorables, aimables : vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous les sacrifices que vous n'avez cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.

A mes chers frères Housseem, Zouhir, Youcef

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. Vous êtes toujours dans mon cœur. Je vous dédie ce travail avec tous mes sentiments de fraternité et mes vœux de bonheur. Je vous souhaite un avenir plein de joie, de réussite et de sérénité.

Particulièrement à mon binôme Amira

Ma meilleure amie, ma sœur et ma boîte secret, pour sa présence, son soutien moral, sa fidélité, et ses sacrifices, elle n'a jamais cessé de croire en moi, Merci pour tous les moments qui on a passé ensemble, pour les souvenirs ; je te souhaite une vie pleine de joie de bonheur et de succès

A mes chères cousines

Faïza, Lamia, Marwa, Imene, Houda, Mimi, Samia, Hadjer, Manel, que dieu vous protège.

A mes adorables amies

Nesrine; Sara Darine ; Wissem ; Tchikou ; les sœurs fous Marwa, Safa et Rahma

A toute la promotion 5eme année Environnement « Les BEISTES » et tous les Enssmaliens : Djibouki ; Hanene halieutique ; Hanouna ; Wissem barbie . Dounia

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des sœurs et des amies sur qui je peux compter.

FEDWA

LISTE DES FIGURES

Figure I.1. Structure chimique des hydrocarbures pétroliers.....	4
Figure I.2. Affiliation phylogénétiques des bactéries marines hydrocarbonoclastes ..	13
Figure I.3. Répartition géographique des isolats à partir des séquences de gènes ARNr 16S des bactéries hydrocarbonoclastes.....	14
Figure II.1. Description des différents bassins du port de sidi Fredj.....	21
Figure II.2. carte géographique représentant les différentes zones de prélèvement	22
Figure II.3. Matériel de l'échantillonnage, A : tube conique, B : flacon en verre, C : une benne preneuse.....	23
Figure II.4. Principe d'enrichissement dans un milieu liquide... ..	26
Figure II.5. Les différents résultats du test de catalase... ..	30
Figure II.6. Présentation des différents résultats du test d'oxydase	31
Figure II.7. Schéma représentant les trois phases de l'émulsification.. ..	34
Figure III.1. Les flacons d'enrichissement ; A : enrichissement à 10, B : enrichissement à 10 ⁻⁴ , C:control négatif.....	38
Figure III.2. Les flacons d'enrichissement de mélange d'alcane ; A : enrichissement à 10 ⁻² , B : enrichissement à 10 ⁻⁴ , control négatif.....	38
Figure III.3. Culture bactérienne après réisolement dans un milieu liquide ; A : présence de trouble, B : absence de trouble.	40
Figure III.4. Différents aspects microscopiques des bactéries à Gram positif et négatif.....	41
Figure III.5. Pourcentage des tests de biodégradation en fonction de différentes sources de carbone... ..	43
Figure III.6. Histogramme représentant les résultats des tests de biodégradation des différents hydrocarbures	44
Figure III.7. Histogramme représentant les résultats obtenus après une semaine d'incubation à différentes températures.	47
Figure III.8. Histogramme représente les résultats de test de différentes valeurs de pH obtenus après la mesure de la densité optique.....	48
Figure III.9. Histogramme représentant les résultats de test des différentes salinités obtenues après la mesure de la densité optique.....	59

Figure III.10. Index d'émulsion E24.....	51
Figure III.11. Les différents résultats de l'index d'émulsification ; A: production de biosurfactants,B : absence d'émulsion.....	52
Figure III.12. Evolution de biomasse des 5 souches bactériennes testées avec le blanc de l'alcane comme un control négatif.....	53
Figure III.13. Evolution de biomasse des 5 souches bactériennes testées avec le blanc de pétrole comme control négatif.....	53

LISTE DES TABLEAUX

Tableau III.1. Les affiliations suspectés des résultats des tests biochimiques	42
Tableau III.2. Les résultats de réisolement des souches bactériennes dans un milieu liquide.....	Annexe III
Tableau IV.1. Les résultats de mesure de la densité optique des souches bactériennes en fonction de différentes sources de carbone.....	Annexe IV
Tableau IV.2. Les valeurs statistiques de mesure de la densité optique des cultures bactériennes en fonction de différentes sources de carbone.....	Annexe IV
Tableau IV.2. Les valeurs statistiques de mesure de la densité optique des cultures bactériennes en fonction de différentes sources de carbone.....	Annexe IV
Tableau V.1. Résultats de l'effet de la température.	Annexe V
Tableau V.2. Résultats de l'effet du pH.	Annexe V
Tableau V.3. Résultats de l'effet de la salinité.....	Annexe V
Tableau VI.1. Résultats du test d'émulsification.....	Annexe VI
Tableau VII.1. Les résultats de mesure de la densité optique pour la suivie de la cinétique des bactérie hydrocarbonoclastes.	Annexe VII

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Alc: alcane.

BA : blanc de mélange d'alcane.

Benz: benzène.

BP : blanc de pétrol brut.

BTEX : Benzène, Toluène, Ethyl-benzène et Xylène.

C⁻ : sans source de carbone(contrôle négatif)

C⁻ : catalase négatif.

C⁺ : catalase positif.

CMN: Corynebacterium, Mycobacterium et Nocardia.

DO : densité optique.

He : hauteur de l'émulsion.

Ht : la hauteur totale.

Max : maximum.

Min : minimum.

Num : numéro.

O⁻ : oxydase négatif.

O⁺ : oxydase positif.

pH : potentiel hydrogène.

Teb : température d'ébullition.

Tris : trishydroxyméthylaminométhane.

Tol: toluène.

Xyl: xylene.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	I
Dédicaces.....	II
LISTE DES TABLEAUX	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VII
TABLE DES MATIERES.....	VIII
INTRODUCTION GENERALE.....	2
CHAPITRE I : GENERALITES.....	5
I.1. Pollution par les Hydrocarbures	5
I.1.1. Définition de la pollution.....	5
I.1.2. Pollution par les hydrocarbures	5
I.1.3. Définition et caractérisation.....	6
I.1.4. Classification	6
I.1.4.1. Hydrocarbures saturés	7
I.1.4.2. Les hydrocarbures aromatiques	8
I.1.4.3. Les asphaltènes	8
I.1.4.4. Les composés polaires	8
I.1.5. Sources de la pollution par les hydrocarbures	8
I.1.6. Origine de pollution par les hydrocarbures	9
I.1.7. Devenir et mobilité des hydrocarbures dans l'environnement	10
I.1.8. Impacts de la pollution par les hydrocarbures	11
I.1.9. Les accidents pétroliers en milieu marin	13
I.1.9.1. Les accidents pétroliers dans le monde	13
I.1.9.2. Les accidents pétroliers en AlgérieL'Algérie occupe la 12eme place mondiale en production de pétrole, représentée essentiellement par le bassin de Hassi Messaoud, constitue une véritable métropole économique, grâce aux activités d'exploration, de production et de transport des hydrocarbures. Le phénomène de pollution hydrocarbonée a	

une importance de plus en plus grande sur les plans environnemental, sanitaire et économique. Cette pollution peut avoir un impact soit direct ou indirect, sur la santé humaine et l'équilibre des écosystèmes aussi bien marins que continentaux, (MBONIGABA *et al*, 2009).13

I.2. Biodégradation des hydrocarbures 14

I.2.1. Biodépolluants 14

I.2.2. Bioremédiation 15

I.2.3. Microorganismes qui dégradent les hydrocarbures 15

I.2.4. Définition des bactéries hydrocarbonoclastes 15

I.2.5. Biogéographie des bactéries marines hydrocarbonoclastes..... 16

I.2.6. Propriétés des bactéries marines hydrocarbonoclastes 17

I.2.7. Biodégradation par types d'hydrocarbures 18

I.2.7.1. Biodégradation des hydrocarbures saturés 18

I.2.7.2. Biodégradation des aromatiques..... 19

I.2.8. Les facteurs influençant la biodégradation 19

I.2.8.1. Composition chimique des hydrocarbures 19

I.2.8.2. Humidité 19

I.2.8.3. Température..... 19

I.2.8.4. Salinité 20

I.2.8.5. Potentiel d'hydrogène (pH) 20

I.2.8.6. Taux d'oxygène 20

I.2.8.7. Contenu en nutriments..... 20

I.3. Biodégradation des hydrocarbures par les biosurfactants 21

I.3.1. Définition des biosurfactants 21

I.3.2. Classification des biosurfactants 21

I.3.3. Utilisation des biosurfactants..... 21

II.1	Description de la zone d'étude (Sidi Fredj).....	23
II.1.1	Situation géographique	23
II.1.2	Description du port de sidi Fredj	23
II.1.3	Sources de pollution dans le port.....	24
II.2	Echantillonnage	25
II.3	L'étude expérimentale	26
II.3.1	Conditionnement du matériel.....	26
II.3.2	Préparation du milieu de culture ONR7	26
II.3.3	Enrichissement.....	28
II.3.3.1	Mode opératoire.....	28
II.3.3.2	Schéma récapitulatif.....	29
II.3.4	Dilution (10^{-4}).....	30
II.3.4.1	Mode opératoire	30
II.3.5	Dénombrement sur milieu gélosé	30
II.3.5.1	Dénombrement.....	30
II.3.5.2	Etalement liquide-solide	30
II.3.5.2.1	Mode opératoire	30
II.3.6	Réisolement sur milieu solide.....	31
II.3.6.1	Ensemencement solide-solide.....	31
II.3.7	Réisolement sur milieu liquide à partir d'un milieu solide.....	31
II.3.7.1	Ensemencement solide-liquide	31
II.3.7.2	Mode opératoire	31
II.3.8	Conservation des souches bactériennes par cryoconservation.....	32
II.3.8.1	Principe de la conservation des soches bactériennes par cryoconservation	32
II.3.8.2	Mode opératoire	32
II.4	Test biochimiques.....	32

II.4.1 Test catalase	32
II.4.1.1 Principe	32
II.4.1.2 Mode opératoire	33
II.4.2 Test oxydase	33
II.4.2.1 Principe	33
II.4.2.2 Mode opératoire	34
II.4.3 Coloration de Gram	34
II.4.3.1 Principe	35
II.4.3.2 Mode opératoire	35
II.4.4 Test de la biodégradation sur différentes sources de carbone.....	35
II.4.4.1 Principe	35
II.4.4.2 Mode opératoire	36
II.4.5 Indice d'émulsion E24	36
II.4.5.1 Principe	36
II.4.6 Effets des paramètres physicochimiques sur l'activité des bactéries hydrocarbonoclastes	37
II.4.6.1 Effet de la température.....	37
II.4.6.2 Mode opératoire	37
II.4.7 Effet du pH.....	38
II.4.7.1 Mode opératoire	38
II.4.8 Effet de la salinité	38
II.4.8.1 Mode opératoire	38
II.5 Cinétique de croissance des bactéries hydrocarbonoclastes.....	39
II.5.1 Mode opératoire	39
III.1. Enrichissement	41
III.2. Isolement sur milieu gélosé et dénombrement	42

III.3. Caractérisation biochimique	43
III.3.1 Coloration de Gram, test d'oxydase et catalase.....	43
III.4. Différenciation des souches en fonction des hydrocarbures métabolisés.....	45
III.5. Effets des paramètres physicochimiques sur l'activité des bactéries hydrocarbonoclaste.....	49
III.5.1 Effet de la température	49
III.5.2 Effet du pH	51
III.5.3 Effet de la salinité.....	52
III.6. Indice d'émulsion E24.....	54
III.7. Cinétique de croissance des souches bactériennes testées	55
CONCLUSION GENERALE	59
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	62
ANNEXES	70
RESUME.....	70

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

La pollution des océans par les hydrocarbures est un fléau qui affecte profondément la faune et la flore maritime, le grand public ne s'y intéresse que quand des accidents spectaculaires surviennent, un pétrolier qui se brise ou une plateforme qui explose, des nappes de pétrole dérivent alors vers les côtes et tuent les oiseaux de mer et les mammifères marins, mais ces naufrages ne représentent qu'environ 10% de la pollution maritime mondiale par les hydrocarbures, la plus grande part provient des rejets volontaires de navires ou des activités industriels sur la côte.

Cette pollution qu'elle soit chronique ou accidentelle constitue l'un des phénomènes de pollution les plus préoccupants, cette pollution peut avoir un impact soit direct ou indirect, sur la santé humaine et l'équilibre des écosystèmes. En fonction de la localisation du site, de son usage futur ou du coût, certains sites pollués peuvent ne pas être décontaminés. Lorsqu'ils sont dépollués, les eaux peuvent être soumises à des traitements chimiques, physiques ou biologiques. Les traitements biologiques utilisent l'action des agents biologiques. Il s'agit donc de la bioremédiation. **(TARAYRE 2012 ; MI JIN *et al.* 2013)**. La bioremédiation reste la solution la plus efficace, la plus demandée car elle est la mieux maîtrisée et la moins coûteuse **(VOGEL, 2001)**. Il s'agit là d'une technique douce dont le principe repose sur la minéralisation complète des produits pétroliers qui ne génèrent aucun sous-produit toxique ; contrairement aux procédés physicochimiques qui consistent souvent en un transfert de la pollution d'un milieu à un autre ou encore à son confinement **(VANDERCASTEEL, 2005)**.

Cette pollution nécessite donc l'intervention de différents facteurs pour l'élimination du pétrole du milieu marin. Parmi ces facteurs, la biodégradation par les microorganismes et en particulier les bactéries est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement. **(VANESSA S. CERQUEIRA *et al.* 2011)**. Même s'il est relativement lent, ce processus permet une dégradation quasi-complète (transformation en CO₂) des hydrocarbures **(SAURET, 2011)**.

De nombreuses bactéries ont été décrites comme étant capables de métaboliser l'une ou l'autre des fractions du pétrole. Certaines bactéries sont uniquement capables d'utiliser les hydrocarbures comme source de carbone principale et sont alors appelées des bactéries hydrocarbonoclastes. Ainsi, si on reste dans le cadre des bactéries marines, on trouve

principalement les bactéries des genres : *Cycloclasticus*, *Marinobacter*, *Neptunomonas*, *Oleiphilus*, *Oleispira*, *Thalassolituus* ou *Alcanivorax* (YAKIMOV *et al* 2007).

Toutes ces bactéries possèdent des voies enzymatiques qui permettent la métabolisation des hydrocarbures. Il peut s'agir de monooxygénase permettant la métabolisation des chaînes aliphatiques ou des hydrocarbures aromatiques.

Les conditions environnementales jouent un rôle très important dans le contrôle de la croissance et l'activité bactérienne durant la biodégradation d'hydrocarbure. Par conséquent, il est très important d'étudier l'effet des facteurs physico-chimiques comme la salinité et la température et même le pH sur la biodégradation du pétrole pour une implantation de la biodégradation comme une technologie de bioremédiation (MESBAIAH, 2013).

L'objectif principal de ce travail est la recherche des bactéries marines hydrocarbonoclastes et l'étude des effets des paramètres physicochimiques sur la croissance bactérienne et la biodégradation des hydrocarbures par des souches bactériennes isolées à partir de l'eau de mer et des sédiments marins contaminés par les hydrocarbures.

Notre travail est structuré comme suit :

- Le premier chapitre est consacré aux généralités, sur la pollution marine par les hydrocarbures, définition et classification des hydrocarbures et la bioremédiation par les bactéries hydrocarbonoclastes.
- Le second chapitre est réservé à la présentation de la zone d'étude, ainsi que le matériel et les méthodes appliqués dans les différentes étapes de la partie expérimentale.
- Le troisième chapitre est consacré à la présentation et la discussion en détail les résultats obtenus.
- Enfin, nous clôturons ce manuscrit avec une conclusion générale et quelques perspectives.

Chapitre I :

Généralités.

I.1. Pollution par les Hydrocarbures

I.1.1. Définition de la pollution

C'est une modification défavorable du milieu naturel (dégradation, altération) qui apparaît en totalité ou en partie comme le sous-produit de l'action humaine (**RODRIGO *et al.*, 2005**). La notion de la pollution est toute relative ; on peut considérer qu'il y a pollution par les hydrocarbures lorsque l'action de ceux-ci peut être néfaste aux conditions de vie de l'homme directement ou indirectement et si elle affecte les populations végétales et animales qui lui sont utiles (**BERTRAND et MILLE, 1989**).

Ces modifications peuvent affecter l'homme directement ou à travers des ressources agricoles, en eau et autres produits biologiques. Elles peuvent aussi l'affecter en altérant les objets physiques qu'il possède, Les possibilités du milieu ou encore en enlaidissant la nature (**EMILIA KOLLER, (2004)**).

I.1.2. Pollution par les hydrocarbures

Le pétrole constituant la première source mondiale d'énergie, la pollution par les hydrocarbures est la plus répandue et affecte le milieu marin, les environnements côtiers et tout particulièrement le sol et les eaux souterraines.

La cause principale de la pollution des eaux par les hydrocarbures est l'activité humaine littorale et en mer (activités maritimes) qui provoque des pollutions, chroniques ou aiguës, involontaires et accidentelles ou volontaires en mer, les navires, ainsi que les plates-formes de recherche ou d'exploitation pétrolière offshore, les gravières sous-marines, ou les dragages ou encore les installations aquacoles sont sources de rejets polluants.

Les hydrocarbures sont des contaminants environnementaux omniprésents. Ils constituent une classe des produits chimiques organiques dangereux dont certains de leurs effets toxiques sont reconnus comme fortement cancérogènes, génotoxiques, immunotoxique, mutagénique ou tératogénique. Ils représentent une menace pour la santé publique. (**ERIKSON *et al.*, 2003 in GUERMOUCH M'RASSI, 2014**).

L'exploitation des hydrocarbures nécessite et engendre des opérations et activités importantes qui perturbent notre environnement provoquant des effets néfastes pour la santé humaine –(**ARBAOUI NASREDDINE et AFFANE,2005**).En effet, la présence de polluants

dans le milieu marin pose des problèmes de toxicité dès lors que ces polluants peuvent migrer (via le ruissellement et les cours d'eau, ou est apportée par les vents et les pluies...) une fois dans la chaîne alimentaire

ils entrent en contact avec l'homme ou l'animal via son alimentation (**BELMENAI et BENHAFED ,2015**).

I.1.3. Définition et caractérisation

Composés exclusivement d'atomes de carbone et d'hydrogène, les hydrocarbures sont donc des composés organiques de formule brute : C_nH_m où n et m sont des entiers naturels. (**CHAKRABORTY et COATES, 2004**). Ils peuvent être associés en molécules d'une très grande diversité, des plus simples, aux plus complexes et mal connues qu'on trouve dans les fractions lourdes du pétrole brut et dans les schistes bitumineux (**BOCARD, 2006**).

Pour les substances dérivées, elles sont des substances dont la structure chimique, la nomenclature et le comportement schistes bitumineux (**BOCARD, 2006**), peuvent être assimilés à ceux d'un hydrocarbure (**MARTINELLI, 1999**). On les utilise comme carburants, combustibles, huiles lubrifiantes, et produits de base en synthèse pétrochimique car il présente une grande importance commerciale (**DALEMONT, 1998**).

I.1.4. Classification

Les hydrocarbures constituent la fraction la plus importante d'un brut pétrolier, ils représentent entre 65 et 95 % de la plupart des pétroles bruts. Ces hydrocarbures peuvent être classés en quatre familles principales qui sont présentes en proportions variables selon leur origine : les hydrocarbures saturés (30 à 70 %), les hydrocarbures aromatiques et polyaromatiques (20 à 40 %), les composés polaires (5 à 25 %) et les asphaltènes (0 à 10 %) (**BOUDERHEM.A.2011**).

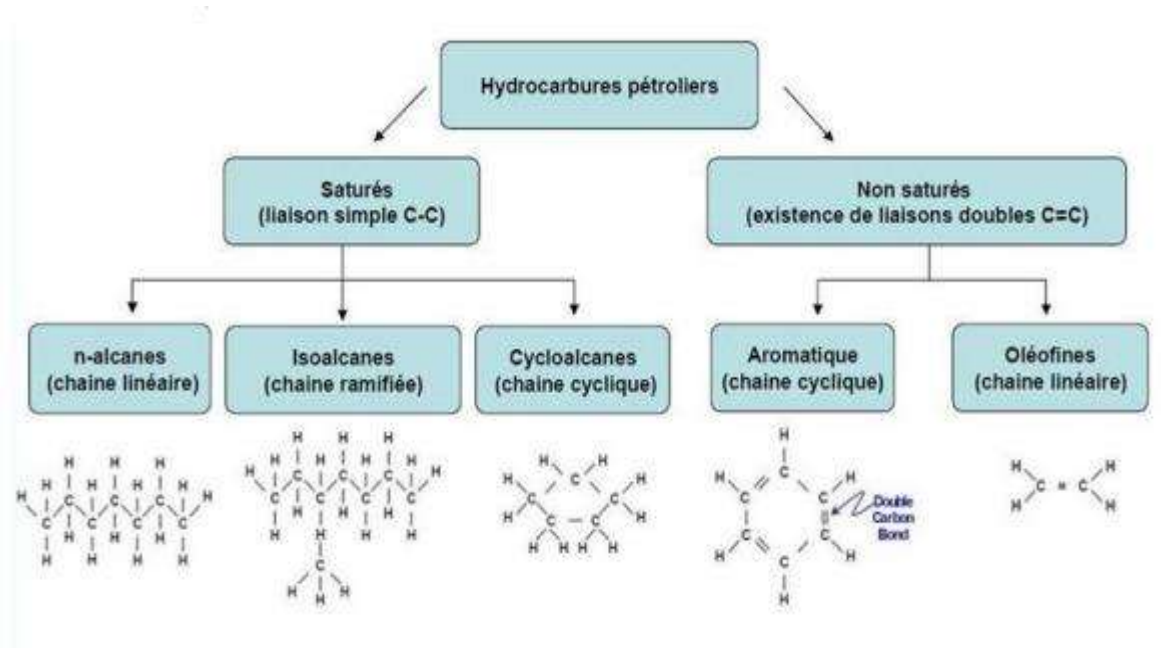


Figure I.1. Structure chimique des hydrocarbures pétroliers (COLOMBANO *et al*, 2008).

I.1.4.1. Hydrocarbures saturés

Parmi les hydrocarbures saturés on distingue :

a. Alcanes linéaires

Les alcanes linéaires (*n*-alcanes, C_nH_{2n+2}), dont la longueur de leur chaîne varie de 7 à 40 atomes de carbone constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier).

b. Alcanes ramifiés

Les alcanes ramifiés les plus abondants sont les *iso*-alcanes (groupement méthyle en position 2). Les autres composés ramifiés antéiso (groupement méthyle en position 3) ou polyramifiés tels que les isoprénoides (exemple : pristane, phytane) sont beaucoup moins nombreux. Ces composés se trouvent dans le pétrole brut à des proportions sensiblement égales à celles des *n*-alcanes.

c. Cycloalcanes

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

I.1.4.2. Les hydrocarbures aromatiques

Les hydrocarbures aromatiques sont des hydrocarbures cycliques polyinsaturés. La présence dans leur formule d'au moins un cycle à trois doubles liaisons conjuguées leur confère des propriétés remarquables (WAUQUIER, 1994). Plusieurs familles d'hydrocarbures aromatiques et polyaromatiques dont le nombre de noyaux varie de 2 à 6 sont présentes dans les pétroles bruts. Ces composés sont dominés par des composés mono-, di- et tri-aromatiques. En général, les hydrocarbures aromatiques sont moins abondants que les alcanes, et ne représentent que 10 à 30 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier. (SOLTANI, 2004).

I.1.4.3. Les asphaltènes

Les asphaltènes sont des composés de hauts poids moléculaires. Ils sont constitués d'une accumulation de feuillets aromatiques condensés très riches en carbone reliés par des chaînes saturées. Ces feuilles sont disposées en empilement qui peut acquérir un débit d'organisation graphique. De ce fait, les asphaltènes se prêtent à des études structurales par diffraction aux rayons X. Isolés, ils forment des solides noirs et brillant insolubles dans les alcanes légers (ROUSSEL et BOULET, 1994 ; TISSOT et WELTE, 1984).

I.1.4.4. Les composés polaires

Ils correspondent à des molécules hétérocycliques, telles que : Les composés oxygénés (phénol, acides carboxyliques, alcools, aldéhydes), les composés soufrés, (mercaptans, sulfures, disulfures) et les composés azotés (pyridines, quinoléines) (SOLTANI, 2004).

I.1.5. Sources de la pollution par les hydrocarbures

Les hydrocarbures dans l'environnement marin peuvent avoir trois origines principales :

- Les rejets industriels et urbains, sources d'hydrocarbures pétroliers ou Pyrolytiques.
- Les végétaux aquatiques (phytoplancton, macrophytes) et organismes hétérotrophiques (zooplancton, bacterioplancton).
- Les végétaux supérieurs terrestres via la matière organique détritique des sols, résultant du drainage des bassins versants.

Notons que la première origine est anthropique, alors que les deux dernières sont biogéniques, donc issues de la biosynthèse récente. (SOLTANI, 2004).

I.1.6. Origine de pollution par les hydrocarbures

Les hydrocarbures pétroliers qui arrivent dans l'environnement marin peuvent avoir plusieurs origines : les sources géochimiques dues aux fuites naturelles dans l'océan qui s'élève à 47%, l'extraction de pétrole 3%, le transport maritime 12% et la consommation forme 38% d'hydrocarbures répartis (SOLTANI, 2004).

On distingue deux origines de ces pollutions :

• Origines accidentelles

Où une grande quantité de polluant est déversée en fonction du temps (déversement ou dépôt ponctuel de polluants) (BELMENAI et BENHAFED, 2015).

L'exploitation humaine des gisements de pétrole n'a cessé d'augmenter depuis le début du siècle dernier. L'extraction, le transport, et l'utilisation de cette source d'énergie entraînent des risques de pollution pour l'environnement pouvant influencer l'équilibre écologique et parfois entraîner la destruction de l'écosystème (SOLTANI, 2004).

• Origines chroniques

C'est une pollution permanente causée soit par des émissions répétées ou continues de polluants, soit par la présence de polluants très rémanents.

Dont les effets cumulés peuvent être plus importants que ceux d'une pollution accidentelle (BELMENAI et BENHAFED, 2015).

I.1.7. Devenir et mobilité des hydrocarbures dans l'environnement

Les hydrocarbures rejetés dans l'environnement subissent à des séries de modification suite l'action de facteurs abiotiques et biologiques, peuvent être déplacé, transformer ou éliminer ces polluants, on citera les facteurs environnementaux qui sont :

a. Evaporation :

Ce phénomène touche les fractions de faible poids moléculaire et dépend des conditions atmosphériques (vent, vagues, température...). Les hydrocarbures les plus légers, ayant de 4 à 12 atomes de carbone ($T_{eb} < 270\text{ °C}$), qui représentent généralement près de 50% des hydrocarbures totaux d'un brut moyen, sont éliminés rapidement dès les premiers jours, pouvant conduire à une pollution de l'atmosphère. (SOLTANI, 2004).

b. Solubilité :

Bien que les hydrocarbures soient des composés insolubles dans l'eau ; certains d'entre eux peuvent partiellement se dissoudre (hydrocarbures aromatiques et hydrocarbures à faible nombre de carbone) (BERTRAND et MILLE, 1989).

c. Emulsification :

Deux types d'émulsions peuvent se former : eau dans l'huile appelée "mousse Chocolat" et huile dans l'eau. Les émulsions eau dans l'huile sont constituées par des hydrocarbures de haut poids moléculaires. Ces émulsions difficilement dégradables sont les précurseurs des résidus goudronneux retrouvés sur les plages, alors que les émulsions « huile dans l'eau » facilitent l'élimination des hydrocarbures (SOLTANI, 2004).

d. Sédimentation :

La sédimentation est le passage du pétrole de la surface vers le fond. Ce phénomène concerne les résidus goudronneux constitués de la fraction pétrolière la plus lourde et dont la densité est supérieure à celle de l'eau de mer. (VANDERSTEEL, 2005).

La sédimentation conduit à la constitution d'agrégats de haute densité difficilement dégradable par voie naturelle. (SOLTANI, 2004).

e. Photo oxydation :

La photo- oxydation est observée au niveau de la surface de l'eau où l'air et la lumière sont présents pour la transformation des hydrocarbures (**PAYNE et PHILLIPS, 1985**).

I.1.8. Impacts de la pollution par les hydrocarbures

Les impacts de la pollution par les hydrocarbures sont multiples. Les aspects les plus évidents sont les grandes catastrophes très médiatisées comme les marées noires : forte mortalité de la faune aquatique, bords de mer englués, Il ne faut pas négliger les conséquences économiques de ces événements pour les riverains vivant de la pêche ou du tourisme ainsi que pour les collectivités territoriales et l'état. Mais les effets à court terme comme à très long terme sur les écosystèmes terrestres et aquatiques sont mal connus. (**SOLTANI,2004**).

En effet, la présence de polluants dans le milieu marin pose des problèmes de toxicité dès lors que ces polluants peuvent migrer (via le ruissellement et les cours d'eau, ou est apportée par les vents et les pluies...) une fois dans la chaîne alimentaire ils entrent en contact avec l'homme ou l'animal via son alimentation (**BELMENAI et BENHAFED ,2015**).

Les déversements d'hydrocarbure peuvent avoir des répercussions sérieuses sur l'environnement marin, tant par engluement physique que par toxicité. la sévérité de l'impact dépend généralement de la quantité et du type d'hydrocarbure déversé, des conditions ambiantes ainsi que de la sensibilité aux hydrocarbures des organismes touchés et de leur habitat. (**ITOPF guide d'information technique,2013**).

a. Impact sur l'homme :

L'homme et les animaux en général, absorbent les hydrocarbures et leurs produits dérivés via la nourriture, l'eau, par contact avec la peau et les cuticules, ou encore par inhalation. Une étude conduite aux Etats Unis a mis en évidence la présence des substances d'hydrocarbures dans différentes matrices tels que l'urine, le sang, les tissus adipeux et même le lait maternel (**KOUZAYHA, 2011**).

b. Impact sur l'écosystème aquatique :

Les voies de transfert et les propriétés des substances conditionnent l'état (dissous ou adsorbé à des particules) dans lequel les hydrocarbures arrivent dans les milieux aquatiques.

La forme chimique des molécules peut fortement conditionner leur biodisponibilité et donc fréquemment leur toxicité pour les organismes aquatiques. Tous les groupes d'organismes aquatiques ne sont pas exposés de la même façon, en fonction de leurs caractéristiques anatomiques, physiologiques et écologiques (habitat, ressources alimentaires utilisées, etc.). Quelle que soit la substance, les conséquences de l'exposition sur les organismes aquatiques peuvent découler d'effets directs ou indirects, ou de la combinaison des deux types d'effets. Au sein des écosystèmes, les effets directs des hydrocarbures affectent les quatre compartiments de l'environnement aquatique : producteurs primaires, zooplancton macrobenthos, poissons et amphibiens. Les effets toxiques directs peuvent entraîner des modifications des interactions biologiques et de divers processus qui impliquent des espèces qui sont moins sensibles à ces substances. (KOUZAYHA,2011).

c. Impact économique :

- La pollution par les hydrocarbures touche l'homme et la nature, les dégâts causés par cette pollution provoquent :
- L'appauvrissement des populations à cause des conflits et des maladies ainsi qu'ils endommagent le paysage des sites touristiques.
- La contamination des produits de la pêche qui deviennent impropres à la consommation (chômage technique des flottilles de pêche, et des emplois induits à terre).

d. Impact sanitaire :

- Les produits pétroliers provoquent une série d'effets physiologiques et toxiques.
- Les composants volatils du pétrole peuvent brûler les yeux, causer des brûlures de la peau, irriter ou endommager les membranes sensibles dans le nez, les yeux et la bouche.
- Les hydrocarbures peuvent déclencher une pneumonie si elles pénètrent dans les poumons.
- Le benzène, le toluène et autres hydrocarbures légers sont transférés rapidement par la circulation sanguine dans les poumons et peuvent endommager les globules rouges, supprimer le système immunitaire, la souche du foie, la rate et les reins et même interférer avec le système reproducteur des animaux et les humains.

I.1.9. Les accidents pétroliers en milieu marin

I.1.9.1. Les accidents pétroliers dans le monde

Les mers et les océans ont été le théâtre d'innombrables mésaventures au fil de l'histoire. Même en excluant les conflits navals des grandes guerres, les 100 dernières années ont connu leur lot de catastrophes (GUERMOUCHE M'RASSI, 2014).

D'autres sources viennent alourdir le bilan, citons l'exemple de la première guerre du Golfe, où la fin du conflit en 1991 a révélé la catastrophe des champs de puits de pétrole en flamme et le naufrage de pétroliers bombardés, déversant des quantités importantes de brut. Le bilan total a été estimé à 800 000 tonnes déversées, 40 millions de tonnes de sols saturés de pétrole et 700 km de côtes polluées (GUERMOUCHE M'RASSI, 2014).

I.1.9.2. Les accidents pétroliers en Algérie
L'Algérie occupe la 12eme place mondiale en production de pétrole, représentée essentiellement par le bassin de Hassi Messaoud, constitue une véritable métropole économique, grâce aux activités d'exploration, de production et de transport des hydrocarbures. Le phénomène de pollution hydrocarbonée a une importance de plus en plus grande sur les plans environnemental, sanitaire et économique. Cette pollution peut avoir un impact soit direct ou indirect, sur la santé humaine et l'équilibre des écosystèmes aussi bien marins que continentaux, (MBONIGABA *et al*, 2009).

Les villes côtières d'Algérie connaissent de graves problèmes de pollution, notamment une importante pollution par les hydrocarbures due au fort trafic pétrolier au large des côtes algériennes. (Plages souillées, débris flottant sur les eaux, nappes d'hydrocarbures ou boues de goudron, rejets de déchets industriels et d'eaux d'égout...). Le rejet illicite en mer est une opération qui consiste à déverser des produits de toute nature qui s'apparentent, le plus souvent, à des hydrocarbures, des mélanges eau et hydrocarbures ou des boues d'hydrocarbures.

Elle désigne la ventilation et l'évacuation des gaz produits par les hydrocarbures dans les citernes d'un navire.

Ces gaz nocifs doivent être éliminés pour permettre aux hommes de pénétrer dans les citernes. Concernant le déballastage, il s'agit de l'opération de déchargement des eaux de lestage du navire, des résidus de cargaison liquide et des résidus de fonctionnement.

Dégazage et déballastage désignent le déversement de polluants en mer, notamment d'hydrocarbures. Les spécialistes soutiennent que les deux opérations doivent se faire au niveau des installations portuaires. Mais, pour fuir le coût, des navires vident leurs citernes et leurs cuves dans les mers et les océans. Que cela soit à Alger, à Oran, à Annaba, à Ghazaouet, à Mostaganem, à Arzew, à Béjaïa, ou à Skikda, le mal est visible. Véritable tableau noir sur la grande bleue (la méditerranée). Les chiffres font état de plus de 50 millions de tonnes de pétrole et de produits pétroliers qui sont exportés annuellement à partir des ports algériens et tunisiens. La Méditerranée est l'une des mers les plus polluées dans le monde. Elle représente 50% de la navigation maritime mondiale dont plus de 20% sont des hydrocarbures. Selon eux, la pollution par les hydrocarbures peut être accidentelle, mais la principale source est volontaire. Les scientifiques ont rappelé que 21 accidents ont été enregistrés en Algérie en 37 ans, dont le plus récent est la fuite d'hydrocarbures dans le port d'Alger. Pour un chercheur dans l'impact de la pollution sur les écosystèmes marins, beaucoup de questions s'imposent concernant l'Algérie.

En 1980, l'Algérie non plus n'a pas été épargnée, à ce titre, l'accident du pétrolier Juan Lavallega a déversé plus de 40 000 tonnes de pétrole dans les eaux territoriales algériennes. Un plan d'action Algérien national pour la réduction de la pollution marine due à des activités industrielles menées à terre a été élaboré sous l'égide du Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement. (GUERMOUCHE M'RASSI, 2014).

I.2. Biodégradation des hydrocarbures

I.2.1. Biodépolluants

Une méthode plus pratique pour épurer les environnements contaminés par des produits dangereux est la biorémediation ou la dépollution biologique (DAVID ,2005). Il s'avère que le traitement des terres polluées se fait majoritairement à l'aide de techniques biologiques

qui s'appliquent préférentiellement hors site, dans des installations spécialisées recevant des terres de plusieurs origines suivant les techniques de biodépollution des sols in situ puis la biodégradation des polluants des terres mises en andain sur le site. Ces techniques se basent sur le fait que les micro-organismes qui se développent dans un sol pollué y trouvent des conditions favorables et se nourrissent notamment du polluant présent qui est alors dégradé. En modulant des paramètres comme l'oxygène, l'humidité, la température et les éléments nutritifs, la croissance des microorganismes dépollueurs peut être optimisée. (DAVID .C ,2005).

I.2.2. Bioremédiation

La bioremédiation est définie par l'utilisation d'organismes vivants pour détruire les polluants environnementaux. La bioremédiation est une technique de traitement biologique des sols pollués qui emploie des microorganismes en tant qu'agents de dégradation de la pollution. La bioremédiation est définie par l'utilisation d'organismes vivants pour détruire les polluants environnementaux. Elle a été appliquée au traitement de contaminations inhabituelles (PERRY, 2001) par l'activité des bactéries l'action de leur condition de prolifération (KOLLER, 2004).

I.2.3. Microorganismes qui dégradent les hydrocarbures

Les microorganismes jouent un rôle important dans la biodégradation des polluants organiques dans les écosystèmes. Cette dégradation résulte de voies métaboliques qui mettent en jeu des populations microbiennes spécifiques ou des capacités métaboliques combinées concernant différentes communautés microbiennes (TRZESICKA-MLYNARZ et WARD, 1995).

I.2.4. Définition des bactéries hydrocarbonoclastes

Les bactéries hydrocarbonoclastes utilisent les hydrocarbures pétroliers comme seule source de carbone. Elles sont ubiquistes et présentes en faible quantité dans les environnements dépourvus de contamination. Naturellement, leurs effectifs sont accrus dans les zones chroniquement polluées par les hydrocarbures et augmentent après un apport de pétrole. (SAURET, 2011).

De nombreuses bactéries dégradant les hydrocarbures, ont été isolés des milieux marins. Cependant, le nombre de genres de bactéries ayant la capacité de dégrader les hydrocarbures de pétrole isolé à partir de l'eau de mer est inférieure à celle isolée à partir des sédiments

Ainsi si on reste dans le cadre des bactéries marines, on trouve principalement les bactéries des genres *Cycloclasticus*, *Marinobacter*, *Neptunomonas*, *Oleiphilus*, *Oleispira*, *Thalassolituus* ou *Alcanivorax* (**Figure I.2**).

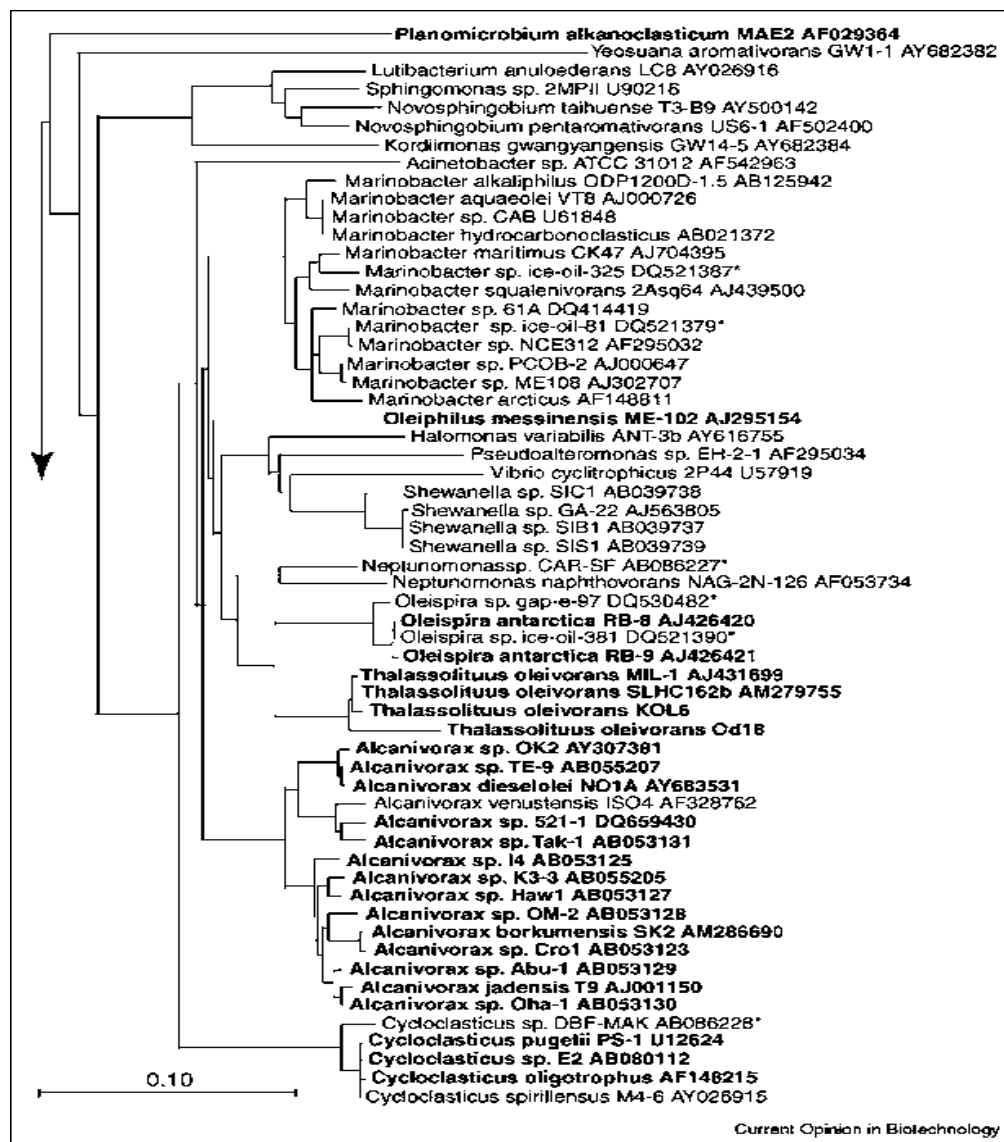


Figure I.2 : Affiliation phylogénétiques des bactéries marines hydrocarbonoclastes (YAKIMOV *et al*, 2007).

I.2.5. Biogéographie des bactéries marines hydrocarbonoclastes

Les bactéries hydrocarbonoclastes ont été isolées dans tous les types d'environnement

marin : eau de surface, masses d'eau de mer profondes et peu profondes, sédiments (HEAD *et al*, 2006), les événements hydrothermaux et les volcans de boues (VETRIANI *et al*, 2005), dans les coraux, éponges et dans les dinoflagellés d'embauches d'aquaculture (GREEN *et al.*, 2004).

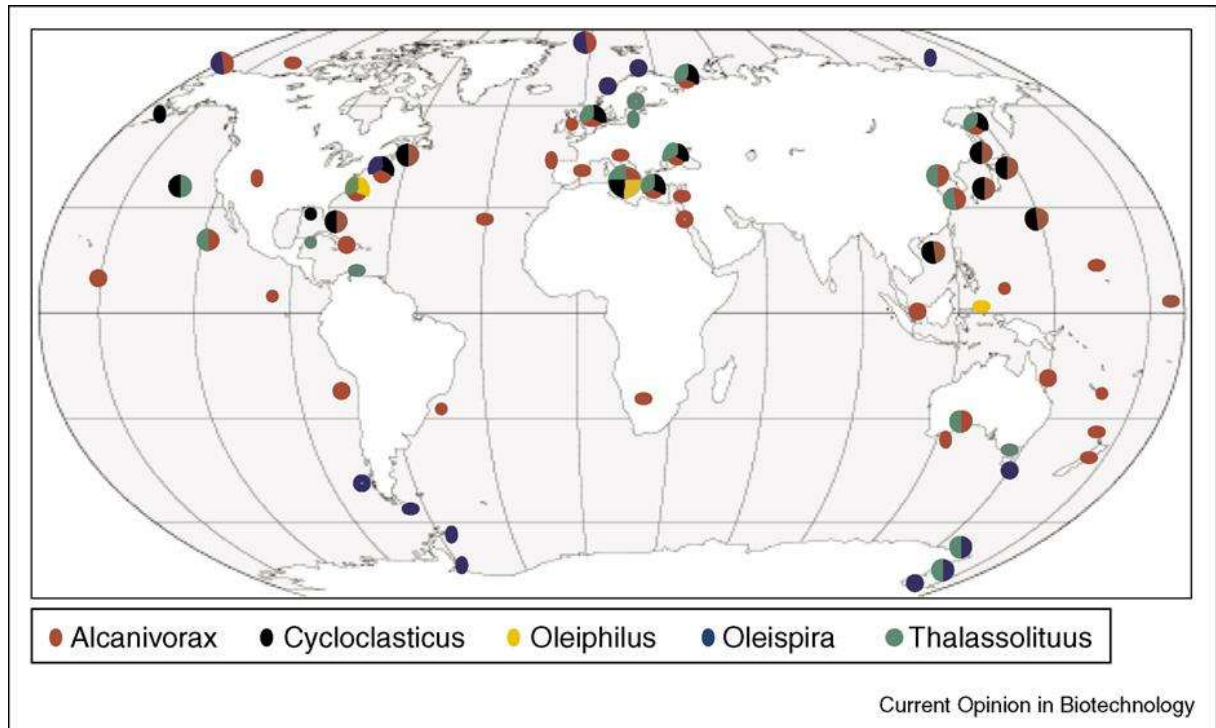


Figure I.3 : Répartition géographique des isolats à partir des séquences de gènes ARNr 16S des bactéries hydrocarbonoclastes (YAKIMOV *et al*, 2007).

Alcanivorax en rouge, est une bactérie qu'on trouve un peu partout et dans tous les types de milieux marins c'est une espèce cosmopolite, *Thalassolituus* et *Cycloclasticusspp* sont également largement distribués, bien qu'elles aient été trouvées principalement dans l'hémisphère nord.

Par contre *oleispira* est jusqu'à présent limitée aux eaux froides aux hautes latitudes, et *Oleiphilus* la moins présente initialement isolée à partir de sédiments portuaires en Italie et également trouvée en Atlantique Nord et Pacifique équatorial.

I.2.6. Propriétés des bactéries marines hydrocarbonoclastes

Les études sur ces bactéries ont montré que le cytoplasme est très dilué, et que la masse sèche par cellule est 7 à 8 fois inférieure à celle d'*E. coli* mais l'ADN constitue jusqu'à 14% de ce poids sec alors que chez *E. coli* il est de 2%, peu de protéines et petite taille du génome

se sont des propriétés caractéristiques de ces bactéries. Elles peuvent utiliser seulement les hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie et en règle générale ne métabolisent pas les sucre et acides aminés. (**HEAD et al, 2006**).

Mais la propriété la plus importante de ces bactéries est qu'elles produisent des biosurfactants, Comme les hydrocarbures sont hydrophobes et peu soluble dans l'eau, les microorganismes produisent des biosurfactants qui sont des produits de surface actif, qui réduisent la tension superficielle des fluides et favorisent le mélange des phases hydrophobes et hydrophiles. Ces biosurfactants favorisent l'émulsification de l'huile en suspension dans l'eau et augmentent sa surface spécifique et donc accélérer son métabolisme.

I.2.7. Biodégradation par types d'hydrocarbures

I.2.7.1. Biodégradation des hydrocarbures saturés

La biodégradation des hydrocarbures saturés est essentiellement un processus aérobie réalisé par des bactéries. Une spécialisation nette des microorganismes selon les longueurs de chaîne des alcanes est une première caractéristique importante. En effet, les bactéries méthylophes strictes sont seules capables (hormis quelques levures) de dégrader le méthane. Elles sont très répandues dans la nature, ce qui reflète la large distribution du méthane dans l'environnement. Ces bactéries appartiennent à cinq genres de bactéries Gram-négatives (*Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylomonas*, *Methylocystis*, *Methylosinus*) (**PARALES et al., 2000**).

Les alcanes à chaîne moyenne (C₅-C₁₀) sont utilisés notamment par des espèces de bactéries du genre *Pseudomonas* comme *P. aeruginosa*, *P. putida* et *P. oleovorans* (**KAISTNER et al., 1994 ; VANDECASTEELE, 2005**). Les alcanes à chaîne longue (C₁₀-C₂₀) sont très bien utilisés par les microorganismes, plus rapidement que les alcanes moyens. Les bactéries remplissant ce rôle appartiennent en particulier aux groupes des *Corynebacterium*, *Mycobacterium* et *Nocardia* (CMN) ; notamment au genre *Rhodococcus*, (**WHYTE et al., 1998**). De plus, les alcanes à très longue chaîne (>C₂₀) sont également dégradés par les microorganismes, (**BALLERINI et VANDECASTEELE, 1999**).

I.2.7.2. Biodégradation des aromatiques

I.2.8. Les facteurs influençant la biodégradation

Les micro-organismes ont la capacité à dégrader le pétrole grâce à la production des enzymes capables de le décomposer, beaucoup plus rapidement dans des conditions environnementales optimales. Certains facteurs influençant cette activité enzymatique parmi lesquels :

I.2.8.1. Composition chimique des hydrocarbures

Les hydrocarbures pétroliers diffèrent par leur susceptibilité aux attaques microbiennes. Ainsi, la vitesse de biodégradation est plus élevée pour les hydrocarbures saturés, viennent ensuite les aromatiques légères, les aromatiques à haut poids moléculaire et les composés polaires ayant la vitesse de dégradation la plus faible (**SOLTANI, 2004**).

I.2.8.2. Humidité

L'humidité est un paramètre important dans les processus de dégradation des composés organiques simples ou complexes. Il est connu que les faibles humidités inférieures à 2% limitent la vitesse de biodégradation (**BLIFERT et PERRAUD, 2004**).

Inversement, des teneurs trop élevées vont influencer sur la perméabilité des sols aux gaz et générer des conditions de limitations de transfert d'oxygène et donc de limitation de métabolisme microbien aérobie (**BLIFERT et PERRAUD, 2004**).

I.2.8.3. Température

La température influence profondément la multiplication microbienne et sur leurs métabolismes. Les températures optimales de la croissance et de l'activité des réactions chimiques des microorganismes du sol varient selon l'espèce. L'intervalle de température favorable à la bonne activité microbienne se situe entre 20 et 37°C (**SCRIBAN, 1999 ; GIBBS et al., 2001**).

I.2.8.4. Salinité

La température influe profondément la multiplication microbienne et sur leurs métabolismes. Les températures optimales de la croissance et de l'activité des réactions chimiques des microorganismes du sol varient selon l'espèce. L'intervalle de température favorable à la bonne activité microbienne se situe entre 20 et 37°C (**SCRIBAN, 1999 ; GIBBS *et al.*, 2001**).

I.2.8.5. Potentiel d'hydrogène (pH)

C'est un paramètre chimique caractérisant l'acidité ou la basicité d'un milieu. Il résulte de la composition ionique de l'eau, et essentiellement de la présence des carbonates issus de l'échange de dioxyde de carbone (CO₂) à l'interface air-mer, ainsi que de la dissolution du calcaire.

L'activité microbienne est largement influencée par le pH, dont l'optimum est compris entre 6 et 8 pour les bactéries et entre 4 et 5 pour les champignons (**BOCARD, 2006 ; GABET, 2004**).

I.2.8.6. Taux d'oxygène

Le processus biologique aérobie est souhaitable pour la bioremédiation de sol pollué par le diesel (**BRINKMANN *et al.*, 1998**). Ainsi, la respiration aérobie semble être le mécanisme primaire pour la biodégradation des hydrocarbures (**GREER *et al.*, 2003**). Plusieurs auteurs montrent que la biodégradation anaérobie est plus lente que la biodégradation aérobie (**HUANG *et al.*, 2000**).

I.2.8.7. Contenu en nutriments

Les nutriments sont indispensables à l'activité et au développement des microorganismes. Ce sont des corps simples qui peuvent être assimilés, sans transformation digestive par les organismes et favoriser la croissance des populations de bactéries. Les plus importants sont l'azote et le phosphore (N, P) (**BAROAAH et BORTHAKOR, 1999**).

I.3. Biodégradation des hydrocarbures par les biosurfactants

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

I.3.1. Définition des biosurfactants

Les biosurfactants sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe non polaire. Généralement, le groupement hydrophile est constitué d'acides aminés, peptides ou de polysaccharides (mono ou di) ; le groupement hydrophobe est constitué d'acides gras saturés ou non saturés (**DESAI et BANAT, 1997**).

La portion hydrophile de la molécule permet de distinguer quatre types chimiques de biosurfactants : les cationiques qui possèdent une charge positive ; les anioniques, agents de surface possédant un ou plusieurs groupes fonctionnels s'ionisant en solution aqueuse pour donner des ions chargés négativement ; les non ioniques, sans charge et les amphotères (zwitterioniques) qui possèdent deux groupements hydrophiles différents : l'un anionique et l'autre cationique. Selon le pH de la solution, ils peuvent agir en tant qu'espèce anionique, cationique ou neutre (**WEST et HARWELL, 1992**). La portion hydrophobe, quant à elle, influe sur la chimie du biosurfactant par son aromaticité, son nombre de carbones ou son degré de ramification (**WEST et HARWELL, 1992**).

I.3.2. Classification des biosurfactants

Les biosurfactants sont classés suivant la nature biochimique du surfactant produit par le micro-organisme. On distingue cinq grandes classes de biosurfactants : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les liposaccharides et les lipides neutres (**HEALY *et al.*, 1996**).

I.3.3. Utilisation des biosurfactants

Les biosurfactants sont reconnus pour être non toxiques, biodégradables et peuvent être utilisés dans des conditions extrêmes (**BANAT *et al.*, 2000**). C'est pourquoi ils peuvent être utilisés dans de nombreux domaines. Cependant, il semblerait que les biosurfactants soient principalement utilisés par l'industrie pétrochimique (**CHRISTOFI et IVSHINA, 2002**).

Chapitre II :

Matériels et méthode.

Dans le but d'isoler et caractériser les bactéries marines hydrocarbonoclastes, une sortie sur terrain a été effectuée dans le port de Sidi Fredj, 5 échantillons d'eaux et 3 échantillons de sédiments ont été prélevés.

L'objectif de ce travail est l'isolement de ces bactéries marines et l'étude des effets des paramètres physico-chimiques sur leur activité.

II.1 Description de la zone d'étude (Sidi Fredj)

II.1.1 Situation géographique

La localité de Sidi Fredj appartient, du point de vue administratif à la commune de Staoueli, daïra de Zéralda et wilaya d'Alger. Elle se situe environ à 25 kilomètres à l'Ouest du chef-lieu. C'est une presque île localisée dans la partie Ouest de la baie d'El Djamila. Cette baie est délimitée par deux promontoires rocheux :

- Sidi Fredj à l'Ouest,
- Ras Acrata au Nord-est.

Le port de Sidi Fredj :

Le port de Sidi Fredj est implanté dans l'anse Est de la presque île, il est conçu de telle manière à ne pas casser l'harmonie du site permettant ainsi de former avec le paysage alentour, une très belle station balnéaire très convoitée par le tourisme en période estivale.

II.1.2 Description du port de sidi Fredj

Le port est subdivisé en cinq (5) bassins aménagés pour permettre l'accostage des petits bateaux ou embarcation.

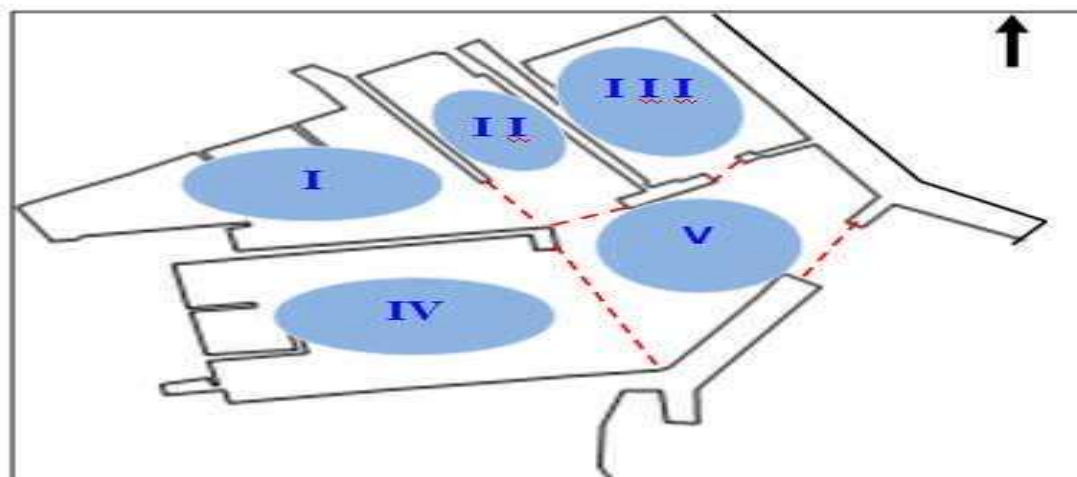


Figure II .1 : Description des différents bassins du port de sidi Fredj (BOUAZIZ, DJERRAI, 2010).

Bassin I : C'est le bassin le plus éloigné de l'entrée du port, et c'est lui qui accueille le déversement des eaux usées par égout provenant des restaurants qui se trouvent au niveau du site.

Bassin II : Délimité par l'épi de la tour mauresque et l'épi de la station d'essence.

Bassin III : C'est le bassin de l'hivernage, délimité par la grande jetée.

Bassin IV : Délimité par l'appontement trois (3) à l'intérieur et la jetée sud à l'extérieur

Bassin V : Situé à la sortie du port et communique avec le large.

Le port qui couvre une superficie de 38 000 m² est protégé par des ouvrages contre la houle, et qui servent de délimitation. Ils sont protégés par des enrochements naturels.

Ces ouvrages comprennent :

- Une jetée nord principale, longue de 230 m se termine par un musoir, servant de barrière de protection contre les vents, et un phare,
- Une jetée Sud, secondaire de 215 m.

II.1.3 Sources de pollution dans le port

La pollution dans ce port de plaisance est surtout de type domestique, à caractère saisonnier. A cette pollution s'ajoute un apport de polluants issus des opérations de carénage (peinture, essence, détergent, etc....) qui se réalisent dans l'un des bassins du port. (BOUAZIZ et DJERRAI ; 2010).

Stratégie d'échantillonnage :

Afin d'isoler le plus grand nombre des bactéries possible nous avons effectué l'échantillonnage dans le port de sidi Fredj zone contaminée par les hydrocarbures.

Les prélèvements ont été effectués sur quatre stations au niveau du port :

(S1 : Une station à quai ; S2 : Une station au centre du bassin III ; S4 : Une station à la sortie du port ; S3 : Une station au centre du bassin V et une station en dehors du port S5 : Une station en face d'oued Mazafron (**Figure II.2**).

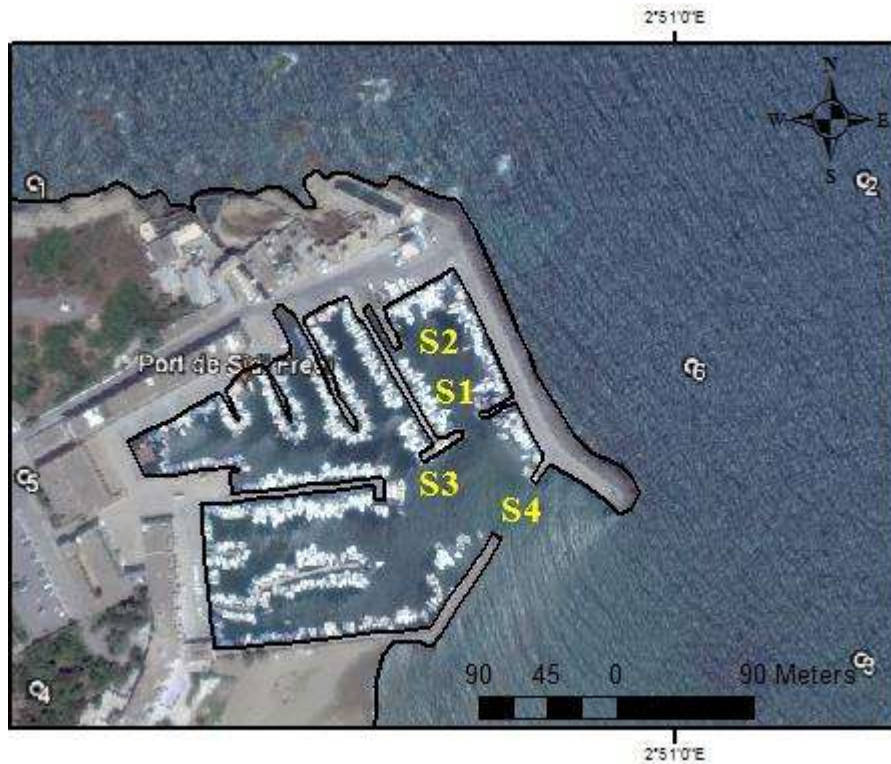


Figure II.2 : Carte géographique représentant les différentes zones de prélèvement.

II.2 Echantillonnage

Les prélèvements ont été effectués manuellement à 30 cm de la surface de l'eau dans des flacons en verre stériles et étiquetés pour la matrice « eau », et à l'aide d'une benne Van Veen pour la matrice « sédiment ». Les échantillons de sédiment ont été mis dans des tubes coniques (Falcon) stériles. Tous les échantillons ont été transportés dans le laboratoire dans une glacière, puis conservés à 4°C.

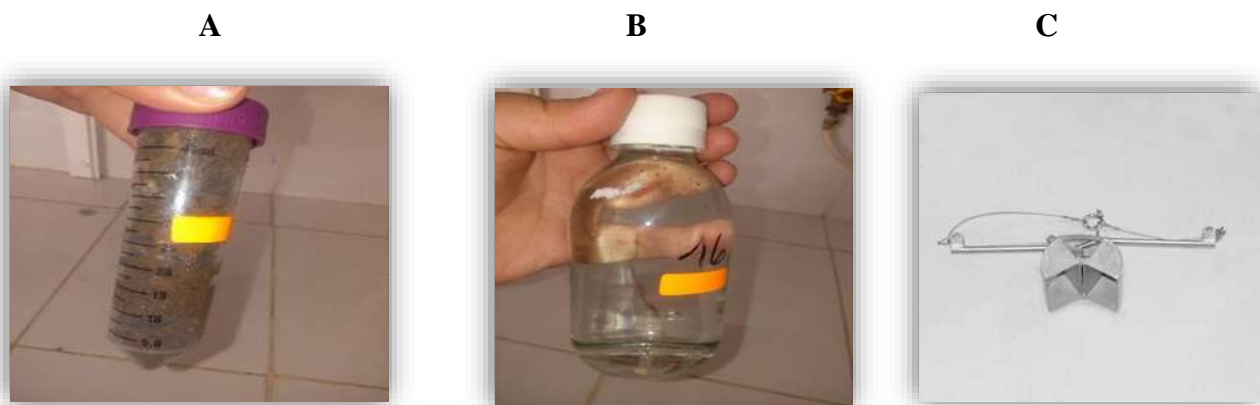


Figure II.3: Matériel de l'échantillonnage, A : tube conique, B : flacon en verre, C : une benne preneuse.

II.3 L'étude expérimentale

II.3.1 Conditionnement du matériel

Avant de commencer les manipulations au laboratoire de microbiologie il faut d'abord conditionner tout le matériel nécessaire :

- Lavage de la verrerie (les flacons, les tubes à essai, les tubes coniques, ... Etc.) ;
- Séchage à 40°C dans l'étuve ;
- Stérilisation à 121°C pendant 15min dans un autoclave.

II.3.2 Préparation du milieu de culture ONR7

Les bactéries hydrocarbonoclastes exigent de se développer dans un milieu de culture particulier ONR7 dont la composition chimique presque identique à celle de l'eau de mer. C'est le milieu le plus communément utilisé pour l'isolement des bactéries marines hydrocarbonoclastes.

Mode opératoire :

Solution 1

NaCl	22,8 gr
Na₂SO₄	3,98 gr
KCl	0,72 gr
NH₂Cl	0,27 gr

Chapitre II : Matériel et méthode.

Tris	1,3 gr
NaBr (0,83 gr dans 10 ml)	1 ml
NaHCO₃ (1,55 gr dans 50 ml)	1 ml
H₃BO₃ (1,35 gr dans 50 ml)	1 ml
NaF (0,13 gr dans 50 ml)	1 ml
Na₂HPO₄ (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) remué avec un agitateur magnétique jusqu'à solubilisation complète ;
- Ajouter tous les éléments traces devant un bec bensen (zone stérile) ;
- Ajuster le pH à 7,6 avec du NaCl ;
- Porter au volume final (600 ml) ;
- Autoclaver.

Pour le milieu solide : ajouter 15 gr de l'agar bactériologique directement dans la solution 1

Solution 2

MgCl₂, 6H₂O	11,18 gr
CaCl₂, 2 H₂O	1,46 gr
SrCl₂, 6H₂O (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) remuer avec un agitateur magnétique jusqu'à solubilisation complète ;
- Ajouter tous les éléments traces devant un bec bunsen (zone stérile) ;
- Porter au volume final (300 ml) ;
- Autoclaver.

Solution 3

FeCl₂, 4H₂O (0,1 gr dans 50 ml)	1 ml
--	-------------

Volume final

100 ml

- Déplacer devant un bec bunsen la quantité désirée de solution de FeCl₂ dans un Falcon 50 ml. Ajouter de l'eau distillée ;
- Stériliser la solution par filtration à travers le filtre de 0,22 µm directement dans la solution 2 ;
- Verser le tout dans la solution 1.

II.3.3 Enrichissement

Pour l'enrichissement et l'isolement des bactéries marines hydrocarbonoclastes nous avons suivi le protocole de (CATANIA.V *et al.*, 2014).

Le lendemain du prélèvement Les échantillons ont été enrichis en additionnant 1% d'échantillon et 0,1% de pétrole brut (source de carbone) au milieu de culture ONR7 (99ml).

II.3.3.1 Mode opératoire

- Remplir 99ml de milieu ONR7 dans des flacons stériles ;
- Ajouter 1ml de l'échantillon d'eau de mer pour la matrice eau et 1g de la matrice sédiment ;
- Ajouter 100µl de source de carbone, pour cela nous avons utilisé du pétrole brut et un mélange d'alcane (C₁₄+C₁₆+C₁₈) ;
- Préparer le **contrôle négatif** sans échantillon pour confirmer et comparer les résultats (99ml de l'ONR7+ 100µl d'hydrocarbure) ;
- Etiqueter les flacons et les incuber avec agitation à 30°C pendant 10 jours.

II.3.3.2 Schéma récapitulatif

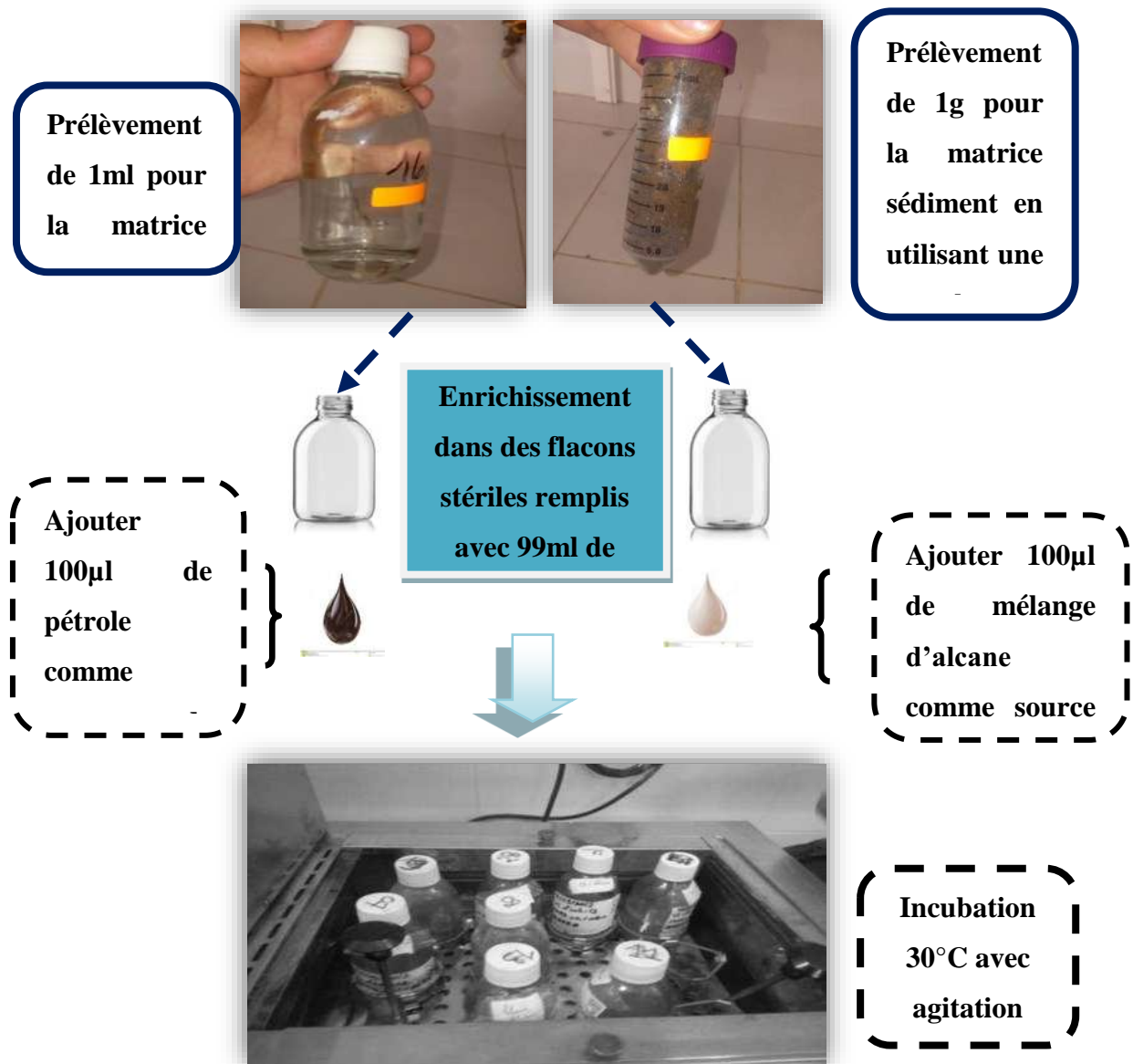


Figure II.4: Principe d'enrichissement dans un milieu liquide.

II.3.4 Dilution (10^{-4})

II.3.4.1 Mode opératoire

Prélever 1ml de la culture bactérienne (10^{-2}) et la verser dans un flacon en verre stérile remplis de 99ml de ONR7, puis ajouter 100 μ l d'hydrocarbure et les incuber à 30°C avec agitation pendant 10 jours.

II.3.5 Dénombrement sur milieu gélosé

II.3.5.1 Dénombrement

Le dénombrement microbiologique sur milieu solide est une technique scientifique de comptage des bactéries. Ce procédé est avant tout destiné pour connaître la présence ou non de ces bactéries dans l'eau de mer. Afin d'effectuer le dénombrement en milieu solide, le nombre des colonies bactériennes doit être inférieure à 300 et supérieure à 30 colonies.

II.3.5.2 Etalement liquide-solide

Afin de décrire phénotypiquement les souches obtenues à partir de l'enrichissement, il est nécessaire de passer par l'étape de l'étalement sur milieu solide.

II.3.5.2.1 Mode opératoire

- Prélever des aliquotes 100 μ l de culture liquide à partir des flacons d'enrichissement ;
- Verser l'inoculum sur le centre de la surface de la gélose ;
- Etaler à l'aide d'un râteau déjà préparé à partir d'une pipette pasteur l'inoculum sur toute la surface de la gélose ;
- Laisser sécher.
- Ajouter 100 μ l d'hydrocarbure (pétrole ou alcane) sur le couvercle de la boîte soit en utilisant des embouts stériles contenant l'hydrocarbure et qui sont directement mis sur le couvercle de la boîte, soit sur du papier filtre.
- Fermer la boîte à l'aide d'un parafilm pour éviter toute évaporation d'hydrocarbure.
- Etiqueter et incuber les boîtes dans l'étuve à 37°C jusqu'à croissance bactérienne

Remarque : il n'est pas possible de verser directement l'hydrocarbure sur la surface de la gélose vue que ce dernier ne s'étale pas correctement et risque de s'évaporer.

II.3.6 Réisolement sur milieu solide

II.3.6.1 Ensemencement solide-solide

Après croissance bactériennes sur milieu solide, les colonies phénotypiquement différentes obtenues à partir des boîtes ont été réisolées sur milieu solide, afin de les purifier. Les colonies ont été réisolées dans les mêmes conditions que l'étape précédente.

II.3.7 Réisolement sur milieu liquide à partir d'un milieu solide

II.3.7.1 Ensemencement solide-liquide

Cette méthode consiste à ensemencer les colonies purifiées dans du milieu liquide avec hydrocarbures, afin d'éliminer les bactéries autotrophes et pour s'assurer que les colonies obtenues ont utilisé l'hydrocarbure comme source de carbone.

II.3.7.2 Mode opératoire

- Verser 5 ml de milieu ONR7 dans un tube à essai stérile.
- A partir de la boîte de pétri contenant les souches purifiées, prélever une colonie isolée à l'aide d'une anse de platine et l'ensemencer dans le tube à essai contenant le milieu liquide
- Ajouter 50µl d'hydrocarbure et fermer le tube.
- Passer le tube dans d'un vortex pour bien mélanger.
- Incuber les tubes à 30°C avec agitation.
- Seules les isolats présentant une croissance prononcée, ont été conservés pour d'autres caractérisations.

II.3.8 Conservation des souches bactériennes par cryoconservation

II.3.8.1 Principe de la conservation des soches bactériennes par cryoconservation

La cryoconservation est une technique de congélation des tissus ou des cellules à préserver pour utilisation ultérieures. Les cellules sont généralement stockées à des basses températures pour stopper toute activités biologiques y compris les réactions biochimiques qui conduisent à la mort cellulaire.

Pour cela on utilise des solutions cryoprotectrices comme le glycérol, qui protègent les tissus biologiques du gel et les dommages causés par la formation de glace.

II.3.8.2 Mode opératoire

- Dans des tubes Eppendorf stériles, mettre 500ul de glycérol à 100%
- Prélever 500 µl de culture liquide mure et les verser dans le tube contenant le glycérol ;
- Homogénéiser le mélange ;
- Conserver au réfrigérateur à -20°C.

II.4 Test biochimiques

II.4.1 Test catalase

II.4.1.1 Principe

Cette enzyme catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui est produit par certaines réactions cellulaires et qui est très toxiques, donc c'est l'une des enzymes chargés d'éponger l'eau oxygénée par la dismutation (**PELMONT, 1993**).

La réaction catalysée est la suivante :



Le test de la catalase consiste essentiellement à ajouter du peroxyde d'hydrogène à des bactéries : la présence de catalase donne lieu à l'apparition de bulles d'oxygène.

II.4.1.2 Mode opératoire

- Déposer sur une lame propre une goutte d'eau oxygénée ;
- Prélever une colonie à l'aide d'une anse de platine ;
- Déposer la colonie dans la goutte sur la lame.

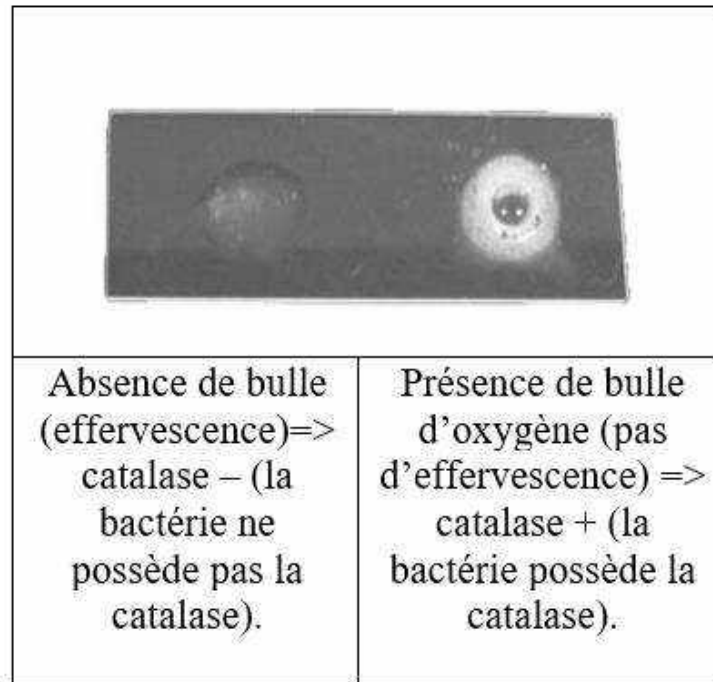


Figure II.5 : Les différents résultats du test de catalase.

II.4.2 Test oxydase

II.4.2.1 Principe

Le cytochrome oxydase est une enzyme de la chaîne respiratoire bactérienne qui catalyse des réactions d'oxydation du type :



En présence d'oxygène ambiant, cette enzyme peut oxyder un substrat incolore en un produit coloré facilement repérable :



La recherche de l'oxydase est un test fondamental pour l'identification des bacilles à Gram négatif.

II.4.2.2 Mode opératoire

- Ce test est réalisé à l'aide de disque d'oxydase prêt à l'emploi :
- Déposer un disque imprégné de réactif sur une lame, l'imbiber avec une goutte d'eau distillée stérile.
- Prélever une colonie parfaitement isolée avec une anse de platine et la frotter sur le disque pendant une dizaine de secondes.
- Observer immédiatement.

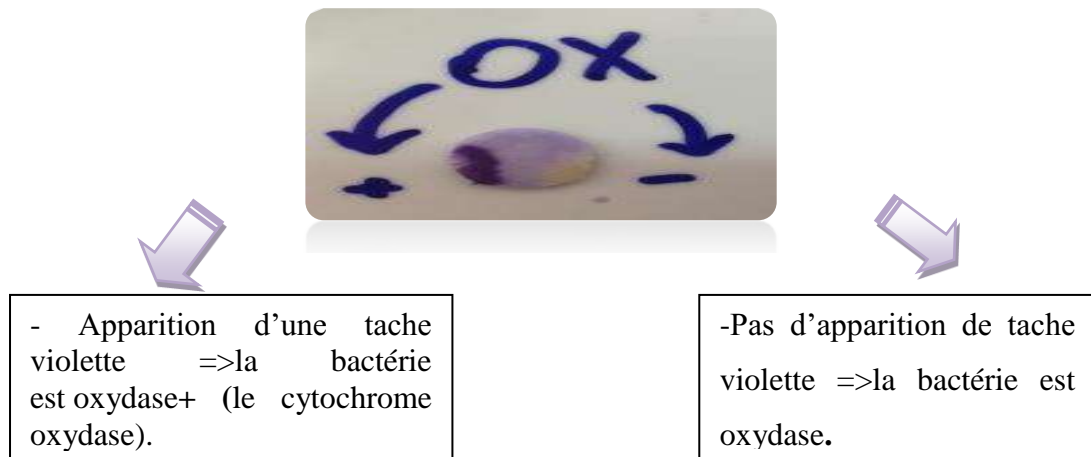


Figure II.6 : Présentation des différents résultats de test oxydase.

II.4.3 Coloration de Gram

Cette technique doit son nom au bactériologiste danois Hans Christian Gram qui a mis au point son protocole en 1884.

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour la distinction entre deux groupes bactériens, les Gram +, dotées d'une simple paroi avec une grande quantité de peptidoglycane et les Gram -,

composées de moins de peptidoglycane mais pourvues d'une membrane externe supplémentaire.

II.4.3.1 Principe

Le violet de gentiane se fixe sur des composants cytoplasmiques et après un temps de coloration, toutes les bactéries sont violettes. Chez les bactéries à Gram négatif, la paroi, riche en lipides, laisse passer l'alcool (ou le mélange alcool + acétone) qui décolore le cytoplasme alors que, chez les bactéries à Gram positif, la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool et le cytoplasme demeure coloré en violet.

II.4.3.2 Mode opératoire

- Etaler les bactéries sur une lame de verre ;
- Fixer le frottis à la chaleur et colorer pendant une minute avec une solution de violet de gentiane ;
- Fixer la coloration du frottis par une solution iodo-ioduré de lugol, pendant une minute ;
- Décolorer le frottis avec l'alcool à 95 % pendant quelques secondes (30sec), puis rincé immédiatement avec l'eau du robinet ;
- Traiter le frottis avec une solution de Fushine pendant une minute ;
- Rincer rapidement au robinet et sécher.

Lecture :

Après ce traitement, les cellules Gram négatif apparaissent roses et les cellules Gram positif apparaissent sous une couleur violette (SINGLETON et SAINBURY, 1984)

II.4.4 Test de la biodégradation sur différentes sources de carbone

II.4.4.1 Principe

Les bactéries isolées sont différenciées en fonction des hydrocarbures qu'elles sont capables de métaboliser, pour cela les souches ont été inoculer dans du milieu additionné à : pétrole brut, un mélange d'alcane ($C_{14} + C_{16} + C_{18}$), hexacosane (C_{26}), octacosane (C_{28}), toluène, xylène, benzène comme unique source de carbone.

II.4.4.2 Mode opératoire

Pour chaque souche bactérienne il faut d'abord préparer 8 tubes à essai stériles 7 tubes pour les différents types d'hydrocarbures qui sont : pétrole brute ; alcane ; toluène ; xylène ; C₂₆ ; C₂₈ ; benzène ; et 1 tube pour le contrôle négatif (C⁻)

- Remplir chaque tube à essai avec 5 ml de milieu ONR7 ;
- Prélever une colonie bien isolée de la souche bactérienne développée sur milieu solide après réisolement par l'anse de platine ;
- Ensemencer chaque tube par la même culture bactérienne ;
- Ajouter dans chaque tube 50µl de différents types d'hydrocarbures ;
-
- Agiter les tubes à l'aide d'un vortex ;
- Incuber à 30°C pendant une semaine.
- Mesurer la densité optique ($\lambda=600\text{nm}$).

II.4.5 Indice d'émulsion E24

C'est le paramètre qui permet d'estimer le pouvoir émulsifiant des biosurfactants (**ALI AHMED,2011**) l'eau est utilisée communément comme un indicateur de l'activité de surface (**ABU RUAIDA *et al.*, 1991**).

II.4.5.1 Principe

Il se mesure selon la technique de (**COOPER et GOLDENBERG,1987**) en introduisant du tétradécane de même volume que la culture bactérienne dans un tube puis les agiter au vortex pendant 2 mn à vitesse maximale. Après 24 heures, on obtient trois phases (**Figure II.7**) ; le moût de fermentation, l'émulsion et le tétradécane de bas en haut, on mesure ensuite la hauteur de l'émulsion (He) et la hauteur totale (Ht) et l'indice d'émulsification est donné par la formule suivante :

$$E24 (\%) = (He / Ht) \times 100$$

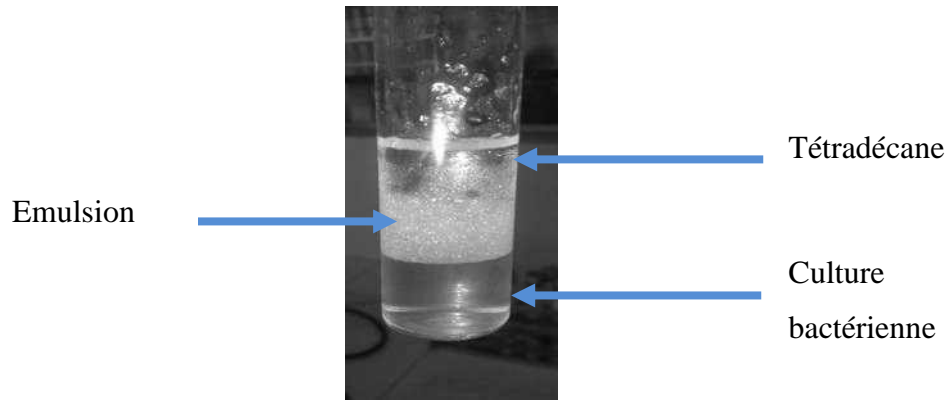


Figure II.7. Schéma représentant les trois phases de l'émulsification.

II.4.6 Effets des paramètres physicochimiques sur l'activité des bactéries hydrocarbonoclastes

II.4.6.1 Effet de la température

Afin de tester la tolérance des souches aux différentes températures, nous avons ensemencé chaque souche dans du milieu minéral (ONR7) contenant 1% de source de carbone, et nous les avons incubés à différentes températures (4°C, 20°C, 30°C, 40°C)

II.4.6.2 Mode opératoire

- Remplir les tubes à essai avec 5ml de milieu ONR7 ;
- Prélever une colonie de la souche bactérienne de la gélose ;
- Ensemencer la colonie dans le tube contenant le milieu ;
- Ajouter 50µl d'hydrocarbure (soit pétrole soit alcane) ;
- Agiter le mélange à l'aide d'un vortex ;
- Incuber chaque série de tube selon la température correspondante.

II.4.7 Effet du pH

Afin de tester la tolérance des souches aux différents pH, des solutions stériles du milieu ONR7 à différents pH ont été préparés. Chaque souche a étéensemencé dans du milieu minéral (ONR7) à pH 4,4 7,6 et 10,5contenant 1% de source de carbone.

II.4.7.1 Mode opératoire

- Préparer les milieux de culture a différentes valeurs de pH (en ajustant le pH avec du HCl ou NaOH
- Remplir les tubes à essai avec 5ml de chaque milieu ;
- Prélever une colonie de la souche bactérienne de la gélose ;
- Ensemencer la colonie dans le tube contenant le milieu ;
- Ajouter 50µl d'hydrocarbure (soit pétrole soit alcane) ;
- Agiter le mélange à l'aide d'un vortex ;
- Incuber à 30 °C avec agitation pendant une semaine.

II.4.8 Effet de la salinité

Le test de biodégradation a été réalisé sur milieu minéral de ONR7 liquide à différentes concentrations de NaCl (0%, 2.2%, 5%, 10% ,20%), Additionné 1% de la source de carbone (soit pétrole brut soit alcane) (**BIRECHE et BERREGUI ,2014**).

II.4.8.1 Mode opératoire

- Préparer les milieux de culture a différentes concentrations de NaCl ;
- Remplir les tubes à essai avec 5ml de chaque milieu ;
- Prélever une colonie de la souche bactérienne de la gélose ;
- Ensemencer la colonie dans le tube remplis par le milieu ;
- Ajouter 50µl d'hydrocarbure (soit pétrole soit alcane) ;
- Agiter le mélange à l'aide d'un vortex ;
- Incuber à 30 °C avec agitation pendant une semaine.

II.5 Cinétique de croissance des bactéries hydrocarbonoclastes

Le suivi de la cinétique de croissance bactérienne à 30°C est réalisé en mesurant la densité optique au moyen d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm. Cette mesure est considérée comme indicateur biologique direct de la biodégradation.

Dans notre travail on a choisi 10 différentes cultures bactériennes de différentes zones et différentes matrices pour suivre leurs cinétiques de croissance.

II.5.1 Mode opératoire

- Ajouté 1ml de la culture bactérienne dans 50ml de milieu ONR7 liquide dans un flacon en verre stériles
- Ajouter la source de carbone (soit pétrole ou alcane) ;
- Incubation des flacons dans un bain marie agitateur à 30°C ;
- Mesurer la densité optique chaque 12h ;
- Tracer les courbes des variations de la densité optique de chaque souche en fonction du temps ;
- Un contrôle négatif a été réalisé (milieu + source de carbone sans bactérie)

Chapitre III : **Résultats et Discussion.**

III.1. Enrichissement

Après l'incubation des milieux d'enrichissement contenant les échantillons (pendant 10 jours à 30°C avec agitation), nous avons noté l'apparence d'un trouble dans la totalité des flacons sauf les flacons contenant le milieu sans échantillon (control négatif) (**Figure III.1**), nous supposons donc que ce trouble est signe de croissance bactérienne, et que les microorganismes présents ont utilisé le pétrole ou le mélange d'alcane comme source de carbone, ce qui indique la capacités de ces derniers à métaboliser les hydrocarbures. Chose qui reste à confirmer dans les étapes suivantes. Les mêmes résultats ont été observés après dilution (10^{-4}) (**Figure III.1**).

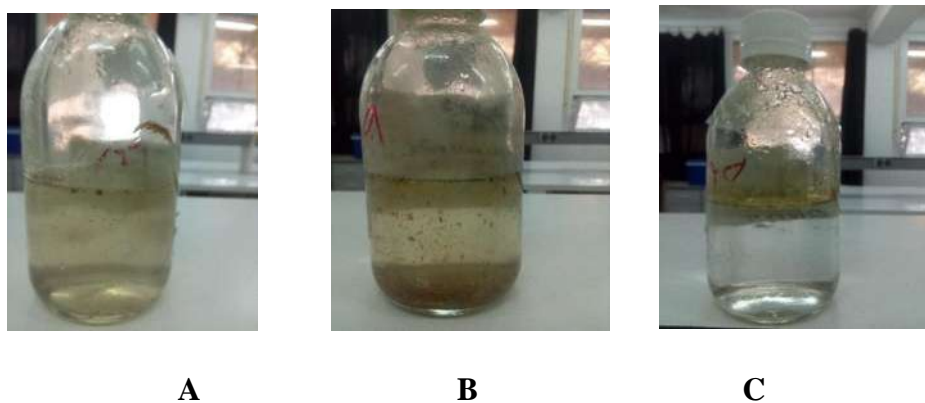


Figure III.1 : Les flacons d'enrichissement ; A : enrichissement à 10^{-2} B : enrichissement à 10^{-4} , C : control négatif.

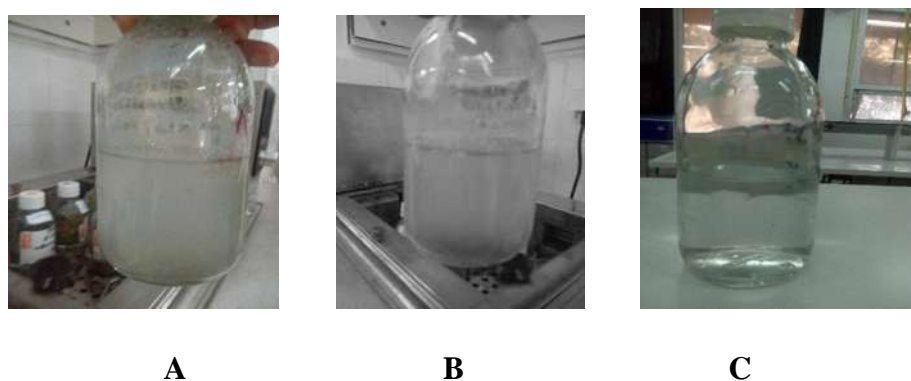


Figure III.2 : Les flacons d'enrichissement de mélange d'alcane ; A : enrichissement à 10^{-2} , B : enrichissement à 10^{-4} , control négatif

III.2. Isolement sur milieu gélosé et dénombrement

Après enrichissement et pour pouvoir observer et caractériser macroscopiquement les bactéries présentes dans l'échantillon, nous avons procédé à l'isolement sur milieu gélosé.

Au bout d'une semaine d'incubation à 30°C, nous avons procédé au comptage du nombre des colonies isolées dans les boîtes de pétri sachant que pour chaque station et pour chaque dilution nous avonsensemencé en dépliant.

Nous avons constaté que pour la dilution 10^{-2} , toutes les boîtes étaient indénombrables (>300 colonies), cependant le nombre de colonies a diminué pour les dilutions 10^{-4} pour les deux matrices (eau et sédiment) ce qui est tout à fait normal. Nous avons aussi remarqué une lenteur de croissance par rapport au milieu liquide, ceci peut être expliqué par le fait que les bactéries ne sont pas en contact direct avec l'hydrocarbure.

Les colonies phénotypiquement différentes obtenues à partir des boîtes ont été ré-isolées sur milieu solide, afin de les purifier. Les colonies obtenues sont toutes de formes circulaires, de petites tailles, à contour régulier, de couleurs blanches, jaunes, rouges orangées et transparentes. Les colonies pour la plupart sont opaques, à surfaces lisses et à consistances crémeuses. Ces phénotypes mis à part les colonies rouges orangées correspondent aux phénotypes des bactéries marines hydrocarbonoclastes. Nous avons noté aussi que les colonies rouges orangées obtenues, après plusieurs ré-isolement sur milieu gélosé, devenaient blanchâtres, ceci peut être expliqué par la présence du fer dans le milieu qui leur a conféré cette couleur.

Nous avons sélectionné 93 colonies à partir des différentes boîtes des différentes stations et de différentes sources de carbone (pétrole brut *et* *alcane*) afin de les purifier (**ANNEXE III**).

Pour s'assurer que les colonies purifiées ont utilisé les hydrocarbures comme source de carbone, nous avons procédé à l'inoculation de ces dernières dans un milieu liquide frais (ONR7 additionné à 1% d'hydrocarbure), cette étape est aussi importante pour l'élimination des bactéries autotrophes.

Après incubation, nous avons constaté que ce n'est pas toutes les souches qui ont manifesté une croissance (**Figure III.3**). En effet 75 souches sur 93 (**Figure III.4**) ont manifesté une croissance bactérienne apparente.



Figure III.3 : culture bactérienne après réisolement dans un milieu liquide ; A : présence de trouble, B : absence de trouble.

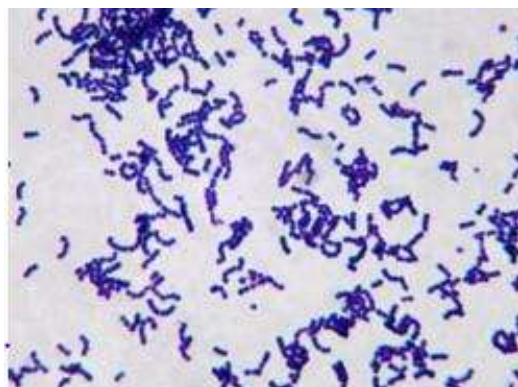
Nous supposons que les souches qui n'ont pas poussé sont des bactéries autotrophes qui transforment la matière inorganique et minérale en matière organique pour se nourrir.

Seules les souches qui ont manifesté une croissance ont été conservées pour d'autres caractérisations.

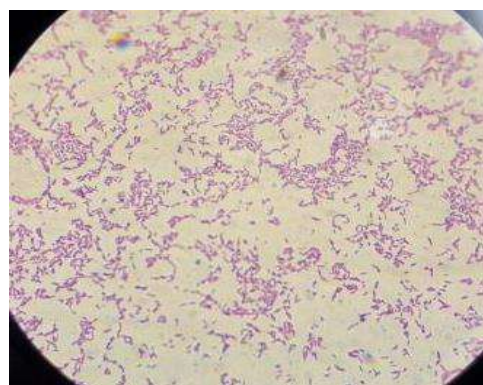
III.3. Caractérisation biochimique

III.3.1 Coloration de Gram, test d'oxydase et catalase

La coloration de Gram est une double coloration qui nous permet de connaître la forme, l'arrangement, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées. Cette coloration est réalisée systématiquement sur les différentes colonies purifiées pour préciser le caractère Gram+ ou Gram-. Avec cette coloration double, les bactéries Gram positifs apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries Gram négatifs sont colorées en rose (**Figure III.4**).



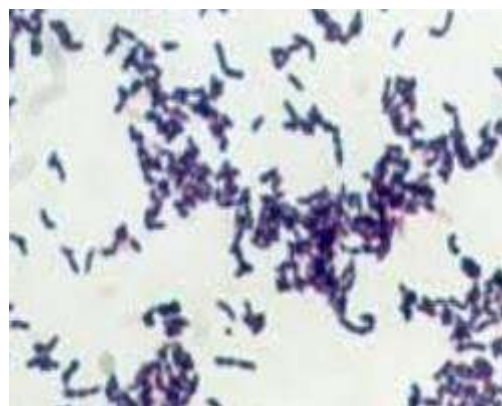
Cocci à Gram⁺.



Cocci à Gram⁻.



Bacille à Gram⁻.



Bacille à Gram⁺.

Figure III.4 : Différents aspects microscopiques des bactéries à Gram positif et négatif

D'après les résultats de l'examen microscopique et les tests biochimiques nous avons constaté une variété des caractères biochimiques et microscopiques (forme, couleurs, Gram ... etc.)

Selon les résultats obtenus, 40 souches ont été déterminées comme étant Gram négatif et 35 Gram positif. Dans le tableau ci-dessous (**tableau III.1**) Nous avons classés les souches, en fonction du mode de groupement et le test d'oxydase pour les bactéries à Gram négatif et le test de catalase pour les bactéries à Gram positif.

Selon la bibliographie les bactéries Gram négatif, oxydase positifs peuvent être affiliées aux groupes bactériologiques suivants : *Alcanivorax*, *Marinocacter*, *Halomonas*. Les Gram négatifs, oxydase négatifs peuvent être affiliés au groupe *Acinetobacter*.

Chapitre III : Résultats et discussion.

Les bactéries dégradant les hydrocarbures à Gram positifs, peuvent être affiliées aux groupes *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Dielzia* (Tableau III.1).

Tableau III.1 : Les affiliations suspectés des résultats des tests biochimiques.

		Souches	Affiliation suspectés	Références bibliographiques
Gram ⁺	O+	1,4,17,48,71,6,8, 9,27,38,78,82	<i>Pseudomonas</i> <i>Alcanivorax</i> <i>Marinobacter</i>	MCGENTY et al., 2012 YAKIMOV et al., 1998 SPROER et al., 1998
	O-	74,18, 19,22,26,42,52, 57,68,84,86,93,7, 13,20,21,34,35,37,39,40, 54,60,62,70,85,89,92	<i>Acinetobacter</i>	BROWN et al., 1992
Gram ⁺	C+	3,5,10,32,33,51,58,81,90, 11,12,16,29,30,44,45,46, 56,64	<i>Arthrobacter</i> <i>Micrococcus</i> <i>Dielzia sp.</i>	EFROYMSON et al., 1991 DAS et al., 2011 BODTKER et al., 2009
	C-	14,23,41,43,47,49, 77,15,24		

III.4. Différenciation des souches en fonction des hydrocarbures métabolisés

Il a été montré que la biodégradation est influencée essentiellement par la composition chimique de l'hydrocarbure.

Les bactéries isolées à partir des échantillons d'eau de mer et de sédiment ont été différenciées en fonction des hydrocarbures qu'elles sont capables de métaboliser. Pour se faire, différents hydrocarbures ont été utilisés comme unique source de carbone : le pétrole brut et le mélange d'alcane comme contrôle positif, (C₁₄ +C₁₆ +C₁₈), hexacosane(C₂₆),

Chapitre III : Résultats et discussion.

octacosane (C₂₈), toluène, xylène, benzène, et un contrôle négatif ne contenant aucune source de carbone.

Les densités optiques ont été mesurées ($\lambda=600\text{nm}$) après une semaine d'incubation à 30°C avec agitation. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau V.1 en (ANNEXE V) ont été considérés comme positifs (croissance bactérienne) toutes cultures présentant une densité optique supérieure à 0,1.

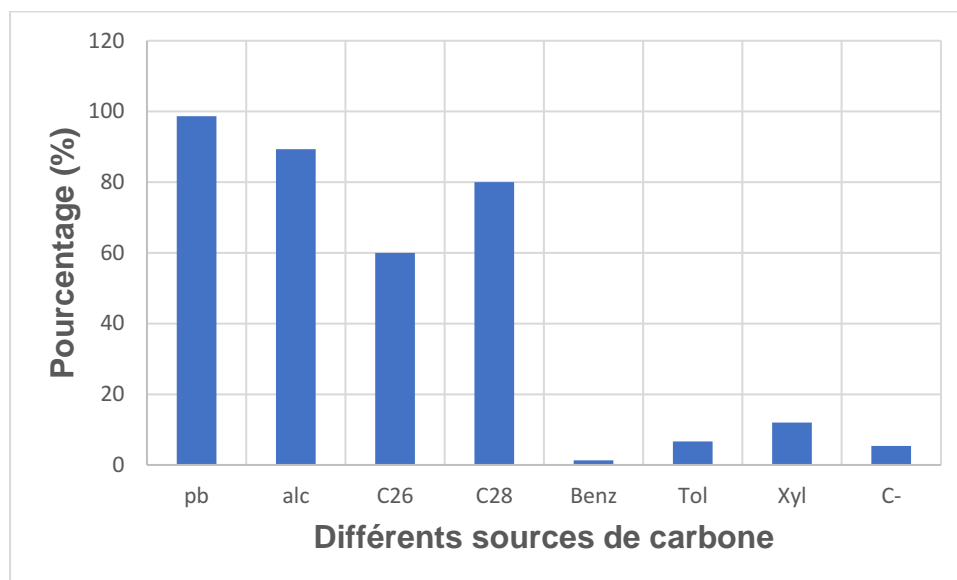


Figure III.5: Pourcentage des tests de biodégradation en fonction de différentes sources de carbone.

Nous avons noté que les densités optiques les plus importantes ont été observées dans les milieux contenant le pétrole ou le mélange d'alcane comme unique source de carbone (**Figure III.5**). 98% des souches testées ont manifesté une croissance en présence du pétrole brut avec une moyenne de $0,49 \pm 0,21$ et un maximum de croissance observé pour la souche 34 avec une $DO=1,32$ (Figure). Ces valeurs ont légèrement diminué pour le milieu contenant le mélange d'alcane comme unique source de carbone, 67 souches sur 75 ont manifesté une croissance bactérienne, avec une moyenne de $0,31 \pm 0,17$ et un maximum noté pour la souche 91 avec une $DO=1,12$.

En ce qui concerne, les milieux contenant l'hexacosane (C₂₆), l'octacosane (C₂₈), nous avons noté une baisse du nombre des souches qui ont manifesté une croissance bactérienne avec respectivement 47 et 60 souches sur 75.

Chapitre III : Résultats et discussion.

Pour les milieux contenant le benzène et toluène comme uniques sources de carbone, la croissance des bactéries isolées est très faible à négligeable, seulement une souche a manifesté une croissance en présence du benzène (souche 88 avec $DO=0,33$) et 5 souches en présence du toluène avec un maximum de croissance observé pour la souche 79 avec une $DO=0,19$. Il est a noté que ces souches ont manifesté des croissances plus importantes en présence d'alcane et de pétrole brut.

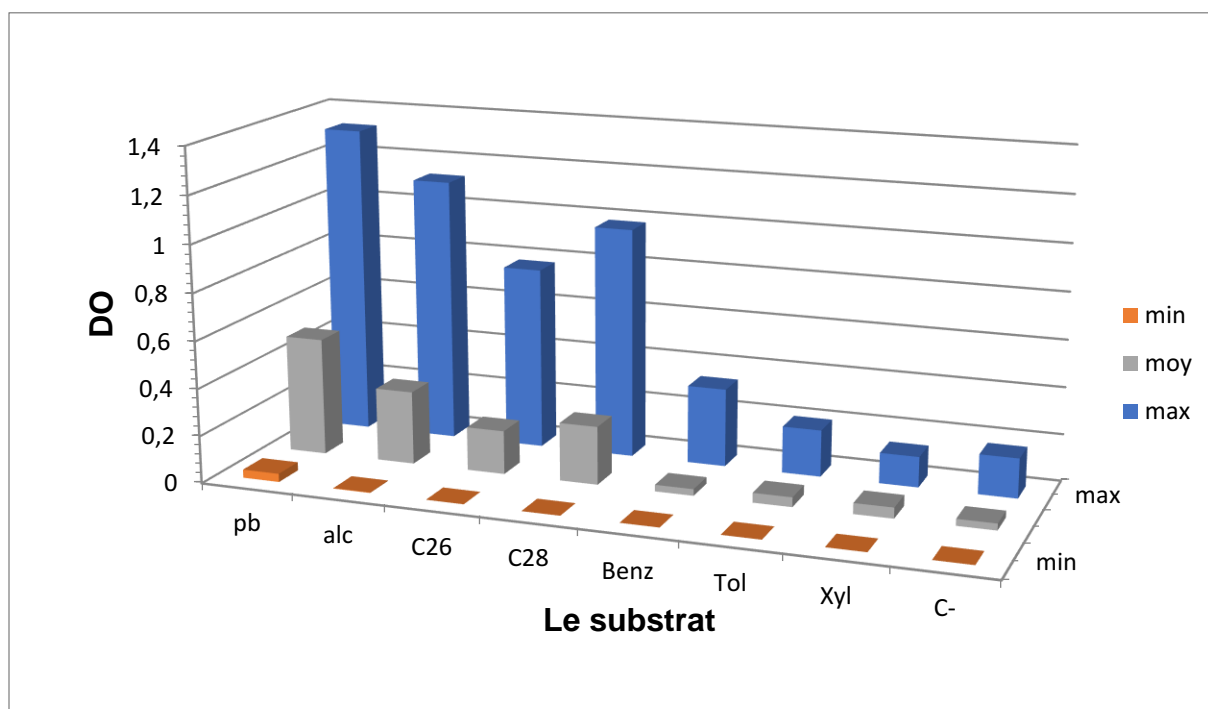


Figure III.6 : Histogramme représentant les résultats des tests de biodégradation des différents hydrocarbures.

Les variations des densités optiques (DO) constatées dans les milieux de culture des différentes souches bactériennes étudiées indique la différence dans leur vitesse d'adaptation au substrat utilisé (AKMOUCI, 2009).

La spécificité des substrats à l'attaque microbienne a été largement étudiée. (ATLAS, 1981 et LEAVY et COLWELL, 1990), ont classé les composés du pétrole en quatre familles : les hydrocarbures saturés, les aromatiques, les asphaltènes (phénols, acides gras, cétones, esters et porphyrines) et les résines (pyridines, quinolines, carbazoles, sulfoxides, et amides). Ces composés différents par leur susceptibilité à l'attaque microbienne. Ainsi la vitesse de biodégradation est plus élevée pour les saturés, viennent ensuite les aromatiques légers, les aromatiques à haut poids moléculaire, les composés polaires ayant la vitesse de dégradation la plus faible. Ce qui explique valeurs obtenues.

Les hydrocarbures saturés incluent les *n*-alcanes, les alcanes ramifiés et les cycloalcanes (naphènes). Les alcanes normaux ou à chaînes linéaires sont les plus abondants (10 à 40 % des hydrocarbures totaux dans le cas du pétrole léger et peuvent atteindre dans certains cas 60 %) et les plus rapidement dégradables : les *n*-alcanes à nombre de carbone supérieur à 44 peuvent être métabolisés par les microorganismes mais ceux ayant de 10 à 24 atomes de carbone (C₁₀-C₂₄) sont généralement les plus facilement dégradables. Les alcanes ramifiés sont plus récalcitrants à la biodégradation que les *n*-alcanes et plus le nombre de ramifications augmente, moins ces composés sont susceptibles à la dégradation microbienne. Les hydrocarbures cycliques constituent une fraction importante des hydrocarbures dans la plupart des bruts pétroliers, ils 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.*, 1994, 1995).

Les hydrocarbures aromatiques constituent généralement 10 à 30 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier (BERTRAND et MILLER, 1989). Des études sur la transformation de ces hydrocarbures par les microorganismes ont montré leur toxicité cellulaire (SIKKEMA *et al.*, 1995). Les hydrocarbures aromatiques de faible poids moléculaires constituent généralement 2 à 20 % des hydrocarbures des pétroles légers et moins de 2 % des hydrocarbures des pétroles lourds (Congress of the United States, Office of Technology Assessment, 1991), tels que les alkyl-benzènes légers qui sont les plus toxiques à cause de leur solubilité dans l'eau, mais peuvent cependant être métabolisés par les microorganismes quand ils sont présents en faibles concentrations. La structure moléculaire de ces substrats détermine la vitesse de leur dégradation : un grand nombre de substituant méthyle empêche l'oxydation initiale (COONEY et SUMMERS, 1976 ; ATLAS *et al.*, 1981).

(RATLEDGE, 1978) a rassemblé des règles qui ont une application générale à l'ensemble des micro-organismes :

1- Les hydrocarbures aliphatiques sont assimilés par une grande variété de microorganismes, les composés aromatiques peuvent être oxydés mais sont assimilés par quelques bactéries seulement.

2- Les *n*-alcanes à chaînes courtes, tel que le *n*-nonane n'est pas toujours assimilés, mais peuvent être oxydés. Seules quelques bactéries ont la capacité de croître sur des alcanes plus courts que le *n*-octane. Quand la longueur de chaîne augmente au-delà de C₉, le facteur de production augmente, mais la vitesse d'oxydation décroît.

3- Les composés saturés sont plus rapidement dégradés que les insaturés.

4- Les composés ramifiés sont moins rapidement dégradés que les composés

III.5. Effets des paramètres physicochimiques sur l'activité des bactéries hydrocarbonoclaste

La biodégradation des hydrocarbures est l'un des premiers mécanismes conduisant à la transformation de ces polluants en produits moins toxiques. Les travaux de recherche sur l'oxydation des hydrocarbures par les microorganismes ont montré que ce processus dépend de la structure chimique des hydrocarbures et des conditions environnementales.

Les facteurs physico-chimiques influant sur la vitesse de biodégradation microbienne sont : la température, l'oxygène disponible, le pH, la salinité, les éléments nutritifs, l'osmose et la pression hydrostatique (ATLAS, 1981 ; LEAHY et COLWELL, 1990). Dans ce travail on va concentrer sur les trois facteurs principaux qui sont (température ; pH ; salinité).

III.5.1 Effet de la température

La température est un paramètre pouvant influencer la biodégradation du pétrole en modifiant son état physique, composition chimique et l'activité physiologique des microorganismes et par conséquent la vitesse de dégradation des hydrocarbures ainsi que la nature et la concentration des espèces microbiennes présentes (ATLAS, 1981 ; LEAHY et COLWELL, 1990).

Parmi les 75 souches, nous en avons sélectionné 20 qui ont manifesté le plus de croissance dans les tests de biodégradabilité en présence de différentes sources de carbone.

Ces souches ont été inoculées dans du milieu (ONR7) contenant du pétrole brut comme unique source de carbone. L'incubation a été faite à différentes températures à savoir 4, 20,30 et 40°C

Les résultats obtenus après une semaine d'incubation sont représentés dans la (Figure III.8).

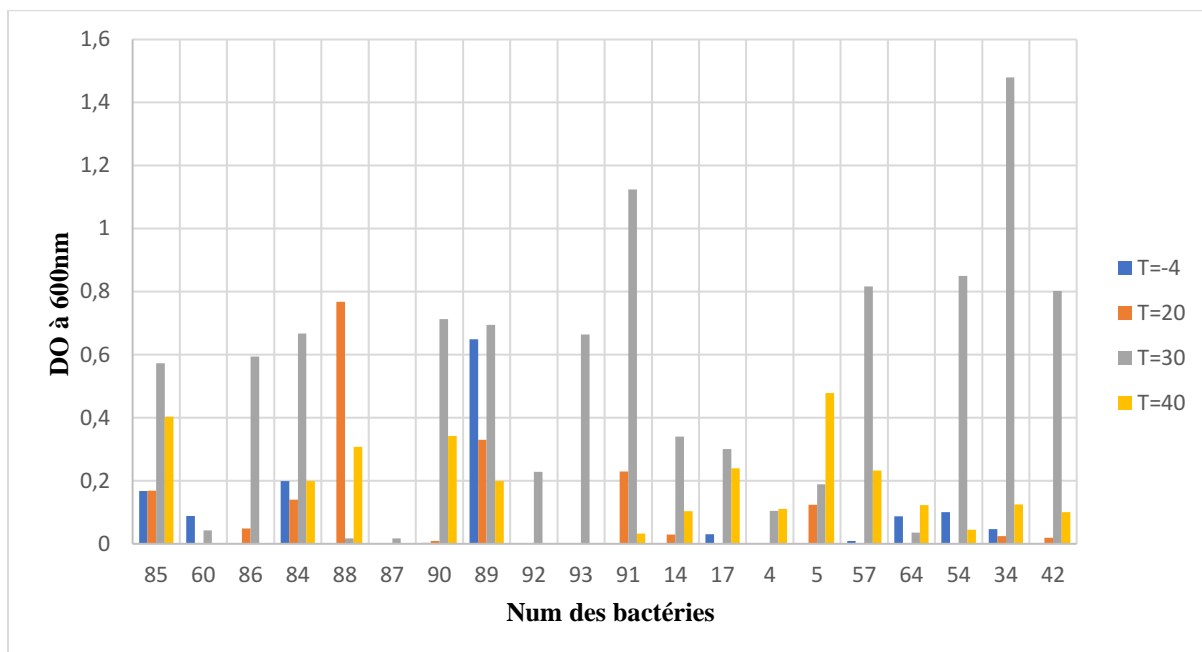


Figure III.7 : Histogramme représentant les résultats obtenus après une semaine d'incubation à différentes températures.

D'après l'histogramme (**Figure III.7**), on remarque que pour la plupart des souches, la croissance la plus importante a été observée à une température de 30°C à l'exception des souches 4, 5, 64 pour qui le maximum de croissance a été observé à 40°C et la souche 88 qui a manifesté le plus de croissance à 20°C.

Cependant la croissance des bactéries a été très faible et négligeable à 4°C. Ceci signifie que la température idéale pour une meilleure croissance des bactéries isolées est de 30°C.

Ceci peut être expliqué par le fait qu'à basse température, la viscosité d'hydrocarbure augmente, la volatilisation des composés toxiques pour les microorganismes tels que les alcanes de faibles poids moléculaires est réduite et leur solubilité dans l'eau augmente par diminution de leur volatilisation ce qui entraîne un ralentissement du métabolisme des microorganismes (**ATLAS et BARTHA, 1972 et ATLAS, 1975**). Des températures plus élevées ont pour effet d'augmenter la vitesse de biodégradation (**WALWORTH *et al.*, 2001 ; SANDVIK *et al.*, 1986 ; SONG *et al.*, 1990**). Le maximum de l'activité métabolique des microorganismes est généralement observé à une température comprise entre 30 et 40°C (**BOSSARD et BARTHA, 1984**).

III.5.2 Effet du pH

L'activité microbienne est largement influencée par le pH, dont l'optimum est compris entre 6 et 8 pour les bactéries et entre 4 et 5 pour les champignons (BOCARD, 2006 ; GABET, 2004). Les 20 souches ont été inoculées dans du milieu ONR7 avec des pH différents à savoir 4.5, 7.5 et 10.5 additionnés à 1% de pétrole brut comme unique source de carbone. L'incubation a été faite à 30°C.

Les résultats obtenus après une semaine d'incubation sont représentés dans la (Figure III.9).

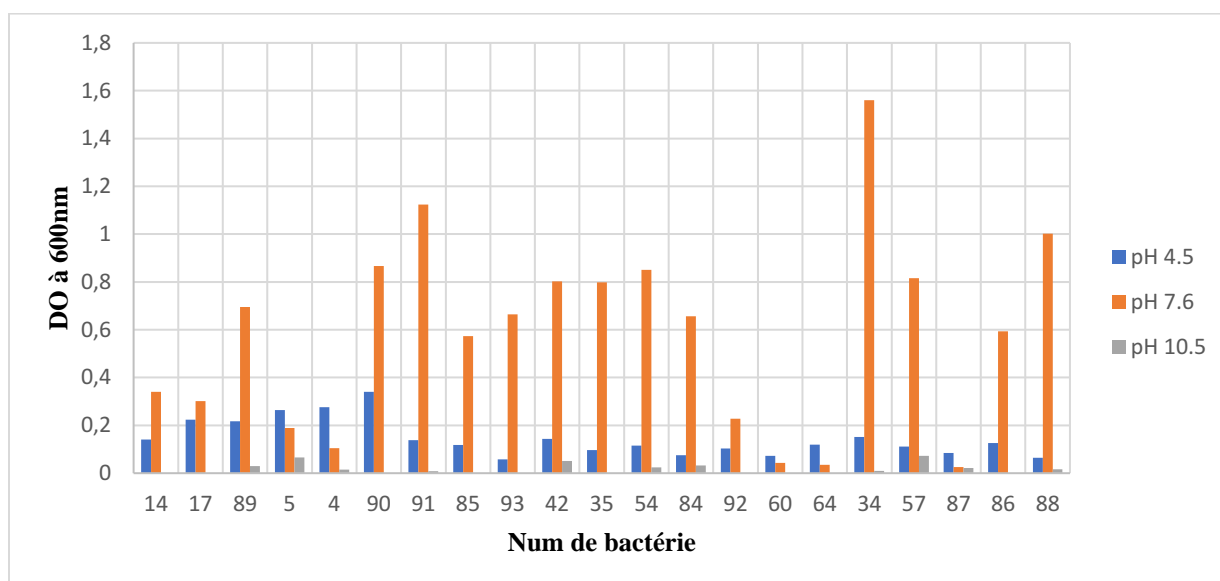


Figure III.8 : Histogramme représente les résultats de test de différentes valeurs de pH obtenus après la mesure de la densité optique.

D'après l'histogramme (Figure III.8), on remarque que la totalité des bactéries n'ont pas poussé à pH=10,5 (DO<0,100).

Pour le milieu à pH=4.5 les valeurs de la DO sont plus élevées par rapport à celles du milieu à pH=10.5, elles varient entre 0.058 et 0.34. 15 sur 20 souches ont manifesté une croissance (DO>0,100).

En ce qui concerne le milieu à pH=7.6 on remarque que les valeurs de la densité optique sont plus élevées par rapport à celles des deux milieux précédents, elles varient entre 0.026 et 1.56 (19 souches sur 20 ont poussé) cela signifie que le milieu idéal pour la croissance des bactéries hydrocarbonoclastes est le milieu à pH=7.6.

L'influence du pH a été très peu étudiée, mais il ne semble jouer qu'un rôle relativement mineur en milieu marin. Contrairement à la plupart des écosystèmes aquatiques, les sols

peuvent avoir des valeurs de pH très variables, allant de 2,5 à 11. Des valeurs extrêmes de pH, ce qui est le cas pour quelques types de sols, pourrait avoir une influence négative sur la capacité des microorganismes à dégrader les hydrocarbures. La croissance des bactéries hétérotrophes et des champignons étant favorisée par un pH proche de la neutralité (LEAHY et COLWELL, 1990).

La dégradation des hydrocarbures est plus élevée dans des conditions légèrement basiques. Quel qu'il soit, le pH des milieux marins n'atteint jamais des valeurs suffisamment extrêmes pour inhiber la biodégradation (LEAHY et COLWELL, 1990).

III.5.3 Effet de la salinité

La salinité est un paramètre qui affecte la biodégradation, alors que la forte salinité diminue le nombre de micro-organismes dans le milieu qui est ralenti les processus de l'humification et de la minéralisation des matières organiques. En effet, de tous les processus biologiques, la nitrification est la plus touchée, ainsi que le dégagement de CO₂. Les fortes salinités constituent donc une barrière naturelle pour la biodégradation (MALLOUHI, 1989 ; BERTRAND *et al*, 1993).

La salinité exerce un effet osmotique sur les micro-organismes, qui ont aussi des besoins en sels comme NaCl, KCl et MgCl₂. Les fortes concentrations ont tendance à dénaturer les protéines, c'est-à-dire à casser la structure tertiaire des protéines qui est essentielle à l'activité enzymatique (ATLAS et BARTHA, 1993).

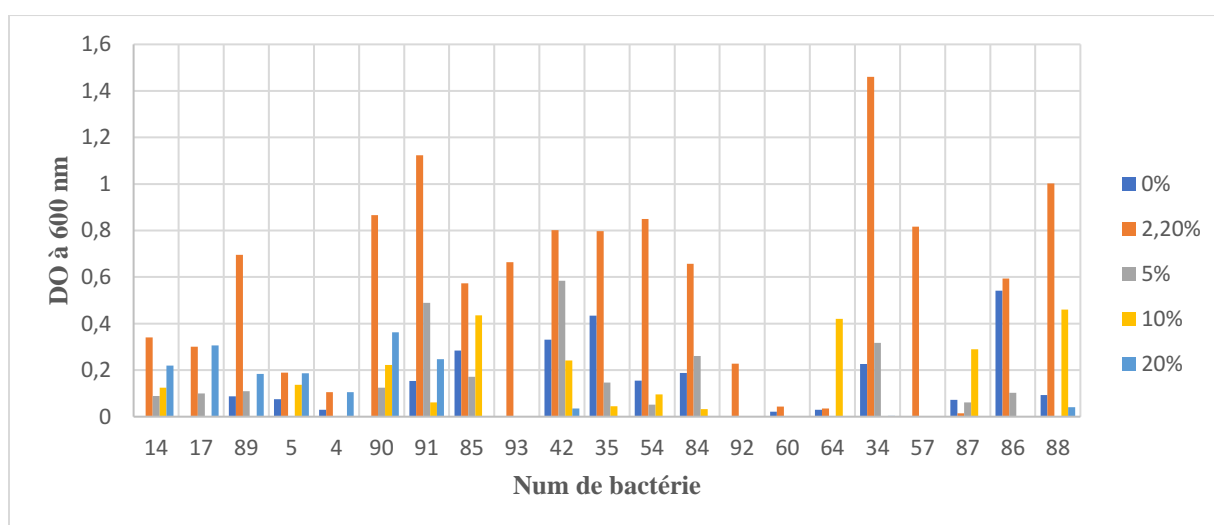


Figure III.9: Histogramme représente les résultats de test des différentes salinités obtenues après l'observation et la mesure de la densité optique.

D'après l'histogramme on remarque que les valeurs de la densité optique de celles des milieux de salinité 0% ;5% ;10% ;20% varient entre 0 et 0.5 et un maximum d'environ 0.58 est observé. Ce sont des valeurs plus ou moins faibles par rapport à la valeur de la densité optique de milieu de 2.20 % de salinité qui varient entre 0.014 et 1.46 cela signifie que les bactéries isolées se développent mieux dans les milieux dont la concentration du NaCl est de 2.20%.

La salinité moyenne des milieux océaniques est de l'ordre de 3.5% et l'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**). Quand la concentration en chlorure de sodium dépasse 1M, l'élimination du pétrole brut diminue rapidement. Pour ce type de substrat, les fortes salinités constituent donc une barrière naturelle pour la biodégradation (**TAGGER et al., 1976 et Al MALLAH, 1988 ; BERTRAND et al., 1990**).

(**BERTRAND et al,1993**) ont étudié 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 0.4M et diminue lentement pour des valeurs supérieures et inférieures à celle-ci. (**WARD et BROCK1978**) ont montré que la vitesse de la biodégradation des hydrocarbures décroît lorsque la salinité passe de 3.3 à 28.4%, et ils ont attribué ces résultats à une réduction générale des vitesses métabolique des microorganismes.

La plupart des micro-organismes ont des besoins limités en sels et sont inhibés par des teneurs en NaCl supérieures à 2%, sauf les espèces halophiles (bactéries, champignons, algues) qui croissent en milieux salins et supportent bien des teneurs en NaCl de 15% (**BIDAUD, 1998**).

Les halobactéries peuvent être des agents dépolluants. En effet certaines archaebactéries utilisent les hydrocarbures tels que le pétrole comme seule source de carbone, cette biodégradation n'a aucune conséquence négative sur les écosystèmes Salins, contrairement au traitement par des agents chimiques (**KHEMILI S, 2008**).

Les concentrations très basses en sel réduisent l'activité des hydrocarbonoclastes et les résultats optimaux de biodégradation sont atteints dans les marges de salinité modérées (**DIAZ et al., 2002**).

Il est tout d'abord nécessaire de considérer que les hydrocarbures sont moins biodégradables dans des environnements hypersalins que dans les non salins. C'est une conséquence de l'effet de "salage" : parce que les sels solubles réduisent l'hydrosolubilité des composés organiques hydrophobes. Plus la concentration en sels dans la phase aqueuse est élevée plus la tendance des composés organiques à d'être adsorbés à la matrice pleine (sédiment ou sol) augmente (MACKAY *et al.*, 2006 ; TAPILATU *et al.*, 2010).

La salinité élevée limite non seulement l'accès microbien aux hydrocarbures mais également la disponibilité de l'oxygène, puisque sa solubilité diminue au fur et à mesure que la concentration en sel augmente (MCGENITY, 2010 ; PFEIFER *et al.*, 1997).

III.6. Indice d'émulsion E24

Les résultats obtenus dans cette étude sont représentés sous forme d'histogrammes (figure III.10)

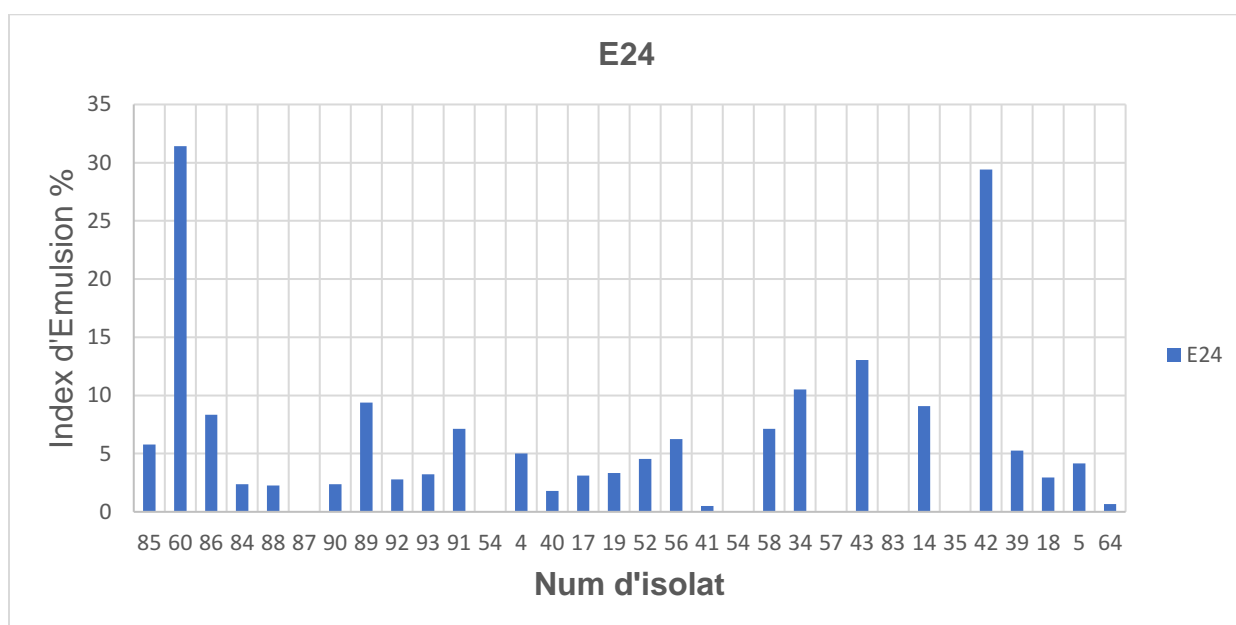


Figure III.10: Indice d'émulsion E24.

Selon les résultats (Figure III.10), on remarque que les deux souches bactériennes 60 et 42 produisent des biosurfactants avec un index d'émulsions plus élevé en présence de l'alcane, (60=31.42%, 42=29.41%). Selon (GHERBAL, 2014), les molécules de surfactants tendent à s'accumuler aux interfaces de deux phases de polarités différentes. Par ces propriétés, les agents tensioactifs peuvent donc augmenter la solubilité apparente des composés hydrophobes, ce qui explique l'augmentation de l'indice d'émulsification (E24) (Figure

III.10). Les microorganismes qui dégradent les hydrocarbures produisent des substances tensioactives et certains d'entre eux, permettent la stabilité de l'huile ou les phases hydrophobes dans l'émulsion. Ces microorganismes peuvent être divisés en deux catégories, une qui produit les biosurfactants à faible poids moléculaire mais habituellement ne font pas des émulsions stables, et l'autre qui produit des biosurfactants qui agissent principalement en tant que stabilisateurs d'émulsions (**SILVA *et al.*, 2010**).



Figure III.11 : Les différents résultats de l'index d'émulsification ; A : production de biosurfactants, B : absence d'émulsion.

III.7. Cinétique de croissance des souches bactériennes testées

La variation de la densité optique au cours de temps (156h) des 10 souches testées au cours de croissance dans le milieu de sels minéraux (ONR7) additionné de 1% de la seule source de carbone (alcane ou pétrole) a été suivi en mesurant la concentration microbienne en fonction du temps ce qui nous a permis de tracer les courbes représentées par les **Figure III.12** et **Figure III.13** :

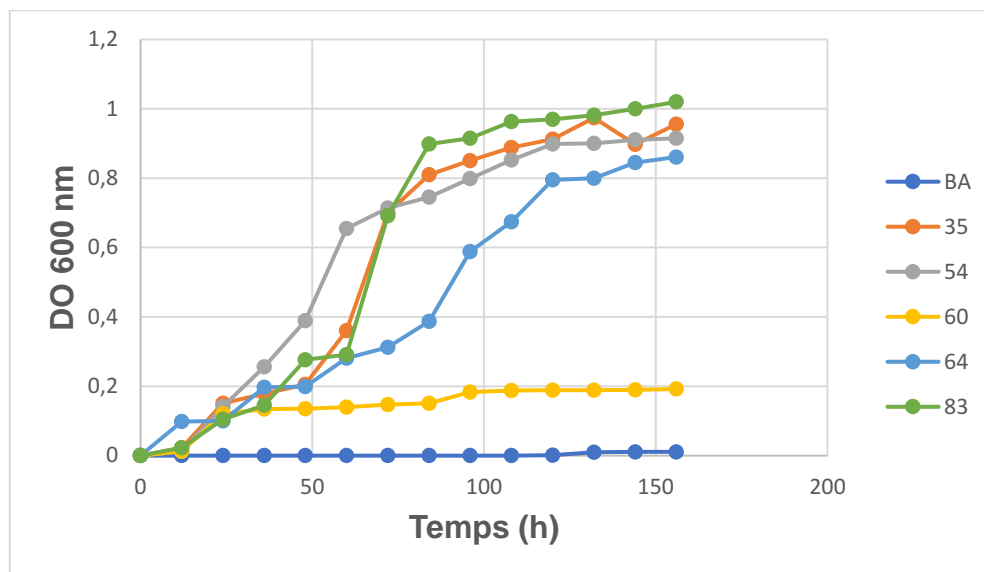


Figure III.12 : Evolution de biomasse des 5 souches bactériennes testées avec le blanc de l'alcane comme un control négatif.

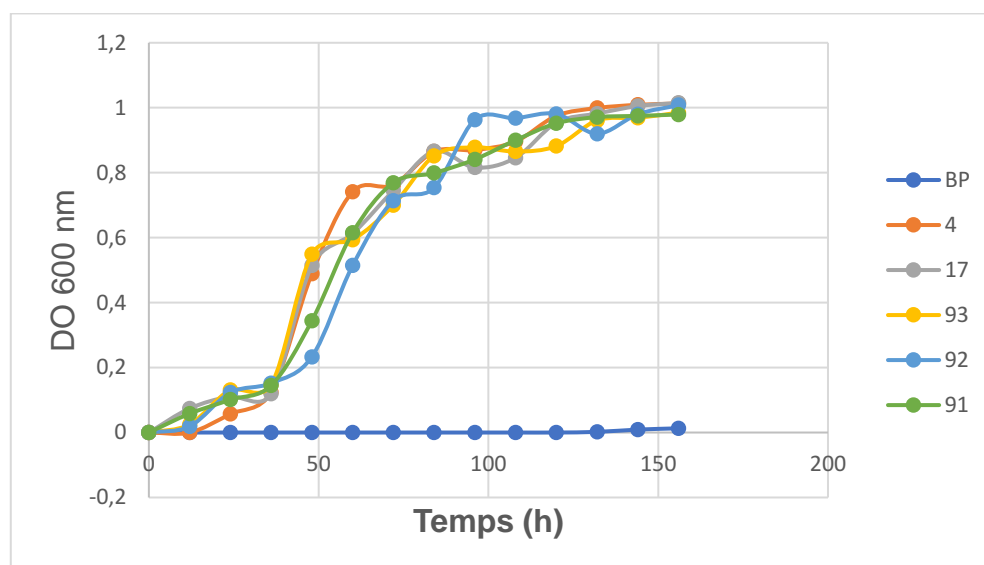


Figure III.13: Evolution de biomasse des 5 souches bactériennes testées avec le blanc de pétrole comme control négatif.

La Figure III.13 représente les variations des valeurs de la densité optique en fonction du temps (1 mesure dans chaque 12h). On note que les quatre souches (35, 54, 64, 83) commencent à croître dès les 12h voire les 24h mais l'augmentation de la charge bactérienne

se présente dans la **Figure III.13** pendant 60h (de 36h jusqu'à 96h). Quant à la souche 60 est représentée par une courbe de croissance avec une pente faible pendant toute la durée d'incubation.

Pour la deuxième courbe (**Figure III.13**), on observe une similarité de trajet de croissance pour les cinq souches testés toutes presque présentent le même tracé. La croissance pour les cinq souches commence par une DO d'environ 0.1, puis on observe une augmentation de la croissance de T_0 jusqu'à 1 jour puis une augmentation exprimée par une phase de croissance exponentielle courte de 24h jusqu'à 84h. Cette augmentation ralentie correspond à la phase stationnaire qui n'est pas fixée dans les mêmes valeurs mais elle est presque stable, observée à partir du 4^{ème} jour jusqu'au dernier jour où la DO atteint une valeur maximale d'environ 1.015.

L'absence de phase latence démontre une adaptation plus rapide des souches étudiées au source de carbone utilisée (pétrole brute ou alcane), elles dégradent les fractions solubles de pétrole. Par ailleurs, l'augmentation de la biomasse microbienne correspondrait à la phase exponentielle, phase durant laquelle la dissolution du substrat « pétrole ou alcane » suffit aux besoins métaboliques des souches, le passage directement à la phase exponentielle exprimé par la facilité de dégradation des composés de source soluble dans l'eau (**ATLAS, 2011**), plus les produits pétroliers sont légers, plus leur diffusion est rapide et plus vite seront biodisponibles. Ainsi, La stabilisation de la concentration microbienne montre que le niveau des exigences nutritionnelles surpasse la vitesse de dissolution du substrat, la biodisponibilité deviendra alors limitante (**ROCHA et al, 2007**), Puis on observe encore une 2^{ème} phase exponentielle s'explique par la richesse de milieu par des composés faciles à dégrader s'exprime par indicateur biologique de croissance élève.

Conclusion générale

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de notre travail est d'étudier les effets des paramètres physico-chimiques (température, salinité, pH) sur la croissance bactérienne et la biodégradation des hydrocarbures par des souches bactériennes isolées à partir de l'eau de mer et du sédiment marin contaminés par les hydrocarbures. Pour ce faire, 5 échantillons d'eaux et 3 échantillons de sédiments ont été prélevés au niveau du port de Sidi fredj.

Le milieu minéral ONR7 a été utilisé comme milieu d'enrichissement additionné au pétrole et mélange d'alcane comme unique source de carbone, 75 souches au total ont été isolées après enrichissement, isolement et purification. Nous avons constaté après l'examen macroscopique que les colonies obtenues sont toutes de formes circulaires, de petites tailles, à contour régulier, de couleurs blanches, jaunes, rouges orangées et transparentes. Les colonies pour la plupart sont opaques, à surfaces lisses et à consistances crémeuses.

D'après les résultats de l'examen microscopique et les tests biochimiques nous avons constaté une variété des caractères biochimiques et microscopiques. Selon la bibliographie nous avons suggéré les affiliations suivantes : les bactéries Gram négatif, oxydase positifs peuvent être affiliées aux groupes bactériologiques suivants : *Alcanivorax*, *Marinocacter*, *Halomonas*. Les Gram négatifs, oxydase négatifs peuvent être affiliés au groupe *Acinetobacter*.

L'étude de la croissance des souches sur milieu ONR7 additionné à différentes sources de carbone, a permis de démontrer que les bactéries isolées ont une préférence pour les alcanes. Ou 89% des souches ont manifesté une croissance apparente.

La mise en culture des souches bactériennes sur milieu minéral ONR7 à différentes valeurs de salinité, de pH et de température a permis de montrer que les souches isolées ont une bonne bioremédiation de pétrole brut et de mélange de l'alcane à une température de 30°C dans un milieu neutre de pH=7.6 avec une concentration de 2.2% d' NaCl. Ou le maximum de croissance a été observé. Cependant une croissance bactérienne a été observée par quelques souches à des concentrations d'NaCl élevée (10%) à cause de leur résistance à ces conditions. Ceci favorise l'utilisation de ces souches dans la bioremédiation des milieux extrêmes.

Les souches isolées produisent des biosurfactants avec un index d'émulsions de 31.42% pour la bactérie 60 donc. Nous concluons que les bactéries isolées produisent des substances

Conclusion générale.

tensioactives qui permettent la stabilité de l'huile ou les phases hydrophobes dans l'émulsion.

En perspective, il serait souhaitable de compléter cette étude par une approche plus approfondie, à savoir :

- Procéder un séquençage de génome des bactéries hydrocarbonoclastes pour préciser les différentes espèces des bactéries étudiées.
- Approfondir nos recherches actuelles en étudiant les effets d'autres paramètres physicochimiques sur les bactéries marines tels que l'oxygène dissous et les sels nutritifs.
- La valorisation des métabolites sécrétés par les bactéries hydrocarbonoclastes (biosurfactants), et leurs exploitations pour améliorer la biodégradation.
- L'étude des propriétés physicochimiques des biosurfactants produits par les bactéries hydrocarbonoclastes, pour mieux connaître leur nature, leur structure et leur mode d'action.
- Déterminer le profil de dégradation des bactéries isolées par chromatographie, afin de déterminer quelles sont les souches les plus performantes pour la bioremédiation.

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **ABU-RUWAIDA, A. *et al.* (1991).** Isolation of biosurfactant producing bacteria product characterization and evaluation. *Acta Biotech.* Vol. 11, n°4, pp. 315-24.
- **AKMOUCI, S. (2009).** Contribution à l'étude des boues de forage : Isolement et évaluation de la capacité de quelques souches microbiennes à dégrader le gasoil. Mémoire de magister. Biochimie et microbiologie appliquée. Boumerdes : Université M'hamad Bougara . 109 p.
- **ALI AHMED, S. (2011).** Essai de réhabilitation d'un sol contaminé par les hydrocarbures à l'aide de tensioactifs obtenus par voie biologique (doctoral dissertation). *Sciences des sols.* Alger : ENSA. pp. 27-92.
- **ATLAS, R., BARTHA, R. (1993).** Interactions among microbial populations. *Microbial ecology: fundamentals and applications.* California : The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., pp 37-38.
- **ATLAS, R., BARTHA, R. (1972).** Biodegradation and mineralization of petroleum in seawater at low temperature. *Canadian journal of microbiology.* Vol.18, n°12, pp. 1851-1855.
- **ATLAS, R. (1975).** Effects of temperature and crude oil composition on petroleum biodegradation. *Applied microbiology.* Vol. 30, n° 3, pp. 396-403.
- **ATLAS, R. (1981).** Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbial reviews.* Vol.45, n°1, pp. 180-209.
- **ATLAS, R. *et al.* (2011).** Microbes et déversements de pétrole. Rapport d'activité. Document non publié. USA : American academy of microbiology.
- **BANAT, M., MAKKAR, R., CAMEOTRA, S. (2000).** Potentiel commercial applications of microbial surfactants, *Applied microbiology and biotechnology.* Vol. 53, n°5, pp. 495-508.
- **BAROOAH, M., BORTHAKUR, H. (1999).** Biodegradation of hydrocarbon in soil of upper Assam. *Journal of the Indian society of soil science.* Vol. 47, n°1, pp. 62-67.

- **BELMENAI, S., BENHAFED, K. (2015).** Isolement et caractérisation des bactéries hydrocarbonoclastes. Mémoire Master. Ecologie Microbienne. Constantine : Université des Frères Mentouri. p.66.
- **BERTRAND, J. 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. Vol. 168, n°1, pp. 125-138.
- **BIANCHI, M. et al. (1989).** Microorganismes dans les écosystèmes océaniques. rapport d'activité. Document non publié. Paris: Masson.
- **BERTRAND, J. et al. (1990).** Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic archaeobacterium. Letters in applied microbiology. Vol. 168, n°1, pp. 125-138.
- **BIDAUD, L. (1998).** Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques approche microbiologique et application au traitement d'un sol pollué. Thèse de Doctorat. Génie des Procédés. Saint-Etienne : Ecole nationale supérieure des mines. 188 p.
- **BIRECHE, S., BERREGUI, A. (2014).** Effets de la salinité sur l'activité des bactéries hydrocarbonoclastes. Mémoire de Master. Microbiologie appliquée. Ouargla : Université Kasdi Merbah. pp.25-35.
- **BOCARD, CH. (2006).** Marées noires et sols pollués par des hydrocarbures (enjeux environnementaux et traitement des pollutions). Rapport d'activité. Document non publié. Paris:Technip.
- **ATLAS, R., RONALD, M. (1991).** Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills. Journal of chemical technology and biotechnology. Vol. 52, n° 2, pp. 149-156.
- **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 : ISMAL. pp. 35-39.
- **BOUDERHEM, A. (2011).** Utilisation des souches bactériennes telluriques autochtones dans la biodétection et la bioremediation des sols pollués par les hydrocarbures. Mémoire de magister. Biologie. Ouargla : Université Kasdi Merbah. pp.3-20.

- **BRINKMANN, K. *et al.* (1998).** Bioremediation of diesel fuel contaminated soil in a rotating bioreactor Part I: influence of oxygen saturation. *Chemical engineering & technology*. Vol. 21, n°2, pp. 168-172.
- **BROWN, W., COOPER, D. (1992).** Hydrocarbon degradation by *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 using the self-cycling fermentation technique. *Biotechnology and bioengineering*. Vol. 40, n°7, pp. 797-805.
- **CHAKRABORTY, R., COATES, J. (2004).** Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Applied microbiology and biotechnology*, Vol. 64, n°4, pp. 437-446.
- **CHRISTOFI, N., IVSHINA, I. (2002).** Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal of applied microbiology*. Vol. 93, n°6, pp. 915-929.
- **COOPER, D., GOLDENBERG, D., BEENA, G. (1987).** Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 53, n°2, pp. 224-229.
- **DESAI, J., BANAT, I. (1997).** Microbial Production of Surfactants and their commercial potential, *Microbiology and molecular biology reviews*. Vol. 61, N°1, pp. 47-64.
- **DÍAZ, M. *et al.* (2002).** Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M, immobilized onto polypropylene fibers. *Biotechnol. Bioeng.* Vol.79, n°2, pp.145-153.
- **AMIROUCHE, Y. (2009).** Marée noire sur la « grande bleue » Dégazage et déballastage sauvages des navires en mer [En ligne]. [Page consultée le 20 Avril 2017]. Disponible sur le web : <http://www.djazair.com/fr/latribune/20150>
- **EFROYMSON, R., ALEXANDER, M. (1991).** Biodegradation by an arthrobacter species of hydrocarbons partitioned into an organic solvent. Department of Soil, Crop, and Atmospheric Sciences. New York: Cornell University. pp. 55-74.
- **ERIKSON, M. *et al.* (2003).** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons at low temperature under aerobic and nitrate-reducing conditions in enrichment cultures from northern soils. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 69, n°1, pp. 275-284.

- **GABET, F. (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. pp. 122-129.
- **GHERMOUCH, A. (2014).** Caractérisation moléculaire des bactéries impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures. Thèse de doctorat. Microbiologie. Oran : Université d'Oran. pp. 102-108.
- **GREER, C. et al. (2003).** Indigenous sediment microbial activity in response to nutrient enrichment and plant Growth following a controlled oil spill on a freshwater wet land, *Bioremediation Journal*. Vol.7, n°1, pp. 69-80.
- **HEALY, M., DEVINE, C., MURPHY, R. (1996).** Microbial production of biosurfactants. *Resources, Conservation and Recycling*. Vol. 18, n°1, pp. 41-57.
- **KOUZAYHA, A. (2011).** Développement des méthodes analytiques pour la détection et la quantification de traces des HAP et de pesticides dans l'eau. Application à l'évaluation de la qualité des eaux libanaises. Thèse de doctorat. Chimie Analytique et Environnement. France : Université de Bordeaux. pp. 65-72.
- **MAAMAR, A. (2015).** Etude de la biodégradation du pétrole brut par le peuplement fongique du port d'Oran. Thèse de Magister. sciences de l'environnement Marin-Biologie. Oran : Université d'Oran. pp. 52-63.
- **MALLOUHI, N. (1989).** Etude de la dynamique de la matière organique (M.O.) dans les sols affectés par la salinité : rapport d'activité. Document non publié. France : Masson.
- **MARTINELLI, I. (1999).** Infiltration des eaux de ruissellement pluvial et transfert des polluants associés dans le sol urbain : vers une approche globale et pluridisciplinaire. Thèse de Doctorat. Sciences appliquées. France : Université de Lyon. pp. 207-209.
- **MBONIGABA, J. et al. (2009).** Caractérisation physique, chimique et microbiologique de trois sols acides tropicaux du Rwanda sous jachères naturelles et contraintes à leur productivité. *Biotechnologie, Agronomie, société et environnement*. Vol. 13, n° 4, pp. 535- 545.

- **MCGENITY, M., TERRY, J. *et al.* (2012).** Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. School of biological sciences. Aquatic biosystems. Vol. 8, n°1, pp. 10.
- **PARALES, R., HARWOOD, D. (2000).** Toluene-degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene, toluene and trichlorethyle. Applied and environmental microbiology. Vol.66, n°9, pp. 4098-4104
- **PHILIPPS, C. (1985).** Photochemistry of petroleum in water: Photooxidation causes changes in oil and enhances dissolution of its oxidized products. Environmental science and technology. Vol.19, n°5, pp. 569-579.
- **RATLEDGE, C. (1978).** Degradation of aliphatic hydrocarbons. In: Watkinson, R.J.(Ed.), Development in biodegradation of hydrocarbons. Applied sciences publishers. Vol.1, n°3, pp. 1-46.
- **ROCHA, M. *et al.* (2007).** Production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* grown on cashew apple juice. Applied biochemistry and biotechnology. Vol.20, n°3, pp. 136-140.
- **RODRIGO, J. *et al.* (2005).** Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. From a petrochemical Sludge landfarming site. International biodeterioration and biodegradation. Vol.56, n°2, pp. 143-150.
- **SANDVIK, S., LODE, A., PEDERSON, T. (1986).** Biodegradation of oily sludge in Norwegian soils. Applied microbiology biotechnology. Vol.23, n°5, pp. 297-301.
- **SAURET, C. (2011).** Ecologies des communautés bactériennes marines soumises à une pollution pétrolière Influence des facteurs environnementaux, de la prédation et de la récurrence des pollutions. Thèse de doctorat. Microbiologie environnementale. France : Université de pierre et marie curie, pp. 126-130.
- **SCRIBAN, R. (1999).** Biotechnologie : restauration par voie biologique des sols contaminés par les polluants organiques. France : Lavoisier. pp. 45-50.
- **SIKKEMA, J., DE BONT, A ., POOLMAN, B. (1994).** Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. Journal of bacteriology. Vol. 269, n°11, pp. 8022-8028.

- **SIKKEMA, J., DE BONT, A., POOLMAN, B. (1995).** Metabolism of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological reviews*. Vol.59, n°12, pp. 201-222.
- **SILVA, S. et al. (2010).** Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. *Colloids and surfaces B : biointerfaces*. Vol.79, n°6, pp. 174– 183.
- **SINGLETON, P., SAINSBURY, D. (1984).** Abrégé de bactériologie. Rapport d'activité. Document non publié. Paris: Masson.
- **SOLTANI, M. (2004).** Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse de doctorat. chimie analytique. France: Université de Paris. pp. 185-212.
- **SONG, H., WANG, X., BARTHA, R. (1990).** Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Applied and environmental microbiology*. Vol.56, n°33, pp. 652-656.
- **TAGGER, S., DEVEZE, L., LEPETIT, J. (1976).** The conditions for biodegradation of petroleum hydrocarbons at sea. *Marine Pollution Bulletin*. Vol.7, n°3, pp. 172-174.
- **TAPILATU, Y. et al. (2010).** Isolation of hydrocarbon-degrading extremely halophilic archaea from an uncontaminated hypersaline pond (Camargue, France). *Extremophiles* Vol.14, n°7, pp. 225- 231.
- **TECHER, D. (2011).** Réhabilitation de sols pollués par des HAP grâce aux bactéries associées à la rhizosphère de *Miscanthus x giganteus*. *Science of the total environment*. Vol. 409, n°20, pp. 4489-4495.
- **VANDECASTEELE, P. (2005).** Microbiologie pétrolière, Technip. Vol.2, n°1, pp. 52-60.
- **VANESSA, S. et al. (2011).** Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. *Bioresource technology*. Vol.102, n°23, pp. 1100-1101.

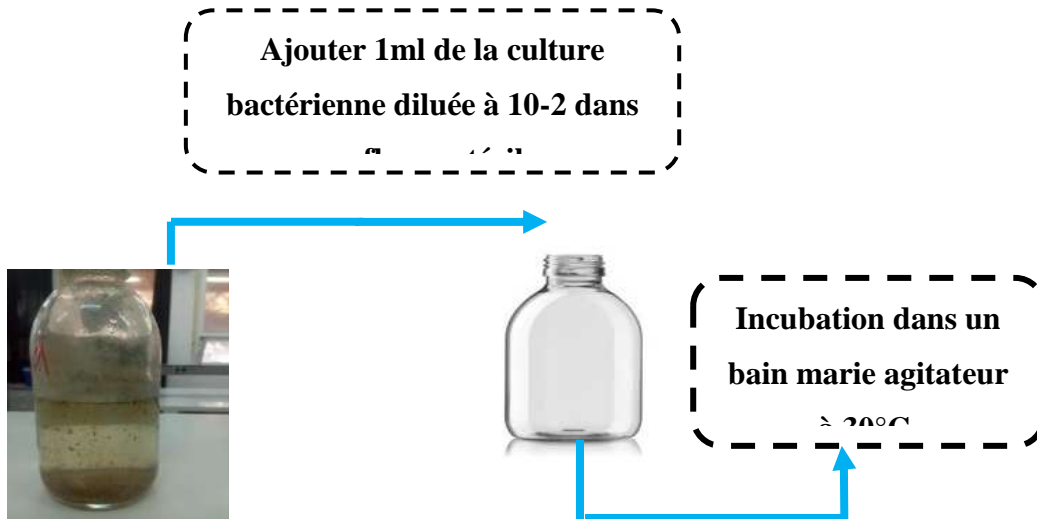
- **VETRIANI, C. (2005).** Mercury adaptation among bacteria from a deep-sea hydrothermal vent. *Applied and environmental microbiology*, Vol.71, n°5, pp. 220-226.
- **VOGEL, T., BALLERINI, D. (2001).** Biorestauration des sols et des aquifères contaminés par des hydrocarbures et des composés halogénés. *Bull.Soc.Fr. Microbiol.*Vol.16, n°3, pp.204- 209.
- **WALWORTH, J., BRADDOCK, J., WOOLAR, D. (2001).** Nutrient and temperature interactions in bioremediation of cryic soil. *Cold region science and technology*. Vol.32, n°9, pp. 85-91.
- **WARD, D., BROCK, T. (1978).** Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments. *Applied and environmental microbiology*. Vol.35, n°5, pp. 353-359.
- **WEST, C., HARWELL, J. (1992).**Surfactants and subsurface remediation, *Environ. Sci.Technol.* Vol.36, n°12, pp. 2324-2330.
- **WHYTE, L. et al. (1998).** Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low températures by a psychrotropic *Rhodacoccus* so. *Applied an environmental microbiology*. Vol.64, n°7, pp. 2578-2584.
- **YAKIMOV, M., TIMMIS, K., GOLYSHIN, P. (2007)** Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current opinion in biotechnology*. Vol.18, n°8, pp. 257–266.

Annexes

ANNEXES

Schéma récapitulatif enrichissement 10^{-4} :

Dilution de 10^{-4} dans un milieu de culture liquide :



ANNEXE II

Ensemencement sur un milieu gélosé.

Schéma récapitulatif de l'étalement liquide solide :

ANNEXE III

Tableau III.2 : Les résultats de réisolement des souches bactériennes dans un milieu liquide.

N° de tube	Source de C	Résultat	La couleur
1	P	Positif	Transparente
2	P	Négatif	Transparente
3	P	Positif	Transparente
4	P	Positif	Jaune
5	P	Positif	Jaune
6	P	Positif	Jaune
7	P	Positif	Blanche
8	P	Positif	Blanche
9	P	Positif	Blanche
10	P	Positif	Transparente
11	P	Positif	Jaune
12	P	Positif	Blanche
13	P	Positif	Transparente
14	P	Positif	Blanche
15	P	Positif	Transparente
16	P	Positif	Jaune
17	P	Positif	Jaune
18	P	Positif	Jaune orangée
19	P	Positif	Jaune orangée
20	P	Positif	Jaune
21	P	Positif	Jaune
22	A	Positif	Jaune
23	A	Positif	Jaune
24	A	Positif	Blanche
25	A	Négatif	Blanche
26	A	Positif	Blanchâtre
27	A	Positif	Blanchâtre

28	A	Négatif	Blanchâtre
29	A	Positif	Blanche
30	A	Positif	Jaune orangée
31	A	Négatif	Blanchâtre
32	A	Positif	Jaune orangée
33	A	Positif	Jaune orangée
34	A	Positif	Jaune orangée
35	A	Positif	Jaune
36	A	Négatif	Jaune orangée
37	A	Positif	Jaune orangée
38	A	Positif	Blanche
39	A	Positif	Blanche
40	A	Positif	Transparente
41	A	Positif	Blanchâtre
42	A	Positif	Blanchâtre
43	A	Positif	Blanchâtre
44	A	Positif	Blanchâtre
45	A	Positif	Blanchâtre
46	A	Positif	Blanchâtre
47	A	Positif	Jaune orangée
48	A	Positif	Jaune orangée
49	A	Positif	Jaune orangée
50	A	Négatif	Transparente
51	A	Positif	Transparente
52	A	Positif	Blanchâtre
53	A	Négatif	Transparente
54	A	Positif	Transparente
55	A	Négatif	Transparente
56	A	Positif	Blanchâtre
57	A	Positif	Blanchâtre
58	A	Positif	Blanchâtre
59	A	Négatif	Blanchâtre
60	A	Positif	Blanchâtre
61	A	Négatif	Transparente
62	A	Positif	Blanche

63	A	Négatif	Blanche
64	A	Positif	Jaune
65	A	Négatif	Jaune orangée
66	A	Négatif	Transparente
67	A	Négatif	Transparent
68	P	Positif	Blanchâtre
69	P	Positif	Blanchâtre
70	P	Positif	Transparente
71	P	Positif	Transparente
72	P	Négatif	Jaune
73	P	Négatif	Jaune
74	P	Positif	Jaune
75	P	Négatif	Jaune
76	P	Négatif	Transparente
77	P	Positif	Transparente
78	P	Positif	Blanche
79	P	Positif	Blanche
80	P	Positif	Transparente
81	P	Positif	Blanche
82	P	Positif	Transparente
84	A	Positif	Blanche
85	A	Positif	Transparente
86	A	Positif	Blanche
87	A	Positif	Blanche
88	A	Positif	Blanche
89	P	Positif	Transparente
90	P	Positif	Blanchâtre
91	P	Positif	Transparente
92	P	Positif	Transparente
93	P	Positif	Transparente

ANNEXE IV

Tableau IV.1 : les résultats de mesure de la densité optique des souches bactériennes en fonction de différentes sources de carbone.

Numéro de bactéries	DO							
	PB	ALC	C26	C28	Benz	TOL	XYL	C-
1	0,214	0,022	0	0,032	0	0,002	0	0
3	0,125	0,302	0,245	0,102	0,014	0,014	0,036	0,03
4	0,109	0,242	0,539	0,032	0,008	0,096	0,098	0
5	0,189	0,165	0,412	0,62	0,078	0,054	0,08	0,099
6	0,514	0,104	0,166	0,96	0,023	0,002	0,001	0,169
7	0,128	0,333	0	0,25	0,052	0,01	0	0,012
8	0,349	0,214	0,211	0,113	0,022	0,102	0	0
9	0,519	0,225	0	0,467	0	0	0,005	0
10	0,356	0,123	0,021	0,201	0	0	0,012	0,123
11	0,289	0,365	0,084	0,098	0	0	0	0,04
12	0,675	0,254	0,095	0,079	0	0,003	0,063	0
13	0,476	0,263	0	0,26	0	0	0,008	0,008
14	0,34	0,478	0,102	0,36	0,023	0,153	0,023	0,098
15	0,511	0,201	0	0,025	0,065	0,1	0,089	0
16	0,246	0,326	0,074	0,201	0,034	0,025	0	0
17	0,301	0,311	0,068	0	0	0	0,067	0,007
18	0,341	0,239	0,153	0,593	0,004	0,023	0,009	0,03
19	0,142	0,176	0,1	0,285	0	0,052	0,077	0,01
20	0,547	0,102	0,108	0,113	0,056	0,008	0	0,005
21	0,976	0,108	0,109	0,057	0,063	0	0	0

22	0,264	0,364	0,222	0,114	0,055	0,015	0,008	0
23	0,552	0,128	0	0,216	0	0,014	0,004	0
24	0,456	0,269	0,036	0,258	0	0,026	0,103	0,008
26	0,258	0,258	0,102	0,101	0,074	0,076	0,009	0,06
27	0,654	0,363	0	0,045	0,012	0,069	0,004	0,001
29	0,122	0,09	0,12	0,112	0,066	0	0	0
30	0,786	0,107	0,126	0,33	0,051	0,037	0,009	0,009
32	0,159	0,147	0,008	0,123	0	0,084	0,062	0,03
33	0,357	0,159	0,21	0,014	0	0,012	0	0,006
34	1,32	0,611	0,383	0,313	0	0,078	0	0
35	0,798	0,597	0,635	0,32	0,008	0	0,125	0
37	0,753	0,3	0	0,108	0,002	0	0,101	0,005
38	0,191	0,165	0,164	0,98	0,018	0,074	0	0
39	0,825	0,224	0,449	0,318	0	0,054	0,094	0,014
40	0,365	0,325	0,178	0,189	0	0,062	0,025	0,022
41	0,531	0,594	0,299	0,405	0	0,023	0,003	0,012
42	0,802	0,499	0,77	0,532	0,011	0	0,109	0,039
43	0,807	0,066	0,26	0,365	0	0	0,11	0
44	0,373	0,332	0,258	0,114	0	0,041	0,007	0
45	0,711	0,044	0,609	0,197	0	0,003	0,084	0,041
46	0,671	0,112	0,096	0,451	0	0,006	0,039	0,033
47	0,409	0,002	0,111	0,245	0,015	0	0,014	0
48	0,544	0,126	0,318	0,321	0	0	0,066	0,072
49	0,729	0,332	0,421	0,106	0	0,029	0,003	0,025
51	0,349	0,166	0,199	0,117	0	0,097	0,088	0
52	0,555	0,385	0,511	0,273	0	0	0,124	0
54	0,85	0,397	0,42	0,482	0,017	0,128	0,13	0,032
56	0,62	0,389	0,387	0,233	0	0,019	0,077	0,003
57	0,816	0,818	0,351	0,484	0	0,043	0,091	0
58	0,615	0,389	0,775	0,546	0,008	0,098	0,063	0,004
60	0,125	0,043	0,018	0,022	0,062	0,063	0,063	0,071
62	0,471	0,145	0,334	0,36	0,006	0,014	0,1	0,055
64	0,035	0,064	0,198	0,225	0,008	0	0,092	0

68	0,574	0,357	0,228	0,15	0,013	0,016	0,005	0,011
69	0,636	0,149	0	0,119	0,001	0	0	0,002
70	0,141	0,265	0,024	0,178	0,007	0,095	0	0
71	0,297	0,223	0,096	0,72	0,096	0,012	0,102	0,03
74	0,845	0,224	0,314	0,342	0,075	0,098	0,032	0,054
77	0,173	0,241	0	0,159	0	0	0,048	0,007
78	0,722	0,354	0,119	0,145	0	0,055	0,079	0
79	0,52	0,109	0,045	0,12	0,008	0,199	0	0
80	0,456	0,111	0,005	0,103	0	0,092	0	0
81	0,414	0,107	0,148	0,125	0,012	0,046	0,085	0,026
82	0,3	0,425	0,155	0,199	0,021	0,01	0,09	0,034
83	0,665	0,777	0,272	0,492	0,062	0,059	0,061	0,09
84	0,74	0,657	0,321	0,481	0,094	0,065	0,024	0,08
85	0,705	0,573	0,057	0,127	0,062	0,068	0,064	0,053
86	0,744	0,594	0,167	0,056	0,069	0,054	0,063	0,112
87	0,605	0,017	0,008	0,089	0,07	0,06	0,066	0,082
88	0,526	1,002	0	0	0,333	0,064	0,08	0,072
89	0,801	0,695	0,07	0,217	0,058	0,02	0,061	0,068
90	0,713	0,866	0,069	0,349	0,079	0,093	0,075	0,153
91	0,602	1,124	0,197	0,042	0,061	0,057	0,062	0
92	0,771	0,228	0,054	0,075	0,062	0,061	0,063	0,061
93	0,264	0,664	0,061	0,35	0,061	0,059	0,064	0,072

Tableau IV.2 : Les valeurs statistiques de mesure de la densité optique des cultures bactériennes en fonction de différentes sources de carbone.

Nombre des souches qui ont poussés	HB	Max	Min	Moyenne	Ecart type	Pourcentage %
74	pb	1,32	0,035	0,49912	0,253513	98,66667
67	alc	1,124	0,002	0,311	0,235757	89,33333
45	C26	0,775	0	0,184867	0,185399	60
60	C28	0,98	0	0,246733	0,204715	80
1	Benz	0,333	0	0,027987	0,046304	1,333333
5	Tol	0,199	0	0,041227	0,042055	6,666667
9	Xyl	0,13	0	0,046653	0,041053	12
4	C-	0,169	0	0,029067	0,039039	5,333333

ANNEXE V

Tableau V.1 : Résultats de l'effet de la température

Numéro des bactéries	T= 4°C	T=20°C	T=30°C	T= 40°C
	D.O	D.O	D.O	D.O
85	0,167	0,169	0,573	0,403
60	0,088	0	0,043	0
86	0	0,049	0,594	0
84	0,199	0,14	0,667	0,199
88	0	0,768	0,017	0,308
87	0	0	0,017	0
90	0,003	0,009	0,713	0,342
89	0,649	0,33	0,695	0,199
92	0	0	0,228	0
93	0	0	0,664	0
91	0	0,229	1,124	0,032
14	0	0,029	0,34	0,104
17	0,03	0	0,301	0,24
4	0	0	0,105	0,111
5	0	0,124	0,189	0,478
57	0,009	0	0,816	0,233
64	0,087	0	0,035	0,123
54	0,1	0	0,85	0,045
34	0,047	0,024	1,48	0,125
42	0	0,019	0,802	0,1

Tableau V.2 : Résultats de l'effet du pH.

Effet de pH sur l'activité des hydrocarbonoclastes			
Numéro des bactéries	pH 4,5	pH 7,6	pH 10,5
	DO	DO	DO
14	0,141	0,34	0
17	0,224	0,301	0
89	0,217	0,695	0,03
5	0,264	0,189	0,066
4	0,276	0,105	0,015
90	0,34	0,866	0
91	0,138	1,124	0,008
85	0,118	0,573	0
93	0,058	0,664	0
42	0,144	0,802	0,051
35	0,097	0,798	0
54	0,116	0,85	0,024
84	0,075	0,657	0,033
92	0,103	0,228	0,001
60	0,072	0,043	0
64	0,12	0,035	0
34	0,152	1,56	0,009
57	0,111	0,816	0,072
87	0,085	0,026	0,021
86	0,126	0,594	0
88	0,065	1,002	0,016

Tableau V.3 : Résultats de l'effet de la salinité

Numéro des bactéries	0%	2,20%	5%	10%	20%
14	0	0,34	0,089	0,124	0,219
17	0	0,301	0,1	0	0,306
89	0,088	0,695	0,11	0	0,184
5	0,075	0,189	0	0,137	0,186
4	0,03	0,105	0	0	0,105
90	0	0,866	0,125	0,222	0,363
91	0,154	1,124	0,489	0,061	0,247
85	0,284	0,573	0,171	0,435	0
93	0	0,664	0	0	0
42	0,331	0,802	0,584	0,242	0,035
35	0,434	0,798	0,146	0,045	0
54	0,155	0,85	0,051	0,096	0
84	0,188	0,657	0,261	0,033	0
92	0	0,228	0	0	0
60	0,021	0,043	0	0	0
64	0,029	0,035	0	0,421	0
34	0,227	1,46	0,317	0	0,003
57	0	0,816	0	0	0
87	0,072	0,014	0,061	0,289	0
86	0,542	0,594	0,103	0	0
88	0,093	1,002	0	0,46	0,04

ANNEXE VI

Tableau VI.1 : Résultats du test d'émulsification

Numéro des bactérie	Ht (cm)	He à t=0 (cm)	He à t=24h (cm)	Pourcentage %
85	2,6	0,3	0,15	5,769230769
60	3,5	1,2	1,1	31,42857143
86	1,8	1,2	0,15	8,333333333
84	2,1	0,1	0,05	2,380952381
88	2,2	0,1	0,05	2,272727273
87	1,7	0,3	0	0
90	2,1	0,1	0,05	2,380952381
89	1,6	0,2	0,15	9,375
92	1,8	0,3	0,05	2,777777778
93	3,1	0,2	0,1	3,225806452
91	1,4	0,2	0,1	7,142857143
54	1,9	0	0	0
4	2	0,2	0,1	5
40	2,8	0,1	0,05	1,785714286
17	1,6	0,05	0,05	3,125
19	1,5	0,1	0,05	3,333333333
52	1,1	0,1	0,05	4,545454545
56	1,6	0,05	0,1	6,25
41	2	0,05	0,01	0,5
54	1,8	0,1	0	0
58	1,4	0,15	0,1	7,142857143
34	1,9	0	0,2	10,52631579
57	1,3	0,25	0	0
43	2,3	0	0,3	13,04347826
83	2,5	0,3	0	0
14	2,2	0	0,2	9,090909091

35	1,3	0,05	0	0
42	1,7	0,1	0,5	29,41176471
39	1,9	0,05	0,1	5,263157895
18	1,7	0,1	0,05	2,941176471
5	2,4	0,01	0,1	4,166666667
64	1,5	0	0,01	0,666666667

ANNEXE VII

Tableau VII.1 : Les résultats de mesure de la densité optique pour la suivie de la cinétique des bactérie hydrocarbonoclastes.

Numéro des bactéries	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156
35	0	0,023	0,151	0,179	0,205	0,36	0,7	0,81	0,851	0,888	0,912	0,974	0,898	0,956
54	0	0,012	0,142	0,256	0,389	0,655	0,714	0,745	0,799	0,852	0,899	0,9	0,911	0,915
60	0	0,012	0,12	0,134	0,135	0,14	0,147	0,151	0,183	0,188	0,189	0,189	0,19	0,192
64	0	0,098	0,1	0,197	0,199	0,281	0,312	0,387	0,588	0,674	0,795	0,8	0,845	0,861
83	0	0,023	0,105	0,145	0,276	0,291	0,692	0,899	0,915	0,963	0,97	0,982	0,985	0,991
4	0	0	0,057	0,124	0,489	0,741	0,762	0,865	0,87	0,896	0,9	0,911	0,975	0,981
17	0	0,074	0,111	0,119	0,514	0,612	0,745	0,866	0,816	0,846	0,851	0,844	0,948	0,95
93	0	0,025	0,131	0,147	0,549	0,593	0,7	0,852	0,878	0,865	0,882	0,961	0,969	0,985
92	0	0,019	0,123	0,152	0,233	0,239	0,714	0,754	0,963	0,968	0,981	0,92	0,98	0,999
91	0	0,058	0,101	0,145	0,344	0,615	0,769	0,799	0,841	0,9	0,952	0,971	0,975	0,979
Blanc alcane	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,001	0,01	0,011	0,011
Blanc pétrole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,002	0,009	0,013

RESUME

L'objectif de notre travail est d'étudier l'effet de la température, pH et de la salinité sur la croissance bactérienne et la biodégradation des hydrocarbures par des souches bactériennes isolées à partir de l'eau de mer et sédiment contaminés par les hydrocarbures. Un suivi de la biodégradation a été effectué dans un milieu de culture minéral ONR7.

Les résultats obtenus montrent que les bactéries marines aptes de dégrader les différents types des hydrocarbures se développent mieux dans des conditions de croissance presque identiques à celles de l'eau de mer et de sédiment marin : une température de 30°C, une concentration de 2.2% de NaCl et un pH légèrement basique de 7.6.

Les résultats de test de l'indice d'émulsification montre la capacité des bactéries marine hydrocarbonoclastes de produire le biosurfactans.

Mots clés : hydrocarbures, biodégradation, bioremédiation, bactéries hydrocarbonoclastes, émulsification.

ABSTRACT

The objective of our work is to study the effect of the temperature, the pH, the salinity on the bacterial growth and the biodegradation of hydrocarbons by bacterial strains isolated from the seawater, and sediment was contaminated by hydrocarbons. A follow-up of the biodegradation was made in a mineral medium ONR7.

The obtained results show that the marine bacteria capable of degrading the various types of hydrocarbons develop better in conditions of growth almost identical to those of seawater and marine sediment, we are talking here about a temperature of 30°C, a concentration of 2.2 % of NaCl and a pH of 7.6. The results of test of the index of emulsification shows the capacity of hydrocarbonoclastic bacteria to produce emulsification products.

Key words: hydrocarbons, salinity, biological breakdown, bacteria hydrocarbonoclastes,

الملخص

الهدف من عملنا هو دراسة اثر درجة حرارة, الحموضة والملوحة على تكاثر البيكتيريا المعزولة من مياه البحر و الرواسب البحرية الملوثة و ايضا متابعة التحلل البيولوجي للمواد الهيدروكربونية من طرف هذه البيكتيريا المعزولة في بيئة معدنية .

النتائج المتحصل عليها هي ان البيكتيريا البحرية القادرة على تحليل المركبات الكربونوهيدرية تتكاثر بصفة احسن في بيئة مشابهة للبيئة البحرية و لها نفس الخصائص الفيزيائية و الكيميائية : درجة حرارة 30 درجة مئوية, تركيز 2.2 % من كلور الصوديوم, ودرجة حموضة 7.6. كما اظهرت نتائج العمل الميكروبيولوجي قدرة هذه البيكتيريا على تصنيع مادة خافضة للتوتر السطحي.

الكلمات الدالة : النفط , البيكتيريا النفطية , التحلل البيولوجي.