



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية عاوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

**Spécialité : *Microbiologie générale
et biologie moléculaire des microorganismes***

Thème

***Isolement et caractérisation des bactéries hydrocarbonoclastes
à partir de sols pollués dans la région de Hassi Messaoud***

Présenté et soutenu par : HADDAD Naouel

Le : 16/06/2015

BOUDJADA Yasmine Djihene

Membres de jury :

Président : Mr Y. Benhizia

Pr. U. Frères Mentouri- Constantine.

Rapporteur : Mme I.Guergouri

M.A. U. Frères Mentouri- Constantine.

Examineur: Mr A. Benguedouar

Pr. U. Frères Mentouri- Constantine.

***Année Universitaire
2014 - 2015***

Table des matières

Résumé

Remerciement

Dédicaces

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction..... 1

Chapitre 1: Revue bibliographique

I- Généralités..... 3

I-1- Aperçu historique..... 3

I-2- Définition du pétrole brut « Crude oil »..... 3

I-3- Son origine..... 3

I-4- Sa composition..... 5

I-4-1- Les hydrocarbures..... 5

I-4-2- Les composés soufrés..... 6

I-4-3- Les autres composés..... 6

I-5- Pollution de l'environnement par les hydrocarbures 6

I-5-1- Définition..... 6

I-5-2- Type de polluants..... 7

I-6- Impact des hydrocarbures sur l'environnement..... 7

II- Biodégradation des hydrocarbures.....	7
II-1- Définition.....	7
II-2- Types de biodégradation.....	8
II-2-1- Biodégradation aérobie.....	8
II-2-2- Biodégradation anaérobie.....	9
II-3- Bactéries dégradant les hydrocarbures.....	9
II-4- Les Modes d'assimilation des hydrocarbures par la cellule bactérienne.....	11
III- Les biosurfactants.....	12
III-1- Définition.....	12
III-2- Classification.....	13
III-3- Applications.....	15

Chapitre II : Etude expérimentale

I- Présentation de la zone d'étude de prélèvement.....	17
I-1- Situation géographique.....	17
I-2 - Situation géologique.....	17
I-3- Caractéristiques géo climatiques.....	18
I-4- Historique de recherche.....	18
II- Prélèvement des échantillons.....	18
II-1- Analyse physicochimique du sol.....	19
II-2- Analyses microbiologiques du sol.....	20
II-2-1- Dénombrement de la microflore totale.....	20
II-2-2- L'isolement.....	21

II-2-3- La purification.....	21
II-2-4- Conservation des souches isolées.....	22
II-2-5- Caractérisation des souches purifiées.....	22
III- Sélection des souches productrices de biosurfactants.....	23
III-1-Test d'émulsification.....	23
III-2-Test parafilm M.....	23
III-3- Déplacement d'huile.....	24
IV- Caractérisation biochimique.....	25
IV-1- Galerie biochimique.....	25
IV-2- Test d'hydrolyse de l'amidon.....	27
IV-3- Test d'hydrolyse de la lécithine.....	27
IV-4 - Recherches des <i>Staphylococcus aureus</i> sur gélose Baird-Parker.....	28

Chapitre III : Résultats et discussion

I- Caractéristiques du sol prélevé.....	29
I-1- Analyse physicochimique du sol.....	29
I-2- Analyses microbiologiques du sol.....	30
I-2-1- Dénombrement de la microflore totale.....	30
I-2-2- Caractérisation des souches purifiées.....	31
II- Sélection des souches productrices de biosurfactants.....	39
II-1- Test d'émulsification.....	39
II-2-Test parafilm M.....	44
II-3- Test de déplacement d'huile.....	45

III- Caractérisation biochimique.....	46
III-1- Galerie biochimique.....	46
III-2- Interprétation des tests biochimiques.....	47
III-2-1- Production d'indole.....	47
III-2-2- Le métabolisme respiratoire.....	47
III-2-3- Etude de la destinée de l'acide pyruvique.....	48
III-2-4- Le métabolisme glucidique et énergétique.....	48
III-2- Test d'hydrolyse de l'amidon.....	51
III-3- Test d'hydrolyse de la lécithine.....	52
III-4- Recherche de <i>Staphylococcus aureus</i> sur gélose Baird-Parker.....	53
IV- Identification des isolats.....	53
Conclusion.....	56
Références bibliographiques.....	58

Annexes

Résumé

L'élimination du pétrole dans le sol nécessite l'intervention de différents facteurs biotiques et abiotiques. Parmi ces facteurs, la biodégradation par les microorganismes.

L'objectif de notre travail est l'isolement et la caractérisation de bactéries hydrocarbonoclastes à partir sol prélevé autour des bacs de stockage dans la région de Hassi Messaoud.

Tous les isolats ont été purifiés sur un milieu contenant 1% de pétrole brut comme source de carbone et d'énergie.

Trois tests ont été réalisés afin de détecter la production de biosurfactants : le test d'émulsification, le déplacement d'huile et le parafilm M .Les vingt isolats ont montré cette capacité synthétique.

Le suivi d'un schéma d'identification dichotomique nous a permis de regrouper nos isolats en six genres principaux : *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*.

Mots clés : Biodégradation, biosurfactant, pétrole brut, hydrocarbonoclastes.

Abstract

The removal of oil from the soil requires the involvement of various biotic and abiotic factors. Among these factors the biodegradation by microorganisms.

The objective of our work is to isolate and to characterize hydrocarbonoclaste bacteria surrounding the storage tanks of crude oil at the refinery of Hassi Messaoud.

All pure isolates obtained and purified, on medium containing 1% of crude oil, as source of carbon and energy.

Three tests were performed to detect the production of biosurfactants: emulsion index, oil spreading technique and parafilm M. the twenty isolates showed ability to produce biosurfactants with different rates.

Followed by dichotomous schema, allowed us to classify bacteria isolated in six genres : *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Enterobacter*, and *Staphylococcus*.

Key words: Biodegradation, biosurfactants, crude oil, hydrocarbonoclaste.

المخلص

إزالة النفط من التراب يتطلب اشتراك مختلف العوامل الحيوية و غير الحيوية ,من بين هذه العوامل التحلل البيولوجي بواسطة الكائنات الدقيقة.

الهدف من عملنا هو عزل و وصف البكتريات (Hydrocarbonoclastes) مامعناه البكتيريا التي تتغذى على النفط الخام الموجودة في التربة المحيطة بصهاريج تخزين هذا الأخير على مستوى مصفاة حاسي مسعود.

جميع العزلات تم الحصول عليها في وسط يحتوي على 1% من النفط الخام كمصدر وحيد للكربون. لقد تم اجراء ثلاثة اختبارات لتقييم انتاج (es biosurfactants): اختبار مؤشر الاستحلاب , اختبار نزوح النفط , إختبار الشريط M.

متابعة المفاتيح ثنائية التفرع « dichotomiques » سمح لنا بتصنيف العزلات الى 6 أنواع أساسية :

Bacillus, Pseudomonas, Acinetobacter, Micrococcus, Enterobacter, Staphylococcus.

الكلمات المفتاحية

التحلل البيولوجي , السرفكتونات الحيوية , البترول الخام , الهيدروكاربونوكلاسية .

Liste des tableaux

Numéro	Intitulé	Page
1	Les différents genres bactériens dégradant les hydrocarbures.	10
2	Source microbienne et principaux types de biosurfactants.	14
3	Les différents tests biochimiques effectués.	25
4	Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de sol.	30
5	Dénombrement de la microflore totale	30
6	Résultats de l'étude macroscopique des colonies isolés sur milieu M2 à partir de l'échantillon du sol contaminé par les hydrocarbures	31
7	Résultats de l'étude microscopique des souches isolées.	37
8	Comparaison entre l'indice d'émulsification du pétrole et du kérosène	40
9	Résultat de l'indice d'émulsification du kérosène	41
10	Résultat du test de parafilm M	43
11	Résultat du test de déplacement d'huile	45
12	Résultats des tests biochimiques	47
13	Résultat test d'hydrolyse de l'amidon	51
14	Genres bactériens identifiés	55

Liste des figures

Numéro	Intitulé	Page
1	Les étapes de la formation du pétrole à partir de la matière organique	4
2	La formule brute des hydrocarbures	5
3	Dégradation aérobie de la matière organique	8
4	Dégradation anaérobie de la matière organique	9
5	Représentation schématique d'une micelle de biosurfactants	12
6	Localisation de la région de Hassi Messaoud	17
7	Stratégie du prélèvement des échantillons de sol contaminés	19
8	Schéma d'isolement et dénombrement des bactéries telluriques	21
9	Echantillon de sol prélevé	29
10	Aspect colonial des isolats N, N2, N3, N4	32
11	Aspect colonial des isolats N5, N6, N7, N8	33
12	Aspect colonial des isolats N9, N10, N11	34
13	Aspect colonial des isolats Y1, Y2, Y3, Y4	35
14	Aspect colonial des isolats Y5, Y6, Y7, Y8, Y9	36
15	Photographie de l'aspect microscopique des isolats N1, Y6, N10, N7 et la coloration de la spore pour les isolats N6, Y6 (Gx100).	38
16	Test d'émulsification du pétrole après 24h.	39
17	Test d'émulsification du kérosène après 24h	39
18	Histogramme représentant l'estimation de la qualité d'émulsion par les valeurs d'E ₂₄ du pétrole et du kérosène de chaque souche	40
19	Histogramme représentant l'estimation de la qualité d'émulsion par les valeurs d'E ₂₄ du kérosène de chaque souche.	42
20	Test d'émulsification du kérosène après 7 jours.	42
21	Test parafilm M.	44
22	A- Test eau peptonée exempte d'indole. B-Test viande foie. C1- Test d'hydrolyse de la catalase sur lame. C2- Test d'hydrolyse de la catalase gélose incliné.	49

23	A-Test RM et VP. B-Test TSI. C1-Test sur disque d'oxydase à partir de colonie. C2-Test sur disque d'oxydase à partir de bouillon nutritif.	50
24	Test d'hydrolyse de l'amidon	52
25	Test d'hydrolyse de la lécithine	52
26	Mise en évidence des <i>Staphylococcus</i>	53
27	Clés dichotomiques pour la différenciation des bacilles et coques Gram négatif	53
28	Clés dichotomiques pour la différenciation des coques Gram positif	54
29	Clés dichotomique pour la différenciation des bacilles Gram positif.	54

Liste des abréviations

AS : aérobie stricte

AAF : aéro- anaérobie facultative

μAF : micro aéroophile

rpm : rotation par minute

RM : rouge de méthyle

TSI : triple sugar iron

VF : viande foie

VP : Vosges Proskawer

Remerciements

On remercie dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de Mme I.GUERGOURI, 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 sommes conscientes de l'honneur que nous a fait Mr Y.BENHIZIA Professeur à l'université frères Mentouri en étant président du jury et Mr A.BENGUEDOUAR Professeur à l'université Mentouri d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Ce travail a été réalisé au laboratoire d'écologie microbienne à l'université Frères Mentouri nous exprimons nos reconnaissances au professeur BENGUEDOUAR pour sa confiance en nous accueillant au sein de son laboratoire pendant ce travail.

On remercie également Mr I. HADDI Professeur à l'université frères Mentour et tous nos professeurs et toute l'équipe du laboratoire de biotechnologie sans exception, pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve.

Nos profonds remerciements vont également à toutes les personnes qui nous ont aidés et soutenus de près ou de loin.

Dédicace

Je dédie ce mémoire à ma grande mère qui nous a quittés mais qui est toujours gravé dans nos cœur et mémoires.

A ma chère maman qui n'a jamais cessé de m'encouragée et de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau. Ses sacrifices et privations ne l'ont pas empêché d'accomplir son devoir de mère soucieuse de l'avenir de ses enfants.

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

A mes sœurs Imen et Rym et mon frère zaki qui étaient toujours à mes côtés et qui n'ont jamais cessé de me soutenir et de m'encourager: Jamais de simples mots ne me permettront de vous exprimer mes remerciements.

A une personne très cher a mon cœur qui ma toujours soutenu et qui été toujours la pour moi dans les bons et les mauvais moments

A mon binôme hiba qui ma accompagnée tout au long de la réalisation de ce mémoire toute personne qui ma apporté un soutien moral de près ou de loin.

Dédicaces

Je dédie ce travail ;

A la mémoire de mon grand père qui a souhaité vivre pour longtemps juste pour voir qu'a ce que nous allons devenir.

A mes parents .Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour Dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A ma sœur Kahina et mon frère Nabil.

A mes cousine : Lalou, Amina, Ryma, Mouna, Amina et Rym.

A mes adorables amies : Amira, Sarah, Souheila, Hella et Achwak avec les quelles j'ai partagé mes moments de joie et de bonheur.

A mes amis : Chawki, Nazim, Seif, Bahaeddine.

A mon binôme yasmine qui m'a supporté durant ces trois derniers mois.

A toute la promotion Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes, et Ecologie Microbienne : 2014-2015

A toute ma famille et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.

INTRODUCTION

Introduction

Le sol constitue un environnement favorable pour la dégradation des polluants organiques. Il renferme de l'eau, des nutriments minéraux, de l'oxygène et possède une grande surface spécifique qui permet un contact et des échanges importants entre les polluants et les organismes dégradeurs. C'est aussi un réservoir d'organismes et notamment de microorganismes, qui participent activement à la dégradation des matières et contaminants organiques.

Le rejet des hydrocarbures d'origine pétrolière dans l'environnement constitue l'un des phénomènes de pollution les plus préoccupants. Il entraîne la prolifération des microorganismes aptes à dégrader les hydrocarbures, de plus la communauté microbienne du sol semble présenter de fortes capacités de résistance et/ou d'adaptation : elle supporte souvent l'arrivée de polluants toxiques (Amellel et *al.*, 2001).

La solution la moins couteuse et la plus efficace est l'utilisation des microorganismes tels que les bactéries. 90% des bactéries présentes dans la nature sont utiles pour la biodépollution.

La bioremédiation est définie comme un processus d'élimination complète ou de conversion des produits récalcitrants toxiques en des produits non toxiques par des bactéries ou un ensemble de microorganismes (Desai et *al.*, 2008).

Les bactéries hydrocarbonoclastes ont la capacité de synthétiser des biomolécules appelées biosurfactants possédant les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ont l'avantage d'être biodégradables, non toxiques. (Banat et *al.*, 2000).

Les biosurfactants synthétisés par les microorganismes extrêmophiles sont aussi efficaces dans les conditions de température, de salinité et de pH extrêmes. Ils constituent des outils très intéressants dans beaucoup d'applications industrielles et environnementales.

Introduction

Cette étude a pour objectifs d'isoler et de caractériser les bactéries hydrocarbonoclastes à partir de sols pollués par les hydrocarbures présentant un potentiel de production de biosurfactants autour des bacs de stockage de pétrole brut au niveau de la raffinerie de Hassi Messaoud, région du Sud Algérien.

Nous avons structuré notre mémoire en trois chapitres : le premier chapitre présente une synthèse bibliographique, le second décrit le matériel et les méthodes utilisées, et un troisième chapitre consacré aux résultats et discussion qui sera suivi d'une conclusion et des perspectives de cette recherche.

Chapitre 1: Revue Bibliographique

I- Généralités

I-1- Aperçu historique

Le mot « Pétrole est issu des deux mots latins « Petra » et « oléum » qui signifie « huile de pierre » ; dès l'antiquité il pouvait être utilisé comme revêtement étanche, médicament miracle ou arme de guerre.

Le pétrole est repéré la première fois au Moyen-Orient à la surface de la terre. Dès 1852, l'utilisation du pétrole n'a cessé d'augmenter avec la découverte du Kérosène ou « Pétrole lampant » utilisé pour l'éclairage.

En 1859, il y'a eu forage du premier puits destiné à la production de pétrole par le « Colonel Drake » dans l'état de Pennsylvanie en USA.

Dès les années 1950 le pétrole constitue la première source d'énergie et de puissance mondiale (www.univ.ency-education.com).

I-2- Définition du pétrole brut « Crude oil »

Le pétrole brut est un mélange liquide complexe d'hydrocarbures, c'est-à-dire de combinaisons chimiques de carbone (C) et d'hydrogène (H). Il est généralement extrait du sous-sol «bassins sédimentaires » où il occupe les vides de roches poreuses appelés « roches réservoirs». Il contient de faibles quantités de soufre, ainsi que des traces d'azote, d'oxygène et de métaux (www.univ.ency-education.com).

Le pétrole est aussi souvent appelé « or noir » en référence à sa couleur noire et à son prix élevé (Nilles. 2008).

I-3- Son origine

Suite à la sédimentation de matières organiques végétales et animales et à leur enfouissement sous d'autres couches sédimentaires, la pétrogenèse commence.

La décomposition de ces matières organiques provoque une perte d'oxygène dans le milieu induisant des réactions réductrices donnant du kérogène.

Puis, sous l'action combinée de la chaleur (60°C) et de la pression (enfouissement d'environ 1500 à 2000 mètres), la transformation en hydrocarbures débute.

Ce pétrole en formation est moins dense que la roche qui l'entoure, il va donc migrer vers la surface. Si le pétrole est arrêté dans sa progression par des roches imperméables, il se concentre pour former des poches qui sont à l'origine des réservoirs actuels (Nilles. 2008).

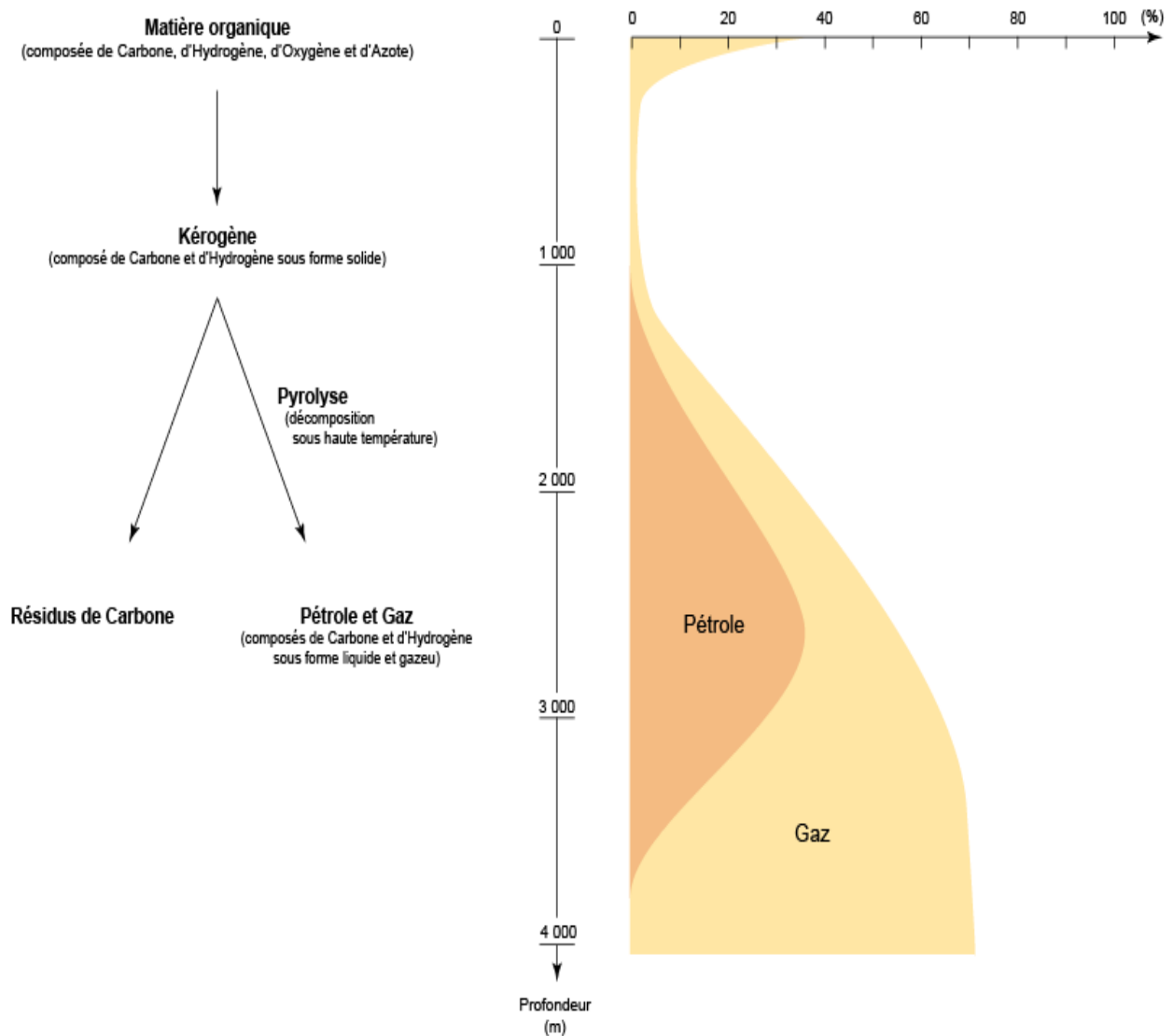


Figure 1. Les étapes de la formation du pétrole à partir de la matière organique

(www.petrole-et-medicament.e-mon.site.com).

I-4- Sa composition

I-4-1- Les hydrocarbures

Le pétrole brut est formé essentiellement d'hydrocarbures qui sont des molécules organiques exclusivement composées de carbone et d'hydrogène, où le carbone présente 83 à 87% en volume et l'hydrogène 10 à 14 % de formule brute : C_nH_m où n et m sont des entiers naturels.

De part leur abondance naturelle, ils font partie des produits chimiques les plus importants pour l'humanité et sont notamment utilisés comme source d'énergie primaire (Chakraborty et Coates. 2004).

Les hydrocarbures contenus dans le pétrole sont regroupés en trois familles :

- les paraffines (alcanes) C_nH_{2n+2} sont composées de liaisons simples, qu'elles soient aliphatiques ou cycliques,
- les naphènes (Cyclo-alcane) C_nH_{2n} composés de liaison simple ou chaque atome de carbone est reliée à deux atomes de carbone et à deux atomes d'hydrogène,
- les aromatiques C_nH_{2n-6} composés aromatiques possèdent des cycles à doubles liaisons alternées (Tarayre. 2012).

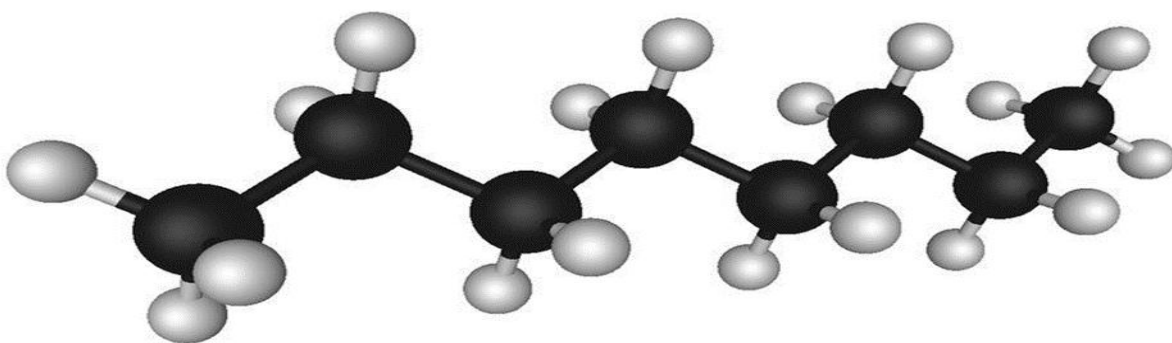


Figure 2. La formule brute des hydrocarbures (Perron et *al.*, 2010).

I-4-2- Les composés soufrés

Les composés soufrés sont présents dans le pétrole brut sous forme de composés organiques soufrés, le sulfure d'hydrogène H₂S est le seul composé non organique présent dans le brut.

I-4-3- Les autres composés

Parmi les autres composés constituant le pétrole, les composés oxygénés, les composés azotés et les métaux (dont 75% du Nickel et de Vanadium), on peut aussi trouver le Sodium, Calcium, Magnésium, Aluminium, et le fer.

I-5- Pollution de l'environnement par les hydrocarbures

I-5-1- Définition

La pollution est une modification défavorable du milieu naturel (dégradation, altération) qui apparaît en totalité ou en partie comme le sous-produit de l'action humaine (Bouderhem. 2011).

On peut considérer qu'il y a pollution par les hydrocarbures lorsque l'action de ceux-ci peut être considérée comme néfaste aux conditions de vie de l'Homme directement, ou indirectement, si elle affecte les populations animales et végétales qui lui sont utiles (Bouderhem. 2011).

I-5-2- Type de polluants

Les groupes de composés pétroliers polluants pour les quelles la biodépollution est possible sont :

- les hydrocarbures pétroliers (gasoils, fuels, kérosène, huiles minérales),
- les déchets d'exploitation du pétrole (boues et résidus d'huile de forages)

(Bouderhem. 2011).

I-6- Impact des hydrocarbures sur l'environnement

Les impacts environnementaux, sanitaires et économiques de la pollution par les hydrocarbures sont de plus en plus importants en premier lieu la pollution du milieu souterrain par les hydrocarbures concernent la qualité des eaux souterraines, les rendant impropres pour certaines utilisations (eau potable en particulier) (Scriban. 1999).

Les sols contaminés par les hydrocarbures présentent un danger lors d'un contact direct avec l'Homme ou l'animal ou lors de leur transfert dans la chaîne alimentaire.

Au niveau de la phase gazeuse du sol, les risques sont réels avec la présence de substances volatiles: émanations toxiques, incendies et explosions avec des produits inflammables et explosifs en atmosphère confinée (Scriban. 1999).

Il est donc nécessaire de décontaminer des milieux pollués, la bioremédiation s'avère être une alternative très intéressante.

II- Biodégradation des hydrocarbures

II-1- Définition

La biodégradation est l'ensemble des mécanismes de transformation d'un contaminant en différents sous-produits par l'action des microorganismes. Ce phénomène peut s'effectuer à n'importe quel milieu (sol, eau) ainsi que dans différentes phases du polluant (liquide, solide, gazeuse) (Lecomte. 1995).

II-2- Types de biodégradation

II-2-1- Biodégradation aérobie

La biodégradation aérobie d'une substance organique est le degré de modification physique et chimique que subit cette matière organique par les microorganismes en présence d'oxygène.

La première étape dans la dégradation aérobie de ces composés est l'introduction dans le substrat d'un atome d'oxygène dérivé de l'oxygène moléculaire. Cette étape critique est effectuée par les oxygénases (Olivier et *al.*, 2005).

La figure 3 illustre les processus de biodégradation d'une substance organique en condition aérobie.

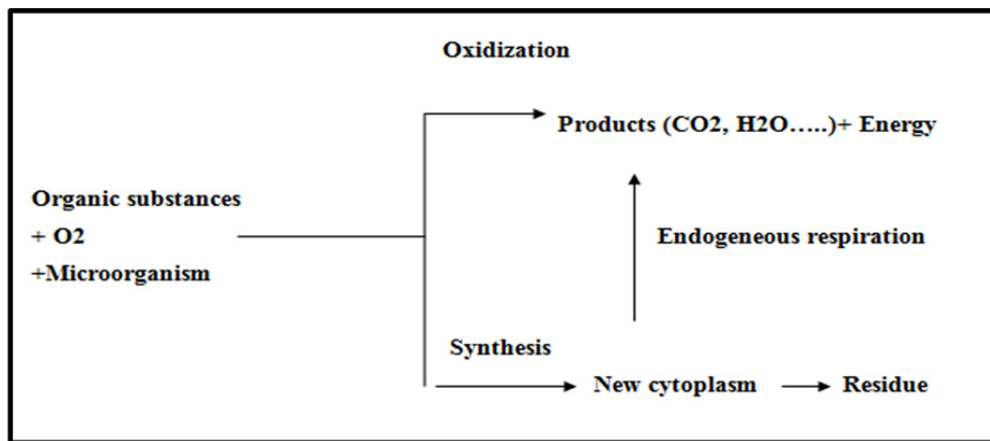


Figure 3. Dégradation aérobie de la matière organique (Bouderhem. 2011).

Celle-ci peut être affectée par la modification de l'un des facteurs suivants :

- vitesse de dégradation des composés organique,
- quantité de l'oxygène consommée,
- produits résultant de la dégradation,
- activité microbienne.

II-2-2- Biodégradation anaérobie

La biodégradation anaérobie d'une substance organique est le degré de modification physique et chimique que subit cette matière organique par les microorganismes en conditions d'anaérobiose (Bouderhem. 2011).

La figure 4 illustre les processus de biodégradation que subit la matière organique en condition anaérobie.

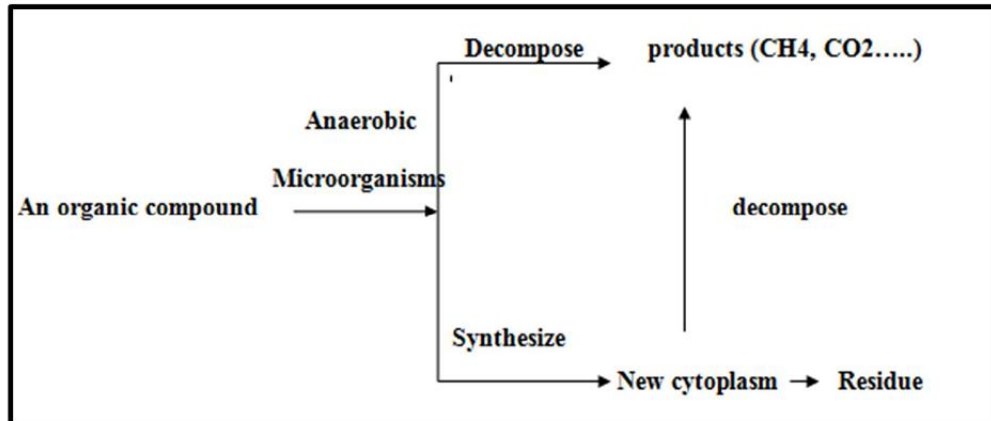


Figure 4. Dégradation anaérobie de la matière organique (Bouderhem. 2011).

II-3- Bactéries dégradant les hydrocarbures

Le sol est composé de matière minérale provenant de l'érosion des roches et de matière organiques : l'humus ; provenant de la décomposition partielle des végétaux.

Le sol comprend des bactéries, des champignons, des protozoaires, des algues et des virus (Soltani. 2004).

Une grande diversité de bactéries et champignons peut dégrader les polluants organiques dans le sol, tels que les hydrocarbures et leurs produits de dégradation.

Ces derniers deviennent de nouvelles sources de carbone dans le sol. Les microorganismes s'en nourrissent et les transforment en eau et en CO₂.

La biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes appelés « hydrocarbonoclastes » a été mise en évidence dès 1946 par ZoBell.

L'existence d'organismes susceptibles de métaboliser les hydrocarbures a été signalée dès le début du 20^{ème} siècle par Sohgen (Gatellier. 1970).

En revanche, la culture de bactéries étant plus rapide, ajouté au fait que les bactéries assimilent mieux certaines molécules, l'usage de ces dernières est préféré. Dans cette optique, cette synthèse traitera donc des bactéries dégradant les hydrocarbures.

Lorsque l'on nomme les bactéries capables de dégrader les hydrocarbures, presque tous les clades phylogénétiques sont représentés. Aussi, on retrouve aussi bien des bactéries Gram négatives que des bactéries Gram positives (Técher. 2011).

On peut y retrouver tous les types de bactéries, des autochtones, des hétérotrophes, des aérobies ; des anaérobies ; des mésophiles ; des psychrophiles et des thermophiles.

De nombreux genres bactériens ont été recensés et décrits comme aptes à dégrader des hydrocarbures (Tarayre. 2012).

Tableau 1. Les différents genres bactériens dégradant les hydrocarbures (Tarayre. 2012).

<i>Aeromonas</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Achromobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Actinomyces</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Alcanivorax</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Beneckea</i>	<i>Brevibacterium</i>
<i>Burkholderia</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Cycloclasticus</i>	<i>Cytophaga</i>	<i>Erwinia</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Leucothrix</i>	<i>Micrococcus</i>
<i>Moraxella</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Myxobacterium</i>	<i>Peptococcus</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Sarcina</i>	<i>Serratia</i>	<i>Shewanella</i>
<i>Spherotilus</i>		<i>Xanthomonas</i>		

Selon Pelmont (1995), Les caractéristiques des bactéries aptes à biodégrader les hydrocarbures sont les suivantes :

- apte à se reproduire rapidement suite à un entreposage de longue durée,
- génétiquement stable,
- apte à biodégrader une vaste étendue de polluants pétroliers,
- activité enzymatique et croissance des bactéries dans des conditions environnementales optimum,
- aucun effet secondaire néfaste et produits finaux non toxiques,
- 63% pigmentés (orange, jaune et rouge),
- la majorité des souches bâtonnées Gram négatives,
- 32% des bactéries motiles ou mobiles,
- 20% des bactéries à Gram positives, filamenteux.

II-2- Les Modes d'assimilation des hydrocarbures par la cellule bactérienne

Il y'a quatre modes d'assimilation bactérienne de l'hydrocarbure liquide, soit :

- par l'utilisation de composés organiques préalablement solubilisés,
- par contact direct de la cellule avec le composé organique. Cela peut être facilité par des modifications cellulaires telles que la formation de fimbriae ou l'augmentation de l'hydrophobicité de la surface cellulaire qui favorise l'attachement de la cellule au composé organique (Maier et *al.*, 2009),
- par contact direct avec les microgouttelettes dispersées dans la phase aqueuse,
- une assimilation améliorée via la synthèse des biosurfactants, qui augmentent la solubilité des hydrocarbures dans l'eau, ou peuvent encore faciliter l'attachement des cellules aux hydrocarbures (Maier et *al.*, 2009).

III- Les biosurfactants

III-1- Définition

Les microorganismes utilisent des hydrocarbures comme source de carbone et excrètent par la suite une variété de biosurfactants qui sont des produits naturels, biodégradables et donc respectueux de l'environnement.

Les surfactants (Surface Active Agents) sont des agents à activité de surface (tensioactifs), synthétisés chimiquement ou par voie biologique (biosurfactants) (Al- Arajl et *al.*, 2007).

Les Biosurfactants sont des composés amphiphiles présents à la surface des cellules microbiennes, ou sécrétés par voie extra cellulaires. Ils contiennent deux fractions; une fraction hydrophobe non polaire et une fraction hydrophile polaire.

Le groupement hydrophile est constitué d'acides aminés, peptides ou de polysaccharides (mono ou di) et le groupement hydrophobe est constitué d'acides gras saturés ou non saturés (Desai et Banat.1997).

Ils réduisent la tension de surface et possèdent une propriétés d'émulsification donc, ils sont souvent bio émulsifiants (Deo et *al.*, 2005).

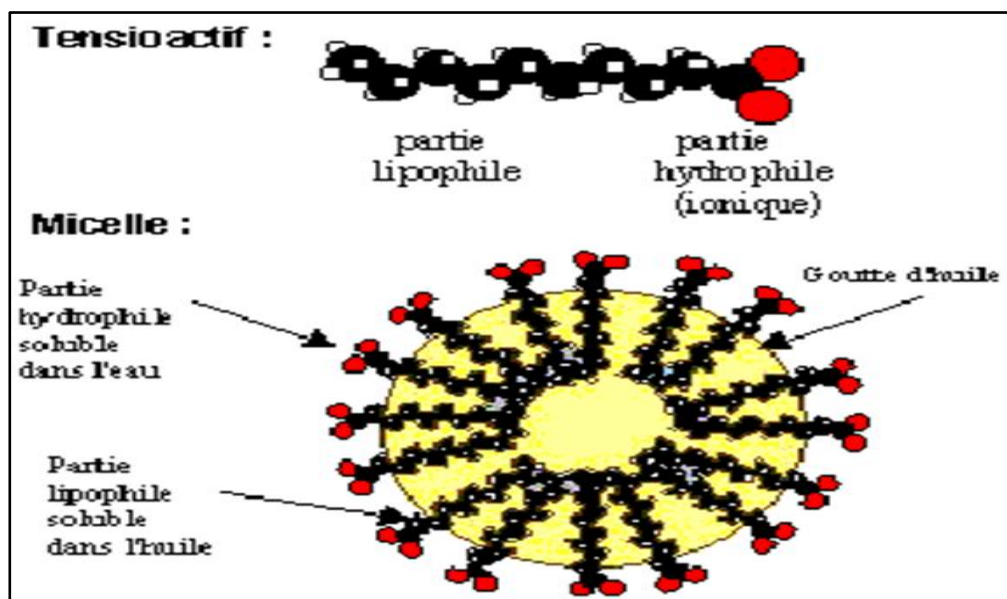


Figure 5. Représentation schématique d'une micelle de biosurfactants (Abouseoud. 2008).

III-2- Classification

Les biosurfactants sont classés suivant leur nature biochimique en cinq grandes classes : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les liposaccharides et les lipides neutres.

- Les glycolipides, sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acides hydroxyaliphatiques. Les glycolipides les plus étudiés sont les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides.
- Les lipopeptides, sont composés d'un lipide attaché à une chaîne polypeptidique.
- Les phospholipides, sont formés de groupements alcool et phosphate et de chaîne lipidique.
- Les lipopolysaccharides ou polymériques, sont constitués d'une ou plusieurs unités saccharides et d'acides gras.

Les acides gras et lipides neutres, sont les biosurfactants qui possèdent la masse molaire la plus élevée (Djarbaoui. 2011).

Du fait de leur forte production et de leurs propriétés tensioactives importantes, les biosurfactants les plus communs et les plus étudiés sont les glycolipides et les phospholipides (Desai et *al.*, 1997).

Tableau II. Source microbienne et principaux types de biosurfactants

(Desai et al., 1997).

Biosurfactants	Organismes
Glycolipides	
Rhamnolipides	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas sp.</i>
Trehalolipides	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Mycobacterium sp.</i>
Sophorolipides	<i>Torulopsis bombicola</i> <i>T. apicola</i> <i>T. pitrophilum</i> <i>Ustilagozoeae</i> <i>U. maydis</i>
Lipopeptides et lipoprotéines	
Peptides-lipides	<i>Bacillus licheniformis</i>
Serrawetine	<i>Serratiamarcescens</i>
Viscosine	<i>P. fluorescens</i>
Surfactine	<i>B. subtilis</i>
Subtilisine	<i>B. subtilis</i>
Gramicidine	<i>B. brevis</i>
Polymyxine	<i>B. polymyxa</i>
Acides gras, lipides neutres et phospholipides	
Acides gras	<i>Candida lepus</i>
lipides neutres	<i>N. erythropolis</i>
Phospholipides	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactants polymériques	
Emulsane	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersane	<i>A. calcoaceticus</i>
Mammane-lipide-protéine	<i>Candida tropicalis</i>
Liposane	<i>C. lipolytica</i>
Hydrate de carbone-protéine-lipides	<i>P. fluorescens</i> <i>Debaryomyces polymorphis</i>
Protéine PA	<i>P. aeruginosa</i>
Biosurfactants particuliers	
Vésicule et fimbriae	<i>A. calcoaceticus</i>
La cellule entière	Variété de bactéries

III-3- Applications

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:

- environnement, récupération assistée du pétrole, le taux de récupération est 60-95 % dans des conditions extrêmes (Abouseoud. 2008),
- agriculture, élimination des pesticides à partir des plantes et des sols, amélioration de la photosynthèse, croissance des plantes (Abouseoud. 2008),
- agroalimentaire, amélioration de la texture et de la saveur des aliments (Abouseoud. 2008),
- antiadhésive, élimination des biofilms bactériens par adsorption de couche de biosurfactant sur la surface (verre, polymère, acier...) (Abouseoud. 2008),
- chimie, détergent domestique et industriel (Abouseoud. 2008),
- cosmétique, préparation de crèmes hydratantes, préparation de shampoings et savons riches en huiles essentielles (Abouseoud. 2008),
- industrie pharmaceutique, comme agents thérapeutiques présentant des activités antibactériennes, antifongiques et antivirales pour combattre les différentes maladies infectieuses (Guergouri. 2010).

Chapitre 2: Matériel et Méthodes

I- Présentation de la zone d'étude de prélèvement

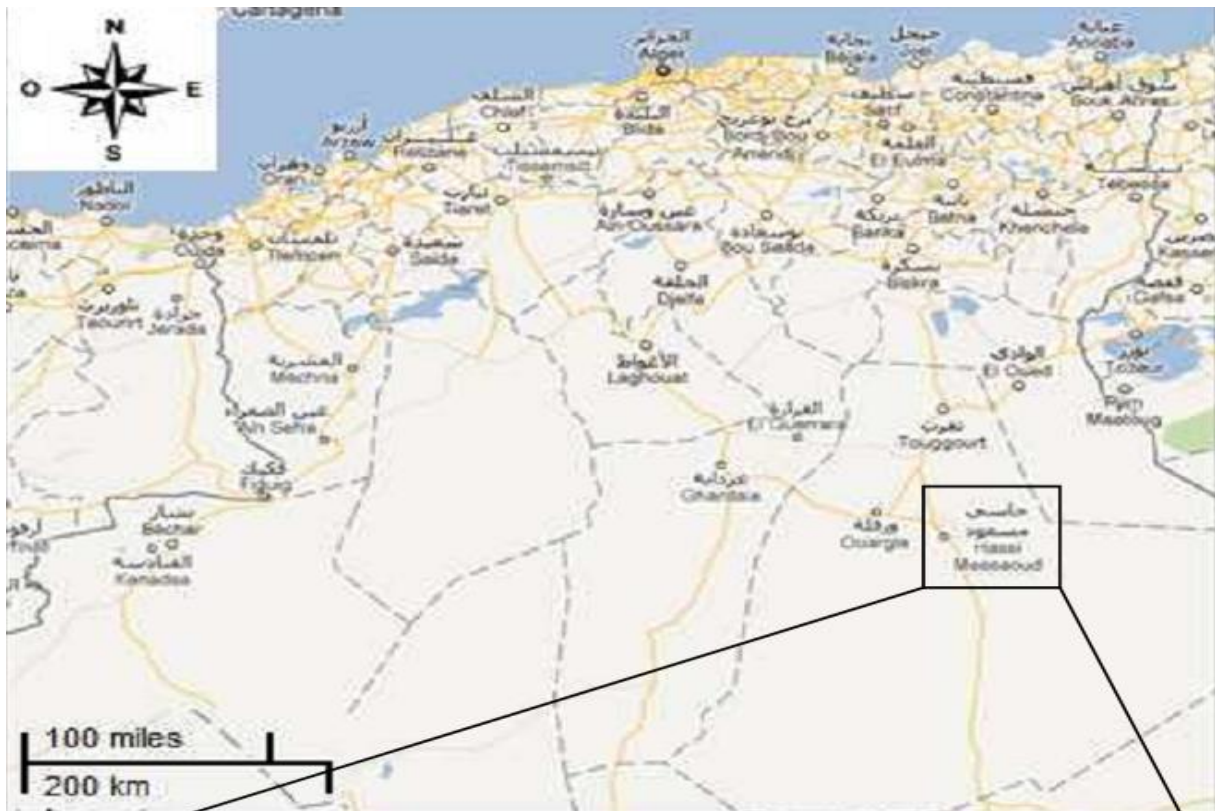


Figure 6. Localisation de la région de Hassi Messaoud (Google Map).

I-1- Situation géographique

Le champ de Hassi Messaoud se situe à 798 KM au Sud-Est d'Alger et à 650 KM de Constantine.

I-2- Situation géologique

Le champ de Hassi Messaoud occupe la partie centrale de la province triasique. De par sa superficie et ces réserves, il est le plus grand gisement de pétrole d'Algérie et, s'étend sur près de 2200 Km² de superficie.

Il est limité :

- au *Nord Ouest* par les gisements de Ouargla (Gellala, Ben Kahla et Houd Berkaoui),
- au *Sud Ouest* par les gisements d'El-Gassi, Zotti et El Agreb,
- au *Sud Est* par les gisements Rhoude El Baguel et Mesdar.

Géologiquement, il est limité :

- a l'*Ouest* par la dépression de Oude M'ya,
- au *Sud* par le môle d'Amguid El Biod,
- au *Nord* par la structure Djammaa-Touggourt,
- a l'*Est* par les hauts fonds de Dahar, Rhoude El Baguel et la dépression de Ghadames.

I-3- Caractéristiques géo climatiques

- Climat : Désertique, une zone éco-climatique aride
- Température : 0°C - 47°C.
- Vents dominants : *Nord/ Nord-Est*

I-4- Historique de recherche

La découverte du champ remonte à 1956 et sa mise en production a démarré en 1958. Depuis cette date, le champ ne cesse de produire. La zone d'étude a été choisie sur la base de son degré de pollution (banque de donnée Hassi Messaoud).

II- Prélèvement des échantillons

A partir d'échantillon de sol pollué aux hydrocarbures prélevé au niveau de la raffinerie de Hassi Messaoud provenant des fuites de stockage et de transport autour des bacs, des bactéries sont isolées afin d'être purifiées caractérisées et utilisées dans la production de biosurfactants.

Les prélèvements ont été effectués à une profondeur de 10 cm à trois distances différentes des bacs de stockage :

- a distance de 1m,
- a distance de 5m
- près de la végétation qui pousse autour des bacs.

La stratégie est conçue de cette manière dans l'esprit de faire varier les échantillons prélevés selon la concentration du polluant.

Les échantillons de sol sont transférés dans des flacons stériles jusqu'au laboratoire.

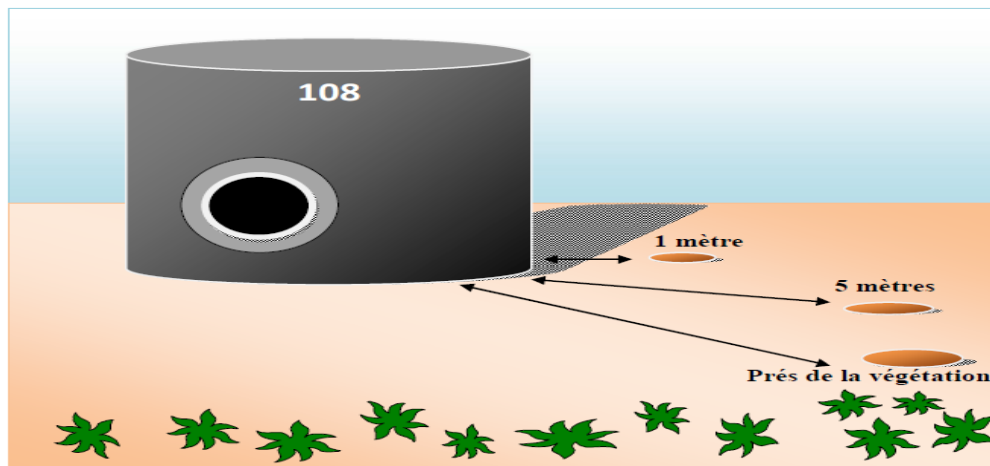


Figure 7. Stratégie du prélèvement des échantillons de sol contaminés (Guergouri. 2010).

II-1- Analyse physicochimique du sol

Une observation de la couleur et de la texture du sol a été réalisée au niveau du laboratoire afin de décrire les caractéristiques physiques.

- Peser 20g de sol.
- Ajouter 50mL d'eau déminéralisée dans un bécher et agiter une minute.
- Laisser reposer 2h.
- Effectuer la mesure en plongeant l'électrode du pH mètre dans le liquide surnageant.
- Laisser la lecture se stabiliser durant plusieurs secondes et noter les valeurs (AFNOR).

II-2- Analyses microbiologiques du sol

II-2-1- Dénombrement de la microflore totale

Afin de dénombrer la microflore totale existante dans les échantillons de sol contaminés par les hydrocarbures, nous avons procédé à une culture sur bouillon nutritif selon la technique du dénombrement sur milieu liquide ou (NPP : le nombre le plus probable).

Les prises d'essais de l'échantillon des dilutions sont incorporées dans un milieu de culture liquide conçu pour permettre la croissance d'un micro-organisme ou de groupe de microorganismes. La croissance se traduit par l'apparition d'un trouble du milieu.

Une série de dilution variant de 10^{-1} à 10^{-9} a été préparée selon les étapes suivantes :

- **préparation de la solution mère**

A partir d'un échantillon de sol destiné à l'analyse microbiologique, 1 g de sol est pesé puis introduit dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique. Le tube est ensuite agité énergiquement pendant 2 minutes. Le contenu du tube représente la solution mère,

- **préparation des dilutions**

Dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile, est ajouté 1 ml de la solution mère. Le mélange bien agité représente la dilution 10^{-1} . 1 ml de cette dilution mélangé à 9 ml d'eau physiologique, correspondra à la dilution 10^{-2} . On continue ainsi jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-9} .

- ensemencement sur bouillon nutritif

0,1 ml de chaque dilution est ensemencé dans les bouillons correspondant. Une répétition de trois tubes pour chaque dilution est faite.

Le premier chiffre du nombre caractéristique correspond à la dilution la moins concentré. La table de Mac Grady pour 3 tubes de dilution permet de lire le NPP correspondant (www.technobio.fr).

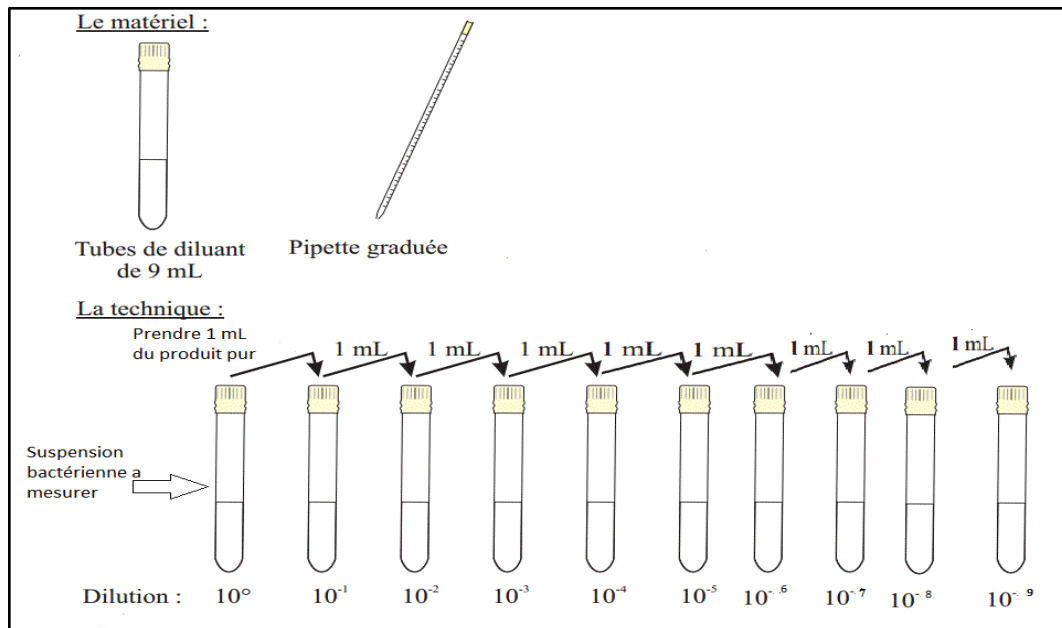


Figure 8. Schéma d'isolement et dénombrement des bactéries telluriques.

II-2-2- L'isolement

Cette étape nous permet de mettre en évidence la microflore bactérienne dégradante les hydrocarbures dans les échantillons des sols pollués par les hydrocarbures pétroliers.

A partir de la solution mère 1ml est ensemencé en masse sur milieu M2 (modifié) additionné de 1% de pétrole brut comme source unique de carbone puis incubé 24h à 30°C.

II-2-2-La purification

Après 24 h d'incubation, l'étape de purification des cultures permet d'obtenir des cultures pures des isolats obtenues.

La sélection est basée sur l'aspect macroscopique des colonies : la couleur, la forme, le diamètre, l'opacité...etc.

Un échantillon de chaque type de colonie est prélevé et ensuite purifié par repiquages successifs selon la méthode des stries.

II-2-3- Conservation des souches isolées

Les souches isolées sont conservées dans des tubes à essai contenant de la gélose nutritive inclinée. Les souches sontensemencées en stries sur la pente des tubes, puis incubées à 30°C pendant 24 heures. Les tubes dans lesquels il y a eu une croissance seront conservés à 4°C pour une durée de 4 à 6 semaines. Afin de pouvoir toujours disposer des souches viables.

La réactivation doit se faire tous les mois (Bourdon et Marchal.1982).

II-2-3- Caractérisation des souches purifiées

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

a- Aspect macroscopique

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification.

D'après Joffinet Leyral (2006), les éléments d'identifications macroscopiques sont:

- la forme des colonies : rondes, irrégulières,...etc,
- la taille des colonies par la mesure du diamètre,
- la couleur de la colonie,
- l'élévation : convexe, concave, plate,
- l'opacité : opaque, translucide ou transparente,
- la surface : lisse, rugueuse, sèche, dentelée,...etc.

b- Aspect microscopique

L'observation microscopique consiste à observer les cellules bactériennes après une coloration au bleu de méthylène et de Gram.

- **Coloration au bleu de méthylène** : permet de visualiser la forme et le mode de regroupement.
- **Coloration de Gram** : est une double coloration qui permet de connaître la forme, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées.

Cette coloration permet de classer les bactéries selon leur capacité à fixer le Cristal violet. Celles qui possèdent une couche de peptidoglycane mince sont décolorées lors du lavage à l'éthanol (Gram-), alors que celles qui possèdent une couche de peptidoglycane épaisse vont retenir le colorant (Gram+).

La consistance et la valeur de la coloration de Gram correspond à des différences biochimique entre la paroi des bactéries Gram positif et les bactéries Gram négatif.

III- Sélection des souches productrices de biosurfactants

III-1- Test d'émulsification

À fin d'estimer l'activité d'émulsification, la valeur calculée est appelée index d'émulsion ou E24 en utilisant le pétrole brut et le kérosène.

Nous ajoutons 4mL de kérosène coloré et ou de pétrole brut à 4mL de bouillon nutritif, le tout est vortexé et agité au vortex à la vitesse maximale pendant 2 minutes. Les mesures sont prises 24h après.

L'index d'émulsion selon (Tabatabaee et *al.*, 2005) représente la hauteur de l'émulsion formé (He) divisée par la, hauteur totale du liquide dans le tube (Ht) multipliée par 100 :

$$\mathbf{E24 = (He /Ht) .100}$$

III-2- Test parafilm M

25µl de surnageant bactérien est ajouté à la surface hydrophobe du parafilm. La forme de la goutte à la surface est appréciée après une minute et son diamètre est mesuré en se référant à un même volume d'eau distillée comme témoin négatif (Hewald,et *al.*, 2005).

III-3- Déplacement d'huile

Dans une boîte de pétri de 10 cm de diamètre, on transfère 20 ml d'eau distillée additionnée de 10 µl de pétrole brut et de 10 µl de suspension bactérienne successivement.

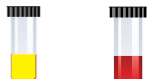

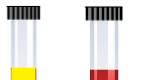

Un halo de déplacement de pétrole est observé dont le diamètre formé sera mesuré en cm² (Morikawa et *al.*, 1993).

On refait les trois tests avec des tubes contenant 5 ml de bouillon nutritif auxquels on ajoute 1% de pétrole brut les tubes seront partiellement dévissés et agités pendant une semaine.

IV- Caractérisation biochimique

IV-1- Galerie biochimique

Tableau 3. Les différents tests biochimiques effectués (Joffin et Leyral, 2006).

Milieux de culture	Test recherché	Ensemencement	Incubation	Réactifs à ajouter	Résultats positifs	Résultats négatifs
TSI gélose- glucose- lactose- saccharose	Fermentation du -lactose -glucose -saccharose	-Stries serrées pour la pente. -Simple piqûre pour le culot	24h à 37°C		Rouge brun → -pente jaune -culot jaune -pente rouge -culot rouge	Rouge brun
	Production de gaz				Bulles d'air à l'intérieur de la gélose ou fissure de la gélose	Pas de changement de l'aspect de la gélose
	Production de l'H ₂ S				Noircissement	Absence de noircissement
Eau peptonée exempte d'indole	Production d'indole à partir du tryptophane	Quelques gouttes de la suspension bactérienne	24h à 37°C	Kovacs	Formation d'un anneau rouge à la surface	Absence d'anneau ou anneau jaune
Clark et Lubs	Production d'acétoïne à partir du glucose	Quelques gouttes de suspension bactérienne	24h à 37°C	Rouge de méthyl (RM)	jaune → rouge 	Jaune 
	Production d'acide pyruvique à partir du glucose			Voges-Proskauer (Vp1 et Vp2)	jaune → rouge à rose 	Jaune 
Recherche de la catalase	Enzyme catalysant l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène formé lors de réactions en aérobiose.	Déposer une goutte d'eau oxygénée sur une lame et émulsionner directement une partie de la colonie prélevée avec l'anse. - ou verser 1ml d'H ₂ O ₂ dans une culture de 24h en bouillon ou sur une gélose inclinée.			Dégagement de gaz	Pas de dégagement de gaz

Matériel et méthodes

Milieux de culture	Test recherché	Ensemencement	Incubation	Réactifs à ajouter	Résultats positifs	Résultats négatifs
Recherche de l'oxydase	détection de la phénylène-diamine-oxydase enzyme entrant dans divers couples d'oxydo-réduction	un disque d'oxydase contenant de l'oxalate N-dimethylparanitrop hénylène-diamine est déposé une lame et mis encontact avec une colonie bactérienne fraîchement cultivée ou bien en contact avec le bouillon			Apparition d'une coloration Violette	Absence d'une coloration Violette
Gélose viande foie (VF)	Détermination du type respiratoire	Plonger l'effilure d'une pipette pasteur boutonnée dans la suspension bactérienne	24h à 37°C		<p>-Aérobie strict : croissance dans la zone superficielle de gélose ;</p> <p>-Anaérobie strict : croissance dans la zone profonde de la gélose ;</p> <p>- Aéro-anaérobie facultative : croissance sur toute la hauteur de la gélose.</p> <p>-Micro-aérophile : croissance dans un cylindre de gélose d'environ 0.5cm de hauteur et situé à environ à 1à2 cm de la surface.</p>	Absence de croissance

IV-2- Test d'hydrolyse de l'amidon

L'amidon est un polysaccharide, polymère du glucose α , constitué d'amylose et d'amylopectine. La gélose à l'amidon est une gélose nutritive, additionnée de 1% d'amidon de pomme de terre. Elle permet de mettre en évidence la dégradation de ce polysaccharide par certaines espèces appartenant notamment au genre *Bacillus* et *Pseudomonas*.

L'ensemencement s'effectue par touche, l'incubation à 30° pendant 1 à 5 jours.

L'hydrolyse de l'amidon s'exprime par un halo d'éclaircissement autour de la colonie. L'observation est plus nette en inondant la surface du milieu avec du lugol (Delarass. 2014).

IV.3. Test d'hydrolyse de la lécithine

La lécithinase est une enzyme recherchée sur une gélose au jaune d'œuf coulée en boîte de Pétri ; elle produit une opacification par rupture de l'émulsion du jaune d'œuf.

Le jaune d'œuf, substrat complexe, est composé de lécithine, de triglycéride et d'une lipoprotéine. Il permet donc de rechercher 3 enzymes : la lécithinase, la lipase, et la lipoprotéinase pour l'identification des genres *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Clostridium*.

Ce milieu de culture est préparé en ajoutant 2ml d'une émulsion de jaune d'œuf et d'eau physiologique stérile à 20 ml de gélose nutritive, fondue est ramenée à 47+ ou - 2°C, couler dans les boîtes de Pétri et laisser solidifier.

Ce test a été effectué pour les isolats Y5 et N6.

Ensemencer en touches avec les souches à étudier. Incuber de 1 à 5 jours à 30°C.

L'aspect de la colonie sur la gélose par l'apparition d'un :

Halo d'éclaircissement autour de la colonie apparaissant en premier : lipoprotéinase positive.

Halo opaque blanc jaunâtre, bord net sous la colonie ou en limite : lécithinase positive.

Si lécithinase - : opacité floue limitée à la surface de la colonie : présence d'une lipase.

Si lécithinase + : ajout d'une solution saturée de sulfate de cuivre, si coloration bleu vert des cristaux d'acides gras à la surface de la colonie : présence d'une lipase (Delarass. 2014).

IV-4-Recherches des *Staphylococcus aureus* sur gélose Baird-Parker

Après autoclavage du milieu de base, on ajoute 10 ml d'émulsion de jaune d'œuf (eau physiologique et jaune d'œuf v/v), et une ampoule de tellurite de potassium.

Ce test est effectué pour les coques Gram +

Après ensemencement et incubation à 37°C pendant 24 à 48h, trois caractères sont lus :

- présence d'une lipoprotéinase par un halo transparent autour des colonies,
- présence d'une lécithinase par un halo trouble autour des colonies.
- réduction du tellurite noir par la couleur de la colonie (Joffin et Leyral., 2006).

Chapitre 3: Résultats et Discussion

I- Caractéristiques du sol prélevé

I-1- Analyse physicochimique du sol



Figure 9. Echantillon de sol prélevé.

L'observation des prélèvements de sol, montre que la couleur et la texture diffèrent d'un échantillon à un autre, rapportés dans le tableau 4.

Le premier échantillon prélevé à une distance de 1 m du bac est de couleur noire et d'une texture agrégée, compacte et humide, tandis que le deuxième, prélevé à 5 m du bac est de couleur cuivre et de texture sableuse ainsi que celui près de la végétation.

Les échantillons contiennent probablement des concentrations différentes de pétrole. Logiquement, plus nous nous approchons du bac de stockage, plus la terre est saturée par le pétrole, chose qui explique la couleur et la texture du premier échantillon.

La mesure du pH au niveau du laboratoire montre des valeurs proches de la neutralité.

Tableau 4. Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de sol.

Bac	Distance	pH	Couleur	Texture
R1	1m	6.50	Marron foncé	Sableuse humide
R1	5m	6.56	Marron clair	Sableuse
R1	Près de la végétation	7.19	Jaune	Sableuse
R3	1m	6.69	Marron foncé	Sableuse humide
R3	5m	6.27	Marron clair	Sableuse
R3	Près de la végétation	6.66	Jaune	Sableuse

Ce pH proche de la neutralité, favorise la croissance des bactéries et des champignons et par conséquent assurait un déroulement efficace de la biodégradation des hydrocarbures

(Leahy et Colwell. 1990).

I-2- Analyses microbiologiques du sol

I-2-1- Dénombrement de la microflore totale

Le dénombrement de la microflore totale dans notre échantillon de sol pollué par les hydrocarbures fait ressortir un taux de :

Bac R3 à une distance de 1m : $N = 21.10^2$ unité formant trouble UFT/ml.

Bac R3 à une distance de 5m : $N = 9,3.10^2$ unité formant trouble UFT/ml.

Bac R3 Près de la végétation : $N = 7,5.10^2$ unité formant trouble UFT/ml.

Les bactéries de la microflore totale ont développées une adaptation aux polluants, elles se nourrissent à partir des dérivés du pétrole ce qui explique la charge microbienne élevée près du bac. Par contre près de la végétation les bactéries se nourrissent des produits synthétisés par les plantes.

Tableau 5. Dénombrement de la microflore totale.

	Dilution	SM	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
Distance	1m	+++	++-	---	---	---	---	---	---	---	---
Résultat	1m	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Distance	5m	+++	+-	+-	+-	+-	+-	+-	+-	---	---
Résultat	5m	3	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Distance	Près de la végétation	+++	+-	+-	+-	+-	+-	---	---	---	---
Résultat	Près de la végétation	3	2	2	2	2	1	0	0	0	0

I-2-2- Caractérisation des isolats purifiés

a- Aspect macroscopique

L'ensemencement sur le milieu M2 additionné de 1% de pétrole brut comme source de carbone nous a permis d'isoler vingt colonies distinctes par leur aspect, leur taille et leur couleur, le temps d'adaptation diffère d'un isolat à un autre pour accéder à cette source de carbone.

les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 6 figure (10 ; 11 ; 12 ; 13 ; 14).

Tableau 6. Résultats de l'étude macroscopique des colonies isolés sur milieu M2 à partir de l'échantillon du sol contaminé par les hydrocarbures.

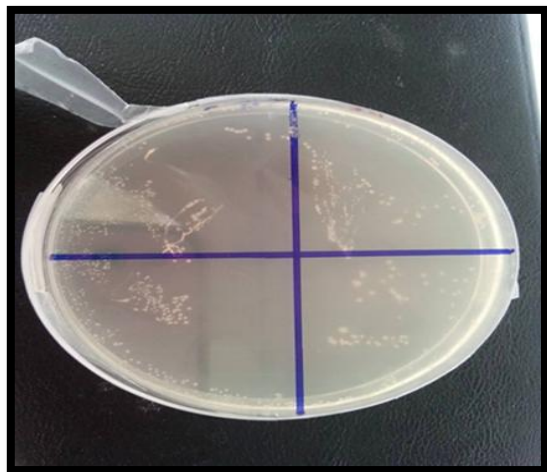
Critère	Forme coloniale	Taille	Couleur	Contour	Elévation	Opacité	Consistance
N1	Ronde	Petite	Orange	régulier	Convexe	Opaque	crémeuse
N2	Ronde	Grande	Beige	régulier	Plate	Opaque	crémeuse
N3	Ronde	Petite	Blanche	régulier	Convexe	Opaque	crémeuse
N4	Ronde	Petite	Beige	régulier	Plate	translucide	crémeuse
N5	Ronde	Grande	Beige	régulier	Plate	translucide	crémeuse
N6	Ronde	Moyen	Beige	régulier	Plate	translucide	crémeuse
N7	Ronde	Grande	Beige	régulier	Plate	Opaque	crémeuse
N8	Ronde	Moyen	beige et diffusion de pigment jaune verdâtres du milieu	irrégulier	Plate	Opaque	Sèche
N9	Ronde	Petite	Blanche	régulier	Convexe	translucide	Crémeuse
N10	Ronde	Petite	Jaune	régulier	Convexe	Opaque	Crémeuse
N11	Ronde	Petite	beige foncé	régulier	Plate	Opaque	Sèche
Y1	Ronde	Petite	Beige	régulier	Plate	Opaque	Crémeuse
Y2	Ronde	Petite	transparente	régulier	Convexe	translucide	Crémeuse
Y3	Ronde	Moyen	Beige	régulier	Convexe	Opaque	Crémeuse
Y4	Ronde	Petite	Beige	régulier	Convexe	Opaque	Crémeuse
Y5	Ronde	Moyen	Jaune	régulier	Convexe	Opaque	Crémeuse
Y6	Filamenteuse	Grande	Blanche	régulier	Plate	Opaque	Crémeuse
Y7	Ronde	Petite	Blanche	régulier	Plate	Opaque	Crémeuse
Y8	Ronde	Petite	Blanche	régulier	Plate	Opaque	Crémeuse
Y9	Ronde	Petite	Jaune	régulier	Plate	translucide	Crémeuse



N1



N2



N3



N4

Figure 10. Aspect colonial des isolats N, N2, N3, N4.



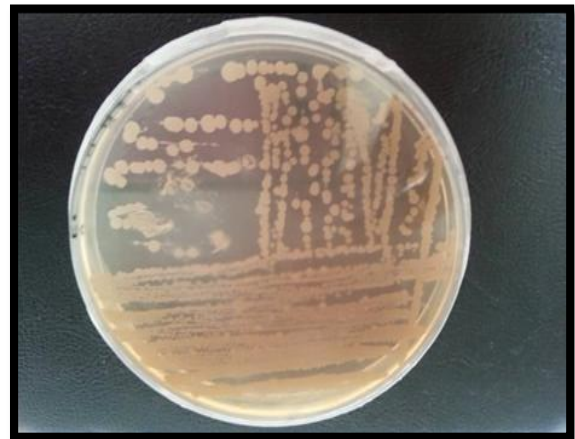
N5



N6

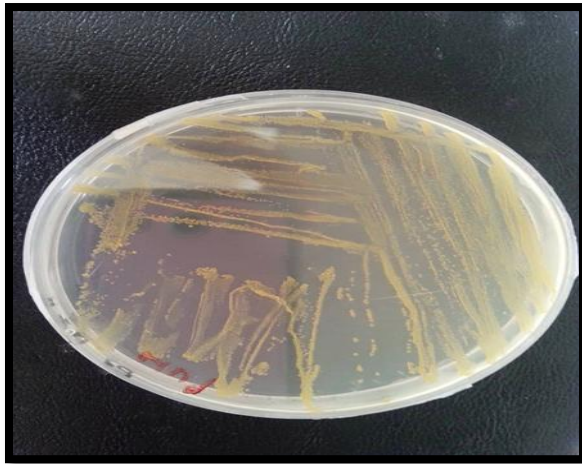


N7



N8

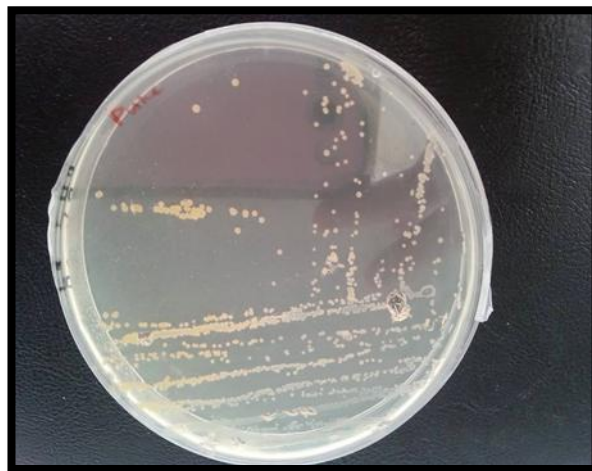
Figure 11. Aspect colonial des isolats N5, N6, N7, N8.



N9

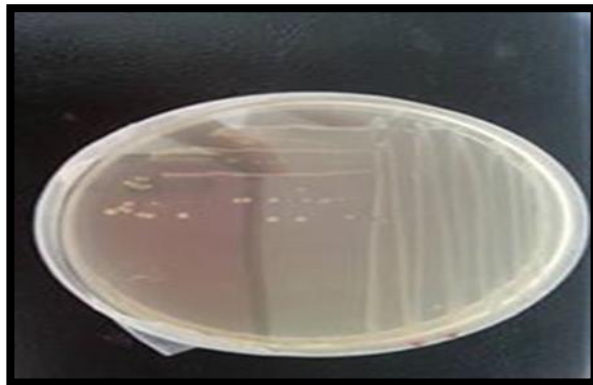


N10



N11

Figure 12. Aspect colonial des isolats N9, N10, N11.



Y1



Y2



Y3



Y4

Figure 13. Aspect colonial des isolats Y1, Y2, Y3, Y4.



Y5



Y6



Y7



Y8



Y9

Figure 14. Aspect colonial des isolats Y5, Y6, Y7, Y8, Y9.

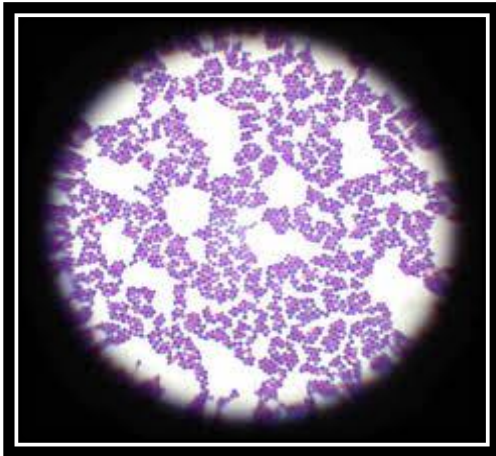
b- Aspect microscopique

L'observation microscopique a été réalisée suivant trois étapes : après coloration de Gram, l'observation à l'état frais et après une coloration des spores.

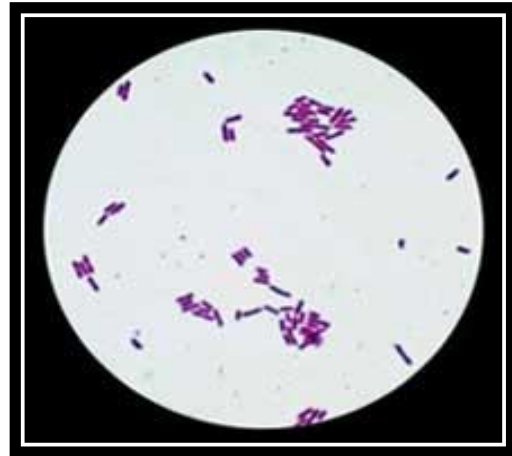
Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 7 (figure15).

Tableau 7. Résultats de l'étude microscopique des souches isolées.

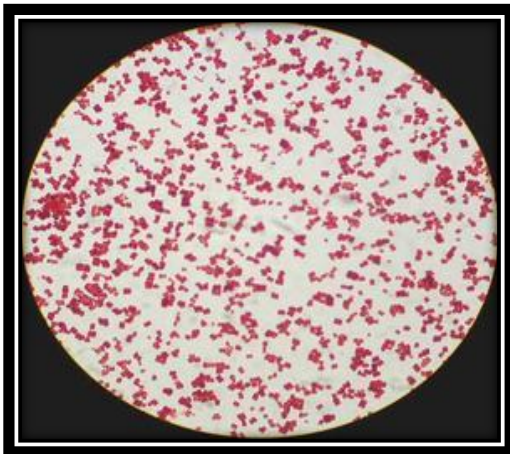
Isolats	Gram	Forme des cellules	Arrangement	Présence de spores
N1	+	Coque	Isolées ou en paire	-
N2	-	Coccobacille	Isolées ou en paire	-
N3	-	Coque	Isolées ou en paire	-
N4	-	Bacille	Isolées	-
N5	-	Bacille	Isolées	-
N6	+	Gros bacille	Isolées ou en chaînette	+
N7	-	Bacille	Isolées	-
N8	-	Coque	Isolées ou en paire	-
N9	-	Coque	Isolées ou en paire	-
N10	-	Coque	Isolées ou en paire	-
N11	-	Coque	Isolées ou en paire	-
Y1	-	Coque	Isolées ou en paire	-
Y2	-	Coccobacille	Isolées ou en paire	-
Y3	+	Coque	Isolées ou en paire	-
Y4	-	Coque	Isolées ou en paire	-
Y5	-	Coque	Isolées ou en paire	-
Y6	+	Gros bacille	Isolées ou en chaînette	+
Y7	-	Bacille	Isolées	-
Y8	+	Coque	Isolées ou en paire	-
Y9	-	Bacille	Isolées	-



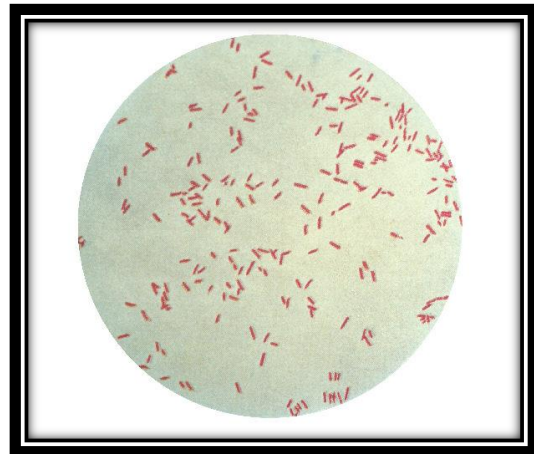
N1



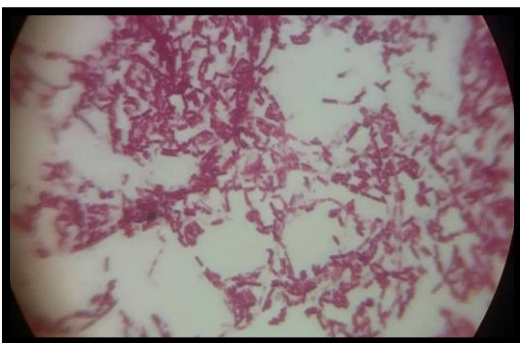
Y6



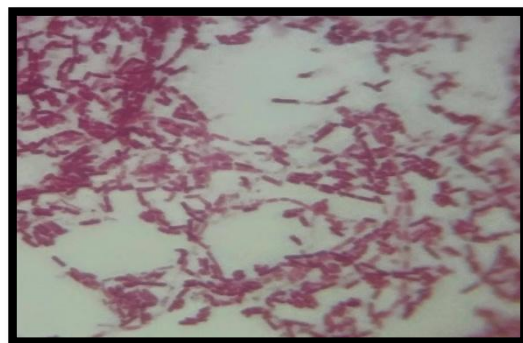
N10



N7



N6



Y6

Figure15. Photographie de l'aspect microscopique des isolats N1, Y6, N10, N7 et la coloration de la spore pour les isolats N6, Y6 (Gx100).

II- Sélection des souches productrices de biosurfactants

II-1- Test d'émulsification

Afin de confirmer et d'estimer la production des biosurfactants par les souches isolées nous avons réalisé le test d'émulsification qui permet de calculer l'indice d'émulsion (E_{24}).

D'après les résultats obtenus, il en ressort que certaines souches produisent des biosurfactant avec des différences dans le taux et le type d'émulsion obtenus.

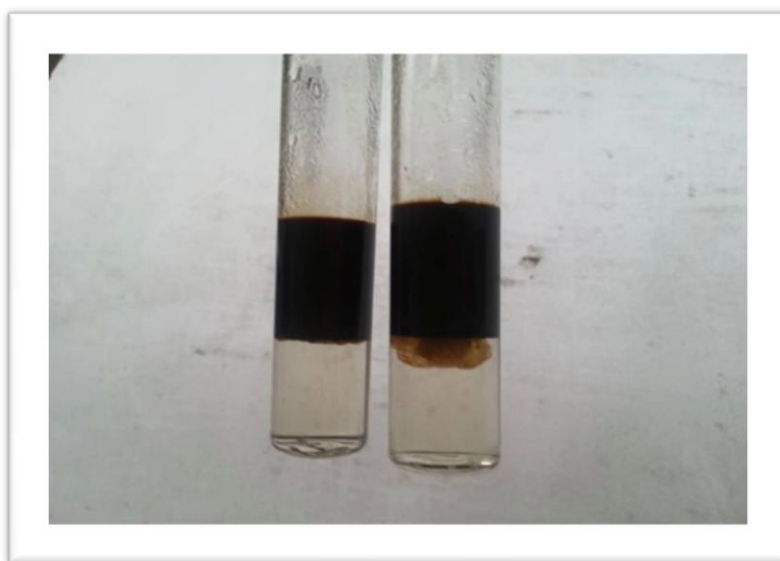


Figure 16. Test d'émulsification du pétrole après 24h.



Figure 17. Test d'émulsification du kérosène après 24h.

Tableau 8. Comparaison entre l'indice d'émulsification du pétrole et du kérosène.

Isolats	Pétrole	Kérosène
T	0	0
N1	0	7
N2	4	0
N3	4	11
N4	14	0
N5	9	11
N6	7	0
N7	0	4
N8	7	0
N9	0	11
N10	0	9
N11	21	7
Y1	11	9
Y2	4	11
Y3	0	19
Y4	0	11
Y5	0	4
Y6	16	0
Y7	11	16
Y8	9	0
Y9	0	0

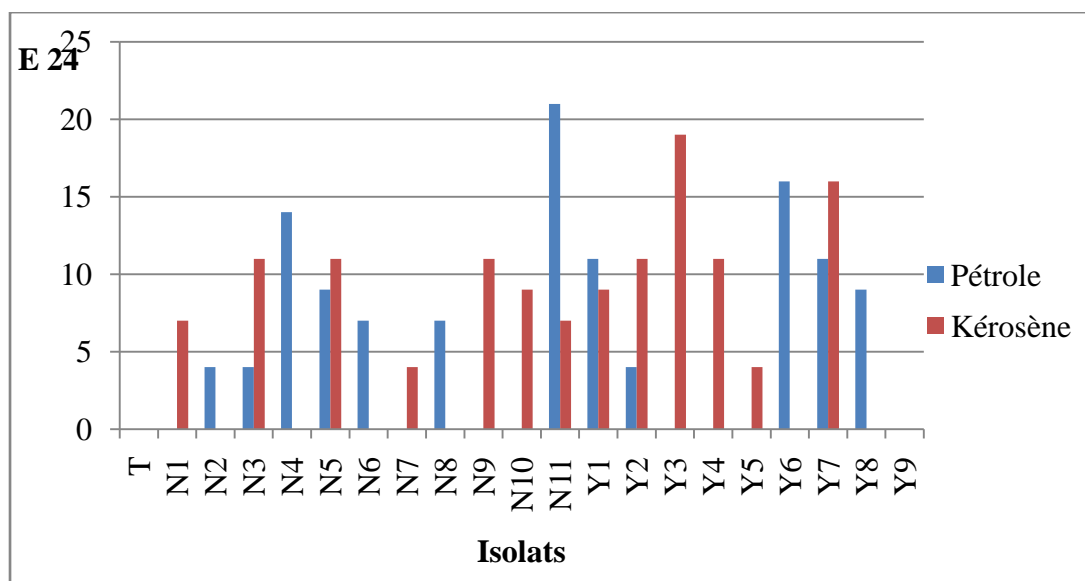


Figure 18. Histogramme représentant l'estimation de la qualité d'émulsion par les valeurs d'E₂₄ du pétrole et du kérosène de chaque isolat.

Tableau 9. Résultat de l'indice d'émulsification du kérosène.

Isolats	l'indice d'émulsification E_{24}	
	24h	7 jours
Témoin	0	0
N1	7	23
N2	0	0
N3	11	21
N4	0	0
N5	11	30
N6	0	23
N7	4	30
N8	0	0
N9	11	35
N10	9	42
N11	7	45
Y1	9	30
Y2	11	0
Y3	19	7
Y4	11	33
Y5	4	35
Y6	0	0
Y7	16	28
Y8	0	0
Y9	0	19

Pour mieux visualiser la différence entre les isolats sélectionnés en termes de productivité et rendement en biosurfactants, les résultats obtenus par le calcul des E_{24} sont représentés sous forme d'un histogramme (figure19).

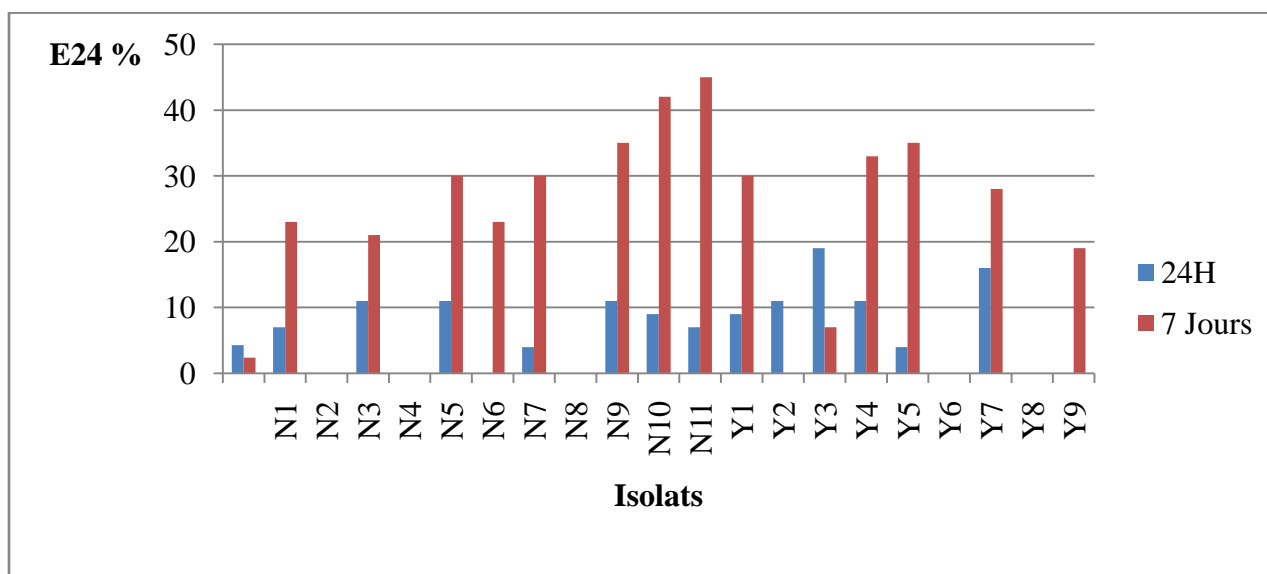


Figure 19. Histogramme représentant l'estimation de la qualité d'émulsion par les valeurs d' E_{24} du kérosène de chaque isolat.

L'index E_{24} permet une estimation quantitative du taux d'émulsification par les différents isolats. Certaines bactéries émulsifient totalement la quantité du kérosène ajoutée (N11, Y5, N9, N5, N7, Y1, Y4) tandis que d'autres forment des émulsions partielles (N1, N3, N6, Y3, Y7, Y9).

Ces résultats peuvent être comparés avec les résultats obtenus par Guergouri I. en 2010, qui montrent que le taux de biodégradation des hydrocarbures est différent d'un groupe bactérien à un autre.



Figure 20. Test d'émulsification du kérosène après 7 jours.

II.2. Test parafilm M

Tableau 10. Résultat du test de parafilm M.

Isolats	Test de parafilm M	
	24h	7jours
Témoin	-	-
N1	+	+
N2	++	+
N3	+	+
N4	++	+
N5	+	+
N6	+	-
N7	+	+
N8	-	++
N9	+	+
N10	+	+
N11	+	+
Y1	+	-
Y2	-	++
Y3	++	+
Y4	++	++
Y5	++	+
Y6	++	+
Y7	+	+
Y8	+	+
Y9	-	+

- : Résultat négatif / + : faible production / ++ : forte production

L'effondrement de la goutte dépend de la présence de biosurfactants, si le surnageant ne contient pas de biosurfactants la partie polaire de la molécule d'eau est repoussée par la surface hydrophobe du parafilm la goutte reste stable, si le surnageant contient le biosurfactant la tension interfaciale entre la goutte et la surface hydrophobe est réduite, la goutte diffuse.

Ces résultats peuvent être comparés avec les résultats obtenus par (Walter et *al.*, 2010). Démontre que la stabilité de la goutte dépend de la concentration en biosurfactant.



Figure 21. Test parafilm M.

II-3- Test de déplacement d'huile

La mesure par pied à coulisse a aboutit aux résultats suivant :

Tableau 11. Résultat du test de déplacement d'huile.

Isolats	Surface en cm ²	
	24h	7 jours
Témoin	0	0
N1	0.09	5.21
N2	4.96	6.84
N3	6.97	7.66
N4	2	6.84
N5	8	11.74
N6	3.83	4.71
N7	3.83	6.21
N8	2.83	7.09
N9	7.85	10.42
N10	4.39	4.08
N11	3.83	6.46
Y1	0	1.44
Y2	0	4.89
Y4	0	7.41
Y5	0	9.04
Y6	3.89	2.95
Y7	3.26	3.01
Y8	0.62	11.55
Y9	0	3.26

Le déplacement d'huile est une technique rapide et efficace pour la détection de biosurfactant, l'activité de production a été observée chez nos isolats par l'apparition d'une zone claire à la surface d'huile-eau, de telle sorte que la zone claire est proportionnelle à la concentration de biosurfactants produit.

Le taux de production de biosurfactants augmente proportionnellement avec l'augmentation de l'agitation et l'aération.

Ces résultats peuvent être comparés avec les résultats obtenus par (Cipinyte et *al.*, 2011) qui montrent que le taux de production de biosurfactants diffère d'un isolat à un autre.

Amaral. 2010 montre que le taux de production de biosurfactants augmente proportionnellement avec l'augmentation de l'agitation et l'aération.

III- Caractérisation biochimique

III-1- Galerie biochimique

Les résultats des tests biochimiques sont regroupés dans le tableau 12.

Tableau 12. Résultats des tests biochimiques.

Isolats	Indole	Viande foie	RM	VP	TSI				Catalase	Oxydase
					Pente	Culot	Production de gaz	H2S		
N1	-	AS	+	-	+	-	-	-	+	-
N2	-	AAF	+	-	+	+	-	-	-	-
N3	-	AS	+	-	+	-	-	-	+	-
N4	-	AS	+	-	+	+	-	-	+	-
N5	-	AS	+	-	+	-	-	-	+	-
N6	-	μAF	+	-	+	-	-	-	+	-
N7	-	AAF	+	-	+	+	-	-	-	-
N8	-	AS	+	-	-	-	-	-	+	+
N9	-	AS	+	-	-	-	-	-	+	-
N10	-	AS	+	-	-	-	-	-	+	-
N11	-	AAF	+	-	+	-	-	-	-	-
Y1	-	AAF	+	-	-	-	-	-	+	-
Y2	-	AS	+	-	-	-	-	-	+	-
Y3	-	AAF	+	-	+	+	-	-	+	-
Y4	-	AAF	+	-	-	+	-	-	+	-
Y5	-	AS	+	-	+	-	-	-	+	-
Y6	-	AAF	+	-	+	+	-	-	-	-
Y7	-	AS	+	-	-	-	-	-	+	-
Y8	-	AAF	+	-	+	+	-	-	+	-
Y9	-	AAF	+	-	+	+	-	-	+	+

+ : Résultat positif / - : Résultat négatif

III-2- Interprétation des tests biochimiques

III-2-1- Production d'indole

Certaines bactéries désaminent puis hydrolyse le tryptophane pour donner une molécule d'indole. L'indole réagit avec la fonction aldéhyde du paradiméthyl amino benzaldéhyde pour donner un composé coloré en rouge.

Touts nos isolats ne produisent pas d'indole (figure 22).

III-2-2- le métabolisme respiratoire

a- Type respiratoire

Les résultats obtenus sur le milieu VF montrent que les isolats (N1, N3, N4, N5, N8, N9, N10, Y2, Y5, Y7) se développent uniquement dans la partie supérieure du milieu dans les tubes, se sont des bactéries aérobies strictes. Les autres isolats peuvent croitre tout au long du milieu, il s'agit donc de bactéries aérobies anaérobies facultatives, tandis que l'isolat (N6) se développe dans une zone étroite du milieu situé au dessous de la zone aérobie, donc c'est une bactérie micro aérophile (figure 22).

b- Catalase

En présence d'oxygène moléculaire, certaines réactions métaboliques conduisent à la formation d'eau oxygénée. La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée en eau et oxygène.

Nous avons détecté une catalase chez les isolats (N7, N11, Y6) (figure22).

c- Oxydase

Ce test est basé sur l'oxydation d'une forme incolore de dérivés N-méthylés du para (4) phénylène diamine en leur forme oxydée, semi -quinone rosé violacé.

Nous avons détectés une oxydase chez les isolats (N8, Y9) cela signifie qu'elles possèdent une chaîne respiratoire (figure 23).

III-2-3- Etude de la destinée de l'acide pyruvique

Le milieu Clark et Lubs permet de savoir le devenir de l'acide pyruvique.

Tous nos isolats utilisent la fermentation acide mixte qui se traduit par une couleur rouge après adjonction du rouge de méthyle (figure 23).

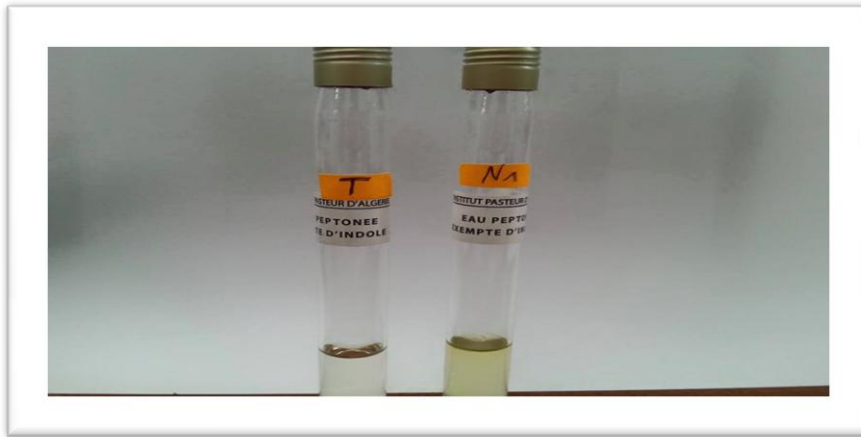
Par contre la réaction de (VP) est négative pour tous les isolats (figure 23).

III-2-4- Le métabolisme glucidique et énergétique

Les isolats (N2, N4, N7, Y3, Y4, Y6, Y8, Y9) fermentent le glucose et produisent assez d'acide pour que l'indicateur deviennent jaune dans le fond qui est relativement anaérobie mais non sur la pente.

Les isolats (N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N11, Y3, Y5, Y6, Y8, Y9) ferment le lactose ou le saccharose font viré la pente au jaune.

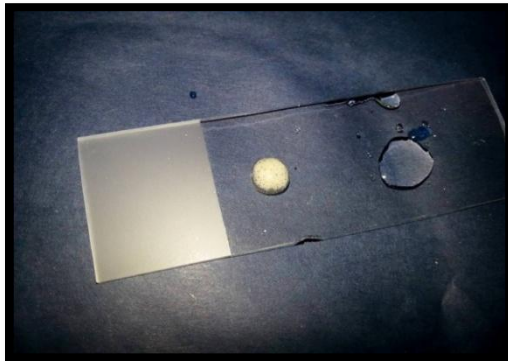
Tous les isolats ne produisent pas d'H₂S ni de gaz (figure 23).



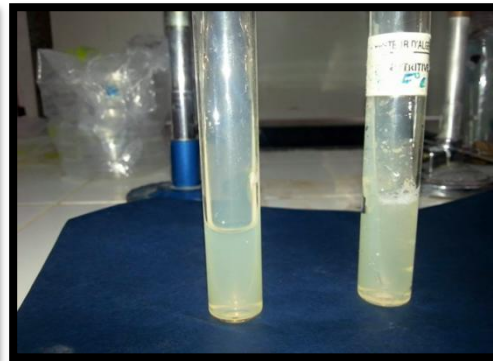
A



B

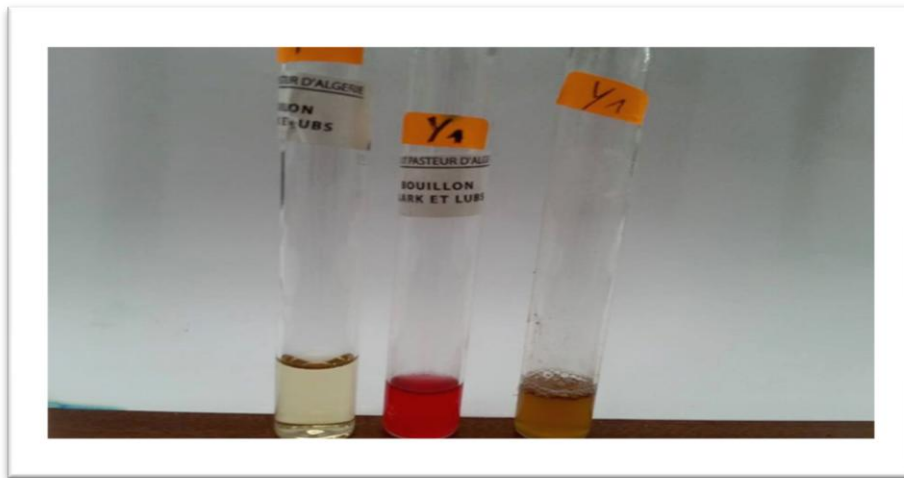


C1



C2

Figure 22. A- Test eau peptonée exempte d'indole.
B- Test viande foie.
C1- Test d'hydrolyse de la catalase sur lame.
C2- Test d'hydrolyse de la catalase gélose incliné.



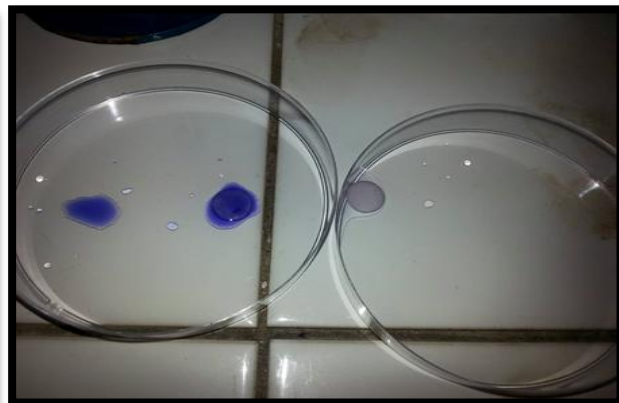
A



B



C1



C2

Figure 23. A- Test RM et VP.

B-Test TSI.

C1-Test sur disque d'oxydase à partir de colonie.

C2-Test sur disque d'oxydase à partir de bouillon nutritif.

III-2- Test d'hydrolyse de l'amidon

Tableau 13. Résultat test d'hydrolyse de l'amidon.

Isolats	Révélateur	Observation	Résultat
N1	Le Lugol	Zone bleu autour des colonies	-
N2	Le Lugol	Zone bleu autour des colonies	-
N3	Le Lugol	Zone bleu autour des colonies	-
N4	Le Lugol	Zone bleu autour des colonies	-
N5	Le Lugol	Zone bleu autour des colonies	-
N6	Le Lugol	Zone bleu autour des colonies	-
N7	Le Lugol	Zone rouge à jaune doré au tour des colonies	+
N8	Le Lugol	Zone bleu autour des colonies	-
N9	Le Lugol	Zone bleu autour des colonies	-
N10	Le Lugol	Zone bleu autour des colonies	-
N11	Le Lugol	Zone bleu autour des colonies	+
Y1	Le Lugol	Zone bleu autour des colonies	-
Y2	Le Lugol	Zone bleu autour des colonies	-
Y3	Le Lugol	Zone bleu autour des colonies	-
Y4	Le Lugol	Zone bleu autour des colonies	-
Y5	Le Lugol	Zone bleu autour des colonies	-
Y6	Le Lugol	Zone bleu autour des colonies	-
Y7	Le Lugol	Zone bleu autour des colonies	-
Y8	Le Lugol	Zone bleu autour des colonies	-
Y9	Le Lugol	Zone bleu autour des colonies	-

+ : Résultat positif / - : Résultat négatif.

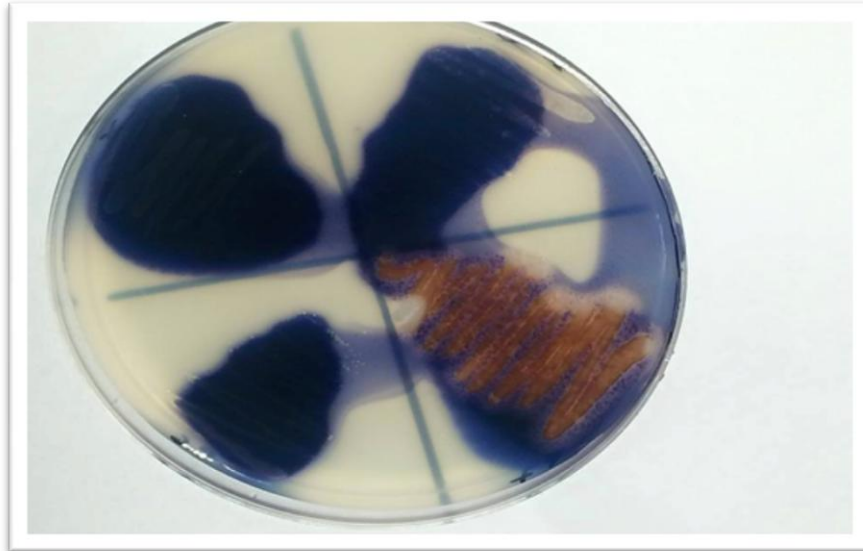


Figure 24. Test d'hydrolyse de l'amidon.

III-3- Test d'hydrolyse de la lécithine



Figure 25. Test d'hydrolyse de la lécithine.

Résultat : positif pour Y5 en bas / Résultat : négatif pour N6 en haut.

I-4- Recherches des *Staphylococcus aureus* sur gélose Baird-Parker



Figure 26. Mise en évidence des *Staphylococcus*.

Résultat : positif pour Y3 et Y8.

IV- Identifications des isolats susceptible de dégrader les hydrocarbures

Afin d'identifié nos isolat, nous nous somme basés sur des clés dichotomiques.

Selon les résultats obtenus, on constate une prédominance des bactéries Gram négatives par rapport aux Gram positives.

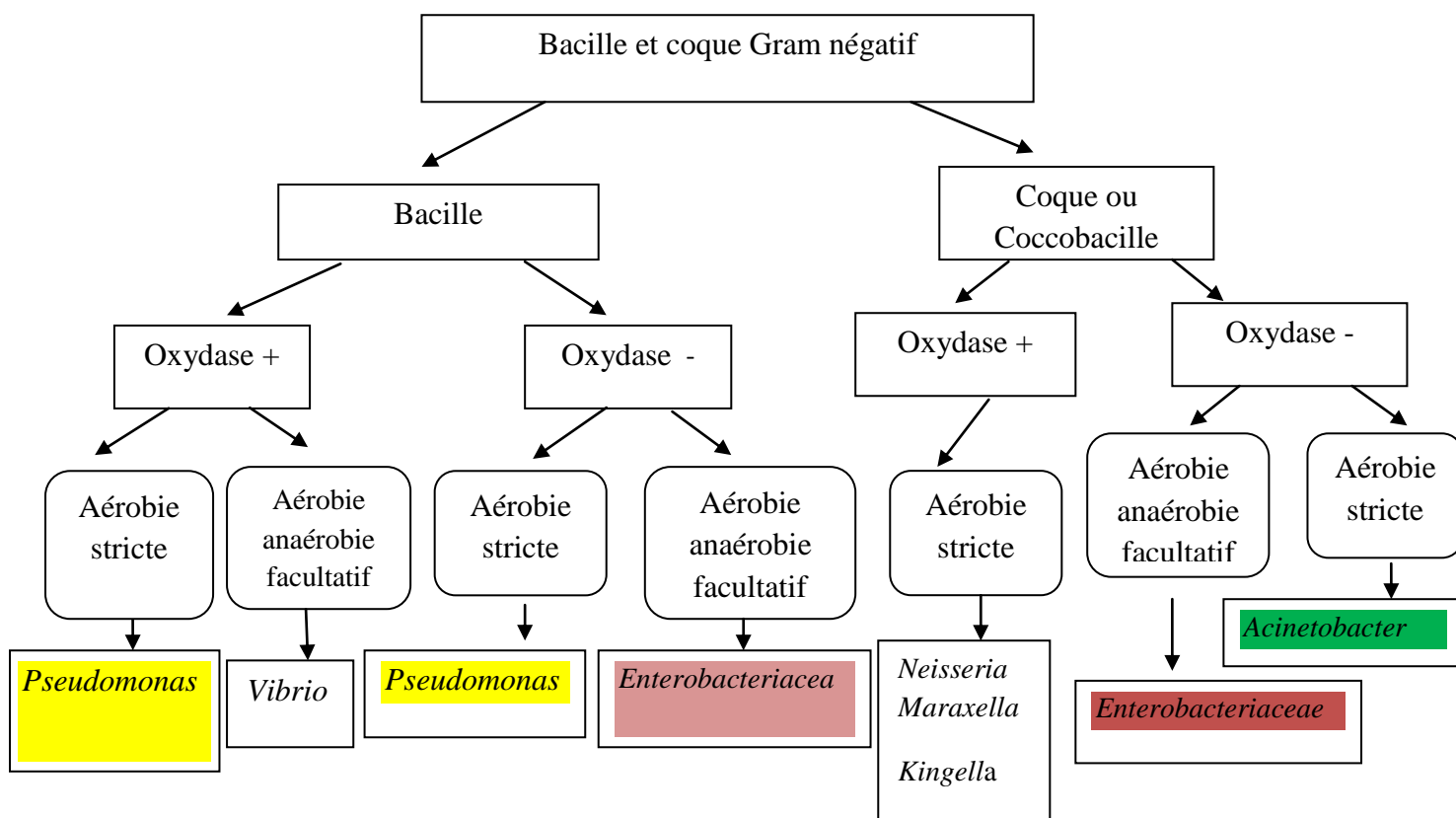


Figure 27. Clé dichotomique pour la différenciation des bacilles et coques Gram négatif.

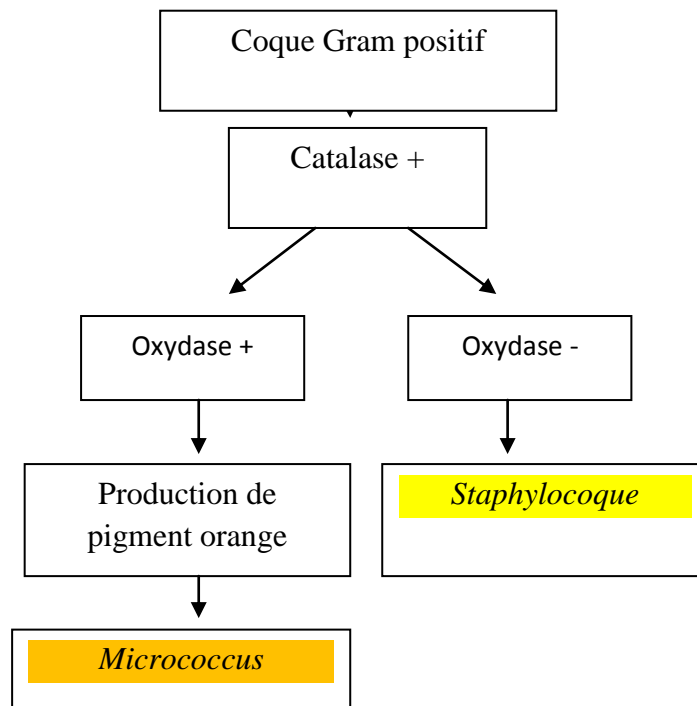


Figure 28. Clé dichotomique pour la différenciation des coques Gram positif.

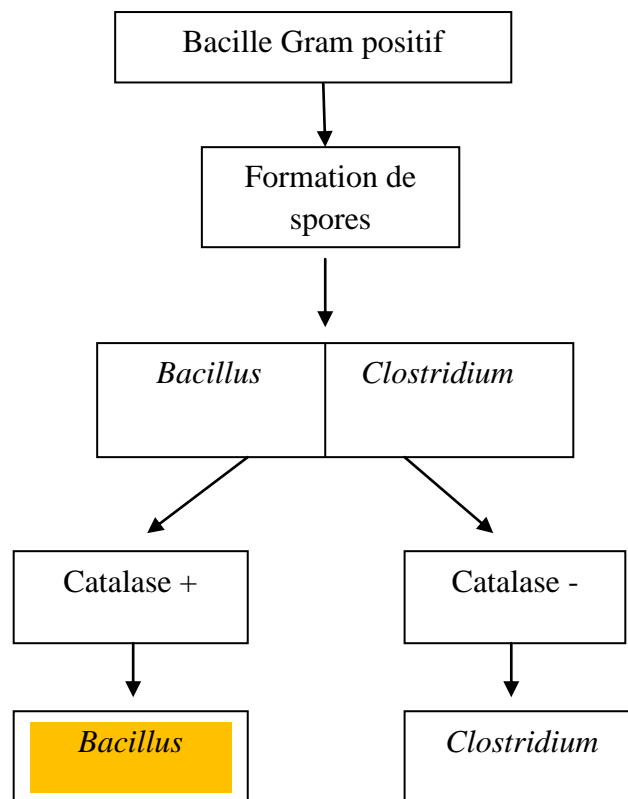


Figure 29. Clé dichotomique pour la différenciation des bacilles Gram positif.

Tableau 14. Genres bactériens identifiés.

Isolats	Genre présumé
N1	<i>Micrococcus</i>
N2	<i>Enterobacteriaceae</i>
N3	<i>Acinetobacter</i>
N4	<i>Acinetobacter</i>
N5	<i>Acinetobacter</i>
N6	<i>Bacillus</i>
N7	<i>Enterobacteriaceae</i>
N8	<i>Acinetobacter</i>
N9	<i>Acinetobacter</i>
N10	<i>Acinetobacter</i>
N11	<i>Enterobacteriaceae</i>
Y1	<i>Enterobacteriaceae</i>
Y2	<i>Acinetobacter</i>
Y3	<i>Staphylocoque</i>
Y4	<i>Enterobacteriaceae</i>
Y5	<i>Acinetobacter</i>
Y6	<i>Bacillus</i>
Y7	<i>Acinetobacter</i>
Y8	<i>Staphylocoque</i>
Y9	<i>Pseudomonas</i>

Conclusion et Perspectives

De nombreux micro-organismes sont capables d'utiliser des composés polluants comme nourriture. Le pétrole brut, qui est déversé dans le sol accidentellement ou de façon chronique est constitué de nombreuses et différentes molécules composées essentiellement d'atomes de carbone et d'hydrogène ; ce sont les hydrocarbures.

Ces molécules peuvent être utilisées, métabolisées, assimilées par certaines bactéries mangeuses de pétrole et productrices de substances naturelles dénommées surfactants qui stimulent la formation des émulsions facilitant ainsi l'accès à la source de carbone complexe et constituant un processus biologique de remédiation de sol pollué.

Le principal objectif de ce projet était d'isoler et de caractériser sur un plan phénotypique les bactéries hydrocarbonoclastes autrement dit capables de dégrader le pétrole brut dans un sol subissant une pollution très ancienne et continuelle par déversement de ce dernier autour des bacs de stockage dans une base située au Sud de l'Algérie (région saharienne aride) dans la Wilaya de Hassi Messoud.

Dans un premier temps nous avons réalisé une étude préliminaire concernant d'une part, la caractérisation physico-chimique et microbiologique du sol pollué et d'autre part la sélection d'isolats dégradant le pétrole en se basant sur leur capacité à produire les biosurfactants et enfin, nous nous sommes basé sur des clés dichotomiques pour présumer les genres bactériens.

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus se résume ainsi :

- Les résultats d'isolement bactérien de sol contaminé nous ont permis d'isoler vingt souches bactériennes mangeuses de pétrole brut. Une assimilation qui demande un certain temps d'adaptation et préparation d'équipement enzymatique pour pouvoir accéder à cette source de carbone huileuse.
- En se basant sur leurs caractères macroscopiques, microscopiques et biochimiques nous avons présumé les genres bactériens suivants : *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*.

- La réalisation de trois tests : d'émulsification E_{24} , déplacement d'huile et parafilm M nous a permis de suggérer qu'il y'a production de biomolécules spécifiques ayant des propriétés tensioactives.
- La souche la plus productrice de biosurfactants à partir du pétrole est kérosène est la souche N11 (coque à Gram négatif) avec un $E_{24} = 21\%$ et 45% en ce qui concerne le déplacement d'huile est de 6.46 cm^2 .

En matière de perspectives, nous préconisons plusieurs volets à l'avenir

- Les souches qui ont dégradé le pétrole et qui ont donnés des biosurfactants comme produits peuvent être utilisées comme agents de dépollution une fois mieux caractérisées.
- Tester les souches et leur pouvoir dégradant sur les polluants et autres rejets industriels.
- Production, extraction et étude de propriétés biologiques des biosurfactants issus de l'activité métabolique de différentes souches et ceci vis-à-vis de plusieurs substrats.
- Une étape de séquençage après amplification de l'ADN 16S dans un but de taxonomie moléculaire.

Références Bibliographiques

Abouseoud,M.(2008). *les biosurfactants biomolécules a multiusages, conférence sur les bioprocédés*,Media, 12-13 octobre 2008 ; résumé, le centre universitaire Dr,yahiafares,Media.

Alaraji,L.,AbdRahman,R.-Z,Basri,M.etSalheh,A.-.(2007).*Microbialsurfactant.*

Department of basic Medical Science, Malaysia,vol.15,N°3,p.99-105.

AFNOR. (1993).*Qualité des sols, méthodes chimiques, détermination du carbone organique par oxydation sulfochronique*, NF*31-109.

Amaral, P.-F., Coelho, M. Marrucho,I. et Coutinho, J.-P.(2010). *Biosurfactants from yeasts: characteristics, production and application.* In: Biosurfactants. Sen, R. Edition, Springer Science, p. 236-249.

Amellel,N., Berthelin,J., Porta, J.-M. and Vogel T. (2001). *Distribution and location of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and PAH-degrading bacteria within polluted soil aggregates.* Biodegradation.

Banat,I-M,Desai,D.-j.(1997).*Microbial production of surfactants and their commercial potential,Departemnt of biology*, Unated Arab Emirates, vol.61,N °1,p.47-64.

Banat,I-M.Makkar,R.-S.et Cameotra,S.-S.(2000).*Potential commercial applications of microbial surfactants*, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, vol.53, p.495-508.

Banque de données (Data Bank) de HMD, Sonatrach.

Bouderhem,A.(2011).*Utilisation des souches bactériennes autochtones dans la biodégradation et la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures.*Magister.Université Kasdi Merbah, Ouargla

Bourdon,J.-L.etMarchal,N. (1982). *Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries.* Edition Doin, Paris.

Bouillon, V. (2003). *Impact environnemental des corps gras et de leurs dérivés formulés ou non: biodégradabilité et écotoxicité, Oléagineux, Corps Gras, Lipides.* Vol.10.

Chakraborty, R et Coates, J.-D.(2004). *Anaerobic degradation of mono aromatic hydrocarbons.* *Appliquation Microbiol Biotechnolgy.* vol.64, p. 437–446.

Cipinyte, V., Grigiskis, S., Sapokate, D. and Baskys, E.(2011). *Production of biosurfactants by Arthrobacter sp. N3, a hydrocarbon degrading petroleum, the 8th International Scientific and Pratical Conference,* Lithuania.

Delarass, C. (2014). *Pratique en microbiologie de laboratoire : recherché de bactéries et de levures-moisissuures.* Edition lavoisier, Paris, p 146-147.

Djerbaoui, A.-N. (2011). *Utilisation des souches bactériennes dans la production de biosurfactant et la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures.* Mémoire de Magister. Université de Kasdi Merbah, Ouargla.

Gatellier, C. (1970). *La microbiologie du pétrole.* Revue de l'institut français de pétrole, vol 25 N°4, p. 198.

Deo, P.-G, Karanth, N. et Veenadig, K. (2005). Microbial production of biosurfactant and their importance. Department of biochemistry. India.

Devine, C.- M., Healy, M. et Murphy, R. (1996). Microbial production of biosurfactant. Ressource, conservation and recycling, p. 41-57.

Guergouri, I.(2010). *Caractérisation des bactéries isolées de sols contaminés par les hydrocarbures (zone de Skikda) et productrices des biosurfactants.* Mémoire de magister. Université Mentouri, Constantine.

Hewald, S., Josephs, K. and Bolker, M.(2005). *Genetic analysis of biosurfactant production in Ustilagomaydis.* Applied Environ. Microbiol, vol, 71p. 3033-3040.

Iqbal, S., Khalid, Z.-M. and Malik, K.- A. (1995). *Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray induced mutant of Pseudomonas aeruginosa.* Lett. Appl Microbiol vol.21, p.176-179.

Joffin, J.-N et Leyral, G. (2006). *Microbiologie technique*, Tome1 : Dictionnaire des techniques, 4^{ème} édition. Edition CRDP d'aquitaine.

Lecomte, P. (1995). *Les sites pollués, traitement des sols et des eaux souterraines.* Édition Lavoisier, TEC & DOC, p. 198.

Leahy, J.- G., Colwell, R.- R. (1990). *Microbial Degradation of hydrocarbons in the Environment Microbiol*, vol, 54, p. 305-315.

Maier, R.- M., Pepper, I. -L. et Gerba, C.- P. (2009). *Environmental Microbiology*, 2nd Edition, 598 p.

Magniez. (2014). *Méthode de dénombrement des microorganismes en milieu liquide.* Consulté le 6 novembre 2014 de (www.technobio.fr).

Morikawa, M., Daido, H., Takao, T., Satoru, M., Shimonishi, Y. and Imanaka, T. (1993). *A new lipopeptide biosurfactant produced by Arthrobacter sp. strain MIS38.* Journal of Bacteriology, vol, 175, p. 6459-6466.

Nilles, A.-B. (2008). *Effets de pollutions par hydrocarbures sur les capacités de défense d'organisme marins.* Thèse de doctorat. Université de la Rochelle.

Scriban, R. (1999). *Biotechnologie : restauration par voie biologique des sols contaminés par les polluants organiques.* Edition Lavoisi.

Sebastien. (2013). *Le pétrole et les médicaments.* (www.petrole-et-medicaments.e-mon-site.com).

Soltani M.(2004).*Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone.* Thèse de doctorat de l'université Paris 6.

Scow,K.- M.(2003). *Rate of biodegradation*, in:Lyman, w.-j.,et Rosenblatt,w. Eds. Hand book of chemical Property Estimation Methods, Mc Graw-Hill, New York.OPU. P. 875. ytique, p. 284.Edition.

Tabatabaee,A., Mazaheri,M.,A., Noohi,A.-A and Sajadian,V.-A. (2005).*Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil reservoirs.* Iran. J. Environ. Health Sci. Eng.,N° 2,p.6-12.

Tarayre,C.(2012). *Bioremédiation de sols pollués aux hydrocarbures.* Editions Universitaires Européennes. 116p.

Técher, D. (2011).*Réhabilitation de sols pollués par des HAP grâce aux bactéries associées à la rhizosphère de Miscanthus x giganteus.* Université Paul Verlaine de Metz. 307p.

Olivier,B et Magot,M., (2005). *Petroleum Microbiology*, Edition illustrée, Edition ASM Press.

Pelmont,J.(1995), *Bactéries et environnement-adaptation biologique*, Tome 1.OPU. P. 875.

Perron, K., Schrenzel, J. et Linder, P. (2010). *Des bactéries et des hommes de la santé au développement durable. Conférence sur la microbiologie*, Geneve, 6-7 septembre 2010 ; programme et résumés, Faculté de médecine.

Walter,V., Syladath,C and Hausman, R(2010). *Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms*, New York, vol.672.

Annexe I : Matériel utilisé

1. Matériel du laboratoire

Equipement	Verrerie et matériel en plastique
Etuve (Heraeus)	Fioles de 50 ml, 100 ml, 500 ml, 1000 ml
Autoclave (Webco)	Béchers de 1000 ml
pH mètre (Sartorius)	Boîtes de pétrie en plastique
Vortex -plaque chauffante (VELP/ Sanijders)	Pipettes Pasteur
Centrifugeuse à froid (Sigma)	Tubes à essai
Agitateur (GFL)	Lames et lamelles
Microscope photonique (Will Wetzlar)	Parafilms
Balance analytique (OHAUS)	Anse de platine
Bain marie (Mettler)	Pinces (métalliques)
Bec bunsen (Nahita)	

Annexe II : Milieux de culture et réactifs

A. Composition des milieux de culture et tests biochimiques préparés

1. Gélose nutritive

Ingrédients	Quantité
Extrait de viande	1,0g
Extrait de levure	2,0g
Peptone	5,0g
Chlorure de sodium	5,0g
Agar	15,0g
Eau distillée	1000 ml
pH	7,4

2. Bouillon nutritif

Ingrédients	Quantité
Peptone	5,00 g
Extrait de viande de bœuf	2,00 g
Extrait de levure	1,00 g
Na Cl	5,00 g
Glucose	1,00 g
Eau distillée	1000 ml
pH	7,2

3. Milieu M2 (modifié) :

Ingrédients	Quantité
NH ₄ Cl	2,00 g
KCl	0,10 g
K ₂ HPO ₄	1,00 g
CaCl ₂	0,01 g
KH ₂ PO ₄	0,50 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,01 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,50 g
Extrait de levure	0,50 g
Eau distillée	1000 ml
pH	6,50

4. Clark et Lubs

Ingrédients	Quantité
Peptone tryptique	7g
Glucose	5g
K ₂ HPO ₄	5g
H ₂ O	1L
pH	7.5

5. Gélose a l'amidon

Ingrédients	Quantité
Péptone	5g
Amidon	10h
Agar	20g
H2O	1L
ph	6.8

B. Réactifs et solutions

- Alcool,
- Disques d'oxydases,
- Eau distillée,
- Eau oxygénée 10 V,
- Violet de gentiane,
- Fuchsine,
- Vert de malachite,
- Bleu de méthylène,
- Pétrole brut,
- Huile à immersion,
- Réactifs de Kovacs,
- Solution de lugol,
- HCl,
- NaOH,
- Nit1, Nit2
- Réactif VP 1 et VP 2,
- Acétone,
- Kéroséne,
- Oil red (colorant d'huile).

Annexe III :

Coloration de Gram D'après SINGLETON(1999), la coloration de Gram s'effectue selon les étapes suivantes :

- Préparer et fixer un frottis bactérien à la chaleur du bec Bunsen.
- Recouvrir au violet de Gentiane pendant 1 minute. Eliminer l'excès par l'eau courante;
- Ajouter du Lugol : deux bains de 45 secondes, jeter l'excès par l'eau courante;
- Traiter à l'alcool 95° pendant 30 secondes, puis rinçage à l'eau;
- Recolorer à la Fuschine pendant 1à 2 minutes, rinçage à l'eau puis séchage;
- L'observation se fait en ajoutant de l'huile à immersion ; les bactéries Gram positif se colorent en violet alors que les Gram négatif se colorent en rose.

Annexe IV :

La coloration de spores s'effectue, selon les étapes suivantes :

- Réaliser un frottis et le fixer
- Coloration : recouvrir la lame d'une solution de vert de malachite. Chauffer jusqu'à émission de vapeur. laisser refroidir et chauffer à nouveau .l'opération doit durer 10 minutes ;
- Epreuve : Laver soigneusement ;
- Contre coloration : Recouvrir la lame de fuchsine pendant 1 minute ;
- Laver, sécher entre deux feuilles de papier absorbant ;
- Observer a l'objectif 100 à immersion ;
- Les spores apparaissent en vert foncés, les sporanges en vert pale et les corps bactériens en rose.

Annexe IV :

Obtention du surnageant :

Le surnageant a été obtenu après une centrifugation à 4000 rpm pendant 10 mn à 4°C.

Annexe V :

- Table de Mac Grady :

Tables NPP (d'après la norme ISO 7218 :1996(F))

Tableau 1 - Table NPP pour 3 x 1 g (ml), 3 x 0,1 g (ml) et 3 x 0,01 g (ml).

Nombre de résultats positifs			NPP	Catégorie lorsque le nombre d'essais de mesures est de 1 pour le lot considéré	Limites de confiance			
					>95%	>95%	>99%	>99%
0	0	0	<0,30		0,00	0,94	0,00	1,40
0	0	0	0,30	3	0,01	0,95	0,00	1,40
0	1	0	0,30	2	0,01	1,00	0,00	1,60
0	1	1	0,61	0	0,12	1,70	0,05	2,50
0	2	0	0,62	3	0,12	1,70	0,05	2,50
0	3	0	0,94	0	0,35	3,50	0,18	4,60
1	0	0	0,36	1	0,02	1,70	0,01	2,50
1	0	1	0,72	2	0,12	1,70	0,05	2,50
1	0	2	1,1	0	0,4	3,5	0,2	4,6
1	1	0	0,74	1	0,13	2,00	0,06	2,70
1	1	1	1,1	3	0,4	3,5	0,2	4,6
1	2	0	1,1	2	0,4	3,6	0,2	4,6
1	2	1	1,5	3	0,5	3,8	0,2	5,2
1	3	0	1,6	3	0,5	3,8	0,2	5,2
2	0	0	0,92	1	0,15	3,50	0,07	4,60
2	0	1	1,4	2	0,4	3,5	0,2	4,6
2	0	2	2	0	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	0	1,5	1	0,4	3,8	0,2	5,2
2	1	1	2,0	2	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	2	2,7	0	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	0	2,1	1	0,5	4,0	0,2	5,6
2	2	1	2,8	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	2	3,5	0	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	0	2,9	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	1	3,6	0	0,9	9,4	0,5	14,2
3	0	0	2,3	1	0,5	9,4	0,3	14,2
3	0	1	3,8	1	0,9	10,4	0,5	15,7
3	0	2	6,4	3	1,6	18,1	1,0	25,0
3	1	0	4,3	1	0,9	18,1	0,5	25,0
3	1	1	7,5	1	1,7	19,9	1,1	27,0
3	1	2	12	3	3	36	2	44
3	1	3	16	0	3	38	2	52
3	2	0	9,3	1	1,8	36,0	1,2	43,0
3	2	1	15	1	3	38	2	52
3	2	2	21	2	3	40	2	56
3	2	3	29	3	9	99	5	152
3	3	0	24	1	44	99	3	152
3	3	1	46	1	9	198	5	283
3	3	2	110	1	20	400	10	570
3	3	3	>110					
autres valeurs			non cité dans la table ISO 7218 : 1996 (F)					

HADDAD Naouel

BOUDJADA Yasmine Djihene

Thème : Isolement et caractérisation des bactéries hydrocarbonoclastes à partir de sols pollués dans la région de Hassi Messaoud

Nature du diplôme : Master en Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes.

Résumé :

L'élimination du pétrole dans le sol nécessite l'intervention de différents facteurs biotiques et abiotiques. Parmi ces facteurs, la biodégradation par les microorganismes.

L'objectif de notre travail est l'isolement et la caractérisation de bactéries hydrocarbonoclastes à partir sol prélevé autour des bacs de stockage dans la région de Hassi Messaoud.

Tous les isolats ont été purifiés sur un milieu contenant 1% de pétrole brut comme source de carbone et d'énergie.

Trois tests ont été réalisés afin de détecter la production de biosurfactants : le test d'émulsification, le déplacement d'huile et le parafilm M .Les vingt isolats ont montré cette capacité synthétique.

Le suivi d'un schéma d'identification dichotomique nous a permis de regrouper nos isolats en six genres principaux : *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*.

Mots clés : Biodégradation, biosurfactant, pétrole brut, hydrocarbonoclastes.

Laboratoire de recherche : Laboratoire d'écologie microbienne, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université des Frères Mentouri Constantine

Directeur de Recherche : Mme I.Guergouri Maitre assistante « A » à l'université des Frères Mentouri Constantine.

Membres du jury :

Président : Mr Y. Benhizia Professeur à l'université des Frères Mentouri Constantine.

Examineur : Mr A.Benguedouar à l'université des Frères Mentouri Constantine.