



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 علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Ecologie Microbienne

Intitulé :

---

**Contribution à l'étude de la biodégradation des hydrocarbures dans les boues de forage par des bactéries productrices de biosurfactants**

---

Présenté et soutenu par : *SELMOUN Meriem*

Le : 12/06/2016

*BENKHEBICHE Djamel Eddine*

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** M. Benhizia Yacine Professeur à UFC

**Rapporteur :** Mme Guergouri Ibtissem Maitre-Assistante « A » à UFC

**Examineurs :** M. Chaabi Rabah Maitre-Assistant « A » à UFC

*Année universitaire  
2015 - 2016*

## *Remerciements*

*Nous tenons tout d'abord à remercier le bon Dieu tout puissant de nous avoir aidés à réaliser ce modeste travail.*

*Nous remercions très chaleureusement notre encadreur Mme GUERGOURI IBTISSEM Maitre-Assistante « A » à UFC qui n'a ménagé aucun effort pour que ce mémoire puisse voir le jour.*

*Nous remercions les membres du jury, Monsieur BENHIZIA YACINE Professeur à UFC et Monsieur CHABBI RABAH Maitre-Assistant « A » à UFC*

*Nous adressons nos remerciements à Mme GUERGOURI Mounia qui nous a accueillis au sein du laboratoire de chimie et nous a proposée son aide pour accomplir notre travail.*

*Nous remercions tous les enseignants de notre cursus qui ont contribué à notre formation.*

*Nous adressons nos remerciements à Monsieur HADDI, et à tout le personnel du laboratoire de biotechnologie.*

*Enfin, il nous serait difficile d'omettre de remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail. Qu'ils trouvent dans ces quelques lignes l'expression de nos sincères remerciements.*

## *Dédicaces*

*J'ai l'honneur de dédier ce travail :*

*A ma Maman qui a toujours cru en moi et qui a été présente quand j'en avais besoin, ses encouragements, sa patience, son attention et ses sacrifices juste pour que je consacre tout mon temps rien que pour mes études, que Dieu la protège.*

*A mon papouné qui a veillé à ce que nous ne manquions de rien, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort, que Dieu le garde pour nous*

*A mes sœurs Aya et lyna que j'aime plus que tout au monde  
« the best sisters in the world »*

*A la mémoire de mes grands parents qui auraient été si fiers de moi  
aujourd'hui, qu'ils reposent en paix*

*A mes tantes et mes oncles*

*A mes cousins et cousines*

*A mon petit bonheur Julia*

*A mes très chers amis Mohamed Nabil, Rasha et Nihed avec qui je partage  
ma petite vie de tout les jours et qui m'ont soutenue moralement pendant toute  
cette période de préparation*

*A mes camarades de ma promotion*

*Aux doctorantes du laboratoire de biotechnologie*

*Meriem.*

## *Dédicaces*

*Je dédie mon mémoire à :*

*Mes chers parents que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments, pour leur patience illimitée, leur encouragement contenu, leur aide, en témoignage de mon profond amour et respect pour leurs sacrifices.*

*A Mes chers frères et sœurs et à toute ma famille.*

*Sans oublier mes trois chers amis et frères Issam Boukheit et Oussama Mahfouf et Danone pour leurs soutien et encouragement*

*A mon binôme et à mes ami(e)s et collègues au laboratoire*

*Walid Adem Rahil Lina Nihed Iness Hadjer Houda Hanene Meriem.*

*A l'équipe du laboratoire 14 «biotechnologie » surtout : Raja, Leila, Maroua et Hanen*

*Et a toute mes amis de la promotion écologie microbienne.*

*Djamel Eddine*

## Résumé

Les borbiers de rejets de forage pétrolier constituent un risque majeur sur l'environnement et par conséquent sur la santé humaine et animale, vu qu'ils soient contaminés principalement par des hydrocarbures et des métaux lourds.

La dépollution biologique de ces sites nécessite des microorganismes efficaces dans ce procédé biologique.

Les bactéries « hydrocarbonoclastes » sont des microorganismes qui se nourrissent typiquement d'hydrocarbures, et peuvent être aussi de bonnes productrices de biomolécules appelées « biosurfactants » présentant un grand nombre d'applications environnementales et industrielles.

A ce titre, les objectifs de notre travail sont d'isoler et de caractériser des souches bactériennes à partir d'un borbier à base d'huile dans une zone d'activité pétrolière dans la région d'Ain Salah située dans l'extrême sud algérien.

La mise en culture sur gélose nutritive a permis d'isoler 17 bactéries, dont six diffèrent par leurs caractères macroscopiques et microscopiques.

Ces six isolats sont testés pour leur capacité à dégrader le pétrole brut sur une gélose M2 dépourvue d'extrait de levure.

Les résultats du test d'émulsification, et de déplacement d'huile ont permis de sélectionner la souche 1, 2P et 5 ayant montrées une grande capacité productive de biosurfactants.

Le suivi de la cinétique de croissance en présence du pétrole brut a montré des courbes de diauxie pour les trois souches.

Un essai d'extraction des biosurfactants par deux méthodes différentes sont réalisées, une extraction par solvant organique et une précipitation acide.

La migration des extraits obtenus par chromatographie sur couche mince a confirmé la détection de biosurfactants chez les souches 1 et 5 par la deuxième technique.

**Mots clés :** biodégradation, émulsification, hydrocarbonoclaste, hydrocarbure, biosurfactants)

## **Abstract**

The oil drilling reject quagmires form a major risk on the environment thus considered a risk on the human and animal health; seeing to it that they're contaminated mainly by hydrocarbons and heavy metals. The biological cleanup of these sites needs efficient microorganisms in this biological process. These hydrocarbonoclastic bacteria are microorganisms that typically feed on hydrocarbons and can also be good producers of biomolecules called «biosurfactants» presenting a large number of environmental and industrial applications.

Now our work objectives are to isolate and characterize bacterial strains starting from an oil based quagmire in a petroleum active zone in Ain Saleh situated in southern Algeria. The culturing on nutrient agar has allowed us to isolate 17 bacteria, 6 of which differentiate with their macroscopic and microscopic characteristics. These 6 isolates are tested for their capacity to degrade crude petroleum on an M2 agar devoid of yeast extracts.

The results of the emulsion test and the oil displacement has allowed to select the bacterial strain 1, 2P and 5 having shown a high capacity in producing biosurfactants. The monitoring of the kinetic development in presence of crude oil has shown diauxic growth curves for the 3 bacterial strains.

An attempt to extract biosurfactants with two different methods have been accomplished, an extraction by an organic solvent and by an acidic precipitation. The migration of the extracts obtained by chromatography on a thin layer has confirmed the detection of biosurfactants on the bacterial strains 1 and 5 using the second method.

**Key words:** biodegradation, emulsion, hydrocarbonoclastic, hydrocarbon, biosurfactants

## ملخص

إن أحواض النفايات الناجمة عن التنقيب على آبار البترول تعد خطرا على البيئة و بالتالي خطرا على الإنسان و الحيوان بسبب تلوثها اساسا بالمحروقات و المعادن السامة الثقيلة.

ان تنقية هذه المواقع تتطلب التحليل البيولوجي بواسطة كائنات حية دقيقة وفعالة.

البكتيريا ( الهيدرو كاربنوكلاستية) هي كائنات تتغذى حصريا على المحروقات وقد تكون منتجة جيدة للسرفكتونات الحيوية التي لها عدة استعمالات في مجالات الصناعة و البيئة.

نهدف من خلال مشروعنا هذا إلى عزل وتوصيف سلالات بكتيرية هيدرو كاربنوكلاستية من حوض النفايات الناجمة عن حفر بئر بترول بمنطقة عين صالح الواقعة في أقصى جنوب الجزائر.

بعد عزل هذه السلالات البكتيرية و توصيفها استطعنا الحصول على 6 سلالات بكتيرية مختلفة مجهرية و ظاهريا من بين 17 عزلة.

أردنا اختبار قدرة هذه السلالات على تحليل 2% من البترول الخام مضافة إلى الوسط الغذائي M2 خالي من خلاصة الخميرة .

بعد إجراء اختبارين اختبار الاستحلاب و اختبار نزوح طبقة النفط أظهرت السلالات البكتيرية 1 و 2P و 5 قدرة عالية على إنتاج السرفكتونات الحيوية.

مراقبة حركية النمو في الوسط الغذائي "LB" بوجود 1% من النفط الخام أظهر لنا منحنى ثنائي النمو (diauxie). حاولنا استخلاص السرفكتونات الحيوية باتباع تجربتين، الأولى بواسطة المذيبات العضوية والثانية بواسطة الترسيب الحمضي.

هجرة المستخلصات بواسطة "CCM" أثبتت لنا قدرة السلالتين 1 و 5 على إنتاج السرفكتونات الحيوية وذلك عن طريق التجربة الثانية.

### الكلمات المفتاحية:

التحليل البيولوجي - الاستحلاب - الهيدرو كاربنوكلاستية - المحروقات - السرفكتونات الحيوية

## Table des matières

Introduction.....	1
-------------------	---

### Synthèse bibliographique

#### Chapitre I : La pollution des sols aux hydrocarbures

I.1. Le sol.....	3
I.1.1. Définition .....	3
I.1.2. Composition du sol.....	3
I.2. Les hydrocarbures.....	3
I.3. Les principaux produits de raffinage du pétrole brut.....	5
I.4. Forage des hydrocarbures et impact sur l'environnement.....	5
I.4 .1. Le forage pétrolier.....	6
I.4.2. Le fluide de Forage.....	6
I .4.3 Définition des bourbiers.....	6
I.5. Evaluation des sites pollués .....	7
I.6.Traitement des sols pollués par les hydrocarbures.....	7

#### Chapitre II : La dégradation des hydrocarbures par voie microbienne et la production de Biosurfactants

II.1 La bioremédiation.....	9
II.1.1. Définition .....	9
II.1.2. Les principales méthodes utilisées dans la bioremédiation.....	9
La bioaugmentation.....	9



La biostimulation.....	9
II.2. Microorganismes aptes à dégrader les hydrocarbures.....	10
II.3. Facteurs physiques et chimiques affectant la biodégradation.....	10
II.4. Généralité sur le biosurfactants.....	11
II.4.1. Définition.....	11
II.4 .2. Type de biosurfactants.....	11
II.4.3. Biosynthèse et rôle physiologique.....	15
II.4.4 Utilisation des biosurfactants.....	15
II.5. Technique de caractérisation des biosurfactants.....	16

## **Matériel et méthode**

1. Description du site de prélèvement.....	17
2. Mesure du potentiel d'hydrogène.....	18
3. Analyses microbiologiques du sol.....	18
3.1.Matériel.....	18
3.2.Dilution décimale.....	19
3.3.Isolement des bactéries.....	19
3.4.Dénombrement des bactéries.....	19
3.5.Purification des isolats.....	20
3.6.Conservation des isolats.....	20
4. Caractérisation phénotypique des souches sélectionnées.....	21
4.1. Etude des caractères morphologiques.....	21
4.1.1. Aspect macroscopique.....	21
4.1.2. Aspect microscopique.....	21

5. Test à la potasse (solution aqueuse à 3 % de KOH).....	22
6. Recherche des enzymes respiratoires.....	22
6.1.Recherche de la catalase.....	22
6.2.Recherche de l'oxydase.....	22
7. Sélection des souches productrices de biosurfactants.....	23
7.1.Matériel.....	23
7.2.Index d'émulsification.....	23
8. Test du déplacement d'huile.....	23
9. Test de biodégradation.....	24
10.Suivi de la cinétique de croissance en présence du pétrole brut.....	24
11.Extraction des biosurfactants.....	24
12.Chromatographie sur couche mince (CCM).....	25

## **Résultats et discussions**

1. Potentiel d'hydrogène.....	27
2. Analyses microbiologiques du sol.....	27
3. Etude des caractères morphologiques.....	28
4. Recherche des enzymes respiratoires.....	32
5. Sélection des souches productrices de biosurfactants.....	33
5.1.Test d'émulsification.....	33
5.2.Test du déplacement d'huile.....	37
5.3.Test de biodégradation.....	38
6. Suivi de la cinétique.....	39
7. Extraction des biosurfactants.....	44
Conclusion.....	47

## Références bibliographiques

## Annexes

## Liste des figures

Figure 01 :	Représentation schématique des principales familles d'hydrocarbures et autres composés du pétrole avec quelques exemples de molécules	3
Figure 02 :	schéma d'une raffinerie	4
Figure 03 :	Représentations les plus utilisées pour illustrer les deux parties (hydrophile et hydrophobe) des molécules amphiphiles des surfactants	10
Figure 04 :	Structure de quelques biosurfactants appartenant aux différents groupes	13
Figure 05 :	Bourbier situé à Teguentour Ain saleh sud Algerie site de prélèvement 14 juin 2015	17
Figure 06 :	Schéma de d'isolement et dénombrement des bactéries	19
Figure 07 :	Les différents aspects des colonies bactériennes obtenus	28
Figure 08 :	Les différents aspects microscopiques obtenus	29
Figure 09 :	Confirmation du Gram par le KOH	29
Figure 10 :	L'effervescence obtenue de la réaction d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> avec la catalase	30
Figure 11 :	Variation du taux d'émulsification d'une souche à un autre et entre les différents types d'hydrocarbures	33
Figure 12 :	Les micelles obtenues après test d'émulsification	34
Figure 13 :	Déplacement d'huile et formation d'un halo clair	35
Figure 14 :	Dégradation du pétrole avec différente concentration en extrait de levure	36
Figure 15 :	Courbes de croissance et pH pour la « Souche 1 »	39
Figure 16 :	Courbes de croissance et pH pour la « Souche 2P »	40
Figure 17 :	Courbes de croissance et pH pour la « Souche 5 »	41
Figure 18 :	Résultat des deux techniques d'extraction	42
Figure 19 :	Chromatographie sur couche mince	44

## Liste des tableaux

Tableau 01 :	Source microbienne et principaux types de biosurfactants	12
Tableau 02 :	Données climatiques à Ain Salah	16
Tableau 03 :	Dénombrement de la microflore totale.	25
Tableau 04 :	Caractères macroscopiques des colonies isolées sur gélose nutritive.	26
Tableau 05 :	Résultat de la coloration de Gram et du test KOH.	27
Tableau 06 :	Résultats de la présence des enzymes respiratoire	30
Tableau 07 :	Calcul de l'index d'émulsion sur kérosène.	32
Tableau 08 :	Calcul de l'index d'émulsion sur Gasoil.	32
Tableau 09 :	Résultat du test de déplacement d'huile	35
Tableau 10 :	Calcul des paramètres de la cinétique	37

# INTRODUCTION

La pollution des sols par les hydrocarbures peut être chronique comme accidentelle et ces derniers peuvent persévérer longtemps lorsqu'elles sont dissimulées dans les sols et les nappes aquifères. Les causes majeures de cette pollution sont les activités industrielles qui génèrent une multitude de composés qui peuvent être toxiques pour les organismes vivants telles que l'extraction, la transformation et l'utilisation des produits pétroliers qui par leurs rejets industriels peuvent contaminer notre environnement : le sol, l'eau, l'air et la biosphère.

Les traitements physico-chimiques proposés sur site ou après excavation des sols, sont coûteuses et non respectueuses des écosystèmes. Il est donc primordial de mettre en œuvre des moyens de dépollution des sites contaminés par des microorganismes. C'est une technique connue sous le nom de bioremédiation, elle est commode pour les hydrocarbures pétroliers tels que le gasoil, kérosène et fioul. La réduction de la pollution qui en résulte, est exploitée dans des procédés visant à décontaminer les sites pollués tout en conservant l'intégrité de l'écosystème.

La biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes appelés « hydrocarbonoclastes » a été mise en évidence dès 1946 par ZoBell. Depuis cette date le nombre d'espèces bactériennes identifiées possédant cette propriété n'a cessé d'augmenter. En se basant sur la fréquence d'isolement, les genres bactériens prédominants sont *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligènes*, *Vibro*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Corynebacteria*, et *Nocardia* (Leahy et Colwell, 1990; Floodgate, 1995). Ces organismes dégradant les hydrocarbures sont ubiquistes (Atlas, 1995 a, b; Olivera et *al.*, 1997), ils ont même été rencontrés dans les écosystèmes extrêmes comme les régions polaires (Whyte et *al.*, 1995; Aislabie et *al.*, 1998), les déserts (Al-Hadrami et *al.*, 1995) ou les sources chaudes (Zarilla et Perry, 1984).

L'activité humaine, au travers des multiples sources de pollution et par la mondialisation des déplacements, favorise l'apparition de nouvelles souches aptes à la dégradation des hydrocarbures (Van der Meer et *al.*, 1992). Ainsi, même si les conditions de température, aération, pH, toxicité ou nutriments sont défavorables, une dépollution intrinsèque reste possible avec une efficacité amoindrie (Leahy et Colwell, 1990; Delille et *al.*, 1998).

# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **Chapitre I : La pollution des sols aux hydrocarbures**

### **I.1. Le sol**

#### **I.1.1. Définition**

Le sol qui est un système polyphasique, défini comme la couche superficielle de la croûte terrestre composée d'eau, d'air et d'organismes ainsi que des particules minérales qui représente l'ensemble des produits de la dégradation physique puis chimique de la roche mère et aussi de matière organique qui est la partie non vivante de la fraction organique du sol constituée d'un mélange hétérogène de résidus de décomposition microbienne et de matière organique fraîche. (Gabet,2004)

#### **I.1.2. Composition du sol**

Le sol est donc un système hétérogène et complexe. Il est composé de 03 phases selon (Gabet,2004) :

- une phase solide représentée par les particules du sol.
- une phase liquide représentée par l'eau du sol qui peut être enrichie en de nombreux composés et particules.
- une phase gazeuse constituée par l'air emprisonné dans le sol.

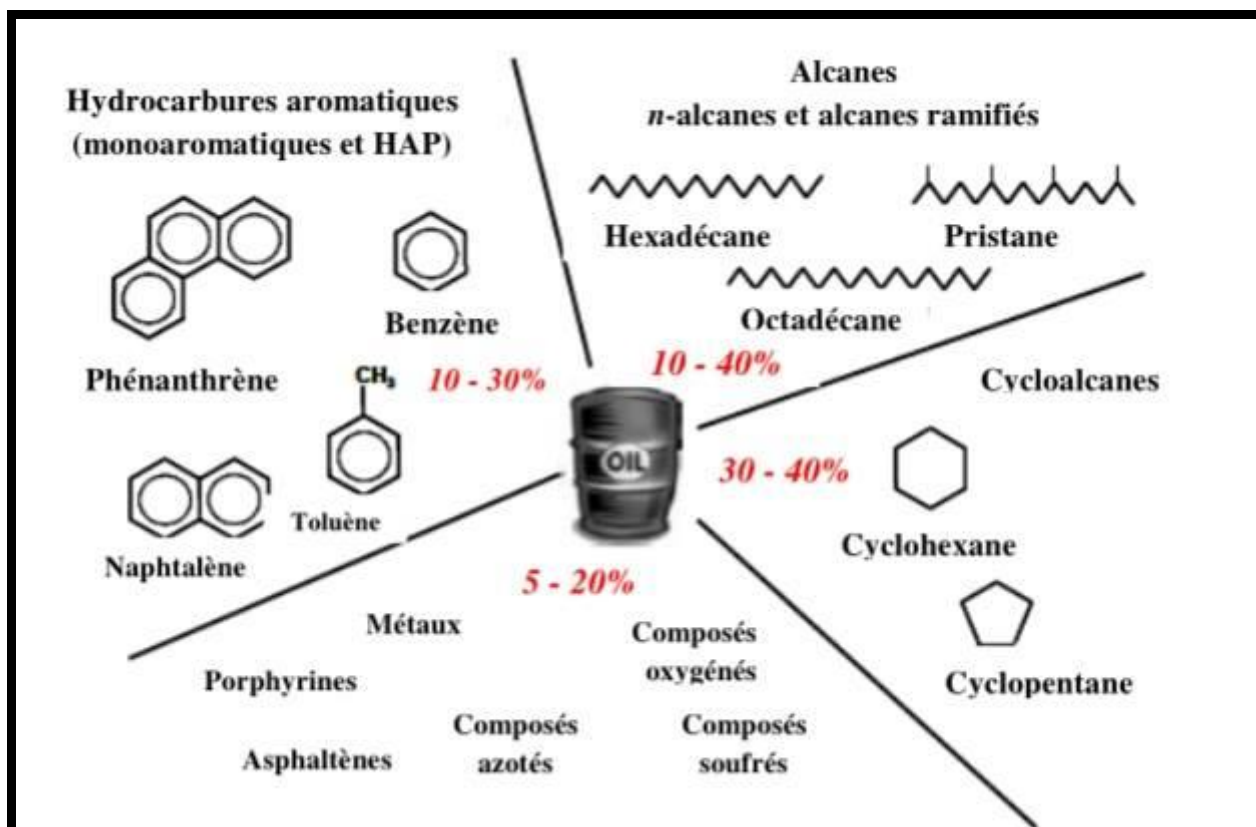
### **I.2. Les hydrocarbures**

Les hydrocarbures sont des composés organiques formés exclusivement d'atomes de carbone et d'hydrogène, ils ont pour formule brute  $C_nH_m$  où « n » et « m » sont deux entiers naturels. De par leur abondance naturelle, ils font partie des produits chimiques les plus importants pour l'humanité et sont notamment utilisés comme source d'énergie primaire.

Malgré la diversité des hydrocarbures et par conséquent de leur biodégradabilité, cette dernière est soumise à quelques règles ; plus la chaîne d'un hydrocarbure sera longue, plus sa biodégradabilité sera difficile et plus l'hydrocarbure comportera de cycles, plus sa biodégradabilité sera importante (Tarayre 2012).



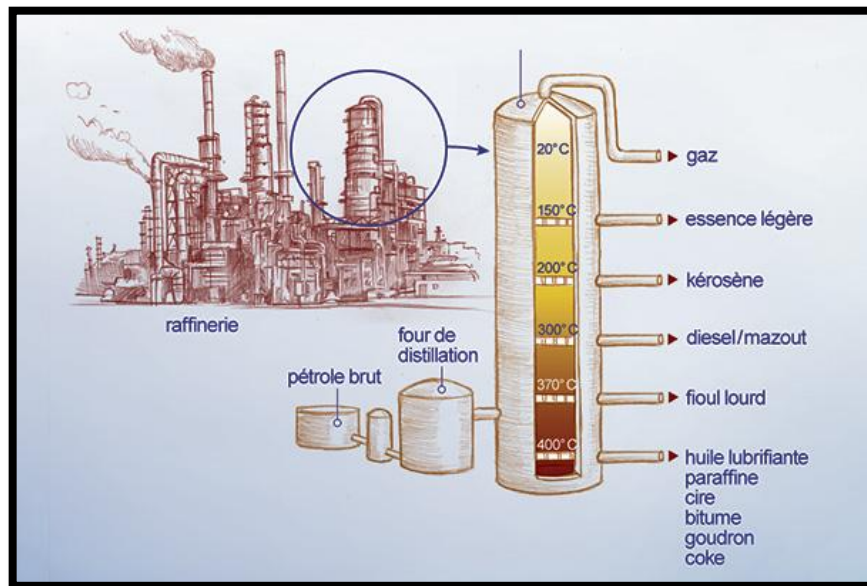
Le pétrole brut est composé de plusieurs hydrocarbures. On y trouve aussi une multitude d'autres éléments tels que l'azote, le soufre, les métaux mais aussi parfois de l'eau salé ou bien des produits sulfuré-thiols. Le pétrole est formé naturellement et on en distingue plusieurs sortes. Les trois grands types d'hydrocarbures sont les alcanes ou paraffine, les cycloalcanes ou naphènes et les composés aromatiques. (www.worldofmolecule.com)



**Figure 1 :** Représentation schématique des principales familles d'hydrocarbures et autres composés d'un pétrole avec quelques exemples de molécules modifié d'après Syakti (2004)

### **I.3. Les principaux produits de raffinage du pétrole brut**

Le raffinage du pétrole n'a cessé d'évoluer pour répondre à la demande des consommateurs souhaitant obtenir des produits plus nombreux et de meilleure qualité. Au départ, il s'agissait de produire du kérosène pour disposer d'une source de combustible d'éclairage moins onéreuse et supérieure à l'huile de baleine. La mise au point du moteur à combustion interne a conduit à la production de benzène, d'essence et de carburant diesel. (Jeanne Mager Stellman, 2000)



**Figure 2** : schéma d'une raffinerie (<http://www.cooperation.ch>)

### **I.4. Forage des hydrocarbures et impact sur l'environnement**

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. C'est le phénomène de bioaccumulation avec le piégeage par les végétaux et les animaux des polluants ou de leurs produits de dégradation jusqu'à des teneurs atteignant les seuils de toxicité (Soltani, 2004).

### **I.4 .1. Le forage pétrolier**

On appelle "forage pétrolier" l'ensemble des opérations permettant d'atteindre les roches poreuses et perméables du sous-sol, susceptibles de contenir des hydrocarbures liquides ou gazeux, L'implantation d'un forage pétrolier est décidée à la suite des études géologiques et géophysiques effectuées sur un bassin sédimentaire. Ceci nous permet de nous faire une idée de la constitution de sous-sol et des possibilités de gisements, sans pour autant préciser la présence d'hydrocarbures. L'opération de forage peut alors confirmer les hypothèses faites et mettre en évidence la nature des fluides contenus dans les roches. (Belhabib et *coll.*, 2013).

Plusieurs systèmes de forage peuvent être employés entre autres « le forage rotary » qui consiste à appliquer une force sur un outil destructif lourd (trépans) suspendu au bout d'un câble qui lui transmet, depuis la surface, un mouvement alternatif créé par un balancier.

L'avantage de cette technique est de pouvoir injecter en continu un fluide au niveau de l'outil destructif de la formation pour emporter les débris hors du trou grâce au courant ascensionnel de ce fluide vers la surface. (Belhabib et *coll.*, 2013).

### **I.4.2. Le fluide de Forage**

Le fluide de forage, appelé aussi « boue de forage » est un système composé de différents constituants liquides (eau, huile) et/ou gazeux (air ou gaz naturel) contenant en suspension d'autres additifs minéraux et organiques (argiles, polymères, tensioactifs, déblais, ciments, ... )

Plusieurs types de boue existent : des boues à base d'eau (Water Based Mud) et des boues à base d'huile (Oil Based Mud). (Belhabib et *coll.*, 2013).

### **I .4.3 Définition des bourbiers**

Dans le domaine de l'exploitation pétrolière, une panoplie des produits chimiques est employée dans la formulation des boues de forage. Ces composés de natures différentes et dont la toxicité et la biodégradabilité sont des paramètres mal définis, sont cependant déversés dans la nature.

En plus des hydrocarbures (HC, tels que le gazole) constituant majeur des boues à base d'huile, on note les déversements accidentels du pétrole, ainsi que d'une variété d'autres produits et additifs spéciaux (tensioactifs, polymères, ..) qui peuvent exister sur les sites de forage. Ces rejets sont généralement stockés dans des endroits appelés « bourbiers »

Les bourbiers « cuttings » sont principalement contaminés par des hydrocarbures

(Gasoil ou pétrole, provenant de la boue à base d'huile) et des métaux lourds (provenant principalement des additifs de la boue). (Belhabib et *coll.*, 2013).

### **I.5. Evaluation des sites pollués**

La plus grande complication reste l'évaluation de la contamination des sites suspects et l'estimation du danger qui l'associe. L'évaluation simplifiée des risques concerne l'impact des sites pollués sur des cibles bien précises. Ce risque est défini par la combinaison de trois facteurs

- Le danger de la source polluante : selon la nature et à la quantité des substances polluantes trouvées sur le site
- Le transfert des substances de la source vers les milieux.
- La cible : l'Homme seul, ou l'environnement.

### **I.6. Traitement des sols pollués par les hydrocarbures**

Les hydrocarbures en forte concentration dans l'environnement ainsi que leur transfert ont un effet néfaste vis-à-vis la santé de l'homme et les écosystèmes. Le choix d'une méthode de dépollution doit être préalablement étudié à fin d'éviter la diffusion du polluant des sites contaminés. Les différents paramètres étudiés généralement sont :

- Type de polluant
- Nature du sol et son accessibilité ainsi que sa localisation
- Date de la pollution (récente ou ancienne)
- L'étendue de la surface contaminée
- les exigences économiques et administratives

Les opérations de traitements des sols pollués peuvent se faire de plusieurs manières (physico-chimique et biologique).

Les procédés physico-chimiques englobent des traitements physiques comme les lavages et l'extraction des polluants, des traitements thermiques par incinération des produits organiques polluants réduits en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O et des traitements chimiques qui ont pour but de détruire les polluants ou les rendre moins toxiques.

Les procédés biologiques qui sont plus écologiques sont aussi employés, comme la phytoremédiation qui par certaines plantes permet de transformer les polluants dans les sols par

association (racines-microflore). Le « Landfarming » qui repose sur le déversement de terres contaminées sur des surfaces plus ou moins préparées à l'avance. L'ajustement du pH et l'additionnement de l'azote sont réalisés afin de stimuler l'activité microbienne, cette technique s'emploie hors site ou sur le site.

Une autre technique biologique par aération du sol ou *bioventing*, repose sur l'injection d'air dans le sol pour fournir aux microorganismes l'oxygène nécessaire à la biodégradation. (Bouderhem ,2011).

## **Chapitre II : La dégradation des hydrocarbures par voie microbienne et la production de Biosurfactants**

### **II.1 La bioremédiation**

#### **II.1.1. Définition**

Appelée aussi biodépollution (dépollution biologique) est une méthode efficace pour épurer les environnements contaminés par des produits polluants dangereux. Cette méthode est réalisée à l'aide de microorganismes généralement *ex situ* (hors site) dans des installations spécialisées qui sera suivie d'une technique de biodépollution des sols *in situ* ( au niveau du sol contaminé) puis la biodégradation des polluants des terres mises en andain sur le site.

La biodépollution est possible pour deux types de polluants pétroliers :

- Les hydrocarbures pétroliers (gasoils, fiouls, kérosène, huiles minérales).
- Les déchets d'exploitation et de transformation du pétrole (boues et résidus d'huiles de forages)

#### **II.1.2. Les principales méthodes utilisées dans la bioremédiation**

##### **➤ La bioaugmentation**

Cette technique consiste à introduire des cultures de microorganismes dans la zone polluée afin d'augmenter le taux de biodégradation des contaminants. La culture peut comprendre une ou plusieurs espèces de microorganismes capable de dégrader et de décontaminer les sites contenant des hydrocarbures et peuvent être soit autochtones ou bien allochtones. (Vogel, 2001).

##### **➤ La biostimulation**

Cette technique consiste à stimuler l'activité des populations microbiennes indigènes (présente dans le sol ou dans les eaux souterraines) par apport de nutriments et par ajustement des conditions du milieu (potentiel d'oxydo-réduction, humidité). (Abdelly, 2007)

## **II.2. Microorganismes aptes à dégrader les hydrocarbures**

Les microorganismes jouent un rôle important dans la biodégradation des polluants organiques dans les écosystèmes terrestres. 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).

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, et chaque genres bactériens n'est capable de dégrader qu'un nombre restreint d'hydrocarbures (Sauret, 2011).

## **II.3. Facteurs physiques et chimiques affectant la biodégradation**

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 (Costes et Druelle ,1997). Les facteurs physicochimiques influant sur la vitesse de biodégradation microbienne sont :

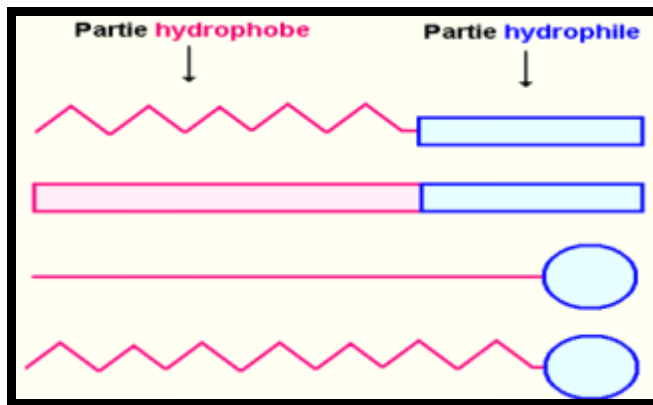
- La structure du sol et leur nature (composition structure et surtout diffusion d'oxygène).
- La composition du polluant selon Soltani 2004 (la vitesse de biodégradation est plus élevée pour les hydrocarbures saturés, viennent en suite les aromatiques légers, les aromatiques à haut poids moléculaire)
- Température (entre 25°C à 37°C.)
- Ressources en oxygène ; sous forme d'oxygène pure, air atmosphérique ou le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- La pression et l'humidité
- Les nutriments (azote et phosphore en particulier)
- Le potentiel d'hydrogène (entre 6 et 8)
- Effet de la salinité

## II.4. Généralité sur le biosurfactants

### II.4.1. Définition

Les surfactants (SURFace ACTive AgeNTS) sont des agents à activité de surface (tensioactifs), synthétisés chimiquement ou par voie biologique (biosurfactants) (Al- Arajl et coll., 2007).

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 constituée d'acides gras saturés ou non saturés (Desai et Banat, 1997).



**Figure 3 :** Représentations les plus utilisées pour illustrer les deux parties (hydrophile et hydrophobe) des molécules amphiphiles des surfactants (Larpent, 2000).

### II.4 .2. Type de biosurfactants

Contrairement aux surfactants synthétisés chimiquement, qui sont généralement classés en fonction de la nature de leurs groupes polaires, les biosurfactants sont généralement classés principalement par leur composition chimique et leur origine microbienne. Rosenberg et Ron ont classés les biosurfactants en deux classes :

- Les biosurfactants à faible poids moléculaire sont efficace dans l'abaissement de la tension interfaciale.
- Les biosurfactants à poids moléculaire élevé sont très efficace comme agents émulsifiants et stabilisateurs (Kappeli et Finnerty, 1979).

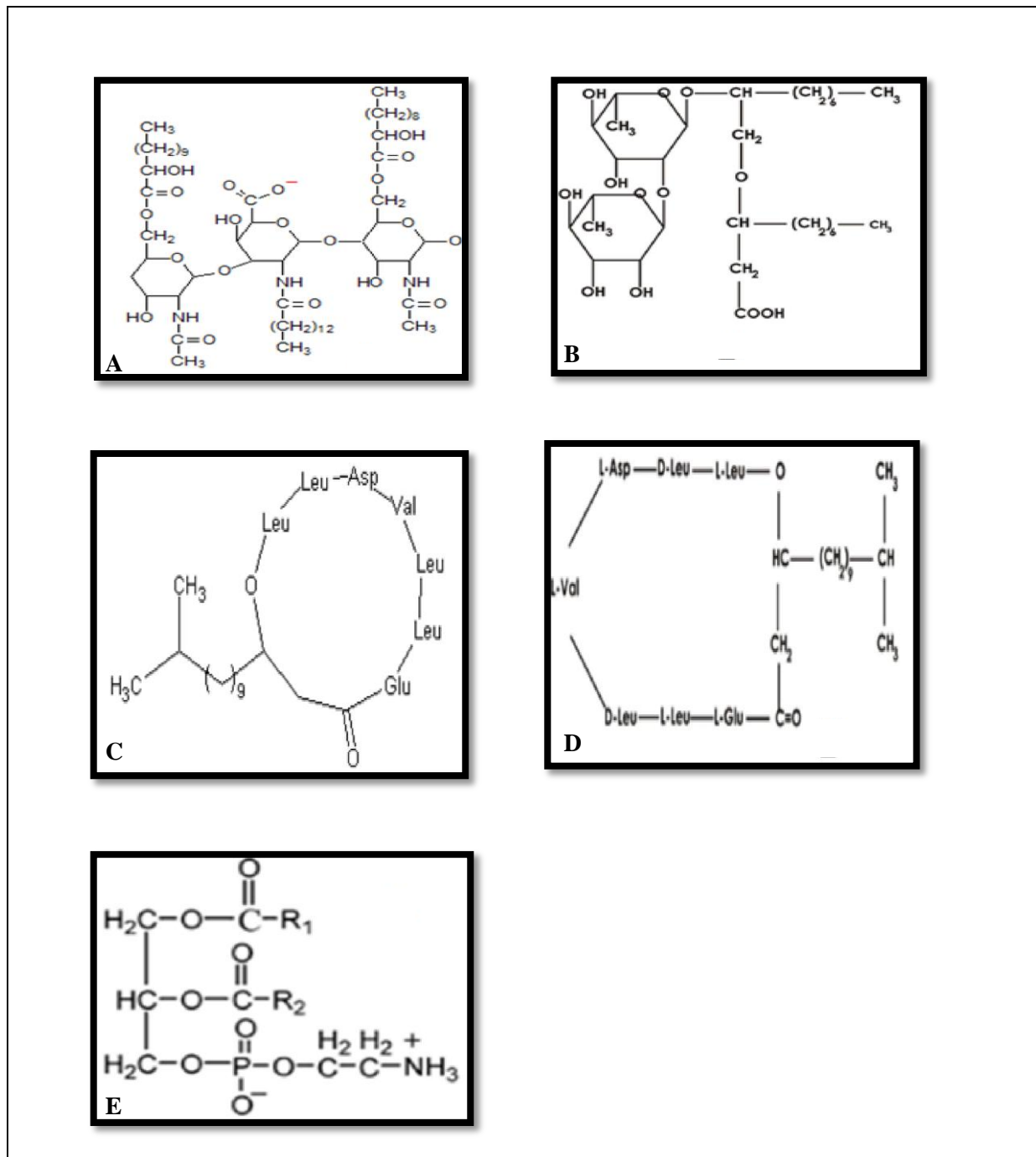


## *Synthèse bibliographique*

Les principales classes de biosurfactants à faible poids moléculaire sont : les glycolipides, les lipopeptides et les phospholipides, tandis que ceux à poids moléculaire élevé comprennent les polymériques. (Voir le tableau 1)

Tableau 1 : Source microbienne et principaux types de biosurfactants (Desai et coll., 1997).

	Biosurfactants	Organismes	Références
Glycolipides	Rhamnolipides	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Guerra-Santos L. et coll., 1984, Robert M et coll., 1989
		<i>Pseudomonas sp</i>	Hisatsuka K. et coll., 1972, Lang S. et coll., 1987, Parra J. et coll., 1989
	Trehalolipides	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Rapp P. et coll., 1979
		<i>Nocardia erythropolis</i>	Margaritis A. et coll., 1979, 1980
		<i>Mycobacterium sp.</i>	Cooper D.G. et coll., 1989
	Sophorolipides	<i>Torulopsis bombicola</i>	Cooper D.G. et coll., 1989, Gobbert U. et coll., 1984
		<i>T. apicola</i>	Hommel R et coll., 1987, Tulloch P. et coll., 1967
		<i>T. petrophilum</i>	Cooper D.G. et coll., 1983
		<i>Ustilago zae, U. maydis</i>	Boothroyd, B et coll., 1956, Syldack, C. 1985
	Lipopeptides et lipoproteins	Peptides-lipides	<i>Bacillus licheniformis</i>
Serrawettine		<i>Serratia marcescens</i>	Matsuyama, T. et coll., 1991
Surfactine		<i>B. subtilis</i>	Arima, K. et coll., 1968, Bernheimer, A.W. et coll. 1970
Gramicidines		<i>B. brevis</i>	Marahiel, M. et coll., 1977
Lipides neutres et phospholipides	Lipides neutre	<i>N. erythropolis</i>	MacDonald, C.R. et coll., 1981
	phospholipides	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	Beeba, J.L. et coll., 1971
Acide gras, lipides neutres et phospholipides	Emulsane	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Rosenberg. E et coll., 1979, Zosim, Z., 1982
	Biodispersane	<i>A. calcoaceticus</i>	Kappeli, O. et coll., 1984
	Hydrates de carbone	<i>P. fluorescens</i>	Singh, M et coll., 1989
	proteine-lipide	<i>Debaryomyces polymorphis</i>	Hisatsuka, K. et coll., 1972, 1977
Biosurfactants particuliers	Vésicules et fimbriae	<i>A. calcoaceticus</i>	Gutnick, D.L et coll., 1987, Kappeli, O. et coll., 1979



**Figure 4 :** structure de quelques biosurfactants appartenant aux différents groupes

(A) Structure de l'Emulsane

(B) Structure d'un Rhamnolipide

(C) Structure d'un lipide Neutre

(D) Structure de la Surfactine

(E) Structure d'un Phosphatidylethanolamine (surfactant parmi les vésicules et fimbriae)

### **II.4.3. Biosynthèse et rôle physiologique**

La production de biosurfactants est un phénomène communément observé lors de la croissance d'un microorganisme sur des substrats insolubles dans l'eau et la réduction de la tension superficielle du milieu ainsi que la formation d'une émulsion stable indiquent une production efficiente (Pruthi et *coll.*, 1995). Selon Adamson (1990), la présence de surfactant est nécessaire pour obtenir une émulsion stable entre deux liquides purs non miscibles (Krepky et *coll.*, 2007).

En effet, ces bactéries synthétisent les biosurfactants qui sont soit des molécules intracellulaires, extracellulaires ou localisées à la surface de la cellule (Prabhu et *coll.*, 2003) pour faciliter la diffusion des hydrocarbures ou leurs dérivés à l'intérieur de la cellule bactérienne à fin de les dégrader (Al-arajil et *coll.*, 2007).

Cependant, les biosurfactants peuvent avoir d'autres rôles aussi importants que l'émulsification, par exemple : l'adhésion aux surfaces solides et la formation de biofilms (Alasan d'*Acinetobacter*), la régulation du niveau énergétique cellulaire (sophorose de *T. bombicola*), l'activité bactéricide (gramicidine, polymexine, surfactine), la pathogénicité de certaines bactéries (rhamnolipides de *Pseudomonas*), ainsi que le piégeage des métaux lourds (Vandecasteele, 2008).

### **II.4.4 Utilisation des biosurfactants**

Les biosurfactants sont reconnus pour être non toxiques, biodégradables et peuvent être utilisés dans des conditions extrêmes

- Ils sont utilisés dans de nombreux domaines :
- L'industrie pétrochimique
- La protection de l'environnement et la remédiation.
- La dépollution marine et des sols contaminés par les hydrocarbures.
- En agriculture pour la formulation d'herbicides et de pesticides
- En pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaire.

## **II.5. Caractérisation des biosurfactants par chromatographie sur couche mince**

L'une des techniques de caractérisation des biosurfactants est la chromatographie sur couche mince (CCM) qui conduit à la séparation des constituants d'un mélange basée sur leur affinités respectives pour deux phases, une couche fine de gel de silice ( $\text{SiO}_2$ ), amorphe qui présente une grande porosité et électronégativité, ce qui sert à une polarité trop élevée. Cette phase est appelée phase stationnaire. Une autre phase appelée mobile est formée d'un solvant ou de plusieurs (éluant) qui migrent sur la plaque de silice, ces solvants sont utilisés selon leurs polarités (dans un ordre croissant):

- Ether de pétrole
- Cyclohexane
- Ether diéthylique
- Chloroforme
- Acétate d'éthyle
- Ethanol
- Méthanol
- Eau
- Acide acétique

Le choix d'éluant reste le point crucial pour réussir une bonne séparation en CCM, il dépend de la polarité des constituants que l'on a à séparer lors de la mise au point par essai de divers solvants purs ou en mélange ([www.dlecorgnechimie.fr](http://www.dlecorgnechimie.fr)).

# **MATERIEL ET METHODES**

## 1. Description du site de prélèvement

Pour la réalisation de nos expériences, nous avons utilisé un échantillon de sol pollué issu d'un borbier à base d'huile constituant l'endroit de rejet de l'exploitation d'un gisement de gaz et de pétrole dans la région d'Ain Salah (sol sableux noir, imbibé de fluides de forage et surtout de pétrole).

Commune de la wilaya de Tamanrasset, cette ville en plein cœur du Sahara algérien présente un climat désertique chaud (Classification de Köppen bwh) typique de la zone saharienne hyper aride, caractérisé par un été torride, très long et un hiver tiède, avec des jours chauds et des nuits fraîches.

La zone située au cœur du Sahara algérien, délimitée par Adrar - Reggane - In Salah, est appelée le « triangle de feu » à cause des maxima quotidiens qui dépassent régulièrement 50°C durant les mois les plus chauds (Henri Poumérولية 2001).

Le prélèvement était fait en mois de juin (2015), et les échantillons étaient préservés à 4°C jusqu'à être analysés.

**Tableau 2 :** Données climatiques à Ain Salah (climat désertique chaud - zone saharienne hyper aride), (Infoclimat 2000-2005)

Mois	jan.	fév.	mars	avril	mai	juin	juil.	août	sep.	oct.	nov.	déc.	année
Température minimale moyenne (°C)	7,2	9,6	14,2	18,1	23,3	27,5	30,6	30,2	26,7	21,3	13,1	8,9	19,28
Température moyenne (°C)	14,7	17,2	22,4	26,6	31,4	35,7	38,5	37,8	34,3	28,8	20,6	16	27,05
Température maximale moyenne (°C)	22,2	24,9	30,5	35,2	39,6	43,8	46,4	45,3	41,9	36,2	28	23,2	34,83
Précipitations (mm)	1,4	0,6	0,6	0,7	0,2	0,1	0	0	0,9	1,9	7,3	0,4	14,1
Humidité relative (%)	41,3	35	27,2	22,8	17,9	13,1	11,9	12,4	16,2	23,5	30,9	41,9	24,51



**Figure 05** : bournier situé à Teguentour Ain saleh sud Algerie  
site de prélèvement 14 juin 2015.

## **2. Mesure du potentiel d'hydrogène**

La mesure du pH de l'échantillon a été effectuée au niveau du laboratoire de biotechnologie de l'université Constantine, à l'aide d'un pH mètre de type « SARTORIUS AGCOTTINGEN ».

Le pH est déterminé selon la norme AFNOR X 31-103 (AFNOR, 1994).

Une suspension de sol est préparée dans l'eau distillée à 2/5 (rapport masse/volume).

Après une heure d'agitation puis décantation, la sonde est plongée dans la solution et la valeur est enregistrée.

## **3. Analyses microbiologiques du sol**

### **3.1. Matériel**

Pour la dilution des échantillons, nous avons besoin d'eau physiologique stérile, tubes stériles, une micropipette et un vortex, une balance.

Pour l'ensemencement et la purification, nous utilisons des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive ordinaire (GN).



### **3.2. Dilution décimale**

Afin de dénombrer la microflore bactérienne existant dans l'échantillon, la solution mère du sol est préparée (10gr de sol dans 90mL de bouillon nutritif) suivie d'une série de dilutions décimales allant de  $10^{-1}$  (**solution mère**) à  $10^{-8}$  en conditions d'asepsie sous une hotte à flux laminaire de type « KOTTERMANN ».

### **3.3. Isolement des bactéries**

On prélève 0,1 ml de chaque dilution préparée qu'on ensemence par étalement sur les boîtes de Pétri contenant de la GN à l'aide d'un râteau. L'incubation des boîtes se fait à 30°C pendant 24h.

### **3.4. Dénombrement des bactéries**

Le dénombrement après culture concerne, évidemment les cellules viables de l'échantillon autrement dit, les cellules capables de croître. Il est basé sur l'aptitude de chaque bactérie, fixée par la solidification du milieu gélosé, à former une colonie visible à l'œil nu (Austin, 1988).

Après 24h d'incubation à 30°C, les colonies développées sont dénombrées à l'aide d'un compteur de colonies en UFC (Unité Formant Colonie).

Le nombre de germes par gramme de sol est déterminé en calculant la moyenne Arithmétique des résultats obtenus et en tenant compte des facteurs de dilution, selon la formule (Marchal et Bourdon ,1982):

$$N = n / d \cdot v$$

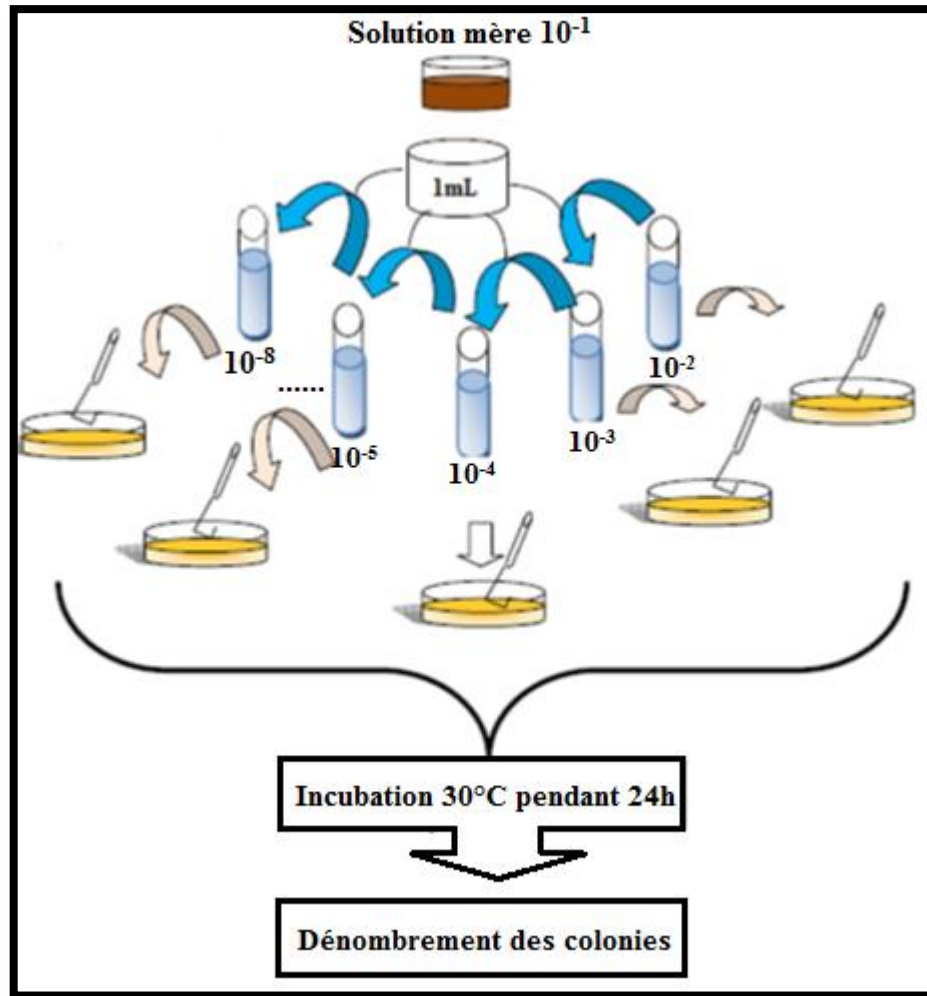
Où :

N : nombre des microorganismes en UFC/ ml.

n: nombre des colonies dénombrées.

v: Volume prélevé (0.1ml).

d: Dilution).



**Figure 06 :** Schéma de d'isolement et dénombrement des bactéries

### 3.5. Purification des isolats

Après 24 h d'incubation, nous passons à l'étape de purification des cultures. Celle-ci nous permet d'obtenir des cultures pures à partir des différentes colonies isolées. La sélection des colonies est basée sur l'aspect macroscopique des colonies à savoir la couleur, la forme, le diamètre, l'opacité. Un échantillon de chaque type de colonie est prélevé et ensuite purifié par repiquages successifs et alternés en milieu liquide, puis en milieu solide jusqu'à l'obtention au sein d'une boîte de Pétri de colonies identiques par l'aspect et la couleur. (Delarras, 2007).

### 3.6. Conservation des isolats

Les isolats sont conservés dans des tubes Eppendorf à 4 °C sur milieu solide (GN) et à -20°C sur bouillon nutritif additionné de glycérol (1:1, v/v) UFC (Obayori *et al.* 2009).

## **4. Caractérisation phénotypique des souches sélectionnées**

Une observation microscopique après coloration de Gram et des spores ainsi que quelques tests biochimiques préliminaires (oxydase et catalase), sont réalisés dans l'objectif de caractériser les isolats et les classer au sein de groupes, pour faciliter la suite d'étude.

### **4.1. Etude des caractères morphologiques**

#### **4.1.1. Aspect macroscopique**

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation. D'après Joffin et Leyral (2006), les éléments d'identifications macroscopiques sont:

- **La forme des colonies** : circulaire, irrégulières, filamenteuse, punctiforme.
- **La couleur** : jaune, crème, rouge, incolore.
- **L'élévation**: convexe, bossue, élevée, plate.
- **L'opacité**: opaque, translucide ou transparente.
- **Le bord** : régulier, ondulé, dentelé, filamenteux.
- **L'aspect** : lisse, rugueuse, muqueuse.

#### **4.1.2. Aspect microscopique**

Une observation sous microscope des bactéries à l'état frais permet de voir la mobilité. La forme et le mode de regroupement seront déterminés par une coloration au bleu de méthylène.

Une coloration de Gram est faite pour classer les bactéries et confirmer leur pureté en plus d'une coloration au vert de Malachite pour voir la présence des spores de résistance.

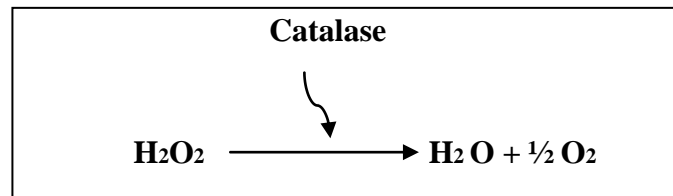
## **5. Test à la potasse (solution aqueuse à 3 % de KOH)**

Test KOH est effectuée en utilisant une goutte de 3 % d'hydroxyde de potassium sur une lame de verre. Une anse visible de cellules à partir d'une seule colonie bien isolée est mélangée dans la goutte. Si le mélange devient visqueux et filant dans les 60 secondes de mélange (KOH positif), alors la colonie est considérée comme Gram- négatifs. La réaction dépend de la lyse de la cellule gram-négative dans la solution alcaline diluée libérer l'ADN cellulaire pour transformer la suspension aqueuse en une solution visqueuse. Cette méthode a été montrée efficace pour *Bacillus* spp (Carlone et al., 1983 Gregersen 1978). Cela peut servir comme un complément précieux à la méthode classique de la coloration de Gram (Von Graevenitz et Bucher 1983).

## 6. Recherche des enzymes respiratoires

### 6.1. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) avec dégagement d'oxygène selon la réaction suivante:



Sur une lame et à l'aide d'une pipette Pasteur, on dépose une colonie bactérienne à laquelle on ajoute de l'eau oxygénée (à 10 volumes = 3%).

La présence d'une catalase est révélée immédiatement par des bulles de gaz qui correspondent à l'oxygène dégagé (Marchal et Bourdon, 1982)

### 6.2. Recherche de l'oxydase

Ce test permet la détection de la phénylène-diamine-oxydase ou le cytochrome oxydase enzyme entrant dans divers couples d'oxydoréduction.

Pour réaliser ce test, un disque d'oxydase préalablement imbibé d'une goutte d'eau distillée stérile est déposé sur une lame et mis en contact avec une colonie bactérienne fraîchement cultivée. L'apparition d'une coloration violette immédiatement indique que le test est positif (Singleton, 1999).

## 7. Sélection des souches productrices de biosurfactants

### 7.1. Matériel

Nous avons besoin de tubes à essai stériles, de micropipette, de vortex, des bouillons de 24h des souches à tester, Kérosène et Gasoil et pétrole brut.

### 7.2. Index d'émulsification

Une activité d'émulsification ( $E_{24}$ ) est mesurée selon la méthode de (Bodour *et al.* 2003) légèrement modifiée.

Quatre millilitres de suspension bactérienne de 24h, sont additionnés de 6ml de kérosène, chaque tube à essai est ensuite agité au vortex pendant 2 min, les tubes sont laissés au repos pour

une heure de temps, une évaluation et une comparaison des émulsions obtenues sont effectuées visuellement. Le calcul de l'indice d'émulsion est réalisé 24h après. Le même protocole est réalisé avec du Gasoil et du pétrole brut afin d'établir une comparaison des trois.

L'équation utilisée pour déterminer l'indice d'émulsification ( $E_{24}$  %) est la suivante:

$$E_{24} = \frac{E}{E'} \cdot 100$$

- avec  $E$ : la longueur de la couche émulsifiée
- et  $E'$  : La longueur totale du mélange.

## **8. Test du déplacement d'huile**

Pour l'essai du déplacement d'huile, 10  $\mu$ l de pétrole brute est ajoutée à la surface de 30ml d'eau distillée dans une boîte de Pétri pour former une mince couche d'huile.

Ensuite 10 $\mu$ l de la culture ou du surnageant sont placés doucement au milieu de la couche d'huile. Si le biosurfactant est présent dans le surnageant, l'huile est déplacée, et un halo clair et visible (zone de compensation) est formé (Morikawa et al., 1993).

## **9. Test de biodégradation**

Le milieu M2 (Voir annexe 2) additionné de 2% de pétrole brut est utilisé pour ce test, avec des concentrations en extrait de levure modifiées vu qu'il constitue un apport de carbone. Trois géloses sont prévues pour chaque souche : une sans extrait de levure, deux autres avec 0,5g/l et 1g/l respectivement afin de réaliser une comparaison et confirmer la capacité de dégradation du pétrole comme unique source de carbone par ces bactéries. Ce test est suivi pendant cinq jours.

## **10. Suivi de la cinétique de croissance en présence du pétrole brut**

La sélection des trois meilleures souches productrices de biosurfactants est basée sur les résultats du test d'émulsification.

Le suivi est fait sur bouillon lysogène (LB) préparé selon la formule (voir annexe 2) et autoclavé puis réparti sur neuf flacons à raison de 100ml par flacon.

Afin de préparer l'inoculum, des cultures de 48h sur gélose M2 additionné de 2% de pétrole brut sont faites.

1ml d'eau distillée stérile est déposé sur chaque boîte et émulsionné avec la culture. La suspension obtenue est récupérée à l'aide d'une seringue stérile et mélangée à 20ml du milieu LB,

le mélange est ensuite agité au vortex et la mesure de la densité optique (DO) est effectuée à 600nm.

On procède par des dilutions avec le milieu LB stérile jusqu'à atteindre une DO = 0,1 correspondant à une charge de  $10^7$  UFC/ml. Cette valeur est appliquée aux trois souches afin de standardiser les densités de départ.

Les flacons du milieu LB additionnés de 1% de pétrole brut sontensemencés avec 5% de l'inoculum préparé (5ml) incubés à la température ambiante sous agitation constante (200rpm) sur un agitateur (marque) pour une meilleure aération et les mesures de la DO et du pH sont effectuées chaque heure de temps pendant cinq jours en partant de  $t_0$ .

### **11.Extraction des biosurfactants**

Après une semaine d'agitation, les 100mL de chaque mout de fermentation sont divisés en deux, 50 mL pour chaque protocole d'extraction.

La première technique est une extraction par précipitation acide (technique de Lapointe, 1996 modifiée). Elle consiste à éliminer les cellules bactériennes par centrifugation (4500 rpm 4°C, 35 min) dans une centrifugeuse du type « Hettich, UNIVERSAL 320R ». Ensuite, le pH du surnageant est baissé par ajout d'HCl 6N jusqu' à environ 2.0, cela va précipiter le biosurfactant. La suspension acidifiée est gardée dans le réfrigérateur à 4°C pendant la nuit.

Une deuxième centrifugation est effectuée et la masse obtenue au fond du tube constitue le biosurfactant partiellement purifié. Cette masse est dissoute dans l'éthyle acétate (5mL) et lavée deux fois à l'NaCl (1mL), puis trois fois à l'eau distillée stérile afin de purifier le biosurfactant.

La deuxième technique est une extraction organique (technique de Carrillo et *col.* 1996 modifiée aussi). En premier lieu, 20% du solvant organique (éthyle acétate) est additionné à 50mL du mout de fermentation, le tout est centrifugé à 4500 rpm à 4°C durant 45mn. Après centrifugation, le mélange se séparera en trois phases, une phase solide (cellules bactériennes) et deux liquides. Les biosurfactants vont passer dans la phase éthyle acétate, et la deuxième phase va subir deux à trois fois la même opération pour extraire le maximum de biosurfactant.

Ensuite, les phases éthyle acétate récupérées sont mélangées et transférées dans le Rotavapor du type « BÜCHI, ROTAVAPOR R110 » afin d'évaporer le maximum du solvant organique et concentrer les extraits dans un très faible volume.

## **12. Chromatographie sur couche mince (CCM)**

En 1941, Archer John Porter Martin et Richard Laurence Millington Synge publient la théorie de la chromatographie de partage sur gel de silice dont le principe repose sur une migration de plusieurs solutés selon la différence de leur miscibilité entre deux phases, une phase stationnaire (gel de silice) et une phase mobile (éluant).

Sur une plaque chromatographique à base de gel de silice, les trois extraits de chaque technique sont piqués à l'aide d'un capillaire, à 0,5 cm du bord de la plaque (dimensions en mm). Le pétrole brut est aussi piqué puisqu'il est contenu dans les extraits.

Dans une cuve en verre, un volume du solvant ou l'éluant (mélange de solvants) est versé, la hauteur de ce dernier ne doit pas dépasser les points de dépôt.

Des essais sont effectués avec 100% éthyle acétate, 50% éthyle acétate /50% n-hexane, 100% n-hexane et 100% éther de pétrole, enfin 33% de Méthanol, chloroforme et eau distillée.

La plaque est posée en position verticale légèrement inclinée sur le bord de la cuve, avec le 0,5 cm immergé dans le solvant qui va monter progressivement vers le haut.

La cuve est recouverte d'un couvercle pour créer une atmosphère saturée en solvant.

Lorsque le front de migration atteint le top de la plaque (-1cm), elle est récupérée pour être observée à l'obscurité sous une lampe UV.

Les taches observées présentent les différentes composantes des biosurfactants.

# RESULTATS ET DISCUSSIONS



## 1. Potentiel d'hydrogène

L'échantillon du sol étudié présente un pH légèrement alcalin de 7,59 après une stabilité du pH mètre qui a duré plus 30 minutes. Cette valeur est en liaison avec la composition complexe des boues de forage, qui contiennent une variété de substances, en autres des argiles (ex : Les bentonites), des additifs minéraux (NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CaSO<sub>4</sub>, Ca (OH) <sub>2</sub>), NaHCO<sub>3</sub>), des produits organiques spéciaux (ex : anti-corrosion) ...etc.

Selon (Leahy et Cotwell, 1990) le pH alcalin des échantillons prélevés de bourbiers est influencé par celui des boues rejetées nécessaires afin d'éviter la corrosion du matériel de production. Ce pH du bourbier proche de la neutralité, favoriserait la croissance des bactéries et des champignons et par conséquent assurait un déroulement efficace de la biodégradation des hydrocarbures).

## 2. Analyses microbiologiques du sol

Le résultat du dénombrement sur gélose nutritive obtenus pour les différentes dilutions a permis d'avoir une idée sur la charge bactérienne du site pollué ainsi que de sa diversité. Les valeurs sont rapportées dans le tableau 3.

**Tableau 3 :** Dénombrement de la microflore totale.

Boîtes de dilution	Nombre des microorganismes en UFC/g.
1 (10 <sup>-1</sup> )	Indénombrable
2(10 <sup>-2</sup> )	Indénombrable
3(10 <sup>-3</sup> )	Indénombrable
4(10 <sup>-4</sup> )	Indénombrable
5(10 <sup>-5</sup> )	Indénombrable
6(10 <sup>-6</sup> )	2,84 .10 <sup>8</sup>
7(10 <sup>-7</sup> )	5,8 .10 <sup>8</sup>
8(10 <sup>-8</sup> )	8 .10 <sup>8</sup>

Selon Dommergues et Manganot (1970), les densités bactériennes dans les sols soumis à des conditions écologiques dures (régions arides et régions polaires), sont faibles mais elles ne tombent rarement en dessous de 10<sup>4</sup> - 10<sup>5</sup> germes /g de sol sec dans les horizons superficiels,

Le dénombrement a montré une charge bactérienne aux alentours de  $10^8$  UFC/g de sol, malgré les conditions éco-climatique du site et la présence des polluants. Cela ne s'explique que par le fait de l'adaptation des bactéries aux conditions extrêmes, et l'utilisation de xénobiotiques comme source de carbone et d'énergie.

En tenant compte uniquement des bactéries cultivables, la variété des aspects, par contre n'est pas très élevée, cela nous a permis de sélectionner à partir de 17 isolats 6 seulement qui sont vraiment différentes sur le plan macroscopique.

### 3. Etude des caractères morphologiques

Les caractères macroscopiques des souches isolées sont regroupés dans le tableau 4.

**Tableau 4 :** Caractères macroscopiques des colonies isolées sur gélose nutritive.

Souches	Forme	Élévation	Bord	couleur	Aspect	Opacité	consistance
1	Circulaire	Convexe	Régulier	Jaune	Lisse	Opaque	Crémeuse
2P deux aspects	Circulaire	Convexe	Régulier	Pigment rose	Lisse	Opaque	Crémeuse
	Irrégulière	Plane	Irrégulier	Jaune	Rugueuse	Opaque	Crémeuse
3	Punctiforme	Plane	Régulier	Irisé	Lisse	Transparente	Visqueuse
4	Circulaire	Bossue	Régulier	Jaune	Lisse	Opaque	Incrusté
5	Irrégulière	Plane	Dentelé	Crème	Rugueuse	Opaque	Sèche
6	Circulaire	Elevé	Régulier	Crème	Rugueuse	Opaque	Visqueuse

L'observation macroscopique montre des colonies bien séparées avec des caractères spécifiques qui différencient les souches. Cependant, la souche 2P qui produit un pigment rose après 48h d'incubation, présente deux aspects différents inséparables, même après plusieurs tentatives de purification de chaque aspect (une quinzaine de repiquages) l'obtention des deux isolats ensemble été inévitable.

D'après les observations, il ressort que les souches isolées sont de forme et de gram différents. Les souches (8),(6) et (7) sont des bacilles à Gram positif, la souche (1) bacilles à Gram négatif alors que la souche est un (5) cocci à Gram positif, la souche (2P) qui présente deux aspects différents, un bacille à Gram négatif et l'autre est un cocci à Gram positif.

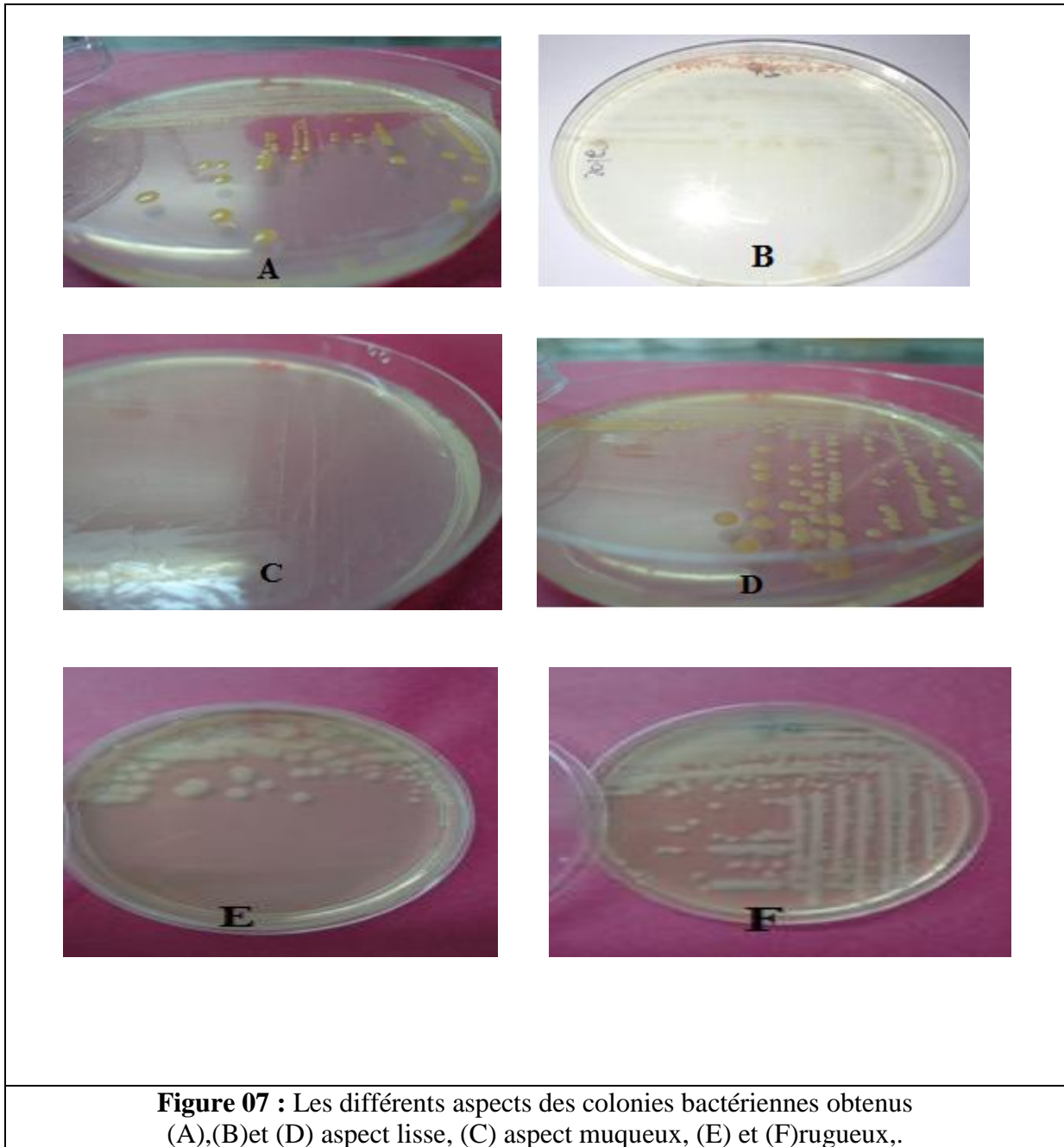
Le Gram est confirmé aussi par le test à la potasse (KOH à 3%). Voir le tableau 5.

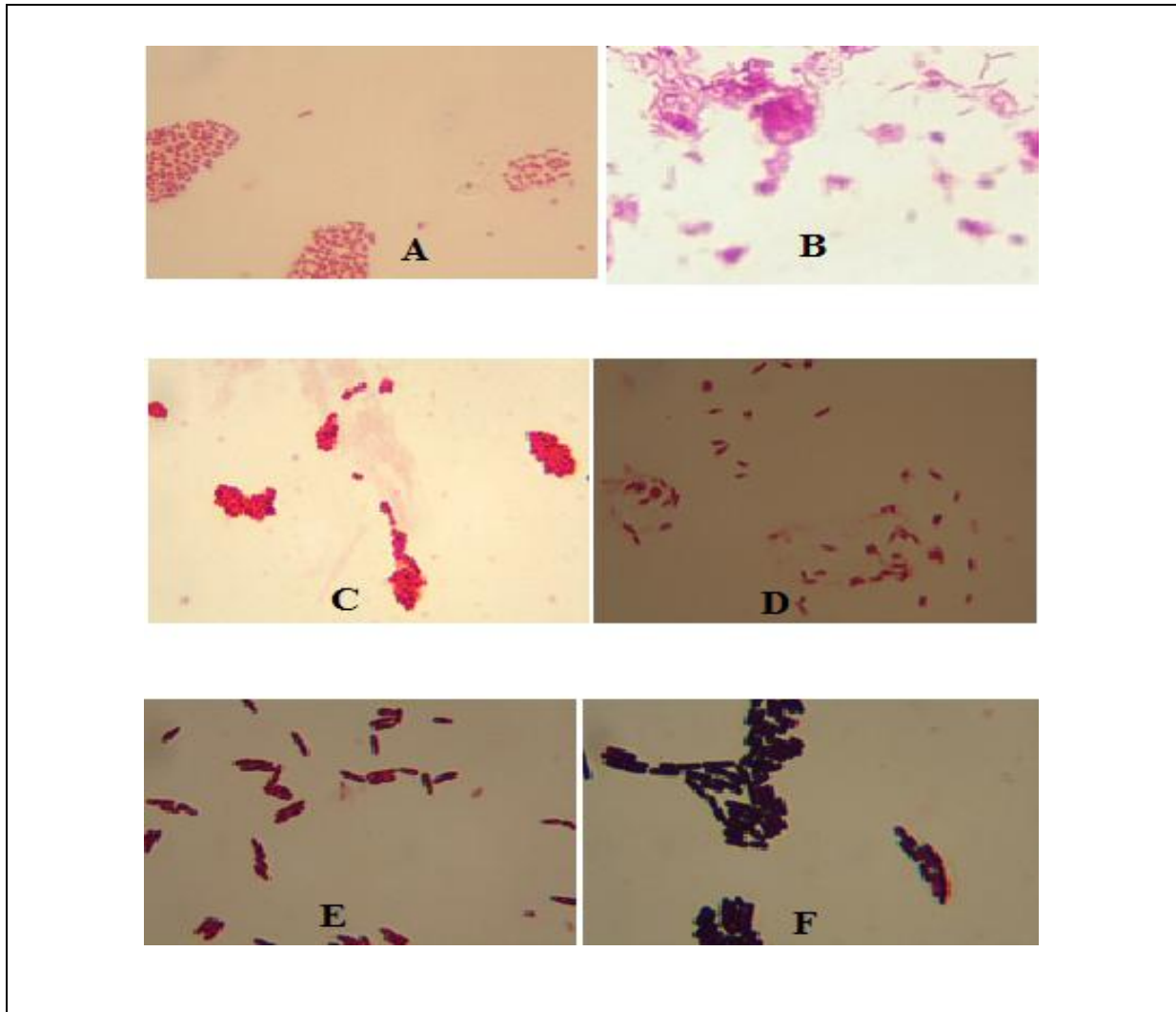
**Tableau 5** : Résultat de la coloration de Gram et du test KOH.

<b>Souche</b>	<b>Test KOH</b>	<b>Gram</b>
<b>1</b>	+	-
<b>2P</b>	/	/
<b>3</b>	-	+
<b>4</b>	-	+
<b>5</b>	-	+
<b>6</b>	-	+

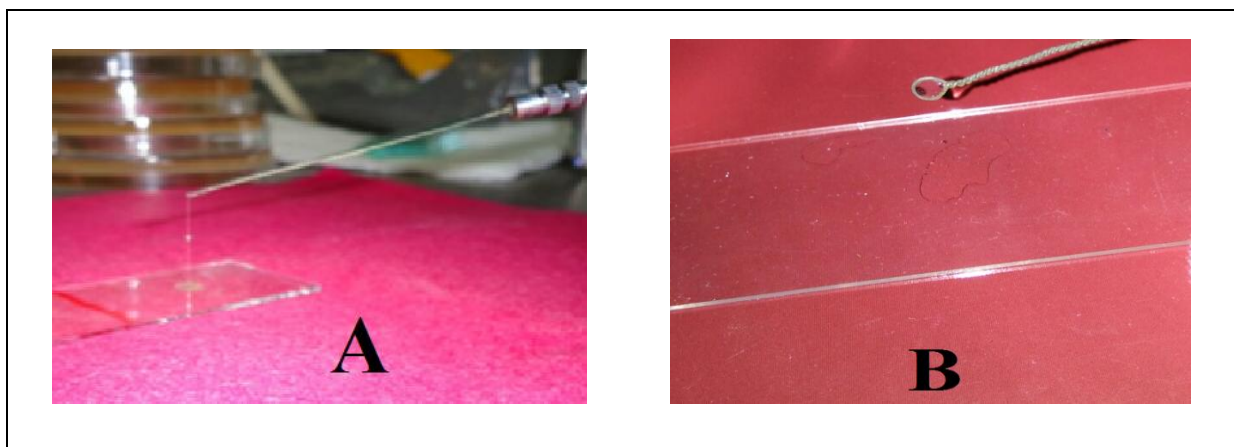
**Gram** : (-) négatif, (+) positif.

**Test KOH** : (-) absence de filament, (+) formation d'un filament (mélange visqueux)





**Figure 08 :** Les différents aspects microscopique obtenus : (A) bacille G-, (B) bacille G- et coque G+, (C) coque G+, (D)(E)(F) bacilles G+



**Figure 09 :** Confirmation du Gram par le KOH (A) formation du filament (B) absence du filament.

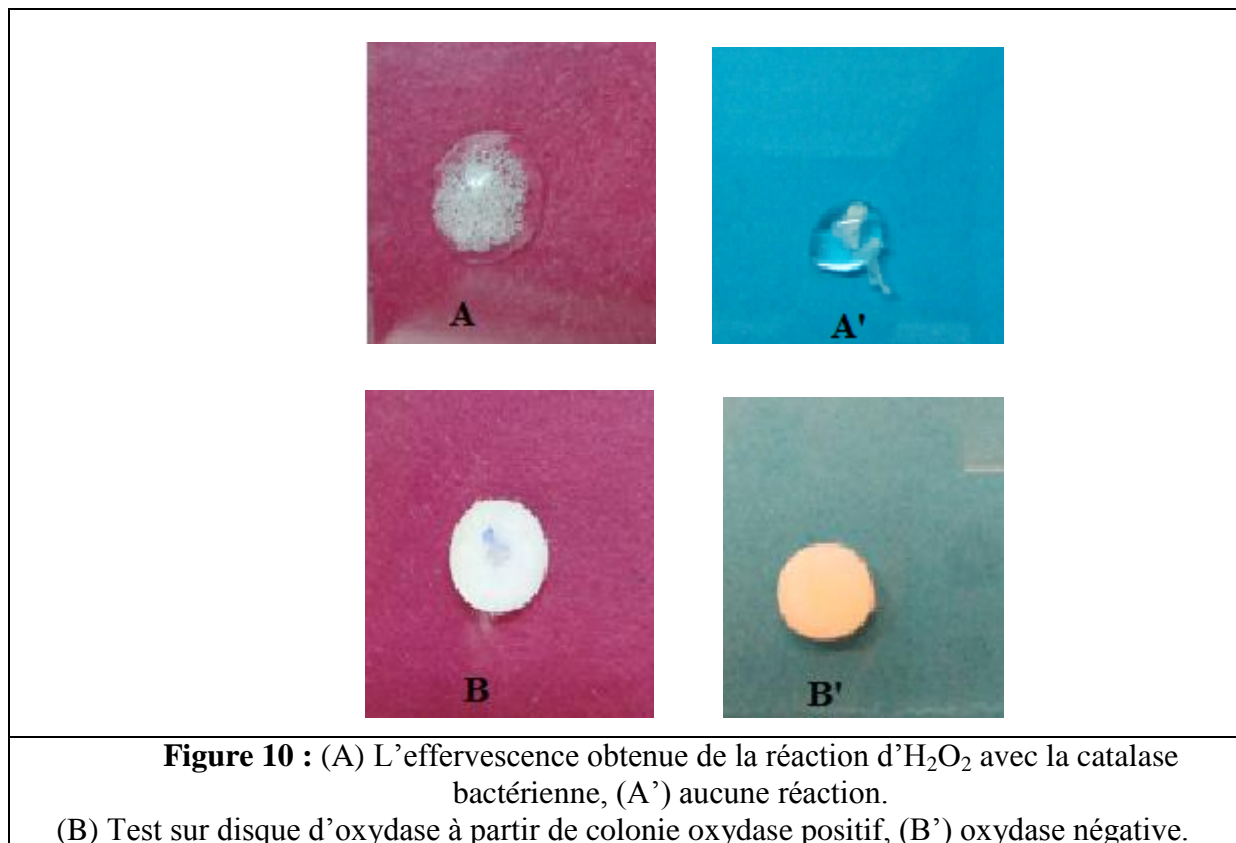
#### 4. Recherche des enzymes respiratoires

Le dégagement des bulles de gaz par les souches (1),(2P),(4),(5),(6) révèle la présence de l'enzyme catalase sauf pour la souche (3) qui ne possède pas d'enzyme.

Pour le test de l'oxydase toutes les souches ont un résultat négatif à part la souche (6). (Tableau 6).

**Tableau 6** : Résultats de la présence des enzymes respiratoire

Souche	Oxydase	Catalase
<b>1</b>	-	+
<b>2P</b>	-	+
<b>3</b>	-	-
<b>4</b>	-	+
<b>5</b>	-	+
<b>6</b>	+	+



D'après les résultats obtenus de la coloration de Gram et des tests d'enzymes respiratoires une petite orientation présomptive vers des groupes bactériens est faite.

La souche (1) bacille à Gram négatif, catalase positive mais qui n'a pas d'oxydase est soupçonnée appartenir à la famille des *Enterobacteriaceae*.

La souche (3) coque à Gram positif avec catalase et oxydase négatives appartient aux *Streptococcaceae*.

Les souches (4) et (5) sont des bacilles à Gram positif non sporulés.

Et en fin, la souche (6) un gros bacille, ayant un Gram positif, sporulé, à une catalase positif appartient à la famille des *Bacillaceae*.

## **5. Sélection des souches productrices de biosurfactants**

### **5.1. Test d'émulsification**

Sur kérosène les valeurs les plus élevées sont observées chez la 2P, 1 et puis la 5 avec des valeurs respectives de 71.15% 69.29% 51.92%.(Tableau 7)

La même chose est observée dans le gasoil avec des index d'émulsification plus faibles 48.07% 11.53% 3.84% respectivement 2P 1,5. (Tableau 8)

Il n'y a pas eu d'émulsification dans les souches 3 pour le gasoil et 6 pour le gasoil et le kérosène qui présentent un index d'émulsification de 0%

Pour le pétrole l'émulsification n'est pas visible avec toutes les souches, qui peut être due à sa couleur aussi bien que sa composition sachant que le pétrole brut c'est la matière première qui va subir une distillation pour son raffinage. Le gasoil et le kérosène constituent alors des produits de raffinage.

Les meilleurs résultats sont obtenus par comparaison au gasoil ceci peut être dû aux degrés de raffinage (le kérosène est plus léger et ne contient pas de soufre).

**Tableau 7 :** Calcul de l'index d'émulsion sur kérosène.

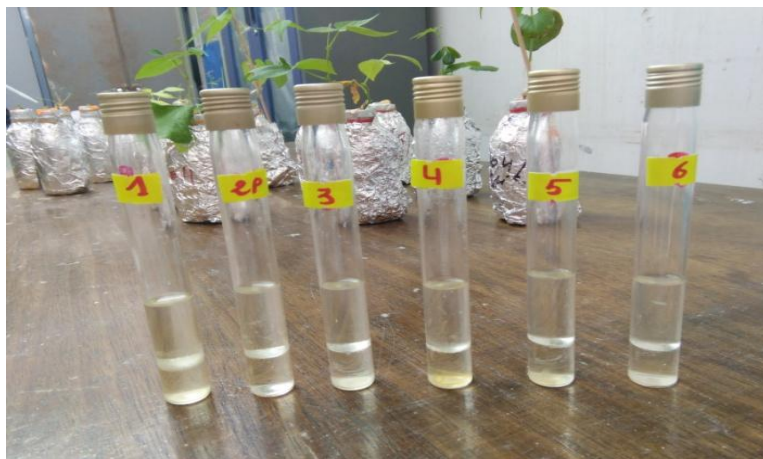
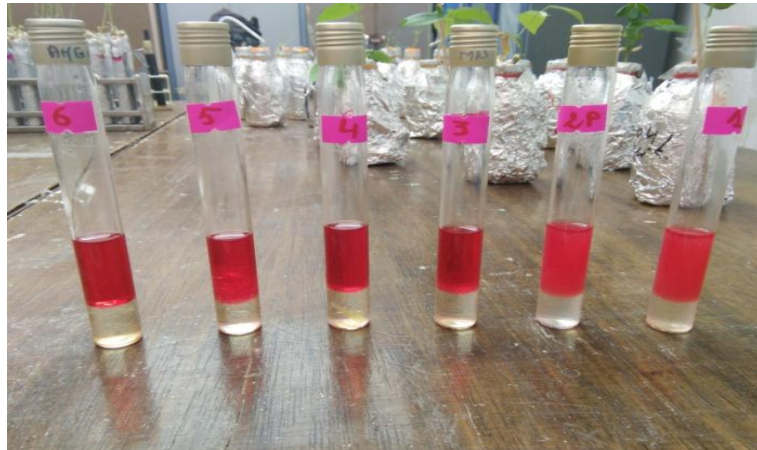
<b>Souche pour kérosène</b>	<b>Longueur de la couche émulsifiée (cm)</b>	<b>Index (E<sub>24</sub>)</b>	<b>Stabilisation après 15 jours</b>
<b>1</b>	3.6	69.23%	+++
<b>2p</b>	3.7	71.15%	+++
<b>3</b>	0.5	9.61%	+++
<b>4</b>	0	0%	- - -
<b>5</b>	2.7	51.92%	++
<b>6</b>	0	0%	++

**Tableau 8 :** Calcul de l'index d'émulsion sur Gasoil.

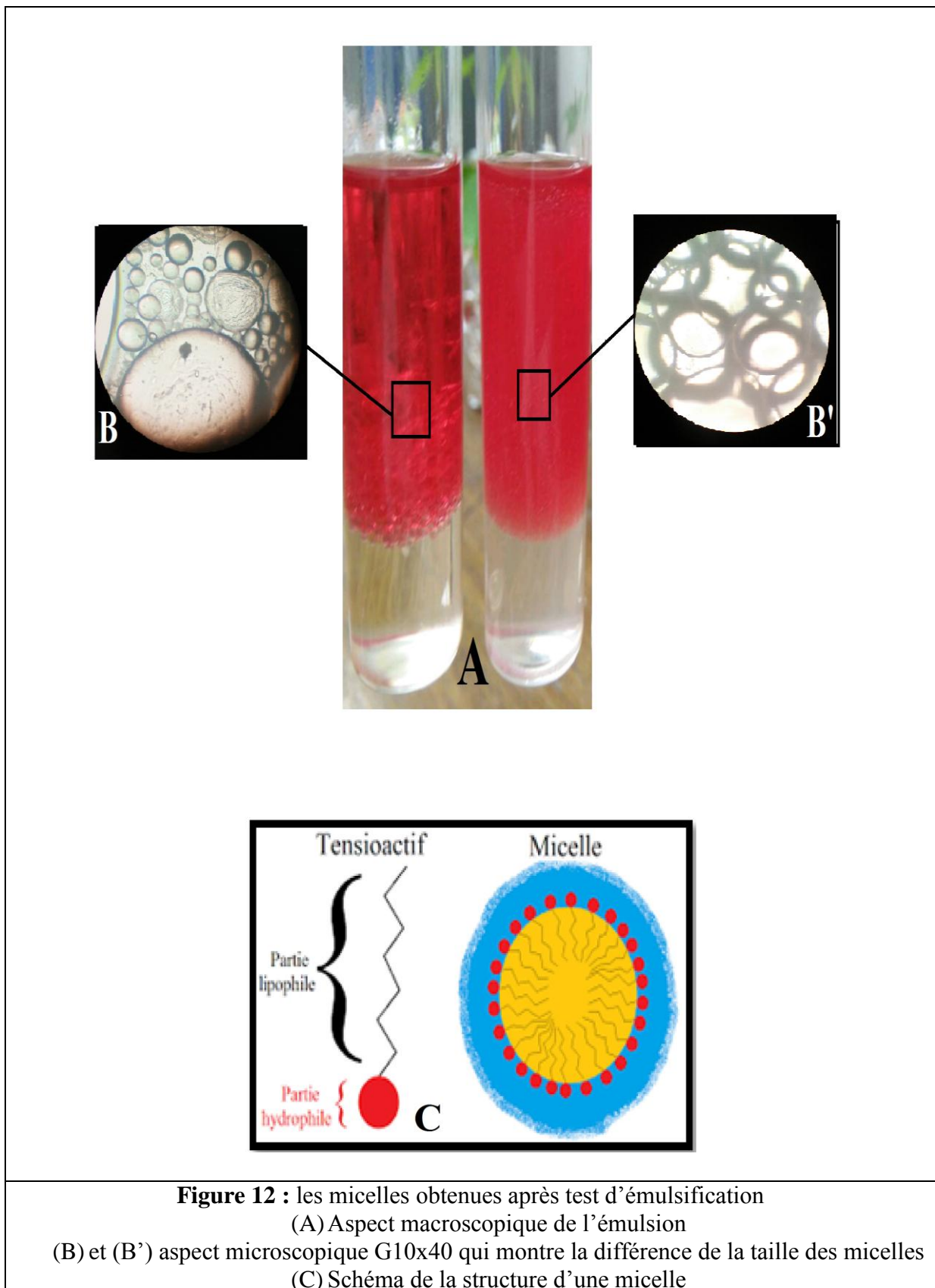
<b>Souche pour gasoil</b>	<b>Longueur de la couche émulsifiée (cm)</b>	<b>Index (E<sub>24</sub>)</b>	<b>Stabilisation après 15 jours</b>
<b>1</b>	0.6	11.53%	+++
<b>2p</b>	2.5	48.07%	++
<b>3</b>	0	0%	+++
<b>4</b>	0.1	1.92%	+++
<b>5</b>	0.2	3.84%	- - -
<b>6</b>	0	0%	+++

+++ Stable, ++ moins stable, - - - aucune stabilité





**Figure 11** : Variation du taux d'émulsification d'une souche à un autre et entre les différents types d'hydrocarbures.



**Figure 12** : les micelles obtenues après test d'émulsification

(A) Aspect macroscopique de l'émulsion

(B) et (B') aspect microscopique G10x40 qui montre la différence de la taille des micelles

(C) Schéma de la structure d'une micelle

## 5.2. Test du déplacement d'huile

**Tableau 9** : Résultat du test de déplacement d'huile

Isolats	Déplacement
1	3,2cm
2P	5cm
3	2cm
4	1,5cm
5	4,3cm
6	2,7cm

D'après le tableau 9 le meilleur résultat est obtenu avec la souche 2P avec une valeur de 5 cm de déplacement, les souches 5 et 1 ont aussi donné des valeurs élevées de 4,3 et 3,2 respectivement.

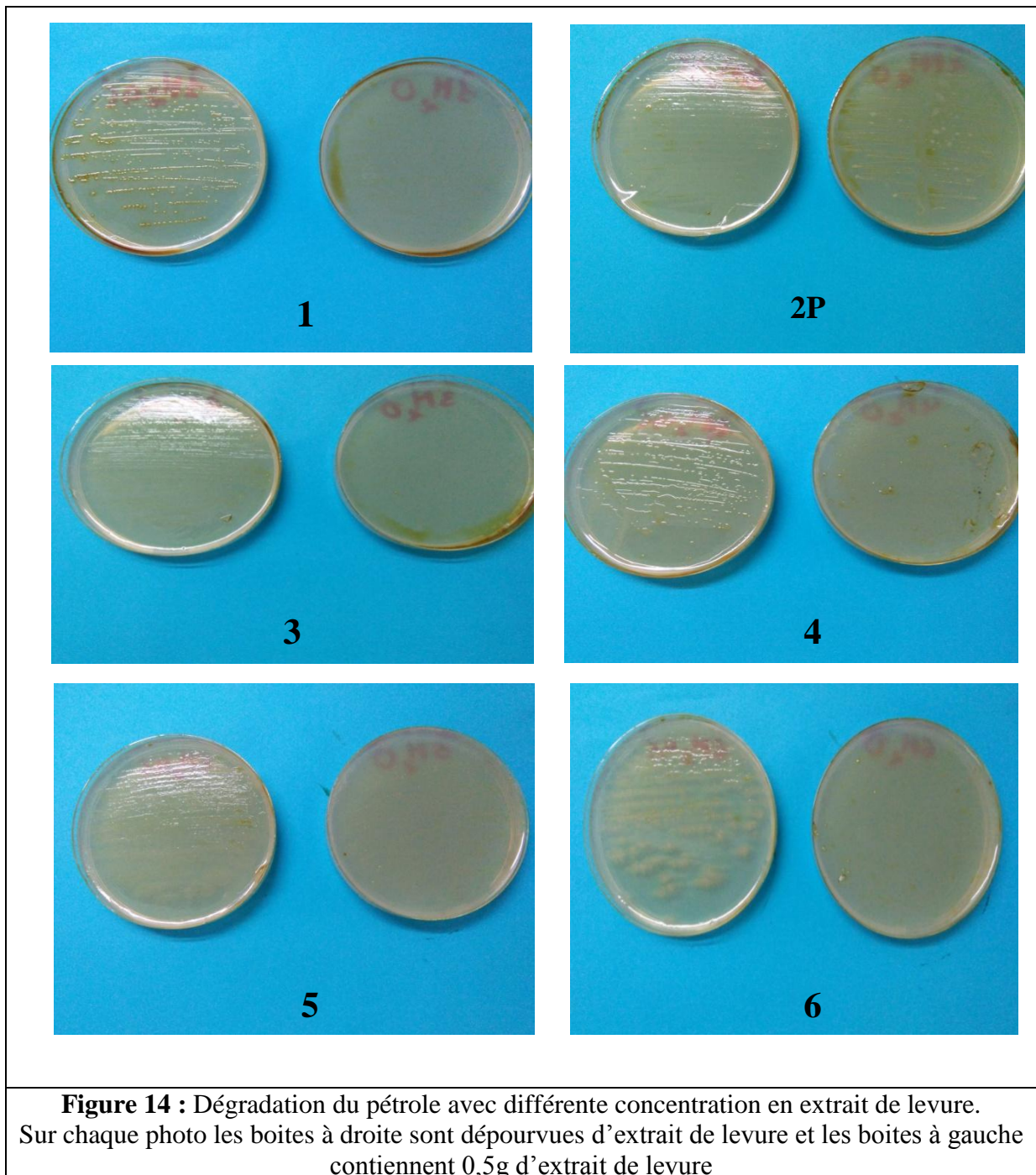


**Figure 13** : Résultat le plus visible du déplacement d'huile avec une formation d'un halo clair

### 5.3. Test de biodégradation

Le milieu M2 additionné 2% de pétrole brute et dépourvu d'extrait de levure a permis la croissance des bactéries au bout de 48h pour toutes les souches avec une différence dans la charge. Contrairement sur les deux boîtes contenant l'extrait de levures, la pousse est obtenue au bout de 24h avec une charge plus importante sur la gélose contenant un gramme d'extrait de levure que celle qui contient 0.5g.

Ceci prouve la capacité des bactéries à dégrader le pétrole comme seule source de carbone et la présence d'une deuxième source favorise encore la croissance et la dégradation.



**Figure 14** : Dégradation du pétrole avec différente concentration en extrait de levure. Sur chaque photo les boîtes à droite sont dépourvues d'extrait de levure et les boîtes à gauche contiennent 0,5g d'extrait de levure

## 6. Suivi de la cinétique

Les résultats issus de ces trois tests ont permis de choisir les souches 1, 2P, 5 pour la production des biosurfactants et le suivi de la cinétique de leur croissance en présence du pétrole brut comme polluant.

**Tableau 10** : Calcul des paramètres de la cinétique

	<b>1</b>	<b>2P</b>	<b>5</b>
<b>Taux de croissance <math>\mu</math> Max (h<sup>-1</sup>)</b>	0.1	0.033	0.125
<b>Temps de génération G(h)</b>	10	30.30	8
<b>Nombre de génération (N)</b>	21.9	7.22	27.37

Phase de latence est absente chez les trois souches. Ceci peut être lié à l'âge des bactéries qui sont jeunes d'une part et d'autre part à leur adaptation aux sources de carbone contenues dans le milieu LB (peptone et extrait de levure).

Quand une jeune culture en phase de croissance exponentielle transférée dans un milieu frais de même composition, la phase de latence est courte ou absente. (Lansing M, 2010)

Les paramètres de croissance calculés pour la Phase exponentielle montre chez les souches 1 et 5 un taux de croissance de 0.1 h<sup>-1</sup> est 0.125 h<sup>-1</sup> respectivement. Ces valeurs sont supérieures à celles obtenues chez la souche 2P.

De même, Le temps de génération de la souche 2P est nettement supérieur à celui de la souche 1 et 5 dont les valeurs sont respectivement 30.30h, 10h et 8h.

Le nombre de générations obtenues chez la souche 1 et 5 (21.9 et 27.37 respectivement) est plus important que celui de la souche 2P (7.22)

Ceci est dû à la présence de deux aspects composants la 2P qui peuvent être compétitives sur la source de carbone.

L'utilisation de la deuxième source de carbone qui est le pétrole brut a nécessité chez les trois souches 1 ; 2p et 5, une phase de latence d'une durée de (22h30mn) (25h) (25h30mn) respectivement.

La complexité de la composition du pétrole explique cette phase de préparation pour son utilisation.

La deuxième phase exponentielle été négligeable par rapport a la première chez les trois souches.

L'épuisement de la deuxième source de carbone qui est le pétrole a conduit à une phase stationnaire qui a durée souche 1 (135h30mn), souche 2P (81h), et la souche 5 (77h30mn) .

Une légère diminution de la charge cellulaire été observée en particulier chez la bactérie 2P et 5. Ceci peut être est expliqué par un déclin du a un phénomène d'autolyse cellulaire.

On parle de la diauxie lorsqu'il y a deux croissance l'une a la suite l'une de l'autre, traduisant le plus souvent les utilisations successive de deux substrats différents. Ce phénomène été découverte par Jacques Monod en 1940 . (<http://www.wabi.snv.jussieu.fr>)

Donc ces résultats confirment qu'il y a un phénomène de diauxie observé chez les trois souches.

Pour le pH la variation des valeurs se situe autours de la neutralité. Ce résultat a été confirmé par Margesin et Schinner (2001), ou ils expliquent qu'une diminution du pH tendant vers la neutralité est en raison de différentes réactions biochimiques entraînant l'assimilation des composés d'un hydrocarbure d'un côté avec synthèse des acides gras d'un autre côté"

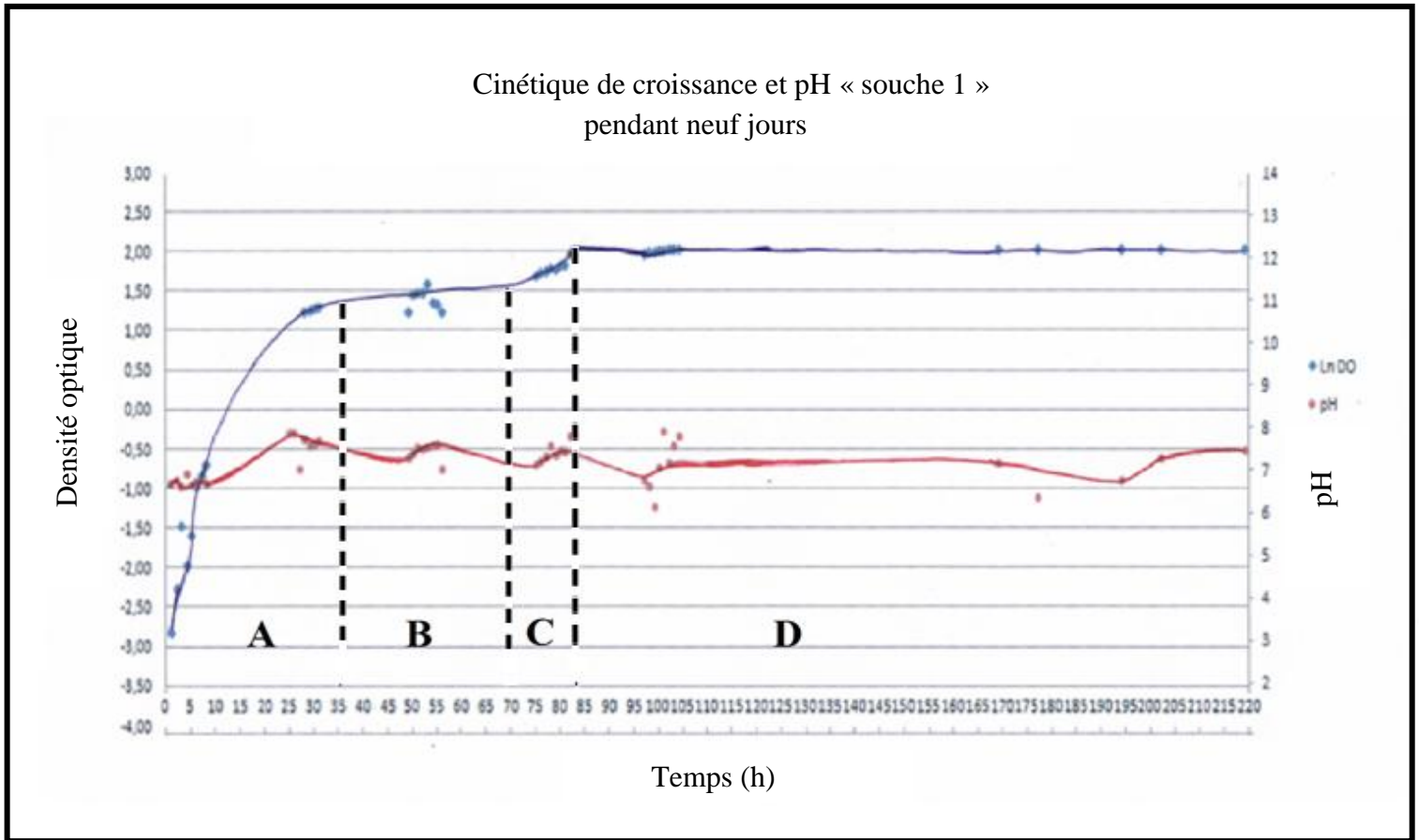
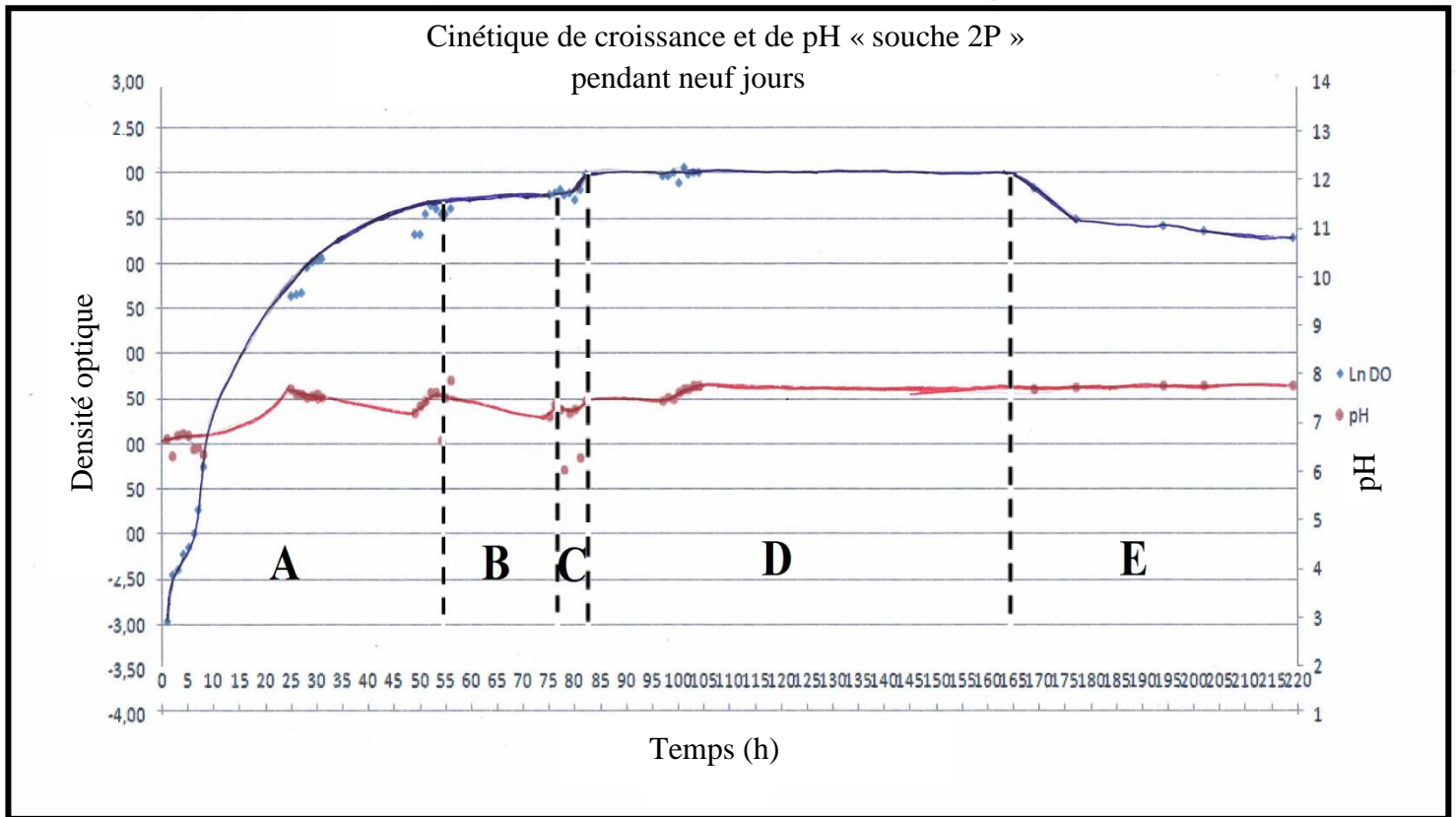


Figure 6 : Courbes de croissance et pH pour la « Souche 1 »

- A : phase exponentiel 1
- B : phase de latence
- C : phase exponentiel 2
- D : phase stationnaire



**Figure 7 :** Courbes de croissance et pH pour la « Souche 2P »

- A :** phase exponentiel 1
- B :** phase de latence
- C :** phase exponentiel 2
- D :** phase stationnaire
- E :** phase de déclin



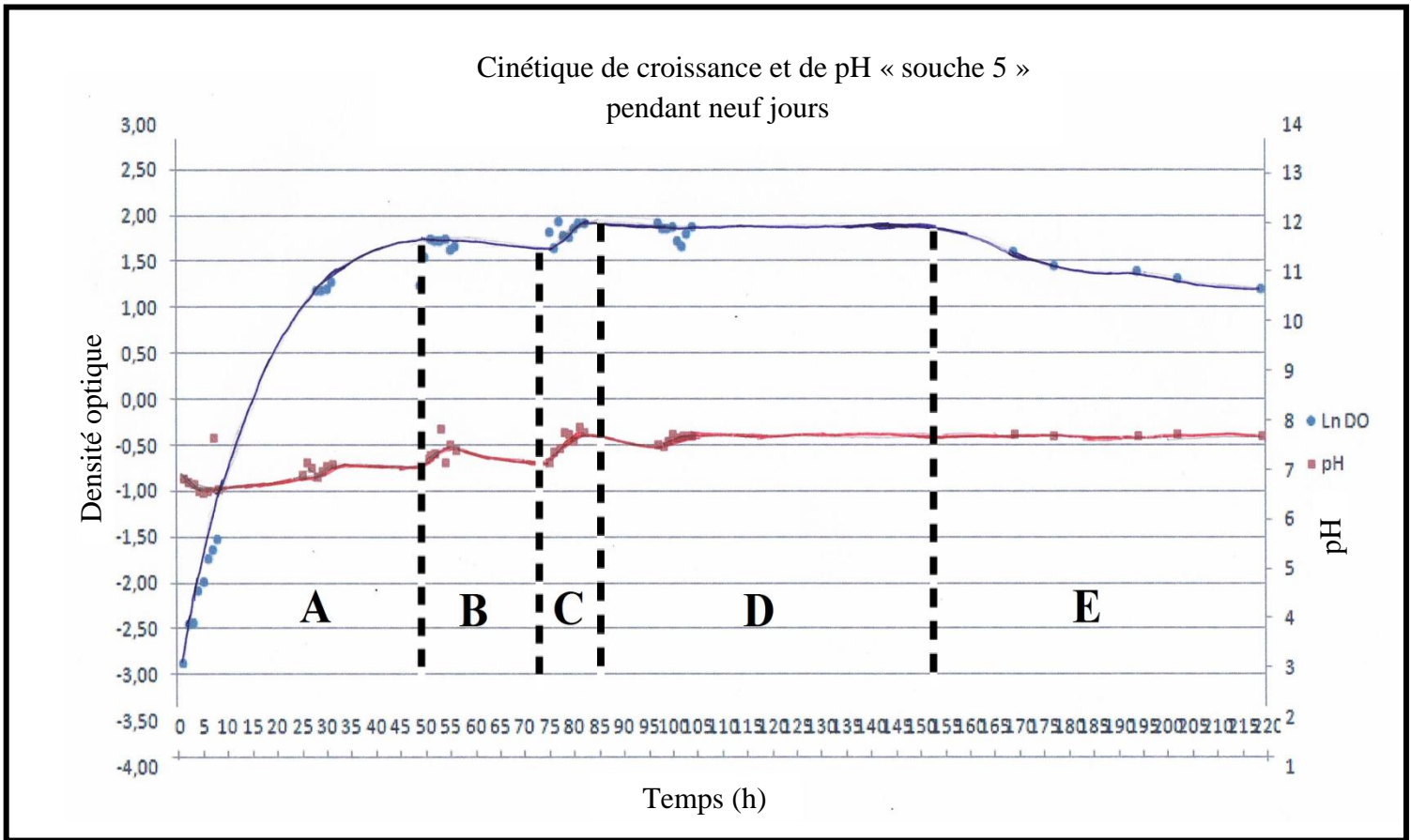
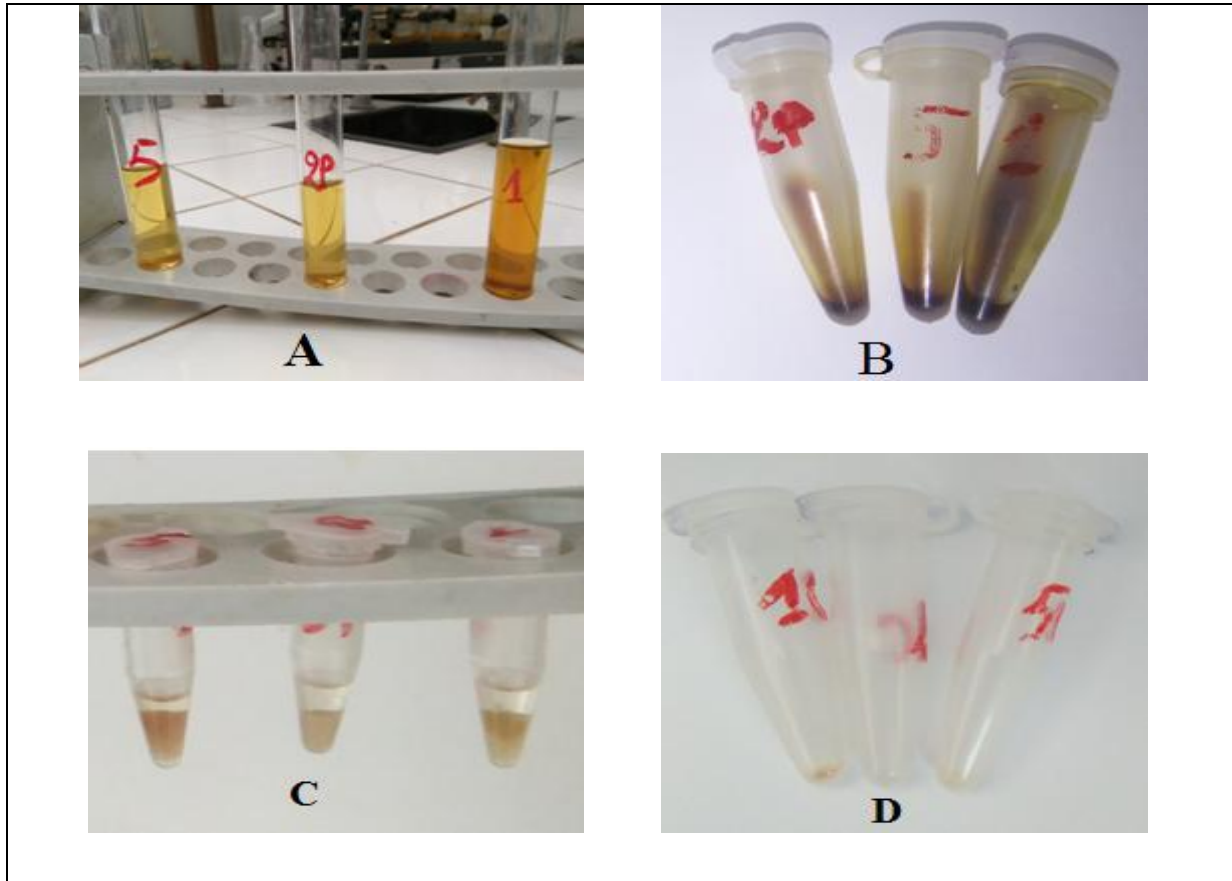


Figure 8 : Courbes de croissance et pH pour la « Souche 5 »

- A : phase exponentiel 1
- B : phase de latence
- C : phase exponentiel 2
- D : phase stationnaire
- E : phase de déclin

## 7. Extraction des biosurfactants

La technique d'extraction par solvant organique a donnée des extraits de couleur noire avec un aspect visqueux après séchage de l'éthyle-acétate à l'air libre qui ressemble à celui du pétrole brut.



**Figure 18 :** Résultat des deux techniques d'extraction.  
(A) La phase organique prélevé après centrifugation  
(C) Récupération du culot formé après la centrifugation  
(B) et (D) Après séchage de l'éthyle-acétate

La chromatographie des trois extraits a montrée des taches fluorescentes au même niveau que celles du pétrole après révélation des plaques sous lampe UV. (Voir Planche 11)

Donc aucune tache correspondant au biosurfactants n'a été observée.

D'après plusieurs auteurs, la répétition de l'étape d'extraction au solvant (éthyle acétate) plusieurs fois (plus de 2) donne des extractions atteignant les 95 %.

La technique par précipitation a donnée une masse consistante non miscible dans l'éthyle-acétate.

Après échec de solubilisation (dans l'éthyle-acétate) par ultrason de la masse obtenue, plusieurs lavages à l'eau distillée avec de l'NaCl saturé (pour éviter la formation d'émulsion) sont réalisées afin de libérer le biosurfactant de ses impuretés.

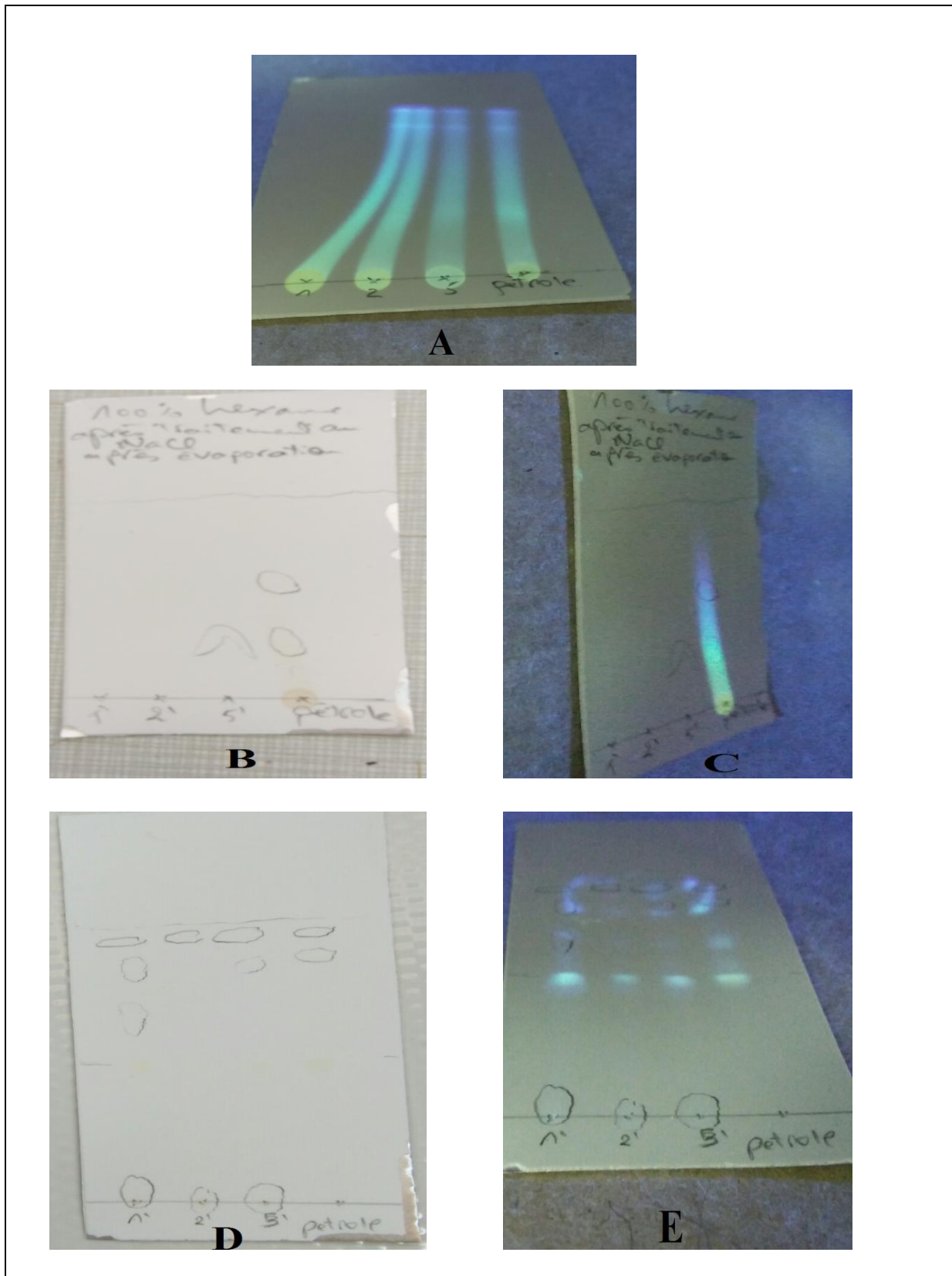
Les quantités des extraits obtenus après séchage du solvant sont très faible ceci peut être du au fait que le biosurfactant reste toujours emprisonné dans la phase intermédiaire que forme les impuretés (non miscible). Les extraits obtenus sont solubilisés dans l'Acétone comme solvant organique.

Malgré cela, des taches qui ne correspondent pas à celles du pétrole sont détectées.

Chez la souche 5 une tache jaune non fluorescente sous forme d'un chapeau est observée. La souche 1 a donnée deux bandes fluorescentes sous UV

Ces bandes observées chez les deux bactéries 1 et 5 correspondent aux biosurfactant synthétisés

Dans le cas de nos bactéries, la technique d'extraction des biosurfactants par la méthode de précipitation acide s'est avérée plus efficace que la technique d'extraction par solvants organiques.



**Figure 19** : chromatographie sur couche mince  
(A)(C) et (E) Révélation des taches sous lampe UV  
(B) Présence d'une tache non fluorescente dans la souche 5  
(D) Observation de deux taches pour la souche 1 différente a celles du pétrole

**CONCLUSION**

Les sols pollués par les hydrocarbures ont un effet néfaste sur l'environnement en générale, mais voyant le coté positive, chaque sol pollué contient une microflore autochtone qui s'adapte pour dégrader ces polluants et les utiliser comme nourriture, c'est une dépollution biologique qui ne demande pas trop d'appareillage ni de grand budget.

Le pétrole brut est l'un des polluants les plus propagés et complexes des sols. Il contient pas mal de molécules qui sont composées essentiellement d'atome de carbone. Ces molécules peuvent être utilisées par des bactéries mangeuses de pétrole et à la fois productrices de surfactants naturels qui stimulent l'accès à la source de carbone complexe pour un bon processus de bioremédiation de l'écosystème pollué.

Le but de notre projet est de rechercher ces bactéries dites « hydrocarbonoclastes », dans un sol ayant subi un grand rejet de fluides de forage pétrolier constitués principalement de pétrole brut et de métaux lourds. Il s'agit de borbiers à base d'huile, situé à l'extrême Sud du Sahara algérienne dans la wilaya de « Ain Salah » qui présente un climat désertique très chaud et aride.

L'isolement et la caractérisation phénotypique de ces bactéries, l'étude de leur habilité à utiliser le pétrole brut comme unique source de carbone, et leur capacité synthétique de biosurfactants, ainsi que la caractérisation de ces produits de haute valeur industrielle ont fait l'objet de notre recherche.

Dans un premier temps, il est important d'avoir une idée concernant les conditions du site dans lesquelles vivaient nos bactéries. Une recherche bibliographique sur le net nous a permis de conclure qu'il s'agit d'une région très aride ou les conditions de température et de pluviométrie sont extrêmes. A cela, s'ajoute la composition très variée des rejets toxiques que reçoivent ces sols, et en grande majorité de pétrole brut donnant une couleur noire aux prélèvements. La mesure de pH de sol du borbier a montré des valeurs légèrement alcalines, liée probablement aux agents anti corrosion ajoutés aux fluides de forages.

Une étude de quelques caractères microbiologiques des isolats bactériens nous a permis de les grouper en quatre groupes à savoir ; des coques à Gram positif (souche 3) de la famille *Streptococcaceae.*, des bacilles à Gram positif sporulant (souche 6) de la famille des *Bacillaceae*, des bacilles à Gram positif non sporulants (souche 4 et 5), et des bacilles à Gram négatif (souche 1) de la famille des *Enterobacteriaceae.*

Une souche contenant deux aspects (2P) un bacille à gram négatif et un coque à Gram positif est retenue vu ses caractères intéressants (la production d'un pigment rose, ainsi qu'un bon rendement sur les tests de production de biosurfactants).

La diversité observée lors de l'isolement était minime, il n'y avait que quelques aspects qui diffèrent, mais par contre la charge globale des flores existantes dans ces sols était spectaculaire de l'ordre de  $10^8$  UFC/g ceci renseigne sur le pouvoir d'adaptation de ce bactéries aux conditions extrêmes.

De 17 isolats, six sont sélectionnés pour l'essai de dégradation de pétrole. Le milieu M2 dépourvu d'extrait de levure additionné de 2 % du pétrole brut est utilisé. Une croissance est obtenue après 48h d'incubation. L'addition d'extrait de levure à raison de 0,5g/L et 1g/L montre une croissance plus importante au bout de 24h, donc deux sources de carbone favorisent mieux l'utilisation du polluant.

Une deuxième sélection de trois bactéries (1, 2P et 5) est basée sur le rendement des bactéries dans deux tests, l'émulsification d'hydrocarbures et le déplacement d'huile. Ces trois sont utilisées pour le suivi de la cinétique de leur croissance sur un milieu LB contenant 1% de pétrole brut. Les trois montrent des cinétiques en diauxie, ou les bactéries commencent par les sources de carbone les moins complexes (extrait de levure et peptones) et catabolisent dans un deuxième temps le pétrole brut avec des pH qui ne s'éloignent pas de la neutralité.

Enfin, l'extraction de biosurfactants par précipitation à l'abaissement du ph suivie d'une chromatographie sur couche mince a montré des taches correspondantes aux produits recherchés mais seulement chez deux des trois bactéries (1 et 5). Par contre l'extraction aux solvants organiques n'a donné aucune tache chez toutes les bactéries.

A la lumière des résultats synthétisés il est souhaitable de compléter ce travail par des approches plus approfondies, à savoir :

- Un séquençage après amplification d'ADN 16s dans un but de taxonomie moléculaire.
- Une étude des propriétés physico-chimiques des biosurfactants pour mieux comprendre leur nature et leur structure.
- L'application d'une extraction plus efficace et fiable
- Tester le pouvoir dégradant des souches avec d'autres rejets industriels

# REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE



**A**

- Abedelly C. 2007.** Bioremédiation/phyto-remédiation. Thèse. Département des sciences naturelles. Institut supérieur de l'éducation et de la formation continue. Université de Tunis.
- Aislabie, J., McLeod, M. and Fraser, M., 1998.** Potential for biodegradation of hydrocarbons in soil from the Ross Dependency, Antarctica. *Applied Microbiology and Biotechnology*, p. 210-214.
- Al-Araji L., Abd Rahman R. N. Z. R., Basri, Salleh M. A. B., 2007.** Minireview: Microbial Surfactant. (AsPac) *J. Mol. Biol. Biotechnol.*, **Vol. 15**, p. 99-105.
- André Hufty, 2001.** Introduction à la climatologie : Le rayonnement et la température, l'atmosphère, l'eau, le climat et l'activité humaine. p. 12.
- Atlas, R.M., 1995a.** Bioremediation of petroleum pollutants. *International Biodeterioration and Biodegradation*, p. 1-3.
- Atlas, R.M., 1995.** Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, p. 4-12.
- Austin B., Bucke D., Feist S.W. & Helm M.M., 1988.** Disease problems among cultured bivalve larvae. ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Directorate of Fisheries Research, Lowestoft, Internal Report N°16, p. 22

**B**

- Belhabibi A. et coll., 2013.** Les fluides de forage à base d'huile : impacts sur l'environnement et technique de traitement. Mémoire Master Professionnel, Université Kasdi Merbah, Ouargla, p.13.
- Bodour A. A., Gerrero-Barajas C. et Maier M., 2003.** Structure and characterization of Flavolipids, a novel class of Biosurfactants produced by Flavolipid sp. Strain MTN11. *App. and Env. Microbiol.*, p. 14-20.
- Bouderhem., 2011.** Utilisation Des Souches Bactériennes Telluriques Autochtones Dans La Biodétection Et La Bioremédiation Des Sols Pollués Par Les Hydrocarbures. Thèse, Université Kasdi Merbah-Ouargla, p. 10-11.

**C**

**Carlone, GM et al. 1983.** Methods for Distinguishing Gram-Positive from Gram-Negative Bacteria. J Clin Microbiol, p. 1157-1159.

**Costes J.-M. et Druelle V. 1997 .** Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques dans l'environnement : La Réhabilitation des anciens sites industriels. Revue de l'Institut Français du pétrole, **vol.52**, n°4.

**D**

**Delarras C., 2007.** Microbiologie Pratique Pour Le Laboratoire D'analyses Ou de Contrôle Sanitaire, 1ère édition, Paris : Edition tec et doc, p. 476

**Delille, D., Basseres, A. and Dessommes, A., 1998.** Effectiveness of bioremediation for oil-polluted Antarctic seawater. Polar Biology, p. 237-241.

**Desai J. D., Banat I. M., 1997.** Microbial Production of Surfactants and their commercial potential, microbiol. And mol. Biol. Reviews, **Vol. 61**, p. 47-64.

**F**

**Floodgate, G.D., 1995.** Some environmental aspects of marine hydrocarbon bacteriology. Aquatic Microbial Ecology, p. 3-11.

**G**

**Gregersen, T. 1978.** Rapid Method for Disitinction of Gram-negative From Gram- positive Bacteria. Appl Microbiol Biotech, p. 123-127.

**Gabet S., 2004.** Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. Thèse de doctorat de l'universite de Limoges, spécialité Chimie et Microbiologie de l'Eau, p. 177.

**H**

**Henri Poumérولية 2001.** Voyage dans l'Afrique profonde, p. 248

**J**

**Jeanne Mager Stellman., 2000.** Encyclopédie de sécurité et de santé au travail, **Vol.3.**

**Joffin J. N. et Leyral G., (2006).** Microbiologie technique, Tome1 :  
Dictionnaire des techniques, 4ème édition. Edition CRDP d'aquitaine, p. 368.

**K**

**Kappeli, O. and Finnerty, W. R., 1979.** Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane grown *Acinetobacter*, *J. Bacteriol.*, p. 707–712.

**Krepisky, N., DA Silva, F.S., Fontana, L.F., Crapez, M.A.C., 2007.** Alternative Methodology For Isolation Of Biosurfactant-Producing Bacteria, *Braz. J. Biol.*, **Vol.67**,p. 117-124.

**L**

**Lansing M, et coll., 2010.** Presstto de microbiologie, p. 123

**Lapointe M., 1996.** Mobilisation en colonne d'un hydrocarbure Aromatique polycyclique (pyrène) adsorbé au sol au moyen d'un biotensioactif produit par *Pseudomonas aeruginosa*. Mémoire de Maîtrise es Sciences, Université de Québec, Sainte-Foy. P. 164.

**Larpent J.P., 2000.** Introduction à la nouvelle classification bactérienne. Les principaux groupes bactériens». Edition Techniques et Documentation. pp 28.

**Leahy, J.G. and Colwell, R.R., 1990.** Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, p. 305-315.

**M**

**Marchal N. et Bourdon J. L., 1982.** Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed. Doin, Paris.

**Margesin R, Schinner F. 2001.** Extremophiles. Institute of Microbiology (NF), University of Innsbruck, Austria, p.73-83.

**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.

**O**

**Obayori, O.S.; Ilori, M.O.; Adebusoye, S.A.; Oyetibo, G.O.; Amund, O.O. (2009).**

Degradation of hydrocarbons and biosurfactant production by *Pseudomonas* sp strain LP1. *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, p. 1615-1623.

**Olivera, N.L., Esteves, J.L. and Commendatore, M.G., 1997.** Alkane biodegradation by a microbial community from contaminated sediment in Patagonia, Argentina. *International Biodeterioration Biodegradation*, p. 75-79.

**P**

**P.G. Carrillo, C. Mardaraz, S.I. Pitta-Alvarez and A.M. Giulietti. 1996.** Isolation and selection of biosurfactant producing bacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. Vol **12**, p. 82-84

**R**

**Prabhu Y., Phale P., 2003.** SB PP2 Novel Metabolic Pathway, Role of Biosurfactant And Cell Surface Hydrophobicity In Hydrocarbon Assimilation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. **61**, p. 342–351.

**Pruthi V., Cameotra S. S., 1995.** Rapid Method For Monitoring Maximum Biosurfactant Obtained By Acetone Precipitation, *Biotechnol. Techniq.* Vol. **9**, p. 271–276.

**S**

- Sauret C. 2011.** Ecologies des communautés bactériennes marines soumises a une pollution pétrolière Influence des facteurs environnementaux, de la prédation et de la récurrence des pollutions. Thèse de doctorat de l'université pierre et marie curie, Spécialité Microbiologie environnementale Ecole Doctorale Sciences de l'Environnement d'Ile de France (ED129).
- Singleton P., 1999,** Bactériologie, Edition Duonod 4<sup>ème</sup> édition Paris, p.415.
- 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, spécialité chimie analytique, p. 284.
- Syakti A.D. 2004.** Biotransformation des hydrocarbures pétroliers et effets sur les acides gras phospholipidiques de bactéries hydrocarbonoclastes marines. Thèse de doctorat, Université de Droit, d'Economie et des Sciences (Aix Marseille III), Marseille, France.

**T**

- Tarayre. C. 2012** Bioremédiation de sols pollués aux hydrocarbures. Editions Universitaires Européennes, p.116.
- Trzesicka-Mlynarz D., Ward O.P. 1995** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAHcontaminated soil. Can. J. Microbiol, p. 470-476.

**V**

- Vandecasteele J. P., 2008.** Petroleum Microbiology, Editions TECHNIP, Paris, p.816.
- Van Der Meer, J.R et al., 1992.** Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. Microbiological Reviews 56, p. 677-694
- Vogel T., D Ballerini. 2001.** Biorestauration des sols et des aquifères contaminés par des hydrocarbures et des composés halogénés. Bull Soc. Fr. Microbiol., p 204-209.

**W**

**Whyte, L.G., Geer, C.W. and Innis, W.E., 1995.** Assessment of biodegradation potential of psychrotrophic microorganisms. Abstract of General Meeting of the American Society for Microbiology 95, p 468.

**Z**

**Zarilla, K.L. and Perry, J.J., 1984.** *Thermoleophilum album* gen. nov and sp. nov, a bacterium obligate for thermophily and *n*-alkane substrates. Archives of Microbiology 137, p. 286-290.

**Zobell, C.E., 1946.** Action of microorganisms on hydrocarbons. Bacteriol. Rev. 10, p. 1-49.

**Sites Web consultés**

<http://www.infoclimat.fr/climatologie/globale/in-salah/60630.html>

<http://dlecorgnechimie.fr/wp-content/uploads/2014/11/CCM.pdf>

[http://www.cooperation.ch/L\\_homme+peut\\_il+fabriquer+du+petrole\\_](http://www.cooperation.ch/L_homme+peut_il+fabriquer+du+petrole_)

[http://www.wabi.snv.jussieu.fr/boccaro/Public/LV342\\_distance/POLY\\_1\\_CNEDLV342.pdf](http://www.wabi.snv.jussieu.fr/boccaro/Public/LV342_distance/POLY_1_CNEDLV342.pdf)

**ANNEXES**

**Annexe1 : Matériels utilisés****1. Matériels du laboratoire :**

<b>Equipement</b>	<b>Verrerie et matériels en plastique</b>
<b>Étuve</b>	Erlenmeyers 250ml, 500ml, 1000ml
Agitateur-plaque chauffante	Tubes a essai
<b>Bain marie</b>	Pipettes pasteur
Incubateur agitateur	Pipette graduées
Hotte à flux laminaire	La poire
Bec bunsen	Anse de platine
Spectrophotomètre	Lames lamelle
Centrifugeuse à froid	Parafilm
Réfrigérateur	Boite de pétri en plastique
Balance de pesé	Becher 75ml, 100ml, 1000ml
Microscope optique	Flacons 180ml ,250 ml
Autoclave	Pinces
Vortex	Fioles de 50ml, 100ml, 500ml, 1000ml
Micropipette	
<b>Balance analytique</b>	

**Annexe 2 : Milieux de culture et réactifs****1. Milieux de cultures :****1.1.Gélose nutritive :**

<b>Ingrédients</b>	<b>Quantité</b>
Extrait de viande	1.0g
Extrait de levure	2.0g
Peptone	5.0g
Chlorure de sodium	5.0g
Agar	15.0g
Eau distillée	1000ml
Ph	7.2



**1.2. Bouillon nutritif :**

Ingrédients	Quantité
Extrait de viande de bœuf	2.0g
Extrait de levure	1.0g
Peptone	5.0g
Na Cl	5.0g
Eau distillée	1000ml
Glucose	1.0g
Ph	7.2

**1.3. Milieu M2 :**

Ingrédients	Quantité
NH <sub>4</sub> Cl	2,00g
KCl	0.10g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.01g
CaCl <sub>2</sub>	0.50g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.01g
FeSO <sub>4</sub> 7h <sub>2</sub> O	0.50g
Extrait de levure	1g
Eau distillée	1000ml
Ph	7

**1.4. Milieu LB :**

Ingrédients	Quantité
Peptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	10 g

## **2. Réactifs et solution :**

- Alcool (éthanol-Acétone)
- Disque d'oxydase
- Eau distillée
- Eau oxygénée 10V
- Violet de gentiane
- Fuchsine
- Pétrole brute
- Huile a immersion
- Solution de lugol
- HCl (six fois normal)
- Oil red (colorant d'huile)
- Ethyle acétate
- Hexane
- Vert de malachite
- Kérosène
- KOH 3%

## **Annexe 3 : Coloration :**

### **1. Coloration de Gram :**

- Selon singleton(1999), la coloration de Gram s'effectue selon les étapes suivantes :
- Préparer le frottis bactérien à la chaleur de bec bunsen
- Recouvrir au violet de gentiane pendant 1minute. 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, rinçage a l'eau puis séchage
- Recolorer à la fushine pendant 1 à 2 minutes, rinçage à l'eau puis séchage.
- L'observation se fait en ajoutant l'huile à immersion, les bactéries Gram positif se colorent en violet alors que les bactéries à Gram positif se colorent en rose.

## **2. Coloration de spores :**

- S'effectue selon les étapes suivantes :
- Réaliser un frotti 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 à l'objectif 100 à immersion
- Les spores apparaissent en verts foncé, les sporanges en verts pale et le corps bactérien en rose.

## Contribution à l'étude de la biodégradation des hydrocarbures dans les boues de forage par des bactéries productrices de biosurfactants

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Ecologie Microbienne

Les borbiers de rejets de forage pétrolier constituent un risque majeur sur l'environnement et par conséquent sur la santé humaine et animale, vu qu'ils soient contaminés principalement par des hydrocarbures et des métaux lourds.

La dépollution biologique de ces sites nécessite des microorganismes efficaces dans ce procédé biologique.

Les bactéries « hydrocarbonoclastes » sont des microorganismes qui se nourrissent typiquement d'hydrocarbures, et peuvent être aussi de bonnes productrices de biomolécules appelées « biosurfactants » présentant un grand nombre d'applications environnementales et industrielles.

A ce titre, les objectifs de notre travail sont d'isoler et de caractériser des souches bactériennes à partir d'un borbier à base d'huile dans une zone d'activité pétrolière dans la région d'Ain Salah située dans l'extrême sud algérien.

La mise en culture sur gélose nutritive a permis d'isoler 17 bactéries, dont six diffèrent par leurs caractères macroscopiques et microscopiques.

Ces six isolats sont testés pour leur capacité à dégrader le pétrole brut sur une gélose M2 dépourvue d'extrait de levure.

Les résultats du test d'émulsification, et de déplacement d'huile ont permis de sélectionner la souche 1, 2P et 5 ayant montrées une grande capacité productive de biosurfactants.

Le suivi de la cinétique de croissance en présence du pétrole brut a montré des courbes de diauxie pour les trois souches.

Un essai d'extraction des biosurfactants par deux méthodes différentes sont réalisées, une extraction par solvant organique et une précipitation acide.

La migration des extraits obtenus par chromatographie sur couche mince a confirmé la détection de biosurfactants chez les souches 1 et 5 par la deuxième technique.

**Mots clés :** biodégradation, émulsification, hydrocarbonoclaste, hydrocarbure, biosurfactants

**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de Biotechnologie

Jury d'évaluation :

**Président du jury :** M. Benhizia Yacine Professeur à UFC

**Rapporteur :** Mme Guergouri Ibtissem Maitre-Assistante « A » à UFC

**Examineur :** M. Chabbi Rabah Maitre-Assistant « A » à UFC

**Date de soutenance :** 12/06/2016

