



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RREPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

التعليم

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des frères mentouri constantine  
Faculté des sciences de la nature et de la vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : microbiologie

قسم: ميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologique

Spécialité : Ecologie Microbienne

Intitulé :

---

# Essai de bioremédiation de sol pollué au gasoil par des bactéries hydrocarbonoclastes

---

Présenté et soutenu par : *Aberkane Malika*

Le : 14/06/2018

*Ayache Roumaïssa*

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** Mme Riah Nacira (Maitre de conférences

<<B>> à UFC)

**Encadreur :** Mme Guergouri Ibtissem (Maitre-assistant

<<A>> à UFC)

**Examineur :** Melle Abdelaziz Ouided (Maitre-assistant

<<A>> à UFC)

*Année universitaire  
2017 - 2018*



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RREPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

التعليم

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des frères mentouri constantine  
Faculté des sciences de la nature et de la vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : microbiologie

قسم: ميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologique

Spécialité : Ecologie Microbienne

Intitulé :

---

# Essai de bioremédiation de sol pollué au gasoil par des bactéries hydrocarbonoclastes

---

Présenté et soutenu par : *Aberkane Malika*

Le : 14/06/2018

*Ayache Roumaïssa*

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** Mme Riah Nacira (Maitre de conférences

<<B>> à UFC)

**Encadreur :** Mme Guergouri Ibtissem (Maitre-assistant

<<A>> à UFC)

**Examineur :** Melle Abdelaziz Ouided (Maitre-assistant

<<A>> à UFC)

*Année universitaire  
2017 - 2018*

## *Remerciements:*

*Tout d'abord, nous remercions Dieu « Tout Puissant » de pouvoir accomplir ce modeste travail.*

*Nous remercions tenons à remercier très chaleureusement Mme GUERGOURI Ibtissem qui nous permis de bénéficier de son encadrement, les conseils qu'elle nous a prodigué, la patience, la confiance qu'elle nous a témoignées ont été déterminant dans la réalisation de notre travail de recherche.*

*Nous remercions les membres du jury, Mme RIAH Nacira professeur à l'université de mentouri Constantine, Melle Abdelaziz Ouidéd a acceptée d'examiner notre travail.*

*Nous remercions toute l'équipe du laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire sans exception, pour leur aide et surtout pour leurs gentillesse.*

*Nous remercions également les personnels de la bibliothèque.*

*Nous remercions tous nos amis en particulier les étudiants de l'option de Microbiologie.*

*Enfin, un grand merci, à toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

# DÉDICACES

*Avant tout je remercier **ALLAH** pour les tout.*

*Je dédie ce modeste travail*

*A mes très chers parents **maman** et **papa** sources de tendresse et la force*

*De courage d'étude*

*Je vous remercie d'être toujours à mes coté de me soutenir, aimer,*

*Protéger et pour tous ce que vous avez fait pour moi.*

*A mes chers frères et ma sœur*

*Mouhemed al Amine, abd elalli, Faouzia,  
Karima*

*Mon fiancé Abderrezak pour leur aide et surtout leur soutien moral et  
Physique.*

*A mes meilleurs amis : Kenza, Salma, Amel, Roumaïssa, Nour Elhouda,*

*Anwar, Linda, Habiba, Rayan, Samehe, Housseme*

*A tous les familles: **ABERKANE**, **AMRANI***

*A tout la promotion d'Ecologimicrobienne 2017/2018.*

*A tous les enseignants(e) et les étudiants(e) de l'itas*

***ABERKANE MALIKA***

# DÉDICACE :

*Avant tout je remercie ALLAH pour le tout.*

*A ma chère mère*

*Aucune dédicace ne saurait mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.*

*Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.*

*Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse dieu, le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.*

*A la mémoire de mon cher père*

*Ce travail est dédié à mon père, décédé trop tôt, qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études.*

*J'espère que, du monde qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'un fils qui a toujours prié pour le salut de son âme. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde !*

*A ma chère sœur : Roufaïda*

*A mon cher frère : Mouhamed*

*Sans oublier ma très chère tante Widade est sont marie Taléb Hichame pour m'avoir accueillie chez elle tout au long de mes études et tout ce qu'ils ont fait pour moi.*

*A mes chères amies et surtout mon amie « Amina Elmaoui », pour leur aide et surtout leur soutien moral et physique.*

*A tout ma famille.*

*A toute la promotion de Microbiologie 2017/2018.*

*A tous ceux qui me connaissent de loin ou de près.*

*Ayache Roumaïssa*

## **Résumé :**

La pollution des sols par le gasoil constitue une menace importante pour tous les écosystèmes de l'environnement et la santé humaine, donc des solutions efficaces, économiques et non toxiques doivent être instaurées rapidement afin de restaurer l'équilibre naturel.

Dans ce mémoire on a fait appel à la capacité des microorganismes indigènes ou exogènes à dégrader ce polluant en composés moins toxiques.

Sept bacs de sol artificiellement pollué au gasoil à 5%, dont cinq ont subi des traitements variés ; de biostimulation, de bioaugmentation, des deux techniques combinées et deux non traités (témoin non pollué et bac atténuation naturelle) sont comparés par rapport au nombre bactérien au cours de 15 jours de traitement .

Le traitement par inoculation de deux consortiums bactériens A et B (bactéries isolées d'un site contaminé au pétrole brut) avait montré les meilleurs résultats, et en particulier le consortium A qui comporte la bactérie II suspectée être une *Pseudomonas aeruginosa*.

Un test de germination des graines d'orge effectué sur les sols traités pendant 15 jours, a donné un taux de germination de 4% uniquement sur les sols traités par le consortium A (avec ou sans fertilisant).

**Mots clés:** pollution, gasoil, bioremédiation, graines d'orges, bactéries.

## **Sammary :**

Soil pollution by diesel fuel is a major threat to all environmental ecosystems and human health, thus effective, economical and non-toxic solutions must be quickly established to restore the natural balance.

In this study paper, was called for the capacity of indigenous or exogenous microorganisms to degrade this pollutant into less toxic compounds.

Seven tanks of soil artificially polluted with 5% diesel oil, five of which have undergone various treatments; biostimulation, bioaugmentation, both combined techniques and two untreated (unpolluted control and natural attenuation tank) are compared in relation to the bacterial number during 15 days of treatment.

Treatment by the inoculation of two bacterial consortia A and B (bacteria isolated from a crude oil contaminated site) had shown the best results, and in particular, consortium A which contains bacterium I1 suspected of being *Pseudomonas aeruginasa*.

A germination test of barley seeds carried out on treated soils for 15 days, gave a germination rate of 4% only on soils treated by consortium A (with or without fertilizer).

**Key words:** pollution, diesel, bioremediation, barley seeds, bacteria.

## الملخص

تلوث التربة من وقود الديزل يشكل خطرا كبيرا على جميع النظم الايكولوجية البيئة وصحة  
الطبيعي , إيجاد , اقتصادية وغير سامة يجب

هذه المذكرة, قدرة الكائنات المجهرية الداخلية أو الخارجية الأصل على تحليل  
الملوث وتفكيكه إلى جزيئات اقل سمية.

سبعة حاويات من التربة الملوثة صطناعيا بوقود الديزل (بنسبة 5%) حيث خمسة منها  
تحفيز حيوي تضخيم حيوي التقنيتان اثنتين من دون علاج (حاوية غير  
ملوثة و أخرى بها الحد الطبيعي) عدد البكتيريا خلال 15 يوما من العلاج.

أظهرت المعالجة بمجموعتين بكتيريتين A B (البكتيريا المع  
الديزل) أفضل النتائج و على وجه الخصوص مع الكونسورتيوم A الذي يحتوي على جرثومة 11  
يشتهه في أنها (*Pseudomonas aeruginosa*).

أعطى اختبار إنبات بذور الشعير في التربة المعالجة لمدة 15 يوماً معدل إنبات 4  
التربة المعالجة بالكونسورتيوم A ( ).

الكلمات المفتاحية: . الديزل, الشعير, البكتيريا .

## Table de matière

Remerciements	
Dédicaces	
Résumés	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste d'abréviations	
Introduction .....	01

### **PARTIE 01 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

#### **Chapitre I : Pollution des sols aux hydrocarbures :**

1. Le sol .....	03
1.1. Définition .....	03
1.2. Constituants .....	03
1.2.1. Phase solide .....	04
1.2.2. Phase liquide .....	04
1.2.3. Phase gazeuse .....	05
1.3. Effet des propriétés du sol sur le comportement du polluant .....	05
1.3.1. Effet des constituants minéraux .....	05
1.3.2. Effet de la texture et structure du sol.....	06
1.3.3. Effet de l'eau du sol .....	06
1.3.4. Effet des constituants organiques du sol .....	06
2. Le polluant .....	06
2.1. Le Gasoil, dérivé de raffinage de pétrole .....	06
2.1.1. Composition du gasoil .....	07
2.1.2. Effet du polluant sur l'environnement .....	08
2.2. Devenir des hydrocarbures dans l'environnement.....	09

#### **Chapitre II : Remédiation des sols pollués aux hydrocarbures**

1. Les différents traitements des sols pollués .....	11
1.1 Traitements physiques .....	11
1.3 Traitements chimiques .....	11
1.4 Traitement biologique .....	12
2. Les principales méthodes de la bioremédiation .....	13
2.1. La bioremédiation in-situ .....	13
2.1.1. Atténuation naturelle .....	13
2.1.2. Bioventing .....	13
2.1.3. Bioaugmentation .....	13
2.1.4 Biostimulation .....	14
2.1.5 Combinaison Biostimulation et Bioaugmentation .....	14
2.2 La bioremédiation ex-situ .....	14
2.2.1 Landfarming .....	14
2.2.2 Biopile ou biotertre .....	15
2.2.3 Bioslurry ou bioréacteur .....	16
3. Mécanismes de dégradation microbienne des hydrocarbures .....	17
3.1. Définition .....	17
3.2. Microorganismes dégradant les hydrocarbures .....	17
3.2.1. Les bactéries .....	17
3.2.2. Les champignons .....	18

3.3. Modes d'accèsion des hydrocarbures par la cellule bactérienne .....	18
3.4. Les voies métaboliques de la dégradation des hydrocarbures pétroliers .....	20
3.4.1. La minéralisation .....	20
3.4.2. Co-métabolisme .....	20
3.4.3. La biodégradation aérobie .....	21
3.4.4. La biodégradation anaérobie .....	21
3.5. Facteurs influençant la biodégradation des hydrocarbures .....	22

## **PARTIE 2 : MATERIEL ET METHODES**

1. Prélèvement de sol .....	24
2. Préparation de sol .....	24
3. Préparation des additifs .....	25
3.1 Polluant .....	25
3.2 Fertilisant .....	25
3.3 Les souches bactériennes .....	26
3.3.1 Aspect macroscopique .....	27
3.3.2 Aspect microscopique .....	27
3.3.3 Préparation de l'inoculum .....	28
3.3.4. Inoculation .....	28
4. Techniques de bioremédiation .....	29
5. Suivie de bioremédiation .....	30
5.1 L'irrigation et le retournement .....	30
5.2 Suivie de la charge bactérienne .....	30
5.3 Suivie du potentiel d'hydrogène (PH).....	31
6. Test de germination .....	32
7. Paramètres biologiques mesurés .....	33
7.1 Taux de germination .....	33
7.2 La longueur racinaires et la partie aérienne .....	33

## **PARTIE 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS**

1. Caractérisation des isolats dégradant les hydrocarbures.....	34
1.2 Aspect microscopique .....	34
2. Le suivi de la bioremédiation des sols pollués.....	38
2.1 Evolution de la biomasse bactérienne dans le sol pollué .....	38
2.2 Evolution de Potentiel d'hydrogène .....	42
3. Test de germination.....	44
3.1 Au début de l'expérience .....	44
3.2 A la fin de l'expérience (T <sub>15</sub> ).....	45
Conclusion.....	48
Références bibliographiques.....	49
Annexes	

## Liste des figures :

<b>Figure 1</b>	le raffinage du pétrole	<b>07</b>
<b>Figure 2</b>	Composition du gasoil	<b>08</b>
<b>Figure 3</b>	Processus influençant le devenir de polluant dans le sol	<b>10</b>
<b>Figure 4</b>	Schéma de principe du landfarming	<b>15</b>
<b>Figure 5</b>	Schéma de principe du biopile ou biotertre	<b>15</b>
<b>Figure 6</b>	Schéma de principe du bioslurry ou bioréacteur	<b>16</b>
<b>Figure 7</b>	Mécanismes d'accession des microorganismes aux hydrocarbures	<b>20</b>
<b>Figure 8</b>	Dégradation aérobie de la matière organique en aérobiose	<b>21</b>
<b>Figure 9</b>	Dégradation anaérobie de matière organique en anaérobiose	<b>22</b>
<b>Figure 10</b>	Photos des deux sites de prélèvement d'échantillonnage.	<b>24</b>
<b>Figure 11</b>	Préparation des deux échantillons de sol	<b>25</b>
<b>Figure 12</b>	Le polluant (le gasoil)	<b>25</b>
<b>Figure 13</b>	le fertilisant	<b>26</b>
<b>Figure 14</b>	Préparation des frottis et coloration de Gram	<b>27</b>
<b>Figure 15</b>	Préparation d'inoculum bactérienne	<b>28</b>
<b>Figure 16</b>	Dispositif expérimental de bioremediation	<b>29</b>
<b>Figure 17</b>	Irrigation et retournement de sol	<b>30</b>
<b>Figure 18</b>	Dénombrement de la flore bactérienne.	<b>31</b>
<b>Figure 19</b>	Le teste de germination à $T_0$ .	<b>32</b>
<b>Figure 20</b>	Le teste de germination	<b>33</b>
<b>Figure 21</b>	Dénombrement bactérien sur gélose nutritif à T 15jours.	<b>38</b>
<b>Figure 22</b>	Evolution de la biomasse bactérienne dans les échantillons du sol au cours d'expérimentation	<b>40</b>
<b>Figure 23</b>	Evolution du pH dans les sols traité ou cours d'expérimentation	<b>43</b>
<b>Figure 24</b>	Résultats des graines germées du sol non pollué et sol polluée par le gasoil à $T_0$	<b>45</b>
<b>Figure 25</b>	Résultats des graines germées du sol traité : bioaugmentation A et approche intégrées A	<b>46</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b>	Screening des risques potentiels du polluant	<b>08</b>
<b>Tableau 2</b>	Les zones de prélèvement des souches bactériennes	<b>26</b>
<b>Tableau 3</b>	Le contenu de chaque bac de technique de bioremédiation	<b>29</b>
<b>Tableau 4</b>	Aspect macroscopique des colonies isolées sur gélose nutritive.	<b>34</b>
<b>Tableau 5</b>	Les différents aspects microscopiques des souches	<b>35</b>
<b>Tableau 6</b>	Aspect macroscopique des souches bactériennes.	<b>36</b>
<b>Tableau 7</b>	Aspects microscopiques (Gx100) des souches bactériennes	<b>37</b>
<b>Tableau 8</b>	Nombre des microorganismes de chaque dilution du sol	<b>39</b>
<b>Tableau 9</b>	Dénombrement de la microflore dans les échantillons de sols	<b>40</b>
<b>Tableau 10</b>	paramètres calculés pour les graines d'orge du sol non pollué (témoin) et sol pollué à T <sub>0</sub> .	<b>44</b>
<b>Tableau 11</b>	L'analyse statistique des graines d'orge du sol polluée par le gasoil non traité et traité par les différentes techniques de bioremediation à T <sub>15</sub>	<b>46</b>

**Liste des abréviations :**

**AIA**: approche intégrée A

**AIB** : approche intégrée B

**BAA** : bioaugmentation A

**BAB** : bioaugmentation B

**BN** : bouillon nutritif

**CA**: consortium A

**CB**: consortium B

**DO** : densité optique

**GN** : gélose nutritif

**HAP** : hydrocarbure aromatique polycyclique

**HC** : hydrocarbure

**HP** : hydrocarbure pétrolier

**K** : potassium

**MO** : matière organique

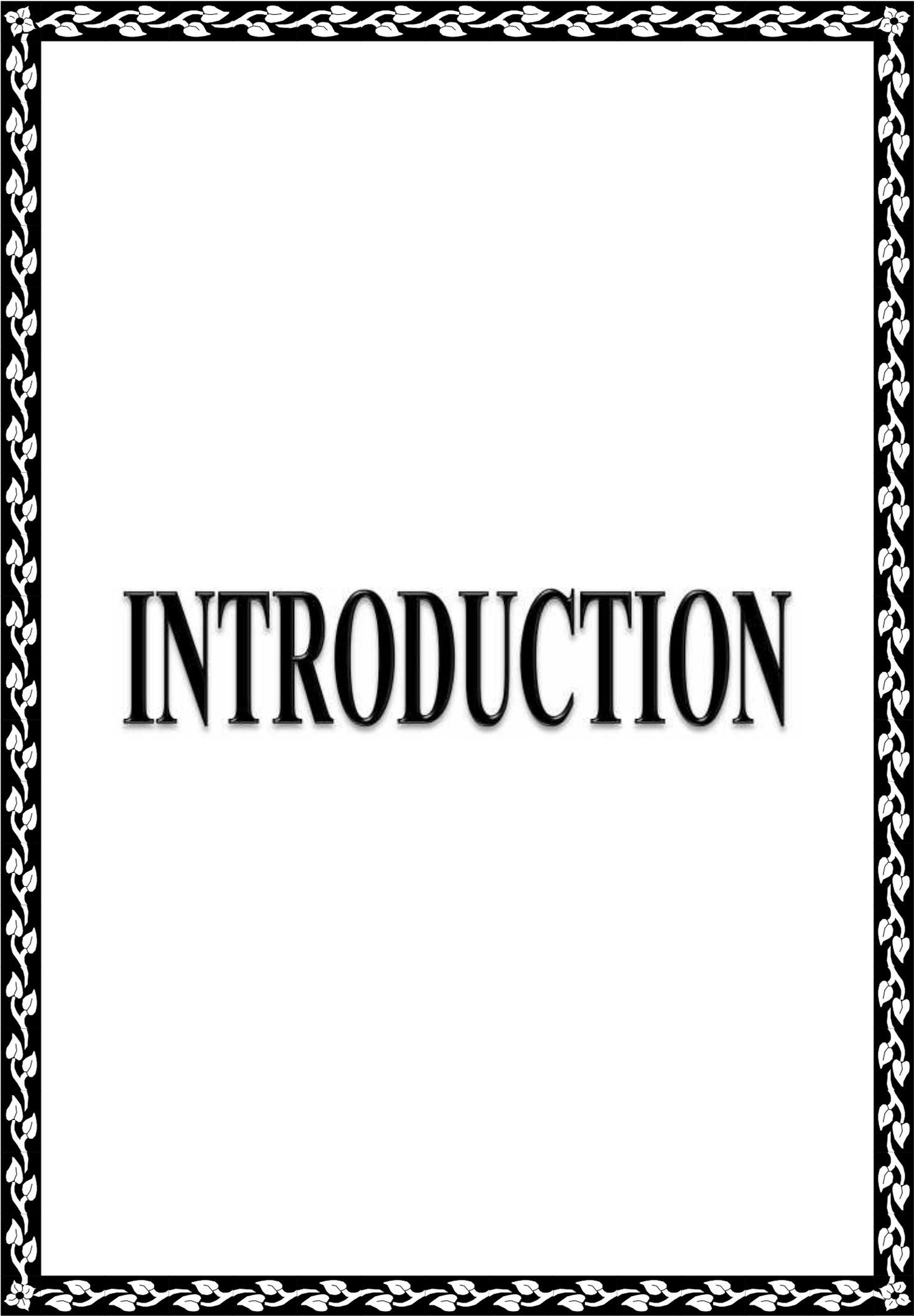
**N** : azote

**P** : phosphore

**pH** : potentiel d'hydrogène

**T** : le temps

**UFC** : Unité formant colonie

A decorative border with a repeating floral and leaf pattern in black and white, framing the central text.

# INTRODUCTION

## Introduction :

Les activités humaines industrielles et économiques sont à l'origine de la production de composés chimiques, dont la plupart présentent une grande toxicité au monde vivant. Tel est le cas des hydrocarbures, qui, suite à leur rejet occasionnel ou accidentel dans l'environnement, peuvent entraîner des catastrophes écologiques irréversibles, pouvant avoir un impact direct ou indirect, sur la santé humaine et l'équilibre de l'écosystème.

L'évaluation de la pollution par les hydrocarbures moyennant les analyses quantitatives et qualitatives s'avère très onéreuse bien qu'elle soit indispensable en fournissant des techniques thermiques, physiques et chimiques qui sont coûteuses, non écologiques, complexes, et qui peuvent conduire à la destruction de la texture et les caractéristique de sol et pas toujours à la neutralisation complète des polluants.

« La technique biologique est reconnue comme une alternative précieuse pour l'élimination de la substance toxique, en raison de sa rentabilité, son respect à l'environnement, sa simplicité technologique et la conservation de la texture et des caractéristiques du sol » (Agarry et Ogunleye, 2012).

L'utilisation de microorganismes pour détoxifier ou éliminer les polluants repose sur leur diverses capacités métaboliques. C'est une méthode évolutive pour la dégradation de nombreux polluants environnementaux, y compris les produits de l'industrie pétrolière.

La bioremédiation par les populations naturelles de microorganismes représente l'un des principaux mécanismes par lesquels le gasoil et les autres polluants hydrocarbonés peuvent être éliminés de l'environnement (Das et Chandran, 2011 ; kumar et al, 2011).

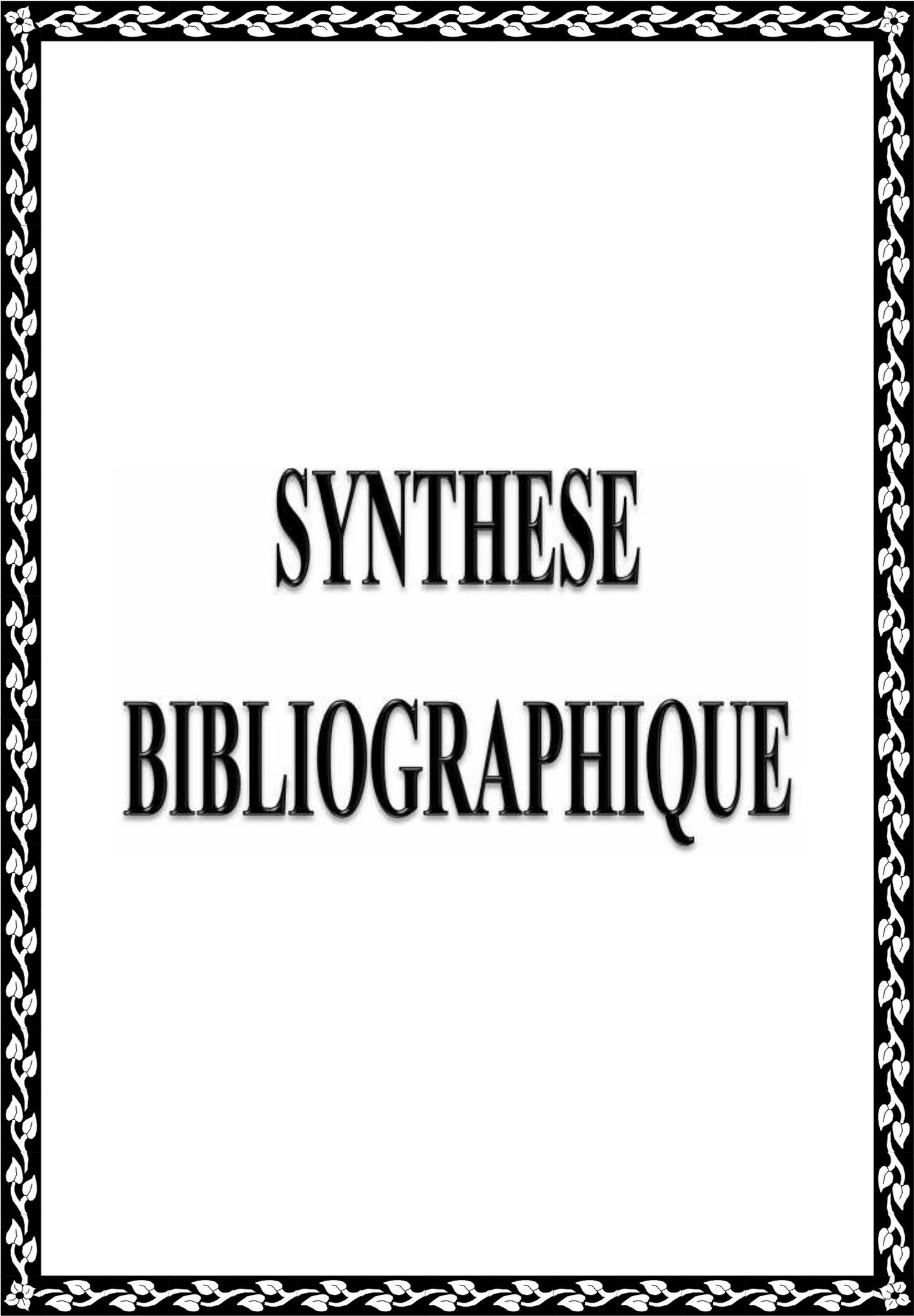
L'objectif de notre travail est d'étudier la capacité de dégradation du gasoil - introduit artificiellement dans le sol - par quelques souches bactériennes étudiées dans des travaux antérieurs et de comparer l'efficacité de plusieurs techniques de bioremédiation à savoir : atténuation naturelle, biostimulation par l'ajout d'éléments nutritifs sous forme d'engrais, bioaugmentation par des souches bactériennes hydrocarbonoclastes et une approche intégrée combinant la biostimulation et la bioaugmentation.

En outre, l'activité dépolluante des souches microbiennes est suivie dans le temps, à travers l'évolution de la biomasse microbienne (UFC /ml), et potentiel d'hydrogènes (pH).

## INTRODUCTION

Un test de germination des graines d'orge effectué après 15 jours de bioremédiation sert de preuve de l'efficacité des techniques appliquées dans l'élimination du gasoil.

Notre mémoire est composé de trois parties : le premier présente un rappel des principales données bibliographiques. Le second décrit le matériel et les méthodes utilisés. La troisième partie est consacrée aux résultats et discussion qui sera suivi d'une conclusion.

A decorative border with a repeating floral and leaf pattern in black and white, framing the central text.

# **SYNTHESE**

# **BIBLIOGRAPHIQUE**

## Chapitre I : Pollution des sols aux hydrocarbures

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.

Les hydrocarbures sont des contaminants environnementaux omniprésents. Ils constituent une classe des produits chimiques organiques dangereux dont certains de leurs effets toxiques sont reconnus comme fortement cancérogènes, génotoxiques, immunotoxiques, mutagéniques ou tératogéniques. Ils représentent une menace pour la santé publique.

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 les chaînes alimentaires. 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 (**Abbia et Guitoun, 2016**).

### 1. Le sol

#### 1.1. Définition

Le terme sols s'applique aux matériaux externes de la surface terrestre, une couche distincte des roches sous-jacentes. La formation du sol implique des interactions complexes entre le matérielle d'origine (roches, sable, moraines, glaciaires), la topographie, le climat et les organismes vivants. Deux principaux groupes de sol peuvent être distingués : les sols minéraux et les sols organiques (**Michael et John, 2007**).

#### 1.2. Constituants

Traditionnellement, on nomme sol la mince couche de terre, il n'est pas un milieu stable, c'est donc un milieu dynamique. En fait le sol comprend trois composantes : solide, liquide et gazeuse. Les minéraux et la matière organique forment la partie solide. Exceptions fait des sols organiques, les minéraux prédominent toujours. L'eau et l'aire occupent les espaces laissées entre les particules solides de sol.

Selon la nature de sol, la proportion de chacun d'eux s'en trouve affectée. Par exemple, si la quantité d'eau augmente, celle de l'aire diminue, et vice versa (**Khedim et Bouchiki, 2013**).

## 1.2.1. Phase solide

Elle est constituée par des minéraux et des matières organiques en proportions variables. On pourrait considérer les organismes vivants du sol comme une partie de la phase solide, puisqu'ils ne sont ni gazeux ni liquides (Calvet, 2000). On distingue deux fractions dans le sol

- **Fraction minérale**

Les minéraux constituent, en général, de 95 à 99% du sol. La composition minérale dépend de la nature de la roche-mère. La nature des minéraux peut être extrêmement diverse avec des tailles granulométriques différentes :

- Sable ( $\varnothing = 2000$  à  $50 \mu\text{m}$ )
- Limon ( $\varnothing = 50$  à  $2 \mu\text{m}$ )
- Argile granulométrique ( $\varnothing < 2\mu\text{m}$ ) (Noumeur, 2008).

Généralement cette fraction n'intervient pas ou peu dans la sorption des HAP sauf quand la teneur en carbone organique de sol est faible, c'est-à-dire lorsque la fraction du carbone organique  $< 0.001$  (Gabet, 2004).

- **Fraction organique**

La fraction organique est constituée à plus de 80% de matière organique (MO) morte (tissus végétaux, résidus d'organismes).

On trouve aussi des organismes vivants : les bactéries, les actinomycètes, les champignons mais aussi des racines ou encore la faune (protozoaires, nématodes, certains insectes, vers de terre) (Quénéa, 2004).

## 1.2.2. Phase liquide

La phase liquide du sol n'est pas uniquement de l'eau pure mais une solution dont la composition est complexe et très variable. On la désigne souvent par l'expression « solution du sol ». Elle contient de très nombreuses substances dissoutes organique et inorganique, ionisées et non dont la nature et la concentration dépendent de plusieurs phénomènes (Khedim et Bouchikhi, 2013).

### 1.2.3. Phase gazeuse

La phase gazeuse du sol est souvent appelée l'atmosphère du sol. Sa composition est souvent voisine de celle de l'air mais elle peut être très variable dans l'espace et dans le temps. Elle dépend principalement de deux facteurs, la proximité de l'atmosphère, c'est-à-dire la profondeur dans le sol et l'activité biologique (Noumeur, 2008).

### 1.3. Effet des propriétés du sol sur le comportement du polluant

Le comportement d'un sol face à une infiltration de polluants sera affecté par ces propriétés. Il sera donc nécessaire de caractériser le sol pour prévoir le comportement des polluants et les conséquences possibles de la pollution (Lemiere et al, 2001).

#### 1.3.1. Effet des constituants minéraux

- **Les argiles**

Les principales caractéristiques des argiles résident dans leurs propriétés colloïdales, leur capacité de rétention d'eau et leur grande surface spécifique qui leur confèrent de fortes capacités d'échange, donc d'adsorption. Les argiles entrent dans la composition de nombreux complexes argilo-humiques, favorisant la rétention des hydrocarbures à long terme (Amellal, 2003).

- **Les sables et limons**

Les sables et les limons représentent la fraction minérale grossière, généralement constituée de quartz, de feldspaths et de micas. Bien que les sables et les limons grossiers ont un rôle fondamental dans l'édification de la structure du sol, ces deux fractions minérales ne semblent pas intervenir de façon importante dans les phénomènes d'adsorption des hydrocarbures dans le sol (Bayard, 1997 ; Jayr et al, 2000).

Généralement la composition chimico-minéralogique du sol et notamment la richesse en minéraux argileux, et la teneur en matière organique, influent sur l'aptitude du sol à retenir momentanément ou à fixer les polluants, sur la disponibilité des colloïdes et sur les réactions biochimique menant à la dégradation de contaminant (Lemiere et al 2001).

#### 1.3.2. Effet de la texture et structure du sol

Les propriétés adsorbants des sols dépendent de leur texture et leur structure. Ces caractéristiques déterminent la porosité et la perméabilité des sols, deux facteurs qui influencent l'adsorption et la mobilité des polluants organiques (Amellal, 2003).

Le degré de pénétration des hydrocarbures est fonction de la texture et de la structure du sol, comme de la quantité et de la nature du produit déversé. Un produit de faible viscosité

pénètre rapidement dans un sol sec et poreux et s'étale donc peu à la surface. Inversement, sur un sol saturé d'eau de type argileux, le produit s'étale largement d'autant plus que sa viscosité est relativement élevée (**Bergue, 1986**).

### **1.3.3. Effet de l'eau du sol**

L'eau pourra entrer en compétition avec les molécules organiques pour l'adsorption sur les matériaux solides du sol entraînant ainsi une baisse de l'adsorption des polluants lorsque le taux d'humidité du sol augmente (**Chiou et Show, 1985**).

### **1.3.4. Effet des constituants organiques du sol**

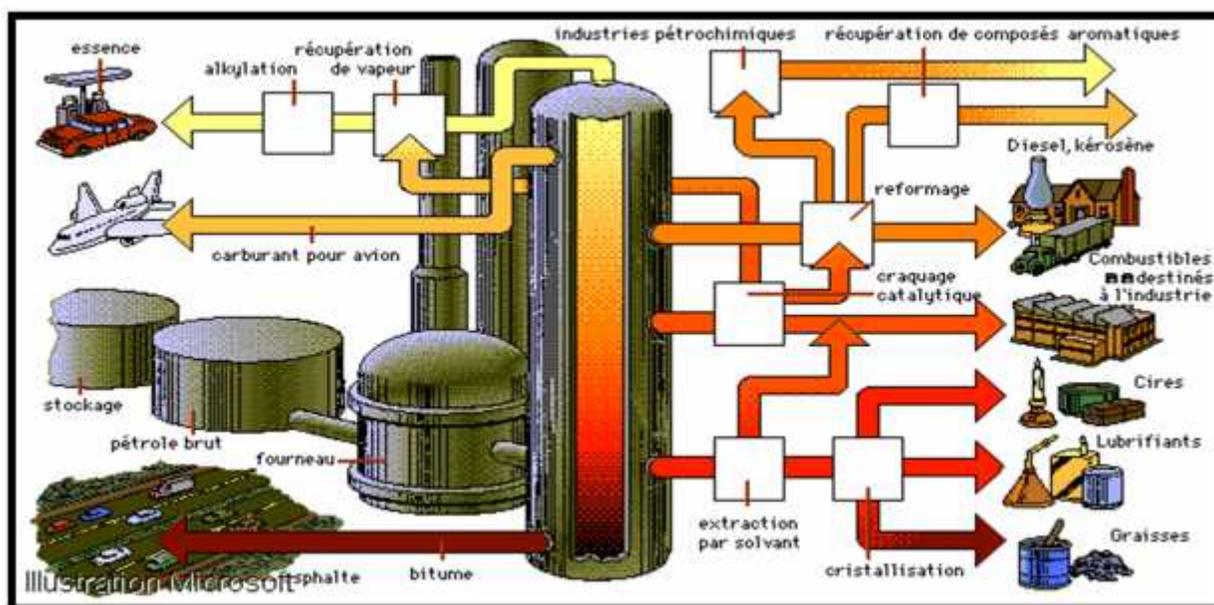
La présence des matières organiques dissoutes telles que les substances humiques et fulviques modifie de façon significative le comportement des molécules organiques dans les milieux aqueux et dans le sol. Elle augmente la solubilité en phase aqueuse des polluants organiques et diminue leur adsorption sur les phases solides, le degré d'influence de la matière organique sur les polluants dépend bien évidemment de la nature et des caractéristiques chimiques de ces derniers (**Bouafiane, 2015**).

## **2. Le polluant**

### **2.1. Le Gasoil, dérivé de raffinage de pétrole**

Une fois le pétrole brut extrait, il doit subir un traitement de raffinage pour être utilisable. Le raffinage consiste à séparer la matière brute en une partie lourde et une autre qui est légère. Pour ce faire, le traitement de raffinage extrait les éléments indésirables pour ne garder que les hydrocarbures.

Le raffinage permet ainsi de purifier le pétrole et de le transformer en produits de composition à peu près constante comme les carburants, les combustibles et les matières premières (**Figure. 1**)



**Figure 01:** le raffinage du pétrole (<http://www.petroleum.fr.st>).

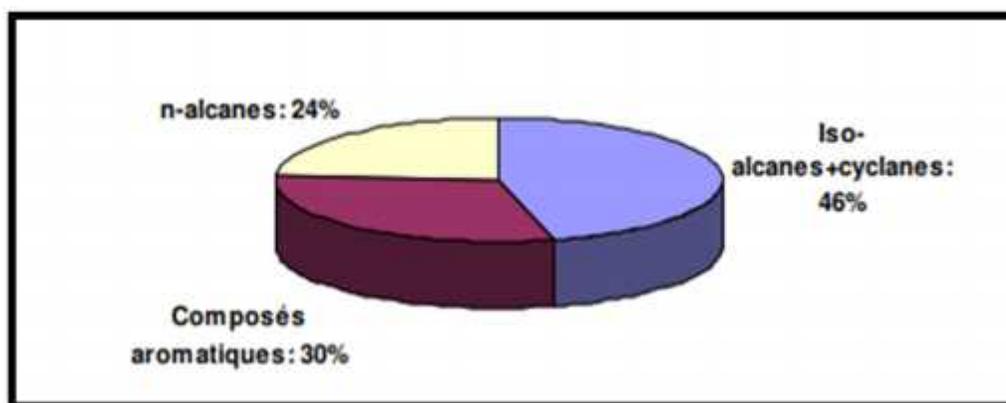
Selon le niveau de transformation, les dérivés du pétrole peuvent être des carburants, des gaz de pétrole liquéfié pour les voitures, du kérosène pour les avions ou encore toutes sortes de fioul pour les usages domestiques. Près de la moitié des produits dérivés du pétrole sont utilisés dans le transport (essence, gasoil).

### 2.1.1. Composition du gasoil

Les carburants tels que l'essence et le gasoil sont stockés et vendus dans les stations-service. Il s'agit des mélanges complexes d'hydrocarbures pétroliers. La composition en hydrocarbures dépend de facteurs comme l'origine du pétrole brut soumis au raffinage et les conditions de raffinage.

Le gasoil se compose de fractions lourdes, principalement de chaînes d'hydrocarbures de 10 à 28 atomes de carbone. Il se compose de 2000 à 4000 hydrocarbures des quatre structures principales (Marchal et al, 2003 ; Piedrafita et al, 2007) :

- n-alcane ou n-paraffines
- iso-alcane ou isoparaffines
- cyclane ou cycloparaffines
- composés aromatiques (BTEX et HAPs)



**Figure 02:** Composition du gasoil (Marchal et al, 2003 ; Piedrafita et al, 2007).

### 2.1.2 Effet du polluant sur l'environnement

De petites quantités de carburant gasoil ou d'essence peuvent entraîner des conséquences négatives pour l'homme et l'environnement.

Le gasoil dans le sol est dangereux s'il devient mobile et s'il atteint sa cible (eaux souterraines ou superficielles, l'écosystème, les hommes...). Un sol pollué devient alors un problème de santé publique si ce polluant atteint la nappe phréatique ou le cours d'eau avoisinant s'ils sont destinés à l'alimentation en eau potable (Marchal et al, 2003 ; Piedrafita et al, 2007).

**Tableau 1:** Screening des risques potentiels du polluant (Piedrafita C et al, 2007).

Source	Voies d'exposition	Objet
Couche surnageante		
Sol	Ingestion de terre/ poussière	Homme
	Contact dermique direct	
	Absorption par les cultures	
	Perméation au travers des canalisations d'eau potable	
Eaux souterraines	Dispersion	Prise d'eau potable
		Captage d'eau pour l'irrigation
		Eaux de surface

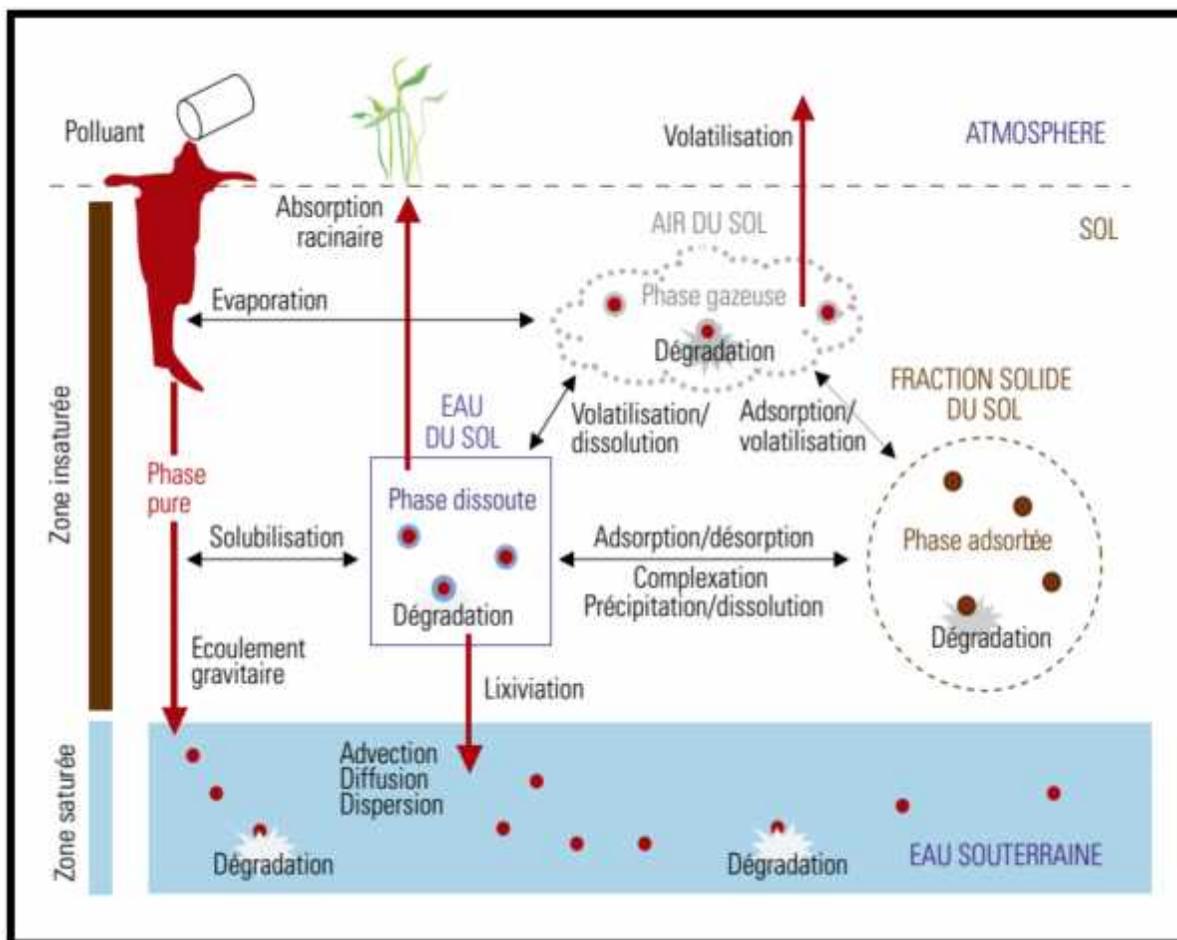
### 2.2. Devenir des hydrocarbures dans l'environnement

C'est par des processus physiques, chimiques et biologiques qu'un hydrocarbure va pouvoir être déplacé, transformé ou éliminé, après avoir été réparti dans l'environnement.

Parmi les différentes altérations que peut subir un hydrocarbure, on citera les facteurs :

- Evaporation (**Soltani, 2004**).
- Solubilisation (**Benchouk, 2017**).
- Emulsification (**Benchouk, 2017**).
- Sédimentation (**Bouderhem, 2011**).
- Photo-oxydation (**Khelil-radji, 2015**).
- Biodégradation (**Bireche et Berregui, 2014**).

Le devenir des polluants rejetés dans l'environnement est principalement gouverné par les processus de biodégradation. L'existence de ces phénomènes dépend de la biodégradabilité intrinsèque du polluant mais aussi de la présence de microflore dégradatrices compétentes dans les sols et les eaux souterraines et des facteurs environnementaux du site. La connaissance de la biodégradabilité des produits pétroliers (essence, gasoil, etc.) représente un enjeu évident. En effet, en cas de pollution accidentelle, il convient d'être en mesure d'apprécier les capacités d'autoépuration du milieu naturel (atténuation naturelle) pour établir une stratégie et mettre en place, si nécessaire, les opérations de réhabilitation.



**Figure 03:** Processus influençant le devenir de polluant dans le sol (Maes et al, 2006).

Selon **Piedrafita (2007)**, la biodégradabilité intrinsèque des carburants, dépend particulièrement de leur structure. En effet, des études ont montré que les hydrocarbures récalcitrants à la biodégradation sont des cycloalcanes et des alcanes ramifiés, notamment ceux qui comportent des atomes de carbone quaternaires ou des groupements substituants consécutifs sur la chaîne carbonée principale.

En outre, les microflore des sols pollués présentent en général une capacité de dégradation légèrement supérieure à celle des sols non pollués. Plusieurs mécanismes peuvent rendre compte de l'efficacité des microflore provenant d'environnements pollués :

- la présence de microorganismes ayant un métabolisme spécialisé ;
- l'existence de co-métabolisme ;
- des interactions positives entre souches (coopération et action en consortium).

## Chapitre II : Remédiation des sols pollués aux hydrocarbures

### 1. Les différents traitements des sols pollués

Les hydrocarbures sont connus pour le risque qu'ils présentent sur la santé humaine et les écosystèmes, si leur concentration et leur mobilité sont trop importantes. Afin d'éviter la diffusion des HP des sites contaminés vers les profondeurs des sols, des mesures doivent être prises en considération. Le choix d'une méthode particulière de dépollution va dépendre, au préalable, de certains paramètres comme le type de polluant et de la variabilité de son comportement (volatilité, adsorbabilité, polarité...), de la diversité des conditions locales (nature du sol, de la nappe, accessibilité, disponibilité de surfaces utilisables à proximité, zone urbaine ou non), de voir s'il s'agit d'une pollution récente ou ancienne, de son étendue. En plus, les exigences économiques et administratives sont à prendre en compte (**Bouderhem, 2011**).

Ceci nécessite donc, un diagnostic au préalable afin d'appliquer l'une des approches de remédiation à la pollution soit *in situ*, directement sur site sur sol restant en place ou *ex situ*, sur le site, sur un sol qui a été excavé ou encore le déplacer du site (traitement « hors site ») (**Marie-Paule, 2007**).

#### 1.1 Traitements physiques

Les traitements physiques consistent à transférer et concentrer les polluants, sans les modifier ou les détruire, en se servant de fluides pour transporter la pollution vers des points d'extraction ou pour l'immobilisation (**Louati, 2013**).

#### 1.2 Traitements thermiques

Les traitements thermiques consistent à chauffer le matériel contaminé pour en extraire le polluant et le détruire (ex : incinération), l'isoler (ex : désorption thermique, thermolyse, etc.) (**Louati, 2013**).

#### 1.3 Traitements chimiques

Les traitements chimiques ont pour but de détruire les polluants ou de les transformer en une forme moins nocive pour l'environnement ; et ceci par l'intermédiaire de réactions chimiques se produisant entre le polluant et le réactif ajouté. Ils peuvent être applicables *in situ* ou après

excavation des sols. La majorité des procédés exigent que les sols soient sous forme de boues ou que les contaminants soient mobilisés dans un milieu liquide (**Bouderhem, 2011**).

### 1.4 Traitement biologique

Les traitements biologiques sont les techniques qui exploitent les propriétés d'un organisme vivant pour réaliser l'opération de dépollution. Ils existent deux catégories principales :

- **Phytoremédiation**

Elle exploite les propriétés des végétaux (plantes, arbustes, arbres) pour extraire, dégrader ou immobiliser les polluants dans un sol pollué. On parle de phytoremédiation aidée lorsqu'il y a ajout d'amendement au sol pour faciliter l'action des plantes.

Ces plantes présentent des mécanismes constitutifs et adaptatifs pour accumuler et tolérer des concentrations élevées en contaminants au niveau de leur rhizosphère (**Benfardia et Chenine, 2014**).

Lorsqu'elle est appliquée aux sols pollués par les hydrocarbures pétroliers, la phytoremédiation repose sur plusieurs mécanismes, à savoir la phytodégradation, la phytoaccumulation, la phytovolatilisation, la phytostabilisation et la rhizoremédiation (**Mazziotti, 2017**).

- **Bioremédiation**

Le terme de bioremédiation est composé de "Bios " qui signifie la vie et se réfère aux organismes vivants et "remédier " qui signifie résoudre un problème (**Babak, 2013**).

C'est un ensemble de techniques qui utilisent les capacités enzymatiques des microorganismes (bactéries, algues, champignons) pour dégrader les polluants organiques. Ces organismes peuvent être déjà présents dans la zone polluée (indigènes) ou ajoutés au milieu (exogène), ou encore être prélevés sur le site contaminé, cultivées au laboratoire puis réintroduits dans le sol.

La bioremédiation se déroule généralement en condition d'aérobie, cependant l'application des systèmes de bioremédiation en condition d'anaérobie permet de dégrader un certain nombre de molécules récalcitrantes (**Abdelly, 2006 ; Fokou Mbogne, 2017**).

## 2. Les principales méthodes de la bioremédiation

### 2.1. La bioremédiation in-situ

Il s'agit de traitements biologiques directement appliqués sur le site à dépolluer. Ils ont l'avantage de ne pas nécessiter d'excavation et de permettre, éventuellement, la poursuite des activités (Hanna, 2004).

#### 2.1.1. Atténuation naturelle

C'est simplement la biodégradation naturelle des polluants par les microorganismes présents dans le sol ou la nappe. Cette méthode consiste uniquement à vérifier la présence et la capacité des micro-organismes utilisés pour dégrader les polluants (Hanna, 2004).

#### 2.1.2. Bioventing

Le bioventing est un procédé consistant à faire circuler de l'air dans la zone contaminée de manière à en extraire les polluants, tout en assurant un apport en oxygène propice à une dégradation biologique additionnelle. Cette technique implique soit la mise en dépression de la zone insaturée, soit à injecter l'air (ou oxygène pur) dans les zones polluée (Nathalie, 2007).

#### 2.1.3. Bioaugmentation

C'est une méthode de traitement in-situ, qui consiste à ensemercer des souches spécifiques de microorganismes exogènes dans le sol afin d'optimiser l'activité microbienne indigène responsable de la biodégradation des polluants organiques. Les microorganismes peuvent être naturels ou génétiquement modifiés. Cette méthode, bien que souvent efficace, peut toutefois conduire au déclin de la population introduite par des réactions de compétitivité avec la microflore indigène ou par défaut d'acclimatation avec le milieu récepteur. Alors, l'autre solution consiste donc à prélever des microorganismes indigènes aptes à dégrader le polluant organique, d'en faire une culture de souche microbienne afin de les réinjecter dans ce sol même (Fokou Mbogne, 2017 ; Odokuma et Dickson, 2003).

### 2.1.4 Biostimulation

La biostimulation consiste à stimuler l'activité et la croissance des microorganismes indigènes du sol par l'ajout de certains composés afin d'améliorer la biodégradation des polluants. Parmi ces composés, des nutriments principalement l'azote, le phosphore, le potassium et des conditions de milieu (potentiel d'oxydoréduction, humidité ...) (**Mazziotti, 2017 ; Miyasaka et al, 2006**).

### 2.1.5 Combinaison Biostimulation et Bioaugmentation

Il est possible de combiner des actions de bioaugmentation avec des actions de biostimulation (ex : ensemencement et ajout de fertilisants). Ces deux techniques de bioremédiation ont été appliquées sur le terrain pour dépolluer les sols contaminés par les hydrocarbures. Plusieurs études ont montré que la biostimulation par ajout de nutriments et la bioaugmentation par inoculation de bactéries renforcent le taux de dégradation de l'hydrocarbure pétrolier dans les sites contaminés (**Louati, 2013**).

## 2.2 La bioremédiation ex-situ

Les traitements hors site peuvent être utilisés dans le cas où les contaminants n'ont pas pénétré trop profondément, les sols peuvent alors être excavés puis traités. L'utilisation de ces procédés hors site permet la plupart du temps une réduction des durées de traitement (**Ballerini et al, 1998**).

### 2.2.1 Landfarming

Le sol est étalé sur une surface imperméable. Des fertilisants sont ajoutés au sol qui est travaillé, retourné et biné, à intervalles réguliers pour permettre son aération et pour favoriser le

Développement des microorganismes. C'est une technique adaptée aux contaminants peu volatils et est souvent utilisée pour restaurer les sols contaminés par les hydrocarbures. Les surfaces ainsi décontaminées peuvent être utilisées ultérieurement comme terrain agricole (**Ali Ahmed, 2011**).

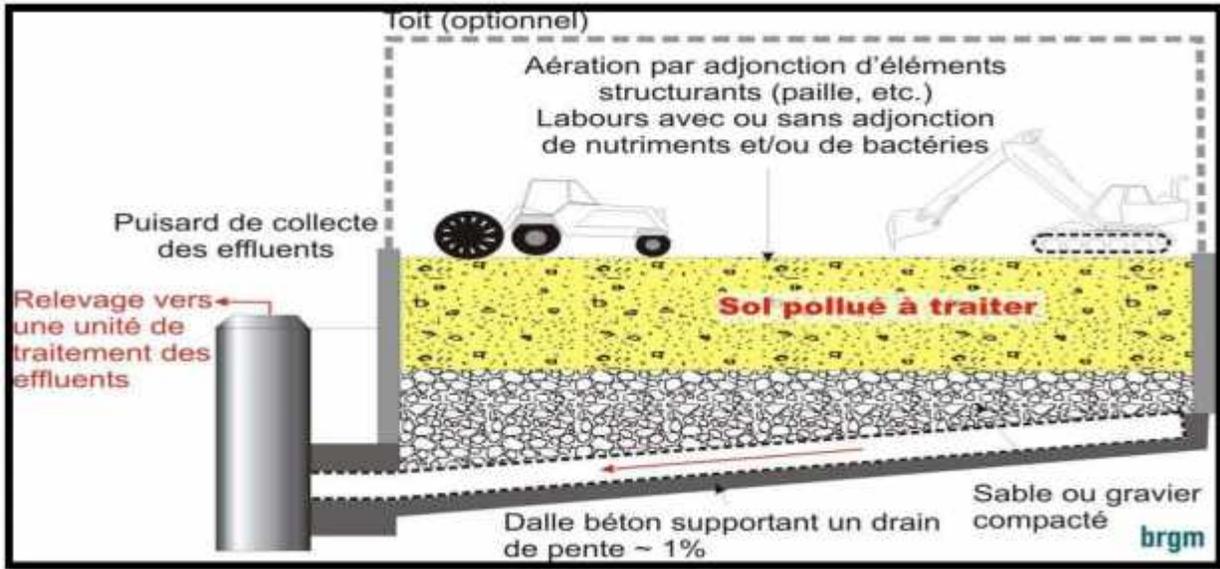


Figure 04: Schéma de principe du landfarming (Colombano et al, 2008).

### 2.2.2 Biopile ou biotertre

C'est une technique utilisée lorsque le sol pollué contient une fraction de contaminants volatils non négligeable. Elle nécessite une mise en tas du sol qui sera recouvert d'une membrane imperméable. Le matériau à traiter est étalé sur une surface imperméable légèrement en pente. A la base du tas, une tuyauterie est installée permettant l'aération du matériau et au sommet, un dispositif d'aspersion servira à l'humidifier. Des rigoles permettent de récupérer l'eau sortant du tas et à laquelle on ajoute les nutriments et les microorganismes nécessaires. Les gaz sont aspirés et traités avant d'être libérés dans l'atmosphère (Ali Ahmed, 2011).

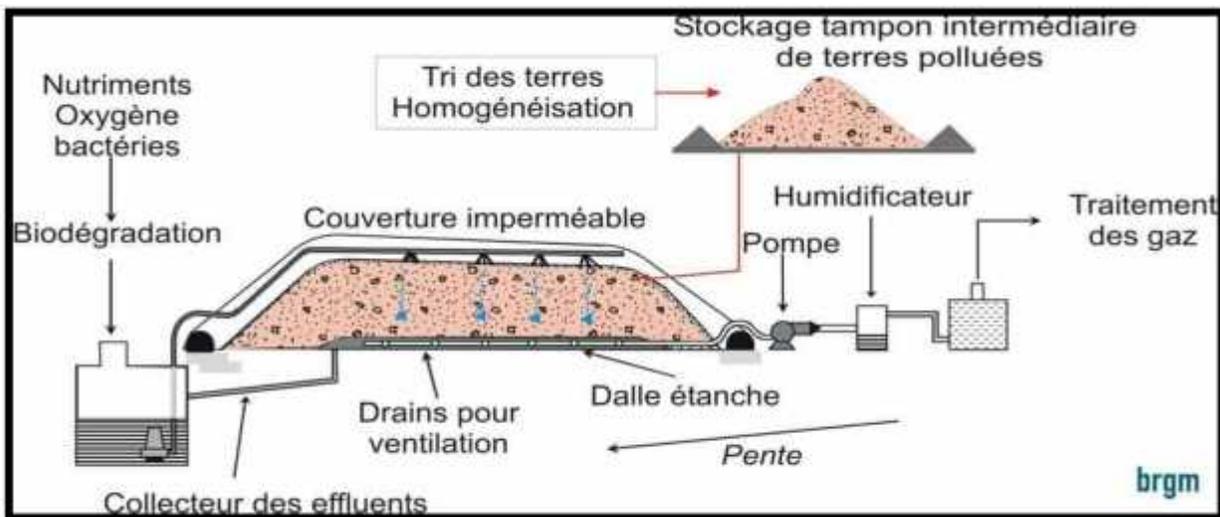


Figure 05: Schéma de principe du biopile ou biotertre. (Colombano et al, 2008).

## 2.2.3 Bioslurry ou bioréacteur

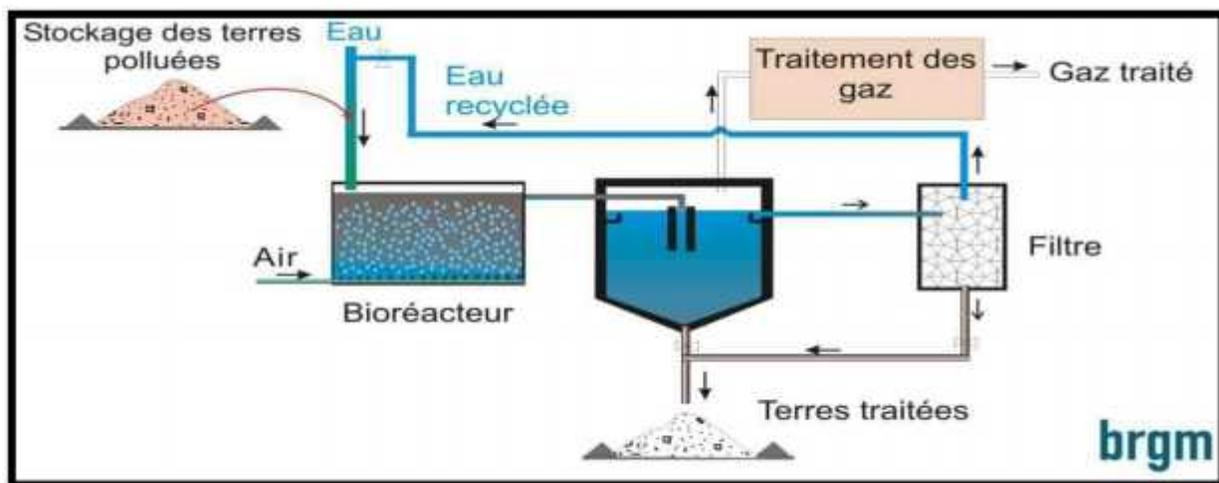
Son principe consiste à réaliser la biodégradation du polluant dans un contenant installé sur le site en ajoutant au matériel à traiter les ingrédients nécessaires à la réaction. On peut traiter de cette façon l'eau, pompée au préalable, le sol qui sera excavé et traité sous forme de boue ou des phases gazeuses (on parle alors de biofiltre).

Le bioréacteur permet de gérer précisément le processus de biodégradation par le contrôle du pH, de la température, de l'humidité et des teneurs en nutriments.

Les conditions optimales peuvent être rapidement atteintes, d'où les bons rendements opérationnels de la méthode.

En fonction du polluant on peut ajouter des microorganismes adaptés pour le traitement qu'il s'agisse de souches autochtones ou allochtones.

Dans la plupart des dispositifs, il y a plusieurs réacteurs en chaîne, le matériel à traiter transitant de l'un à l'autre. Les nutriments sont ajoutés au niveau du premier réacteur. Des microorganismes sont également ajoutés à ce niveau si nécessaire. Un brassage mécanique est réalisé dans chaque réacteur permettant un mélange vigoureux de l'ensemble des constituants de la réaction. L'air est pulsé par le fond du réacteur et est récupéré au sommet chargé d'une éventuelle phase gazeuse polluée qui est dirigée vers un système d'épuration (Ali Ahmed, 2011).



**Figure 06** : Schéma de principe du bioslurry ou bioréacteur (Colombano et al, 2008).

## 3. Mécanismes de dégradation microbienne des hydrocarbures

### 3.1. Définition

La biodégradation est la transformation à l'aide des micro-organismes d'un composé organique métabolisable sous une autre forme plus simple, qui peut être moins ou plus toxique que le composé d'origine (biotransformation) et aboutit à un produit final qui est le dioxyde de carbone et l'eau (minéralisation) (**Kumar et Gopal, 2015**).

### 3.2. Microorganismes dégradant les hydrocarbures

Plusieurs microorganismes peuvent dégrader partiellement ou complètement les hydrocarbures pétroliers. Ce sont principalement des bactéries qui participent à cette dégradation, par contre certains champignons ont aussi démontré qu'ils pouvaient dégrader ces composés. (**Maamar, 2015**).

#### 3.2.1. Les bactéries

Les bactéries sont la classe des microorganismes activement impliqués dans la dégradation des hydrocarbures des sites contaminés. Cette dégradation résulte de voies métaboliques qui mettent en jeu des populations microbiennes spécifiques ou des capacités métaboliques combinées concernant différentes communautés microbiennes (**Haritash et Kaushik, 2009 ; Trzesicka-mynarz et Ward, 1995**).

Les bactéries hydrocarbonoclastes utilisent les hydrocarbures pétroliers comme seule source de carbone. La plupart de ces bactéries appartiennent aux  $\alpha$ -protéobactéries. On peut noter quelques genres majoritaires parmi les 79 récemment répertoriés : *Acinetobacter*, *Alcanivorax*, *Alcaligenes*, *Cycloclasticus*, *Flavobacterium*, *Marinobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Thalassolituus*, *Oleispira* et *Vibrio* (**Prince, 2005**).

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

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

### 3.2.2. Les champignons

De nombreuses études en sols ont démontré l'utilité et l'efficacité des champignons pour la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures parmi ces champignons les genres: *Amorphoteca*, *Neosartorya*, *Talaromyces*, *Graphium*, *Candida*, *Yarrowia*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Pencillium*, *Cunninghamella*, *Fusarium*, *Mucor*, *Phanerochaete*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* et *Trichoderma* . Les avantages principaux des champignons par rapport aux bactéries sont leur capacité à se propager dans les sols grâce à leur mycélium et à produire des enzymes extracellulaires par exemple des oxydases à large spécificité de substrats qui permettent un meilleur contact avec les hydrocarbures (**Benchouk, 2017**).

### 3.3. Modes d'accession des hydrocarbures par la cellule bactérienne

Selon **Scott et Finnerty (1976)**, le mécanisme d'accession impliqué dans le transport des hydrocarbures à travers la paroi des microorganismes est mal élucidé bien que des gouttelettes d'hydrocarbures soient fréquemment observées dans la cellule. Ainsi, du fait de la faible solubilité de la plupart des hydrocarbures, le mécanisme d'accession par les microorganismes peut se faire selon quatre modes que l'on peut décrire comme suit :

- **Utilisation de la phase dissoute (le transfert par solubilisation dans la phase aqueuse)**

C'est l'interaction des cellules avec les hydrocarbures dissous dans la phase aqueuse par les facteurs de solubilisation extra cellulaire (**Soltani, 2004**).

- **Transfert interfacial direct (TID)**

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Dans ce cas, le microorganisme adhère du fait de sa forte hydrophobicité à l'interface phase hydrophobe/phase aqueuse.

Selon **Finnerty et Singer (1985)**, beaucoup de microorganismes dégradant des hydrocarbures ont des surface hydrophobes et peuvent donc s'associer aux gouttelettes d'hydrocarbure ou même entrer dans la phase organique pendant la culture (**khelil-radji, 2015**).

### - **Transfert interfacial assisté par les biosurfactants (TIA)**

Des biosurfactants sont produits par la bactérie. Ils accélèrent le transfert de façon importante en augmentant l'aire interfacial entre les phases hydrophobes et hydrophiles (émulsification) (**Scriban, 1999**).

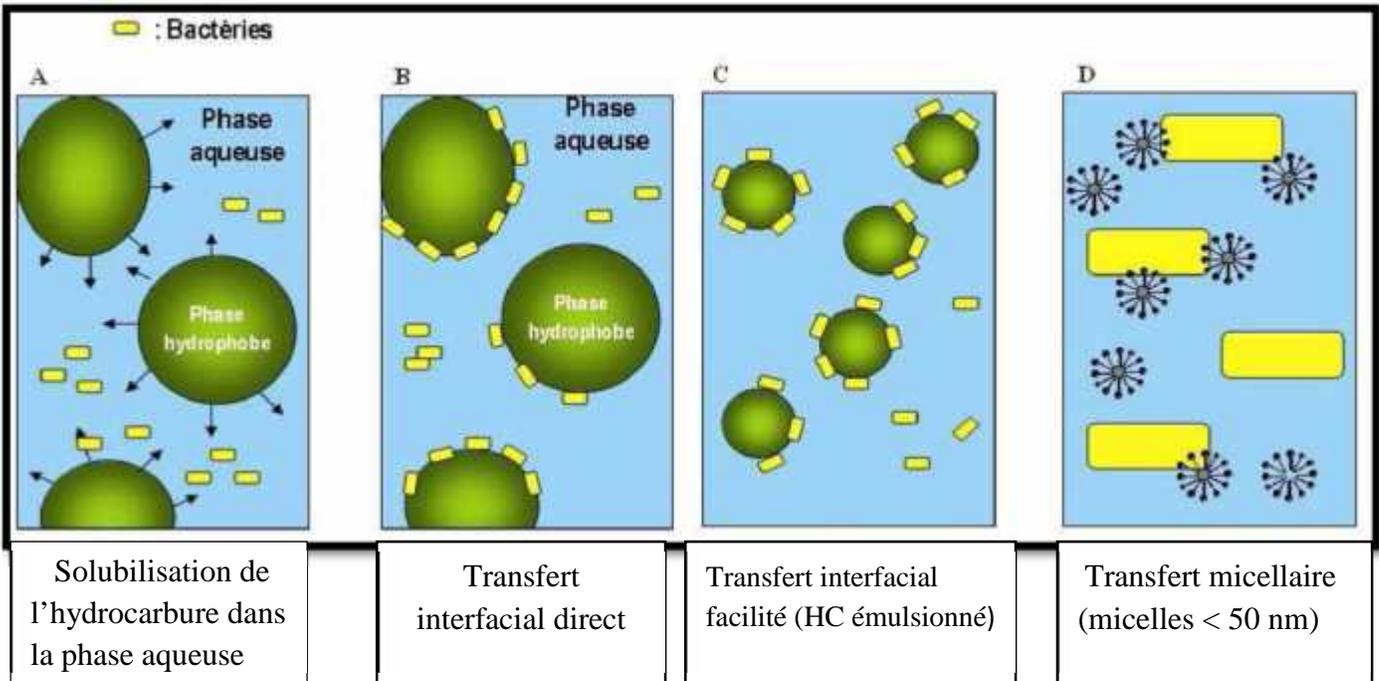
Ce sont des molécules amphiphiles qui possèdent à la fois des régions hydrophiles et des régions hydrophobes .Elles se répartissent donc à l'interface de fluides qui diffèrent en polarité, comme l'huile et l'eau.

Ces propriétés sont particulièrement importantes pour la bioremediation, la dispersion des nappes de pétrole et pour une meilleure récupération de ce pétrole (**Prescott et al, 2010**).

### - **Transfert micellaire (pseudo solubilisation)**

La production de biosurfactants par certains microorganismes peut solubiliser les substrats dans des micelles qui à leur tour seraient directement assimilés.

Plusieurs microorganismes capables de produire des biosurfactants, par exemple : *Rhodococcus aurantiacus*, *mycobactéries paraffinicum*, *corynebacterium spp*, *Bacillus subtilis* etc... Les espèces les plus importants sont celles appartenant au genre *Pseudomonas* produisant les rhamnolipides et les espèces de *Torulopsis* produisant les sophrolipides. (**Bireche et Berregui, 2014**).



**Figure 07 :** Mécanismes d'accession des microorganismes aux hydrocarbures (Vandecasteele, 2005).

### 3.4. Les voies métaboliques de la dégradation des hydrocarbures pétroliers

#### 3.4.1. La minéralisation

La minéralisation est la biodégradation complète des matières organiques à produits inorganiques. Et se produit souvent à travers les activités combinées de consortiums microbiens plutôt que par un seul micro-organisme (Shelton et Tiedje, 1984).

#### 3.4.2. Co-métabolisme

Le co-métabolisme est le processus par lequel un contaminant est fortuitement dégradé par une enzyme ou un cofacteur produit au cours du métabolisme microbien d'un autre composé. Typiquement, il n'y a aucun avantage apparent au micro-organisme impliqué (Hazen, 2010).

### 3.4.3. La biodégradation aérobie

La biodégradation aérobie se fait au cours d'une respiration bactérienne utilisant l'oxygène comme accepteur terminal d'électrons. Ce métabolisme met en œuvre des mono-ou di-oxygénases qui attaquent les molécules par addition d'oxygène (Mounier, 2013).

La biodégradabilité d'une substance organique, est le degré de mobilité physique et chimique que subi cette matière organique provoquée par des microorganismes. Le schéma suivant illustre le processus de biodégradation d'une substance organique en condition aérobie.

Celle-ci peut être affectée par la modification de l'un des facteurs suivants : (Zhanpeng et al, 2002)

- Vitesse de dégradation des composés organiques
- Quantité d'oxygène consommée.
- Produits résultant de la dégradation.
- Activité microbienne.

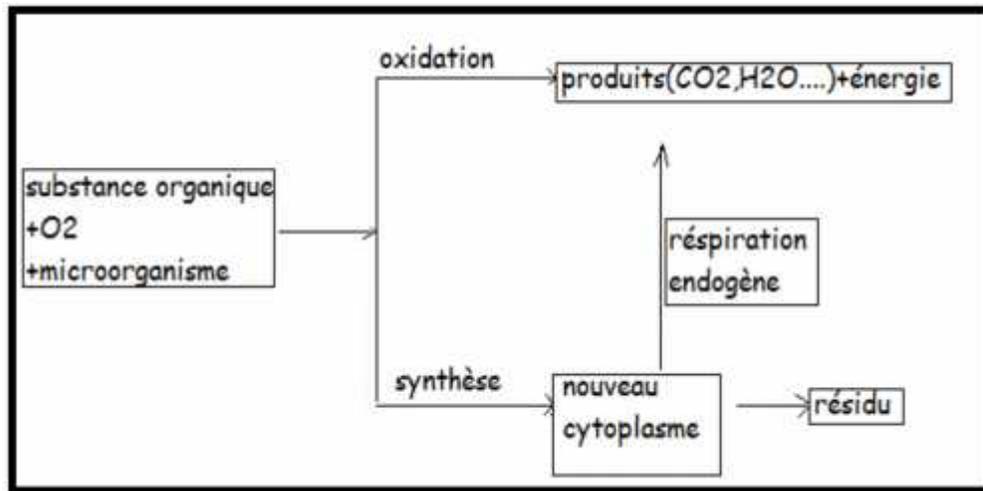


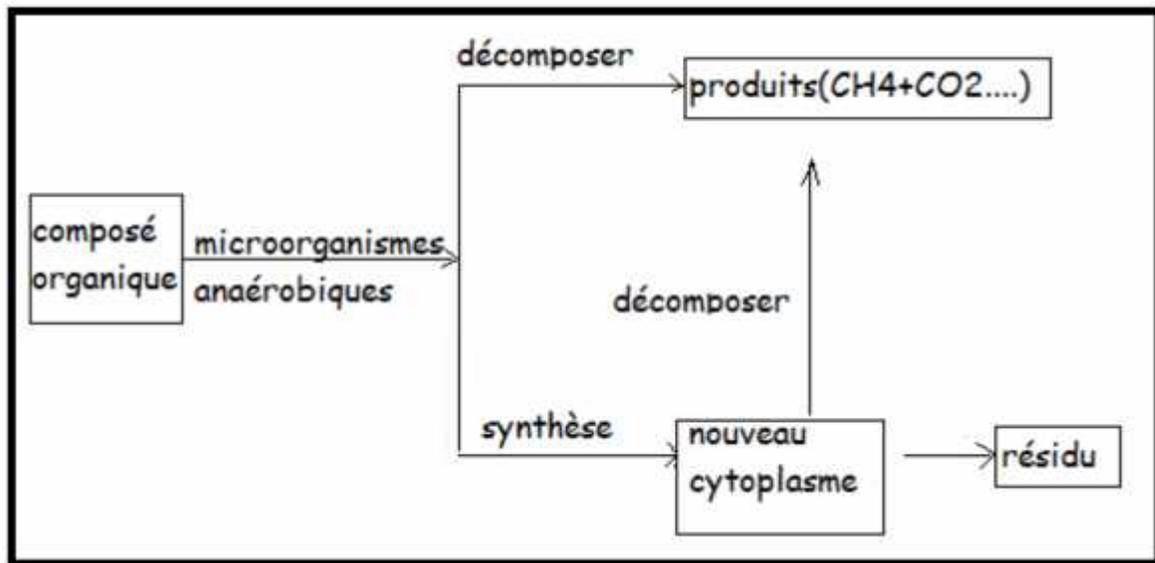
Figure 08: Dégradation aérobie de la matière organique en aérobiose : (Zhanpeng et al, 2002).

### 3.4.4. La biodégradation anaérobie

En absence d'oxygène, les bactéries métabolisent les HAP par voie anaérobie, mais beaucoup plus lentement qu'en aérobiose (Martin, 2012).

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

L'activité métabolique des microorganismes produit des substances organiques simples non complètement oxydées telles que des acides organiques et d'autres composés comme le méthane et l'hydrogène gazeux (Aleksandra, 2010). Le schéma suivant illustre parfaitement les processus anaérobies que subi la matière organique (Hongwel et al, 2003 ; Begbeg, 2008).



**Figure 09:** Dégradation anaérobie de matière organique en anaérobiose (Hongwel et al, 2003 ; Begbeg, 2008).

### 3.5. Facteurs influençant la biodégradation des hydrocarbures

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 Duelle, 1997). Les facteurs physicochimiques influant sur la vitesse de biodégradation microbienne sont :

- La structure et nature du sol (composition structure et diffusion de l'eau et l'air) (Lecomte, 1995).
- La composition chimique des hydrocarbures (la vitesse de biodégradation est plus élevée pour les hydrocarbures saturés, viennent ensuite les aromatiques légères, les

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

aromatiques à haut poids moléculaire et les composés polaires ayant la vitesse de dégradation la plus faible) (**Soltani, 2004**).

- L'humidité (les faibles humidités inférieures à 2% limitent la vitesse de biodégradation) (**Davis et Madsen, 1996**). (les trops élevés vont influencer sur la perméabilité des sols aux gaz (**Ballerini, 1999**).
- Température (entre 20 et 37°C) (**Bouderhem, 2011**).
- Salinité (diminue le nombre de microorganisme). Les fortes salinités constituent une barrière naturelle pour la biodégradation (**Bertrand et al, 1993**).
- Potentiel d'hydrogène (pH) (entre 5 et 9 optimum 7) (**Gabet, 2004**). (le pH acide favorise la solubilisation des métaux lourds) (**Bouderhem, 2011**).
- Taux d'oxygène (Selon **Lecomte, (1995)**, l'oxygène peut être fourni sous plusieurs formes : l'oxygène pure, l'air atmosphérique, le peroxyde d'hydrogène(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou eau oxygénée).
- Nutriments (en particulier l'azote et le phosphore) (**Sauret, 2011**).

A decorative border with a repeating floral and leaf pattern in black and white, framing the central text.

**MATERIEL**  
**ET**  
**METHODES**

## 1. Prélèvement de sol

Pour la réalisation de nos expériences, deux types de sol sont utilisés ; le premier est un sol forestier prélevé au niveau de chaabat ressas à l'Université Constantine 1. Le second est un sable prélevé dans la plage de Jean-Darc (poste 2) à la région de Skikda (figure 1). L'échantillonnage est effectué au mois de mai 2018 de manière aseptique afin de préserver le plus la flore indigène de ces deux sols.

A l'aide d'une pelle désinfectée à l'éthanol et à partir de trois endroits différents, les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol sont décapés et l'échantillon est prélevé de 10 à 15cm de profondeur. Ils sont ensuite acheminés au laboratoire dans des sacs en plastique.



**Figure 10:** Photos des deux sites de prélèvement d'échantillonnage.

## 2. Préparation de sol

Les deux échantillons (sol + sable) sont séchés à l'air durant 3 jours à température ambiante. Ils sont ensuite tamisés avec un tamis dont le diamètre des pores est de 2 mm. Le refus est broyé à l'aide de mortier et pilon, puis tamisé à nouveau (Figure 11). Les sols sont pesés et conditionnés dans des sachets en plastique. Ce sol est rempli dans des boites en plastique à raison de 2 kilo pour chaque boite, chaque boite reçoit un mélange des deux sols (P/P).



**Figure 11:** Préparation des deux échantillons de sol.

### 3. Préparation des additifs

#### 3.1 Polluant

Les échantillons de sol sont pollués artificiellement avec le gasoil à une concentration de 5% (V/P) (Hawrot et Nowak, 2005). Sont laissées pendant 15 jours d'expérimentation à couvercles inversés pour permettre l'échange gazeux.



**Figure 12:** Le polluant (le gasoil).

#### 3.2 Fertilisant

Les hydrocarbures sont source de carbone pour les microorganismes, l'azote et phosphore sont des facteurs limitant la biodégradation des hydrocarbures dans le sol.

## MATERIEL ET METHODES

Le fertilisant utilisé dans l'expérience provient du commerce. Il s'agit d'engrais de type 20.20.20 dont la composition est la suivante :

- 20% d'azote total (N) (composé de d'azote ammoniacale, nitrique et uréique)
- 20% de phosphore pentoxyde ( $P_2O_5$ ),
- 20% d'oxyde de potassium ( $K_2O$ ) soluble dans l'eau,

Il est additionné en poudre, en quantité de 20,1 g pour 2 Kg de sol (Hawrot et Nowak, 2005)



Figure 13: le fertilisant.

### 3.3 Les souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées sont issues d'une étude antérieure de madame **Guergouri (2017)**. Elles sont isolées de sites contaminés par les hydrocarbures pétroliers. Ces souches ont fait l'objet de tests de dégradation de pétrole brute sur gélose et de détection de production de biosurfactant.

Tableau 2: Les zones de prélèvement des souches bactériennes.

Souches	S <sub>8</sub>	S <sub>11.2</sub>	H <sub>3</sub>	I <sub>1</sub>	N <sub>9</sub>	2'	8'	10	13	17
Zone de prélèvement	Nord algérien			Sud algérien						

## MATERIEL ET METHODES

Ces souches bactériennes ont été repiquées sur gélose nutritif (GN) préalablement autoclavée coulée dans les boites de pétries (GN), etensemencé par des stries ensuite incubée pendant 24 heures à 30°C.

### 3.3.1 Aspect macroscopique

Plusieurs caractères sont décrits à partir de l'observation macroscopique des colonies bactériennes d'une culture jeune sur gélose.

D'après **Singleton (1999)**, Les éléments d'identification macroscopique des différents aspects bactériens sont :

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

### 3.3.2 Aspect microscopique

**Coloration de Gram** : c'est une coloration différentielle d'orientation rapide. Elle est réalisée pour toutes les souches bactériennes pour déterminer la forme des cellules, leur mode de regroupement et classer les bactéries en deux grands groupes : bactéries Gram (-) et bactéries Gram (+).



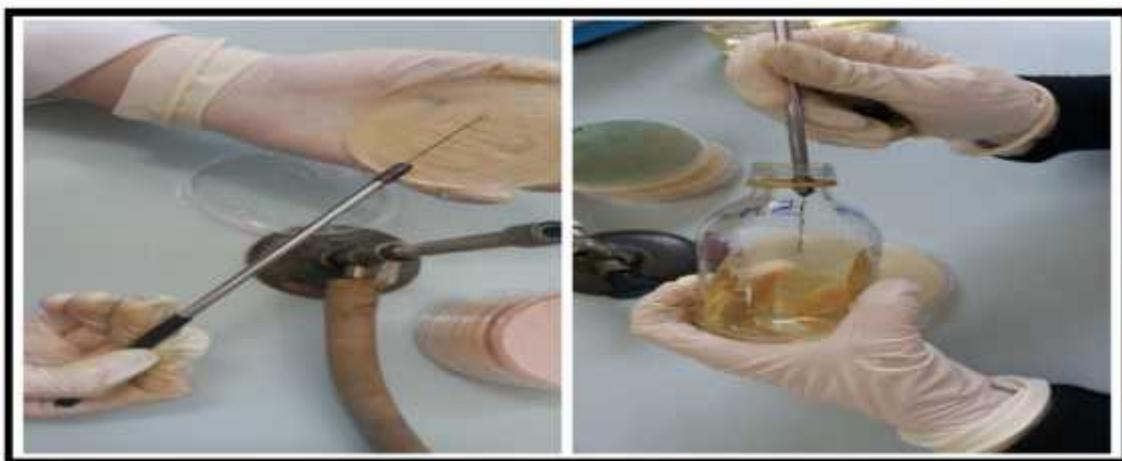
**Figure 14** : Préparation des frottis et coloration de Gram.

### 3.3.3 Préparation de l'inoculum

L'inoculum est défini comme une préparation contenant des cellules vivantes à une certaine concentration, utilisée dans l'approche de bioremédiation par bioaugmentation, c'est à dire, augmenter le nombre des bactéries dans le sol ayant la capacité de s'attaquer au polluant.

A partir d'une culture pure de 24h sur milieu d'isolement, quelques colonies bien isolées sont raclées à l'aide d'une anse de platine et ensemencées dans des flacons de 250 mL contenant 100 mL de BN (annexe).

Après homogénéisation des suspensions bactériennes, leur densité optique est mesurée puis standardisée à 0,1 lue à 600nm (équivalent à environ  $10^7$  jusqu'à  $10^8$  UFC /ml « la loi de Beer-Lambert »).



**Figure 15:** Préparation d'inoculum bactérienne.

### 3.3.4 Inoculation

Dans la nature, la dégradation du polluant est un travail collaboratif réalisé par un ensemble de microorganismes en consortium.

Dans la même réflexion, deux consortiums composés de cinq souches bactériennes à raison de 40 mL de chaque souche sont testés.

- Consortium A (C.A.): S8 – S11.2 – H3 – I1 – N9.
- Consortium B (C.B.) : 2' - 8' – 10 – 13 – 17.

## 4. Techniques de bioremédiation

Le teste de bioremédiation est structuré comme suit (**Hawrot et Nowak, 2005 modifie**):

Sept bacs en plastique de dimension (32cm x21cm x13.5 cm), chacun de ces bacs reçoit 2 kg de sol (1Kg de sol+1Kg de sable). (Tableau. 3)

**Tableau 03** : Le contenu de chaque bac de technique de bioremédiation.

Les bacs	Abr	Les contenus
Témoin		2kg de sol
Atténuation naturelle		2kg de sol+100 gasoil
Biostimulation	Bios	2kg de sol+100ml gasoil+20,1g NPK
Bioaugmentation consortium A	BAA	2kg de sol+100ml gasoil+200ml C.A
Bioaugmentation consortium B	BAB	2kg de sol+100ml gasoil+200ml C.B
Approche Intégré consortium A	AIA	2kg de sol+100ml gasoil+20,1g NPK+200ml C.A
Approche Intégré consortium B	AIB	2kg de sol+100ml gasoil+20,1g NPK+200ml C.B



**Figure 16:** Dispositif expérimental de bioremédiation.

### 5. Suivre de Bioremédiation

Trois paramètres sont suivis durant 15 jours d'expérimentation :

#### 5.1 L'irrigation et le retournement

Chaque semaine durant l'expérimentation ( $T_0$ ,  $T_7$ ,  $T_{15}$ ), le sol est irrigué en ajoutant 20ml d'eau distillé stérile. Le sol est retourné pour des raisons d'aération à l'aide d'une spatule désinfectée et flambée.



**Figure 17:** Irrigation et retournement de sol.

#### 5.2 Suivi de la charge bactérienne

Afin d'estimer la dégradation des hydrocarbures et la croissance des souches bactériennes introduits dans le sol contaminé avec le gasoil. Nous avons effectué un simple dénombrement sur milieu gélosé de la flore bactérienne existant dans l'échantillon.

Les dilutions sont réalisées en eau physiologique stérile variant de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ , quand la solution mère de sol constitue la dilution  $10^{-1}$  (1g de sol dans 9ml d'eau physiologie).

De chaque dilution 0,1ml sont prélevés et ensemencés à la surface d'une gélose par étalement à l'aide d'un râteau et incubée pendant 24heures à  $30^{\circ}\text{C}$ .

## MATERIEL ET METHODES

Les colonies développées sont dénombrés à l'aide d'un compteur de colonies en UFC. Le nombre de germe 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 al, 1982).

$$N = c / d . v$$

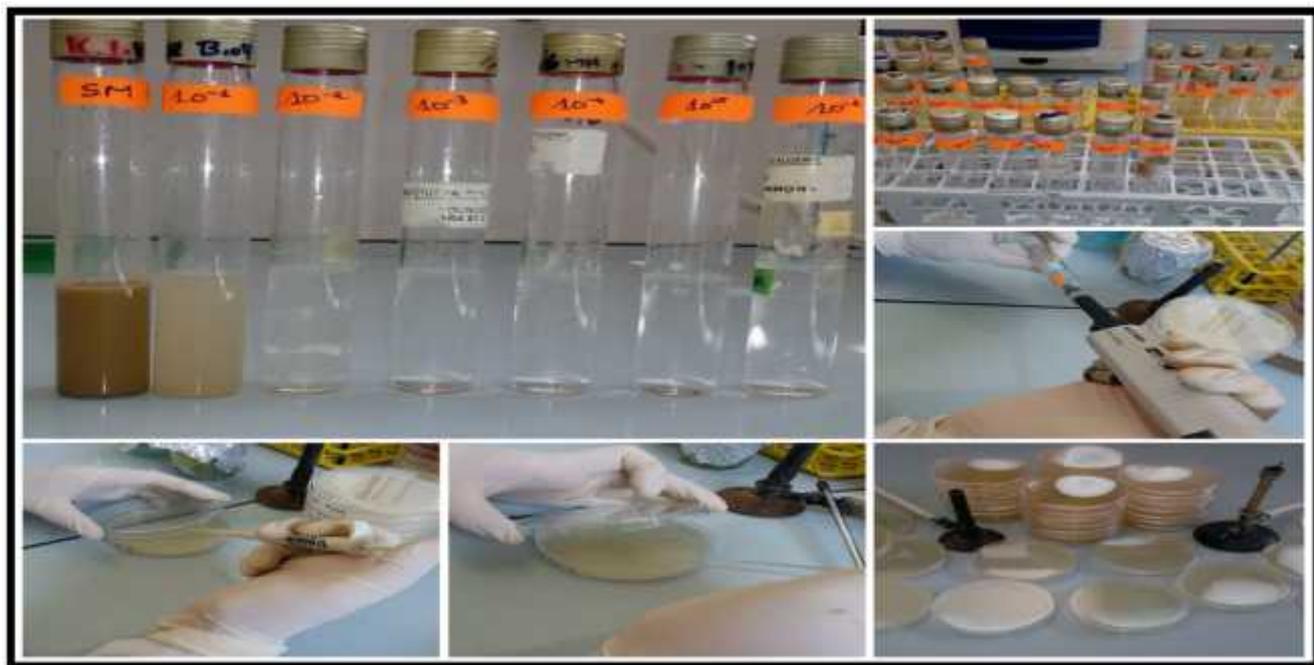
N : nombre des microorganismes en UFC /ml.

C : nombre d'unité formant colonie.

v : Volumeensemencé (0,1ml).

d : Taux de dilution.

Le dénombrement est effectuée à T<sub>0</sub>- T<sub>7</sub>- T<sub>15</sub>.



**Figure 18:** Dénombrement de la flore bactérienne.

### 5.3 Suivre du potentiel d'hydrogène (pH)

Par définition, le pH est l'unité de mesure de la concentration en ions hydrogène, permettant d'évaluer l'acidité ou basicité d'un milieu et influence la disponibilité des éléments minéraux dans le sol.

## MATERIEL ET METHODES

Le pH est estimé à l'aide d'un pH-mètre sur des extraits aqueux du sol après une agitation et une précipitation d'une heure de temps. La sonde est plongée dans la solution, la valeur de ph est affichée.

### 6. Test de germination

Le teste de germination est défini comme teste d'efficacité de bioremédiation. Il permet de voir l'effet toxique du polluant sur la capacité des graines d'orge à germer. Il est effectué deux fois : à  $T_0$  et à  $T_{15j}$ .

Les graines sont sélectionnées et désinfectées dans flacons d'eau distillée- javellisée diluée durant 5min, puis rincés à l'eau distillé stérile plusieurs fois pour éliminer l'eau de javel.

A  $T=0$ , La semence est réalisée dans des bacs en plastique de dimension (17x 11x 6cm) dans les quelles 250g de sol dans les deux bacs le premier non polluée (témoin) et l'autre polluée avec le gasoil (12,5ml de polluant).

25 graines d'orge sont semées dans chaque bac suivis durant 7 jours avec une irrigation chaque 2jours.



**Figures 19:** Le teste de germination à  $T_0$ .

## MATERIEL ET METHODES

Après 15 jours nous avons prélevés 250g de sol de chaque bac et répéter le même teste de germination qui fait à T<sub>0</sub>.



### 7.1 Taux de germination

Le taux de germination est le lot de graines ayant complété leur germination.il est exprimé par la formule suivant :

$$\text{le taux de germination} = \frac{\text{Le nombre de graine germée}}{\text{Le nombre de graine semée}} \times 100$$

### 7.2 La longueur racinaires et la partie aérienne

Les plantes sont extraites du sol remplaçant les bacs dans l'eau. Après 07 jours la taille des partie racinaire et aérienne mesurée et indice de résistance au polluant est calculé :

$$\text{RI} = \frac{\text{Longueur racinaire des graines dans le sol pollué}}{\text{Longueur racinaire des graines dans le contrôle (-)}} \times 100$$

A decorative border with a repeating floral and leaf pattern in black and white, framing the central text.

**RESULTATS**  
**ET**  
**DISCUSSION**

# RESULTATS ET DISCUSSION

## 1. Caractérisation des isolats dégradant les hydrocarbures

### 1.1 Aspect macroscopique

L'observation macroscopique des colonies développées des dix souches après repiquage sur la gélose nutritive montre les résultats regroupés dans le tableau 4.

**Tableau 4 :** Aspect macroscopique des colonies isolées sur gélose nutritive.

Souches	Chromogènes	Forme	Élévation	Opacité	Surface	Bord	Consistance
<b>S8</b>	Crème	dentelée	Plate	Opaque	Rugueux	Irrégulier	Crémeuse
<b>S11 2</b>	Crème	dentelée	Plate	Transparente	Rugueux	Irrégulier	Sèche
<b>H3</b>	blanche	Ronde	Bombée	Opaque	Lisse	Régulier	Crémeuse
<b>N9</b>	Pigment marron diffusible	Ronde	Plate	Transparent	Lisse	Régulier	Sèche
<b>I1</b>	Pigment vert diffusible	Ronde	plate	Transparent	Lisse	Régulier	Crémeuse
<b>S11 2</b>	Crème	dentelée	Plate	Opaque	Rugueux	Irrégulier	Crémeuse
<b>2'</b>	Pigment jaune non diffusible	Ronde	Bombé	Opaque	Lisse	Régulier	Crémeuse
<b>8'</b>	Pigment rose non diffusible	Ronde	bombé	Transparent	Lisse	Régulier	Crémeuse
<b>10</b>	Crème	dentelée	Plate	Translucide	Rugueux	Irrégulier	Sèche
<b>13</b>	jaune	Ronde	Bombé	Transparent	Lisse	Régulier	Crémeuse
<b>17</b>	Crème	dentelée	Plate	Opaque	Rugueux	Irrégulier	Crémeuse

### 1.2 Aspect microscopique

L'observation microscopique a été réalisée après coloration de Gram. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 5.

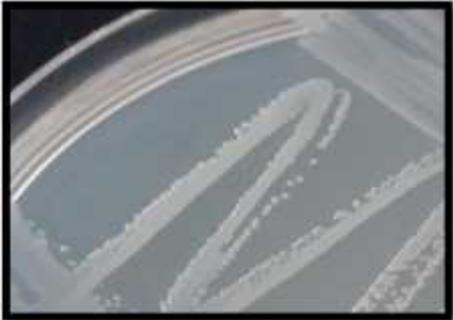
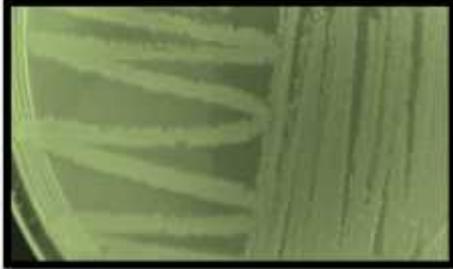
## RESULTATS ET DISCUSSION

**Tableau 5** : Les différents aspects microscopiques des souches.

Souches	Gram	Forme	Arrangement	Présence de Spores
<b>H3</b>	–	Coccobacille	Isolées	–
<b>N9</b>	–	Bacille	Isolées	–
<b>S8</b>	+	Bacille	Isolées	+
<b>S11 2</b>	+	Bacille	En chainettes	+
<b>I1</b>	–	Coccobacille	Isolées	–
<b>2'</b>	+	Gros bacille	En chainettes	+
<b>8'</b>	–	Coccobacille	Isolées	–
<b>10</b>	+	Gros coque	Nid d'abeilles	–
<b>13</b>	+	Gros bacille	Isolées	+
<b>17</b>	+	Gros coque	Nid d'abeilles	–

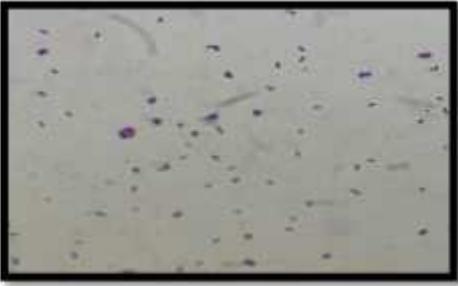
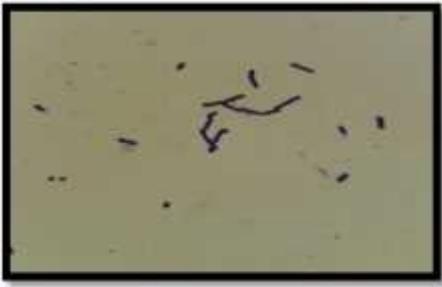
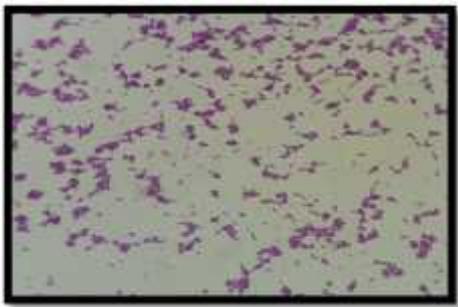
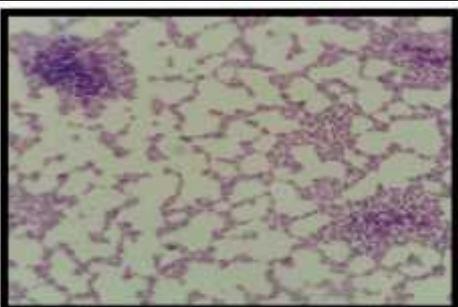
D'après nos observations (tableau 5), il ressort que les bactéries isolées présentent quatre différentes formes : bacille, coccobacille, gros bacille et gros coque avec une paroi à gram positif ou négatif. Les spores sont présentes chez les quatre souches S8, S11.2, 2' et 13.

## RESULTATS ET DISCUSSION

	
<b>La souche 8'</b>	<b>La souche H3</b>
	
<b>La souche 2'</b>	<b>La souche N9</b>
	
<b>La souche 10</b>	<b>La souche I1</b>
	
<b>La souche 17</b>	<b>La souche S8</b>
	
<b>La souche 13</b>	<b>La souche S11.2</b>

**Tableau 6:** Aspect macroscopique des souches bactériennes.

## RESULTATS ET DISCUSSION

	
<b>La souche</b>	<b>La souche S11.2</b>
	
<b>La souche 2'</b>	<b>La souche I1</b>
	
<b>La souche 10</b>	<b>La souche S8</b>
	
<b>La souche 17</b>	<b>La souche N9</b>
	
<b>La souche 13</b>	<b>La souche H3</b>

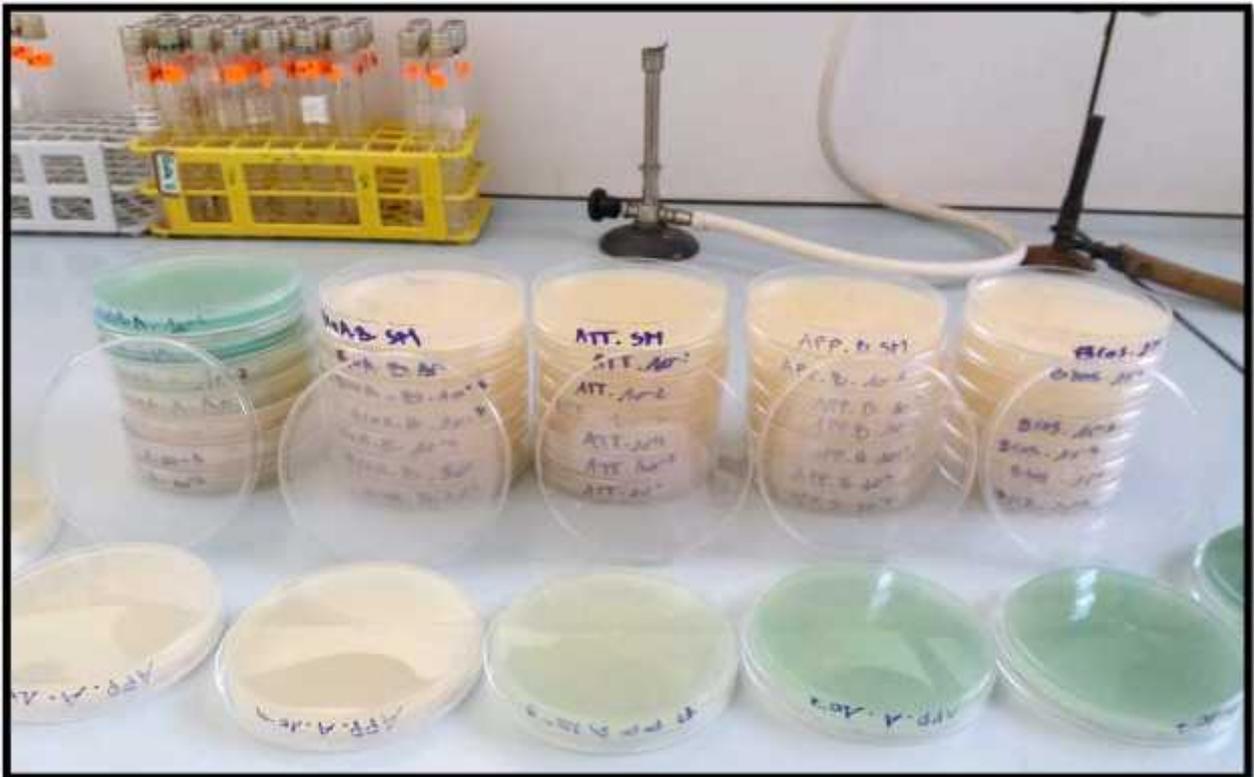
**Tableau 7:** Aspects microscopiques (Gx100) des souches bactériennes.

### 2. Le suivi de la bioremédiation des sols pollués

Pour évaluer la dégradation de gasoil par les isolats nous avons mesuré la concentration microbienne (UFC/mL) et le potentiel hydrogène dans les échantillons du sol contaminés.

#### 2.1 Evolution de la biomasse bactérienne dans le sol pollué

Les résultats de l'évolution de la biomasse bactérienne dans les différents bacs traités à T 15 jours sont rapportés dans les tableaux 8 et 9, la figure 21 (histogramme).



**Figure 21:** Dénombrement bactérien sur gélose nutritif à T 15 jours.

## RESULTATS ET DISCUSSION

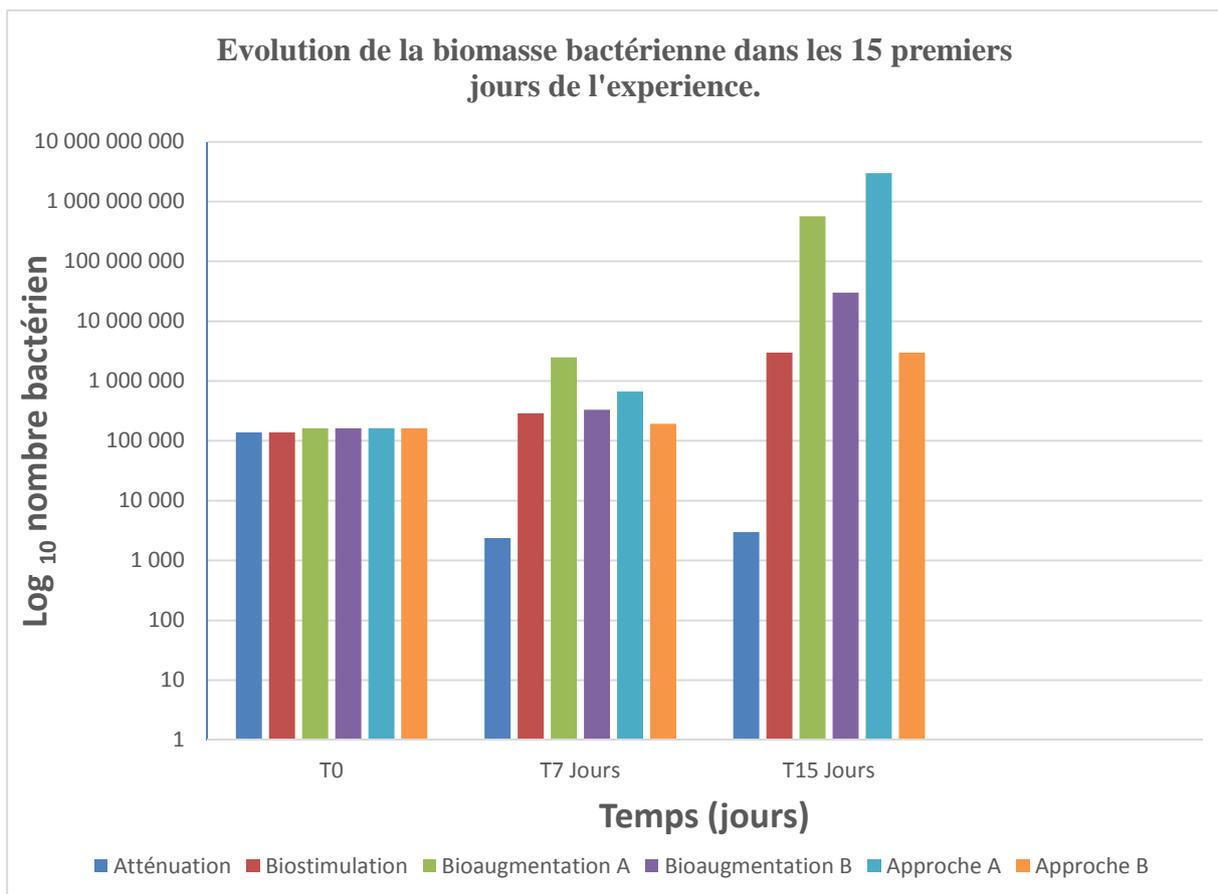
**Tableau 8** : Nombre des microorganismes de chaque dilution du sol

Dilution	Témoïn T0	Atténuation			Bios			BAA			BAB			AIA			AIB		
		T <sub>0</sub>	T <sub>7</sub>	T <sub>15</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>7</sub>	T <sub>15</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>7</sub>	T <sub>15</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>7</sub>	T <sub>15</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>7</sub>	T <sub>15</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>7</sub>	T <sub>15</sub>
10 <sup>-1</sup>	> 300		237	> 300	> 300	> 300		> 300 + Pigment Vert	> 300 + Pigment Vert		> 300	> 300		> 300 + Pigment Vert	> 300 + Pigment vert		> 300	> 300	
10 <sup>-2</sup>	> 300		3	2	> 300	> 300		> 300 + Pigment Vert	> 300 + Pigment Vert		> 300	> 300		> 300 + Pigment vert	> 300 + Pigment Vert		>300	> 300	
10 <sup>-3</sup>	114		> 300	1	290	> 300		> 300	> 300 + Pigment Vert		> 300	> 300		> 300	> 300 + Pigment vert		174	> 300	
10 <sup>-4</sup>	24		1	1	0	> 300		> 300	> 300 + Pigment Vert		33	> 300		67	> 300 + Pigment vert		18	> 300	
10 <sup>-5</sup>	4		0	1	0	0		25	> 300		3	> 300		4	> 300		1	6	
10 <sup>-6</sup>	3		0	0	0	0		2	> 300		1	1		1	> 300		0	0	
10 <sup>-7</sup>	3		1	1	> 300	0		0	57		0	0		0	> 300		0	1	

## RESULTATS ET DISCUSSION

**Tableau 9:** Dénombrement de la microflore dans les échantillons de sols.

Temps	Nombre de microorganisme en UFC /ml						
	Témoin	Attenuation	Bios	BAA	BAB	AIA	AIB
T <sub>0</sub>	1,38×10 <sup>6</sup> (UFC/mL)	1,38×10 <sup>6</sup>	1,38×10 <sup>6</sup>	1,63×10 <sup>6</sup>	1,63×10 <sup>6</sup>	1,63×10 <sup>6</sup>	1,63×10 <sup>6</sup>
T <sub>7</sub>		2,37×10 <sup>4</sup>	2,9×10 <sup>6</sup>	2,5×10 <sup>7</sup>	3,3×10 <sup>6</sup>	6,7×10 <sup>6</sup>	1,92×10 <sup>6</sup>
T <sub>15</sub>		>3×10 <sup>4</sup>	>3×10 <sup>7</sup>	5,7×10 <sup>9</sup>	>3×10 <sup>8</sup>	>3×10 <sup>10</sup>	>3×10 <sup>7</sup>



**Figuer 22:** Evolution de la biomasse bactérienne dans les échantillons du sol au cours d'expérimentation

## RESULTATS ET DISCUSSION

D'après l'analyse des résultats, l'évolution de la biomasse bactérienne des bacs atténuation naturelle et biostimulation montre une diminution de la biomasse au début de traitement puis elle augmente après la 2<sup>ème</sup> semaine. Cela indique qu'il y'a eu une phase d'adaptation des microflore de sols au polluant. Le sol comporte une microflore autochtone importante, qui possède la possibilité d'assurer la biodégradation, mais ça reste un phénomène plus ou moins lent qui nécessite des mois.

Les données obtenues pour la bioaugmentation par contre, montrent une augmentation de la biomasse bactérienne ce qui indique la facilité d'adaptation des consortiums bactérien exogènes au gasoil et notamment le A.

La charge bactérienne notée dans les 4 essais BAA, BAB, AIA, AIB à T<sub>0</sub> est  $1,63 \times 10^5$  UFC/ml (équivalent de la charge bactérienne du témoin plus le nombre de la biomasse bactérienne du consortium).

Dans le bac de traitement par atténuation naturelle nous observons que le nombre bactérien est le plus faible  $2,37 \times 10^6$  à T<sub>7j</sub> par comparaison au reste traitée par des additifs (fertilisant, bactérie, ou bien les deux).

Une augmentation de la concentration bactérienne du bac biostimulation est perçue avec des valeurs allant  $2,9 \times 10^6$  UFC/ml à  $3 \times 10^7$  UFC/ml à T15j de l'expérimentation en la comparant à l'atténuation naturelle qui n'a pas trop varié. Donc le fertilisant stimule les bactéries indigènes du sol. Ce même cas était observé dans les travaux de **Hawort et Nowak en 2005**.

Une forte augmentation de la biomasse bactérienne est révélée dans les bacs de sols bioaugmentés variant de  $2,5 \times 10^7$  à  $5,7 \times 10^9$  pour BAA et  $3,3 \times 10^6$  à  $3 \times 10^8$  pour BAB par rapport à la biostimulation.

Cela ressemble aux résultats obtenus par **Ghazali et ses collaborateurs (2004)** et **Farahat et ses collaborateurs (2007)**.

Cependant, la charge bactérienne pour traitement BAA été supérieur à la BAB. De même pour bacs traités par fertilisant plus bactéries (AIA et AIB) nous remarquons que pendant les sept premiers jours, le nombre bactérien pour AIA monte à  $6,7 \times 10^6$  ce qui constitue une augmentation importante par rapport ou AIB  $1,92 \times 10^5$ .

## RESULTATS ET DISCUSSION

Ceci est dû à la composition des deux consortiums et de l'efficacité de certaines bactéries dans la bioremédiation. C'est le cas notamment de la souche I1 qui a montré une bonne croissance et une diffusion de son pigment verdâtre dans les boîtes de dénombrement.

A T7j, le nombre bactérienne pour les deux bacs AIA et AIB est inférieur à celui des bacs BAA et BAB.

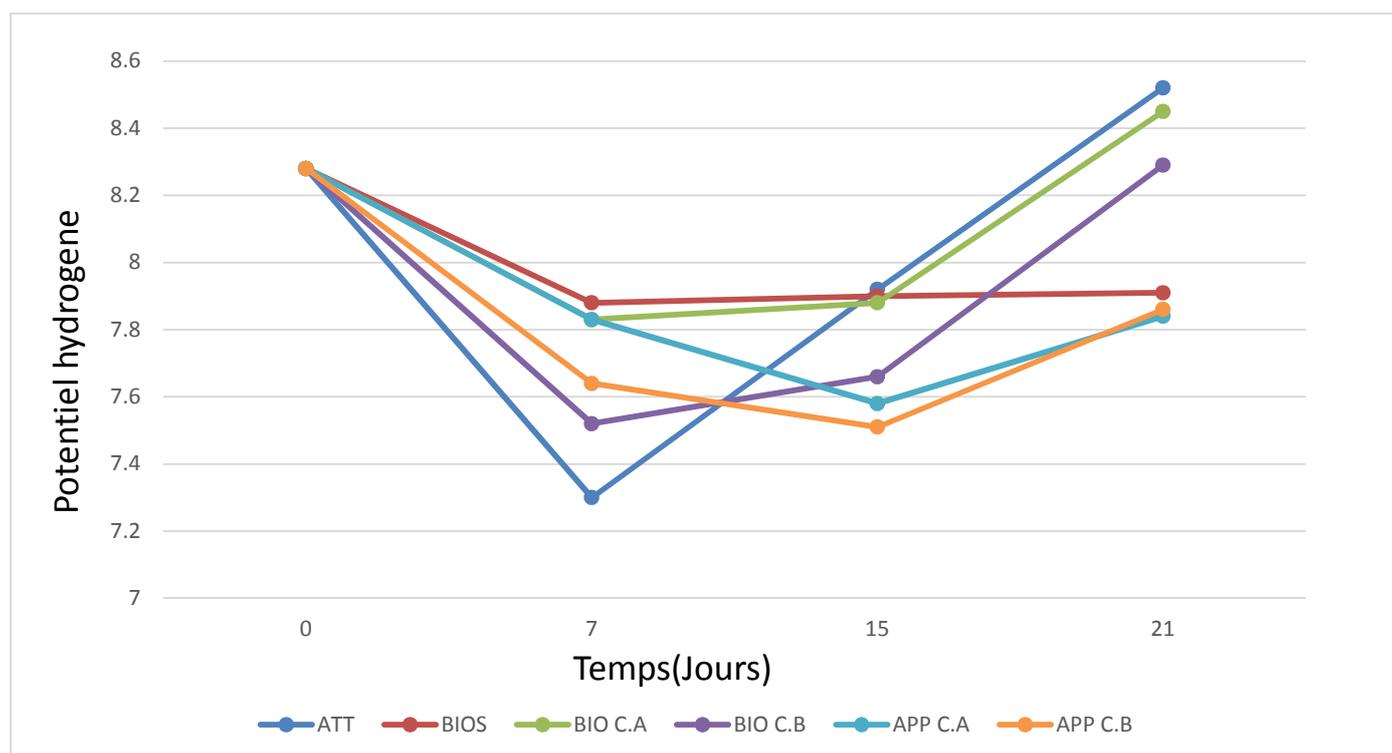
On peut expliquer ça soit par un freinage de la croissance par la présence du fertilisant. Ce cas de figure était observé dans les travaux de **Chorom et ses collaborateurs en 2010** où la concentration du fertilisant jouait un rôle important dans la stimulation ou l'inhibition de la croissance.

La deuxième explication peut être la présence d'interactions antagonistes qui peuvent avoir lieu entre les bactéries dans le sol (ex : prédation, compétition etc...)

Après quinze jours, le nombre pour les bacs AIA à montre la meilleure croissance dépassant  $3 \times 10^{10}$ . Cela peut s'agir d'une adaptation des bactéries du consortium A au polluant et à ces dérivés en présence du fertilisant.

### 2.2 Evolution de potentiel d'hydrogène

L'évolution du pH des échantillons de sol pourrait être utilisée comme un indice de biodégradabilité des hydrocarbures pendant le processus de biodépollution. Les valeurs du pH de nos échantillons de sol sont mentionnées dans la figure 23



**Figure 23:** Evolution du pH dans les sols traité ou cours d'expérience

Les échantillons de sols traités à  $T_0$  présentent un pH moyennement alcalin égal à 8,28.

Dans les premiers sept jours, nous observons une diminution de pH pour tous les bacs. Après 7 jours de traitement, nous constatons une re-augmentation de pH pour la majorité des sols traités.

L'augmentation de la croissance bactérienne influe sur le pH du sol par la diminution de ce dernier à cause de différentes réactions biochimiques des bactéries qui entraînent l'assimilation des composés pétroliers d'un côté avec la synthèse des acides gras porteurs de groupement COOH et de différents acides (formique, acétique, butyrique, lactique), produits par oxydation de la matière organique ou fermentation dans le sol causant ainsi leur acidification. D'un autre côté ces groupements représentent des métabolites intermédiaires de la biodégradation des HC avant la minéralisation complète par les microorganismes.

### 3. Test de germination

Pour évaluer l'effet de la bioremédiation des sols contaminés par le gasoil, des tests de germination d'orge ont été réalisés.

## RESULTATS ET DISCUSSION

La mesure du taux de germination est un indicateur de la qualité biologique du sol, La longueur racinaire et la longueur des parties aériennes comparées à  $T_0$  et  $T_{15}$  renseignent sur l'efficacité de la technique de bioremédiation appliquée.

### 3.1 Au début de l'expérience

Les résultats exprimés dans le tableau montrent une absence de taux de germination dans le sol pollué par le gasoil (0 %), par rapport au sol non polluée (témoin) le taux de germination est de (100 %).

La longueur racinaire est de [12,7-19] cm et une partie arienne [8- 13,7] cm chez les graines germées dans le sol non contaminé (témoin), par contre une absence de pousse dans le sol pollué.

**Tableau 10:** paramètres calculés pour les graines d'orge du sol non pollué (témoin) et sol pollué à  $T_0$ .

	Sol non polluée	Sol polluée
<b>Taux de germination</b>	100 % de graines germées	Aucune graine germée
<b>Longueur racinaire (cm)</b>	[12,7 - 19]	0
<b>Longueur de partie aérienne (cm)</b>	[8- 13,7]	0



**Figure 24 :** Résultats des graines germées du sol non pollué et sol polluée par le gasoil à T<sub>0</sub>.

### 3.2 A la fin de l'expérience (T<sub>15</sub>)

Les résultats illustrés dans le tableau montre le taux de germination des graines d'orge sur le sol traité par différent traitement de bioremédiation et au sol non polluée (témoin).

Dés de 3 jours de semence, 96% des graines semées dans le sol non polluée (témoin) ont germé, alors que sur les autres sols traités aucune ne graine germé.

**Tableau 11:** L'analyse statistique des graines d'orge du sol polluée par le gasoil non traité et traité par les différentes techniques de bioremédiation à T<sub>15</sub>

	Témoin	Atténuation	Bios	BAA	BAB	AIA	AIB
<b>Taux de germination</b>	96%	Aucune graine germée 0%	0%	4%	0%	0%	0%
<b>Longueur racinaire (cm)</b>	[6,4-18,5]	0	0	0,3	0	0,4	0
<b>La partie aérienne (cm)</b>	[2-15,1]	0	0	0	0	0	0
<b>Indice de Résistance (RI)</b>	1	0	0	0,0162	0	0,021	0

A partir de 7 jours, le taux de germination enregistré de 4% pour les graines semées dans l'échantillon de sol BAA, le même pourcentage pour AIA mais dans les autres traitements n'observe aucune germination.



**Figure 25 :** Résultats des graines germées du sol traité : bioaugmentation A et approche intégrées A.

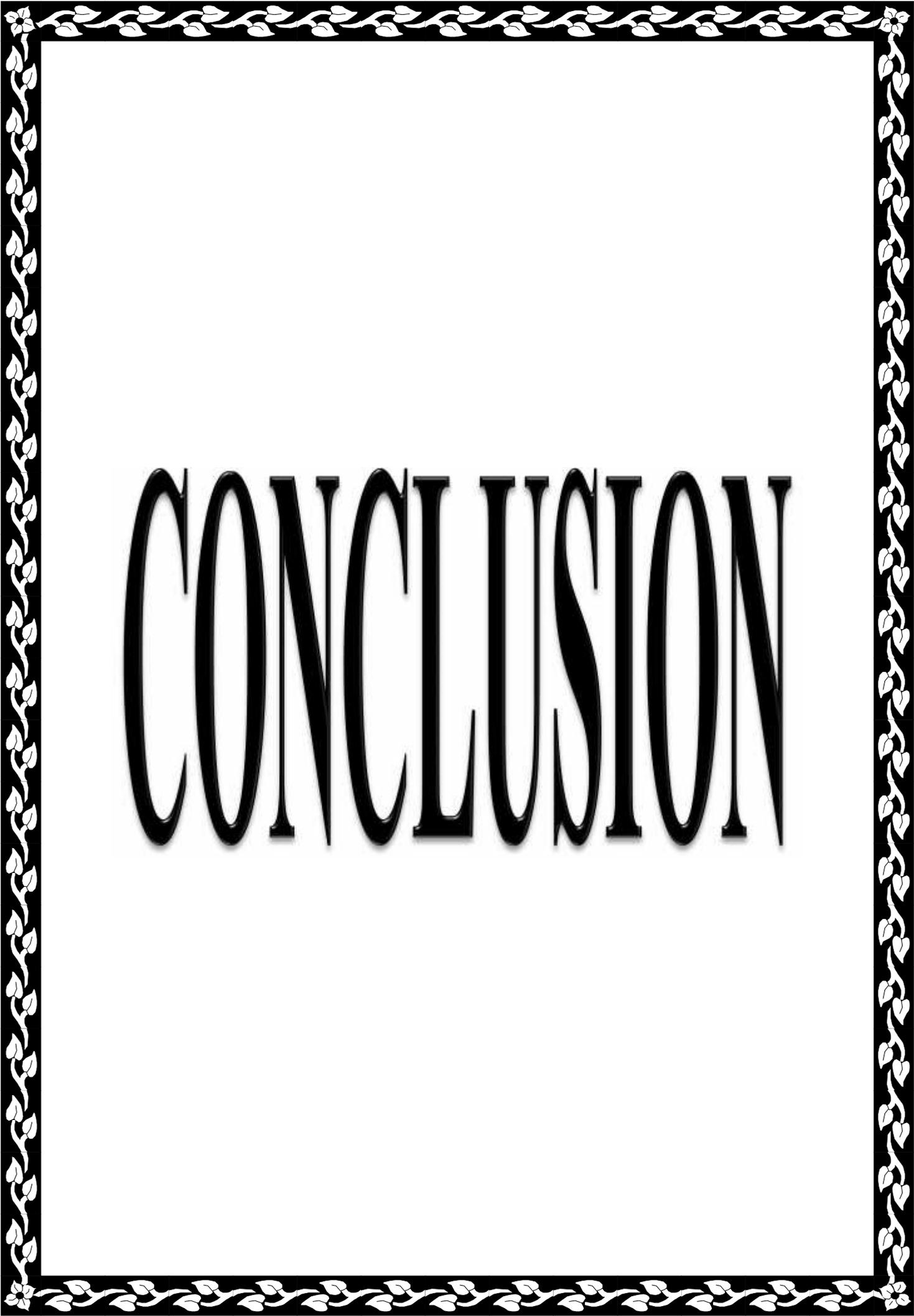
## RESULTATS ET DISCUSSION

La germination des graines et la longueur racinaire ont été affectées d'une manière significative par le gasoil à une concentration de 5 % par rapport au sol témoin. L'inhibition totale de la germination des graines d'orge dans le sol contaminé suggère la toxicité du polluant vis-à-vis de ces graines. L'explication la plus probable est sa propriété physique hydrophobe ; le film de carburant gasoil qui se forme autour des graines peut agir comme une barrière physique, réduisant à la fois le transfert de l'eau et de l'oxygène assimilés par les graines.

La germination des graines d'orge dans les sols contaminés par le gasoil après leur bioremédiation par le CA et CB et le fertilisant (biostimulation) étaient meilleures et significatives par rapport aux sols contaminés non remédiés. L'utilisation des microorganismes dans la bioremédiation des sols pollués a peut-être permis un meilleur contact des graines avec l'eau en émulsifiant le gasoil

En outre, il n'a été observé que le processus de bioaugmentation par les souches bactériennes détoxifiait le sol pollué (particulièrement le CA). On observe aussi que la bioaugmentation à augmenter le taux de germination atteignant une valeur supérieure aux autres sols bioremédiés même s'il est faible (4%) et a diminué la toxicité aiguë du polluant sur le sol.

L'approche combinant les deux techniques bioaugmentation et biostimulation donne des résultats similaires à ceux de la bioaugmentation seule avec un taux de germination identique de 4% mais avec un écart de temps de 48h.

A decorative border with a repeating floral and leaf pattern in black and white, framing the central text.

CONCLUSION

## Conclusion

L'objectif de notre travail était la bioremédiation d'un sol artificiellement pollué au gasoil par des bactéries hydrocarbonoclastes.

Dans la première partie de ce travail, dix souches bactériennes d'une étude antérieure, isolées à partir du sol contaminé par les hydrocarbures sont repiquées. Leur pureté est vérifiée par examen des colonies après croissance sur gélose nutritive et les cellules après coloration de Gram.

Dans la deuxième partie, plusieurs traitements sont appliqués au sol contaminé, durant 15 jours, principalement

- une bioaugmentation par deux consortiums bactériens « A et B » préparés de cinq souches chacun,
- une biostimulation par l'ajout des éléments nutritifs
- une approche combinant les deux précédentes.

Ces traitements étaient comparés à un sol pollué non traité, ou l'activité sera dû à la flore indigène (atténuation naturelle) et un sol témoin non pollué et non traité. Tous les sols étaient aérés et humidifiés périodiquement.

L'efficacité du traitement a été évaluée par le suivi de la biomasse bactérienne par dénombrement ce qui a été significatif et la variation du potentiel hydrogène.

L'utilisation de l'engrais à base des éléments N /P/ K comme agent stimulant, a permis de renforcer l'activité de la microflore indigène de sol.

La bioaugmentation par consortium « A » a donné une meilleure dégradation du gasoil à 7 jours, que le consortium « B ». Ceci affirme une meilleure performance des souches composant le consortium « A » et particulièrement la souche II.

L'approche intégrée « A » a montré le meilleur effet de dégradation du gasoil à 15 jours par rapport à l'approche « B » et la «bioaugmentation « A et B ».

L'évolution du nombre bactérien pendant l'atténuation naturelle est faible, comparé aux sols traités. Cette technique nécessite plus de temps pour donner des rendements satisfaisants.

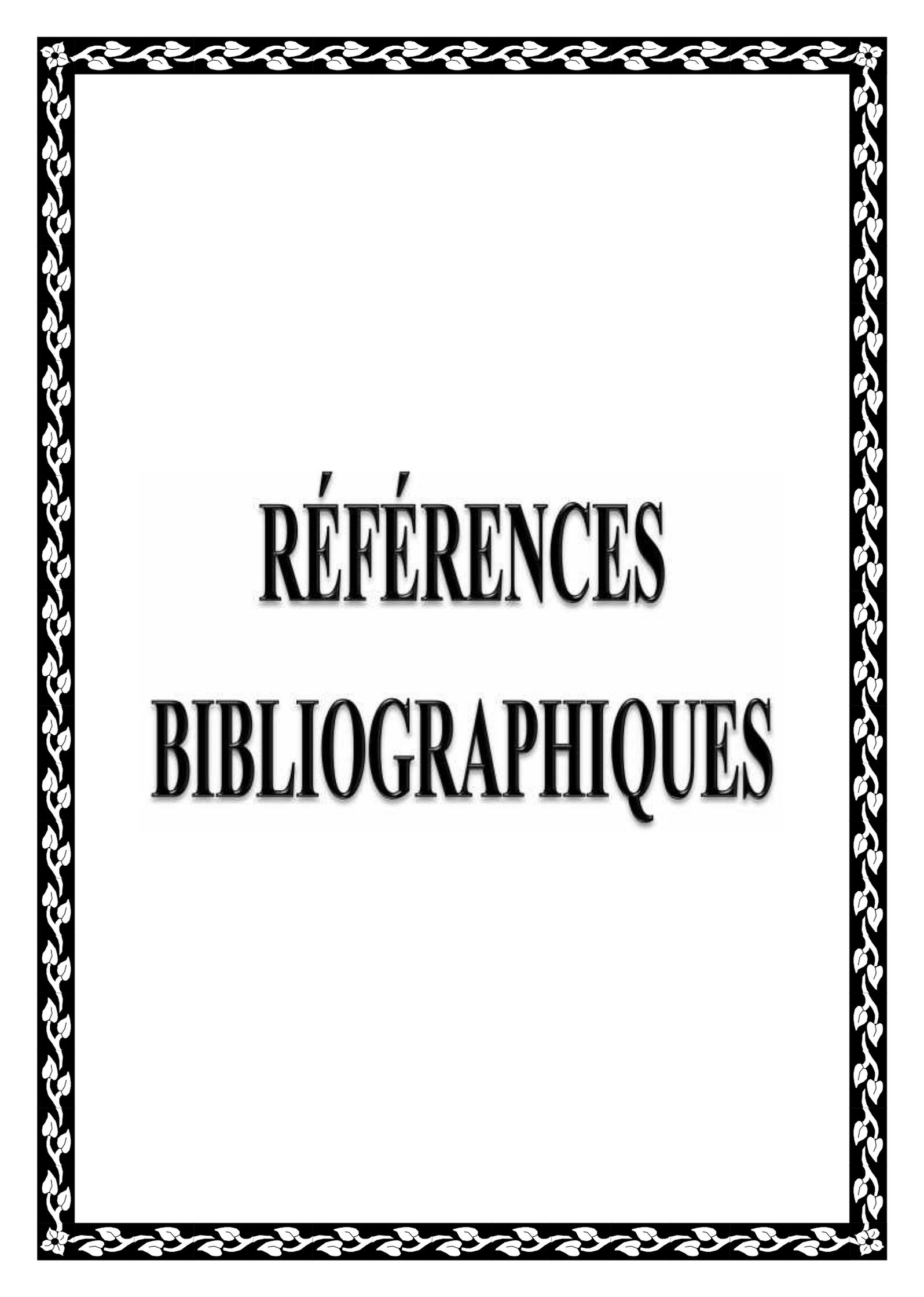
## CONCLUSION

D'autre part, un test de germination des graines d'orge réalisé au début et à la fin du traitement a constitué un indicateur de l'amélioration de la qualité biologique du sol et sa réhabilitation après pollution au gasoil. Le sol traité par le consortium « A » seul ou avec fertilisant a montré un taux de germination des graine de 4% à 15 jours, ce qui confirme l'efficacité de notre traitement pour réduire la teneur en gasoil du sol.

D'après les biotests effectués sur les sols réhabilités, le procédé de bioremédiation adopté semble rendre partiellement les caractères culturaux de ces sols mais le temps reste un facteur très important et déterminant dans l'efficacité des techniques appliquées.

A l'issue de nos résultats, il serait souhaitable de compléter cette étude par :

- le suivi de la bioremédiation pour une période plus longue (des mois)
- L'application de ces procédés sur des échantillons de sols prélevés dans les bourniers.
- L'augmentation de la concentration du polluant afin de déterminer l'aptitude maximale des souches à biodégrader les hydrocarbures.
- L'essai d'autres molécules stimulant la microflore tellurique.
- L'application à plus grande échelle du procédé de réhabilitation dans les conditions de terrain.

A decorative border with a repeating floral and leaf pattern in black and white surrounds the central text.

**RÉFÉRENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

### A

**ABBIA, S., GUITOUN, L. (2016).** Etude les caractérisations de quelque souches bactériennes hydrocarbonoclastes sahariennes .Mémoire de master. Microbiologie appliquée : Université Kasdi Merbah Ouargla, P 03.

**ABDELY, C. (2007).** Bioremédiation/phytoremédiation. Thèse Département des sciences naturelles. Institute supérieur de l'éducation et de la formation continue. Université de Tunisie.

**AGARRY, S., OGUNLEYE, O. (2012).** Box-Behnken design application to study enhanced bioremediation of soil artificially contaminated with spent engine oil using biostimulation strategy. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*. 3(31): P 1-14

**ALEKSANDRA, W. (2010).** Recherche de signaux moléculaires végétaux impliqués dans l'induction de gènes chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemii* (*Dickeya dadantii*). Docteur. Microbiologie environnementale. Université Lyon. p 85

**ALI AHMED, S. (2011).**Essai de réhabilitation d'un sol contaminé par les hydrocarbures à l'aide de tensioactifs obtenus par voie biologique .Thèse de Magistère en science de sol. Université Algérienne, p 36.

**AMELLAL, N. (2003).** Devenir des hydrocarbures ployaromatiques dans les sols: impact des paramètres physico-chimiques et microbiologiques. Thèse de Doctorat. Université de Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fes. MOROCO

### B

**BABAK, P., EBRAHIM, M., AJIT, V. (2013).** An Introduction to Bioremediation. Ramin Agriculture and Natural Resources University. P 5

**BALLERIN, A. (1999).** Traitements biologiques des sols, Technique de l'Ingénieur

**BALLERINI, D., GATELLIER, C., VOGEL, T. (1998).** Techniques de traitement par voie biologique. Ademe Editions. Angers. P 247

**BAYARD, R. (1997).** Etude de l'adsorption/désorption de polluants organiques dans les sols. Approche méthodologique et application au pentachlorophénol et aux hydrocarbures aromatiques polycycliques. Thèse de doctorat. Lyon : INSA de Lyon. France, P 231

**BEGBEG, A. (2008).** Importance des considérations environnementales dans l'étude des performances des additifs utilisés dans les fluides de forage .Thèse en traitement des effluents industriels, faculté de science ingénieur. Université de BOUMERDES.

**BENCHOUK, A. (2017).** Bioremédiation des sols pollués de pétrole par les microorganismes indigènes amélioration génétique de leur pouvoir .Thèse de doctorat en Microbiologie appliquée. Université d IBN Badis Mostaganem, P 10.

**BENFARDIA, H ., CHENINE, A. (2014).** Effets de la nature du sol sur l'efficacité d'un dispositif de biodépollution à l'aide des bactéries hydrocarboruclastes. Mémoires de mastère académique en Microbiologie appliquée. Université Kasdi Merbah Ouargla Ouargla, P 15.

**BERGUE J, M. (1986).** La pollution des sols par les hydrocarbures. Laboratoire régional de ROUEN.

**BERTRAND, J. (1993).** Hydrocarbon Biodegradation and hydrocarbonoclastic bacterial communities composition grown in seawater as a function of sodium chloride concentration. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* P 168, 125-138.

**BIRECHE, Y., BERREGUI, F. (2014).** Effets de la salinité sur l'activité des bactéries hydrocarbonoclastes .Mémoire de master académique. Microbiologie appliquée : Université Kasdi Merbah Ouargla Ouargla, P 7.

**BOUAFIANE, M. (2015).** Recherche de la performance de quelque souche bactérienne dans la réhabilitation de deux types de sols pollués par les hydrocarbures .Mémoire de Magistère en Eco-pédologie et environnement. Université Kasdi Merbah Ouargla, p 15.

**BOUDERHEM, A. (2011).** Utilisation des souches bactériennes telluriques autochtones dans la biodétection et la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures. Mémoire magister en Microbiologie appliquée. Université Kasdi Merbah Ouargla Ouargla, P 5

## C

**CALVET, R. (2000).** Le sol propriétés et fonctions, constitution et structure, phénomènes aux interfaces. Tome 1. Edition France Agricole. Paris (France), P 83-90.

**CHIOU, C.T., SHOW, T.D. (1985).** Soil Sorption of Organic Vapors & Effects of Humidity on Sorptive Mechanism & Capacity. *Env. Sci. Technol.*, P 18.4-10.

**CHOROM, M., SHARIFI H, S., MOTAMEDI, H. (2010).** Bioremediation of a crude oil-polluted soil by application of fertilizers. *Iran j environ health sci ;eng (vol 7)* 319- 326

**COLOMBANO, S., SAADA, A., GUERIN, V., BATAILLARD, P., BELLENFANT, G., BERANGER, S., HUBE, D., BLANC, C., ZORING, C., GIRARDEA, U . (2008).** Quelles techniques pour quels traitements ? Analyse coûts- bénéfiques .BRGM /RP-58609-FR. p 276

## D

**DAS NILANJANA., CHANDRAN PREETHY., (2011).** Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*. 2011:1-13. doi:10.4061/2011/941810

**DAVIS., MADSEN. (1996).** Factors affecting the biodegradation of toluene in soil. *Chemosphere*, vol 33 N 1, p 107-130.

## F

**FARAHAT L, A., NOUR, SH. (2007).**Comparative kinetic study of different bioremediation for soil contaminated with petroleum hydrocarbons. *Material science research India* (vol 4(2) 269-278

**FOKOU MBOGNE, P. (2017).** Bioremédiation augmentée de sols contaminés aux hydrocarbures lourds par ajout de substrats organiques. Mémoire de licence. Université du Québec, P 18.

## G

**GABET, S. (2004).** Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. Thèse de doctorat en Chimie et Microbiologie de l'Eau. Université de Limoges. P 28.

**GHAZALI, M., ABDUL RAHMAN, R., ABU BAKAR, S., BASRI, M. (2004)** Biodegradation hydrocarbon in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation* (vol 54) P 61- 67

## H

**HANNA, K., (2004).** Étude de faisabilité de l'utilisation de molécules "cage" dans la dépollution des sols : solubilisation et extraction de polluants organiques par les cyclodextrines. Thèse doctorat. Université Lyon. France, P 59

**HARITASH, A. K., KAUSHIK, C.P. (2009).** Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*. 169: P1–15

**HAWROT, M., NOWAK, A. (2005)** .Surveillance de la bioremediation du sol pollué avec du carburant diesel appliquant des essais biologique. Université de Szczecin, Pologne (vol 8)

**HAZEN, T.C. (2010).** Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

**HONGWEI, Y et al., (2003).** Anaerobic biodegradability of aliphatic compounds and their quantitative structure biodegradability relationship, Tsinghua University, Beijing, PR China

## J

**JAYR, E., BELKESSAM, L., DAUBIES, K., LORS, C., DESCHÊNES, L., GOURDON, R. (2000).** Behaviour and fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in chalky environment: sorption and biodegradation. 17th International Symposium on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, 25-29 October, Bordeaux, France

## K

**KHEDIM, D., BOUCHIKHI, M. (2013).** Contribution à l'étude de l'influence des caractères physico-chimiques du sol sur la stabilité structurale ; cas de la plaine de Sidi Bel Abbes. Thèse des études supérieures DES en biologie .Université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbes, Pa 16.

**KHELIL-RADJI, F. (2015).**Evaluation du potentiel hydrocarbonoclaste des bactéries marines isolées de la côte oranaise .Thèse de doctorat en science de l'environnement .Université Ahmed ben Bella d'Oran, p 24.

**KUMAR, A., BISHT, B. S., JOSHI V, D., DHEWA, T. (2011).** Review on bioremediation of polluted environment: a management tool. *International Journal Of Environmental Sciences*. 1(6): P 1079-1093

**KUMAR, B. L., GOPAL SAI DV, R. (2015).** Effective role of indigenous microorganisms for sustainable environment. *Biotech*. 5:867–876. DOI 10.1007/s13205-015-0293-6

## L

**LECOMTE, P. (1995).** Les sites polluent: Traitement des sols et des eaux souterraines. Edition Technique et Documentation, Paris, 1995.

**LEMIERE, B., SEGUIN, JJ., Le GUERN, C., GUYONNET, D., BARANGER, PH. (2001).** Guide sur le comportement des polluants dans les sols et les nappes. Ed BRGM. France

**LOUATI, H. (2013).** Etude de la bioremédiaion de sédiments contaminés par des hydrocarbures aromatique polycyclique : Impacte écologique sur la microflore et la meiofaune de la lagune de Bizerte .Thèse de doctorat. Université de Carthage et Montpellier II, P 29.

## M

**MAAMAR, A. (2015).** Etude de la biodégradation du pétrole brut par le peuplement fongique du port d'Oran .Mémoire du Magistère en science de l'environnement marin .Université d'Oran.

**MADIGAN, M., MARTINKO, J. (2007).** Biologie de microorganisme. France : pearson Education France, 11<sup>ème</sup> édition

**MAES, E., SCHADECK, S., BRAHY, V. (2006).** Rapport analytique sur l'état de l'environnement wallon 2006-2007. PARTIE 3: Analyse de l'état des composantes de l'environnement. Chapitre 11 : Les sols et l'environnement terrestre (Rapport analytique). Ministère de la Région Wallon - Direction Générale des Ressources Naturelles et de l'Environnement, Wallonie

**MARCHAL, N., BOURDON, J. L. (1982).** Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. *Ed. Doin*, Paris.

**MARIE-PAULE, N. (2007).** Ecodynamique des Hydrocarbures Aromatiques polycycliques et des communautés microbiennes dans des sols à pollution mixte (HAP, métaux) avant et après traitement par biopile et par désorption thermique : Influence de la rhizosphère et la mycorhization .Thèse de doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy I en Géosciences P 47.

**MARTIN. (2012).** Exploration de la biodiversité bactérienne dans un sol pollué par les hydrocarbures : analyse par marquage isotopique du potentiel métabolique et de la dynamique des communautés impliquées dans la dégradation. Thèse en Chimie Biologie. Université de GRENOBLE

**MAZZIOTTI, M. (2017).** Impact des exsudats racinaires de *Miscanthus x giganteus* sur les microorganismes impliqués dans la bioremédiation d'un sol contaminé au benzo (a) anthracène. Thèse de doctorat. Université de Lorraine, Collegium Sciences et Technologies Ecole Doctorale RP2E «Ressources, Procédés, Produits, Environnement».P 89

**MIYASAKA, T., ASAMI, H., WATANABE, K. (2006).** Impacts of bioremediation schemes on bacterial population in naphthalene-contaminated marine sediments .Biodegradation P227-235

**MOUNIER, J. (2013).** Caractérisation fonctionnelle de gènes de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* lors du développement de biofilms sur composés organiques hydrophobes ; Thèse présentée à l'Université de Pau et des Pays de l'Adour - UPPA Ecole doctorale des sciences exactes et leurs applications.

## N

**NATHALIE ,S . (2007).** Décontamination de sols pollués par les HAP par biodégradation en présence de substrats organiques. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.). Université du Québec.

**NOUMEUR, S. (2008).** Biodégradation du 2,4-dichlorophénol par le microbiote tellurique de la région de Hamla (Batna). Thèse de Magister en Microbiologie Appliquée et Biotechnologies microbienne. Universités Mentouri Constantine, P 3,6.

## O

**ODOKUMA, L., DICKSON, A. (2003).** Bioremediation of a crude oil polluted tropical rain forest soil .Global Journal of Environnement, P 2,29-40

## P

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

**PIEDRAFITA, C., MARIA-VICTORIA., (2007).** « La pollution ponctuelle des sols: Le cas des stations-service dans la Région de Bruxelles-Capitale », Université Libre de Bruxelles, P 153

**PRESCOTT., HARLEY., KLEIN., WILLEY., SHERWOOD., WOOLVERTON.,(2010).** Microbiologie 3eme édition. Université Bruxelles

**PRINCE, R.C. (2005).** The microbiology of marine oil spill bioremediation. *Petroleum microbiology*: p 317-336

## Q

**QUENEA, K. (2004).** Etude structurale et dynamique des fractions lipidiques et organiques réfractaires de sols d'une chronoséquence forêt/maïs (Cestas, Sud-ouest de la France). Thèse de Doctorat. Université de Paris 6 (France), P 4.

## 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).

**SCOTT, C. C. L., FINNERTY, W. R. (1976).** A comparative analysis of the ultrastructure of hydrocarbon- oxidizing microorganisms. *J. Gen. Microbiol*, 94: P 342-350.

**SCRIBAN, R. (1999).** Biotechnologie : restauration par voie biologique des sols contaminés par les polluantes organiques 5èmes éditions. *Ed Lavoisi*.

**SHELTON D, R., TIEDJE J, M. (1984).** Isolation and Partial Characterization of Bacteria in an Anaerobic Consortium That Mineralizes 3-Chlorobenzoic Acid. *Appl. Environ. Microbiol*, 48: P 840-848.

**SINGLETON, P. (1999),** Bactériologie, *Edition Duonod 4ème 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.23.

## T

**TRZESICKA-MLYNARZ, D., WARD, OP. (1995).** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH contaminated soil. *Can. J. Microbiol.* P41.

## V

**VANDECASTEELE, J. P. (2005).** Biodégradation des hydrocarbures aliphatiques et alicycliques. *In: Microbiologie Pétrolière*. Edited by E. Technip. Paris. P173-239

## Z

**ZHANPENG, J., HONGWEI, Y., LI XIN, S., SHAOQI, S. (2002).** Integrated assessment for aerobic biodegradability of organic substances. Chemosphere P 48 133-138.

Site web consultes :

http:// [www.petroleum.fr.st](http://www.petroleum.fr.st)

A decorative border with a repeating floral and leaf pattern in black and white, framing the central text.

ANNEXE

**Annexe 1 : composition des milieux de culture utilisés**

**1. Le bouillon nutritif (BN)**

Extrait de levure	1g
Extrait de viande	2g
Peptone	5g
NaCl	5g
Eau distillée	1000ml

pH=7.4

**2. La gélose nutritive (GN)**

Gélose nutritif hydratée	29g
L'eau distillée	1000ml

**3. L'eau physiologie**

NaCl	8,5g
L'eau distillée	1000ml

## **Annexe 2 : Technique générale de préparation des bactéries pour l'observation microscopique**

### **1. Préparation de frottis**

- Réaliser un frottis ou un étalement.
- Fixer la préparation à la flamme sans dépasser 50.60° (brièvement supportable à la main), ce qui les sèches puis laisser refroidir la lame).

### **2. Coloration de Gram**

Le protocole de cette coloration est composé de plusieurs étapes :

- Préparer et fixer un frottis bactérien à la chaleur du bec bunsen.
- Recouvrir au violet de gentiane. laisser agir 1 minute.
- Verser du lugol. Laisser agir 1minute.
- Décolorer à l'alcool pendant 5 à 10 secondes. Puis rincer à l'eau.
- Recolorer à la fuchsine. Laisser agir de 30 seconde à 1min. rinçage à l'eau puis s'écher.
- L'observation se fait en ajoutant l'huile à immersion, (grossissement x 100).

Les bactéries à Gram positif se colorent en violet alors que les bactéries à Gram négatif se colorant en rose.

**Annexe 3 : Mesure du potentiel d'hydrogène en fonction de temps.**

	T <sub>0</sub>	T <sub>7</sub>	T <sub>15</sub>	T <sub>21</sub>
<b>Atténuation</b>	8,28	7,30	7,92	8,52
<b>Bios</b>	8,28	7,88	7,90	7,91
<b>BAA</b>	8,28	7,83	7,88	8,45
<b>BAB</b>	8,28	7,52	7,66	8,29
<b>AIA</b>	8,28	7,83	7,58	7,84
<b>AIB</b>	8,28	7,64	7,51	7,86

**Annexe 4 : La longueur racinaires et la partie aérienne des plantes obtenues après une semaine de la semence au début et à la fin d'expérience sur sol non pollué.**

**Tableau 1 :** la longueur racinaires et la partie aérienne de sol non polluée (témoin semé à T0 J de bioremediation)

Les racines	La partie aérienne
14.5	8
12.5	11.5
15	12
17.5	8.5
15.6	10
13.5	12.7
12.9	10.3
14	10.2
13.3	11.4
15.2	11.6
16	13
17.5	12.3
18.2	13.6
14.5	13.2
17	12.7
14	11.5
17.1	13.7
16	13
13	12
12	12
17.5	12.2
12.7	12.5
15.7	13
18.8	13
19	13.5

**Tableau 2 :** La longueur racinaire et la partie aérienne de sol non polluée (témoin semé à T15J de bioremediation)

Les racines	La partie aérienne
17	15.1
16.4	12
16	14.5
14.5	11.3
14.2	15
14.4	14
13.2	10.2
17.3	12
13	14.5
18.5	10.5
15.2	13.5
15.5	9.2
10.5	9.7
15.1	13.5
14.7	9.5
17.5	12
12.5	11.8
9.1	10.5
12	10
12.3	11.5
10.6	12.2
6.4	10.1
11.2	11
11.4	2

## Essai de bioremédiation de sol pollué au gasoil par des bactéries hydrocarbonoclastes

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

### Résumé:

La pollution des sols par le gasoil constitue une menace importante pour tous les écosystèmes de l'environnement et la santé humaine, donc des solutions efficaces, économiques et non toxiques doivent être instaurées rapidement afin de restaurer l'équilibre naturel.

Dans ce mémoire on a fait appel à la capacité des microorganismes indigènes ou exogènes à dégrader ce polluant en composés moins toxiques.

Sept bacs de sol artificiellement pollué au gasoil à 5%, dont cinq ont subi des traitements variés ; de biostimulation, de bioaugmentation, des deux techniques combinées et deux non traités (témoin non pollué et bac atténuation naturelle) sont comparés par rapport au nombre bactérien au cours de 15 jours de traitement .

Le traitement par inoculation de deux consortiums bactériens A et B (bactéries isolées d'un site contaminé au pétrole brut) avait montré les meilleurs résultats, et en particulier le consortium A qui comporte la bactérie II suspectée être une *Pseudomonas aeruginosa*.

Un test de germination des graines d'orge effectué sur les sols traités pendant 15 jours, a donné un taux de germination de 4% uniquement sur les sols traités par le consortium A (avec ou sans fertilisant).

**Mots clés :** pollution, gasoil, bioremédiation, graines d'orges, bactéries.

**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire.

Jury d'évaluation :

**Président du jury :** Mme Riah Nacira (Maitre de conférences <<B>> à UFC)

**Encadreur :** Mme Guergouri Ibtissem (Maitre-assistant <<A>> à UFC)

**Examineur :** Melle Abdelaziz wided (Maitre-assistant <<A>> à UFC)

**Date de soutenance :** 14/06/2016