



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

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



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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Ecologie Microbienne*

Intitulé :

Isolement et caractérisation des bactéries hydrocarbonoclastes

Présenté et soutenu par : BELMENAI Maha

Le : 15/06/2015

BENHAFED Nihed Esma

Jury d'évaluation :

Président du jury : M. BENHAIZIA Yacine Professeur. U.F.M. Constantine

Rapporteur : M^{me}. GURGOURI Ibtissem M .A.A. U.F.M. Constantine

Examineurs : M. BENGUEDOUAR Amar Professeur. U.F.M. Constantine

Année universitaire
2014 – 2015

Remerciement

Nous remercions Dieu le tout puissant qui nous a porté de chance pour la réalisation de ce modeste travail.

Un mémoire de fin d'étude ne se réalise jamais seul, c'est pourquoi nous remercions toutes les personnes qui ont participé à ce modeste travail.

Nous tenons particulièrement à remercier vivement notre encadreur : Mme GUERGOURI Ibtissem pour la gentillesse, la direction, et la disponibilité qui nous ont permis d'apprendre et de découvrir énormément d'informations au point de vue scientifique ou technique ; nous la remercions aussi pour nous avoir transmis son gout pour la recherche.

Merci.

On tient à remercier infiniment Mr. BENGUEDOUAR , professeur à l'université Mentouri de Constantine ; pour nous avoir acceptés dans le laboratoire d'Ecologie Microbienne aussi pour avoir accepté d'examiner notre mémoire.

Nos remerciements à Mr. BENHIZIA pour l'honneur qu'il nous en fait en acceptant de juger ce travail, et aussi pour toutes ses orientations et ses conseils durant ce travail.

Nous remercions également toute les doctorantes qui nous ont aidées beaucoup à réaliser le profil ce travail ; nous citons : Radja, Leila, Hanane, Sabira, Maya, Maroua, Asma et Gaci Meriem.

Nos remerciements sont adressés également à :

Toute l'équipe de laboratoire de Biotechnologie.

Tous les étudiants de la promotion de l'Ecologie Microbienne 2014- 2015.

Dédicace

Je dédie ce modeste mémoire

A mes très chers parents avec toute ma reconnaissance

A ma très chère mère Narimene

Tu représentes pour moi le symbole de la bonté et la source de tendresse. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance.

A mon très cher père Nasreddine

Aucune dédicace ne serait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation.

A mon très cher frère Islam

A ma petite soeur adoré Malek

A Fendri S qui m'a encouragé, de leur soutien durant les moments difficiles

A mes copines Sara, Anissa, Rayane et Maha

A notre compagnon au laboratoire Oussama

A mes cousine Smahene, Hawa, Oumnia et chiraz

A tout le groupe de ma promotion de master.

B.Nihed Esma

Dédicaces

Que ce travail témoigne de mes respects

A mes parents.

Grâce à leurs tendres encouragements et leurs grands sacrifices, ils ont pu créer le climat affectueux et propice à la poursuite de mes études

Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mes profonds sentiments envers eux.

Je prie le bon Dieu de les bénir, de veiller sur eux, en espérant qu'ils seront toujours fiers de moi .

A mes frères :

ZIN EDINE et ABD ELKARIM.

A la famille BELMENAI

BOUSSALIA NABIL

A toute la famille BESTANDJI

A tous mes amis : RAYANE , OUSSAMA ,NIHED ,OUALID , MIMA.

Ils vont trouver ici l'expression de mes sentiments de respect et de Reconnaissance pour le soutien qu'ils n'ont cessé de me porter.

Leur générosité et leur soutien m'oblige de leurs témoigner mon profond respect et ma loyale considération.

A tous mes amis et mes collègues.

B . Maha

Tables des matières

Introduction	1
Chapitre 1: revue bibliographique	
I. Les sols pollués par les hydrocarbures	
1. La Pollution.....	2
1.1. Définition.....	2
1.2. Pollution du sol par les hydrocarbures.....	3
1.2.1. Types de polluants et origines.....	3
2. Le Polluant.....	4
2.1. Les hydrocarbures pétroliers.....	4
2.1.1. Définition et caractérisation.....	4
2.1.2. Classification.....	4
2.2. Le Pétrole.....	5
2.2.1. Définition.....	5
2.2.2. Origine du pétrole.....	6
II. La biodégradation des hydrocarbures	
1. Définition de la biodégradation.....	6
2. Les microorganismes dégradants les hydrocarbures.....	6
3. Les facteurs influençant la biodégradation.....	7
3.1. Structure et nature du sol.....	7
3.2. Composition chimique des hydrocarbures.....	7
3.3. L'humidité.....	8
3.4. Température.....	8
3.5. Salinité.....	8

3.6. Potentiel d'hydrogène (pH).....	8
3.7. Taux d'oxygène.....	9
3.8. Contenu en nutriments.....	9
4. Les voies de la biodégradation des hydrocarbures.....	9
4.1. La biodégradation primaire.....	9
4.2. Le Co-métabolisme.....	9
5. La biodégradation des hydrocarbures par les biosurfactants.....	10

III. Les Biosurfactants

1. Définition des biosurfactants.....	10
2. Types, structures et classification.....	10
3. Rôle physiologique des biosurfactants.....	11
4. Différentes applications des biosurfactants.....	11

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

1. Echantillonnage.....	13
1.1 Matériel biologique.....	13
1.2. Présentation de raffinerie de Skikda.....	13
1.3. Technique d'échantillonnage.....	14
2. Analyses physicochimiques du sol.....	14
3. Isolement et purification des souches bactériennes.....	14
3.1. Préparation de la solution mère.....	14
3.2. Préparation des dilutions.....	14
3.3.Dénombrement des bactéries.....	15

3.4. Isolement des bactéries.....	15
3.5. La purification.....	15
3.6. La conservation.....	15
3.7. Caractérisation des isolats purifiés.....	16
3.7.1. Etude morphologique.....	16
A. Aspect macroscopique.....	16
B. Aspect microscopique.....	16
4. La sélection des souches productrices des biosurfactants.....	17
4.1. Test d'émulsification.....	17
4.2. Index d'émulsion E24.....	17
4.3. Test de déplacement d'huile.....	17
4.4. Test de parafilm M.....	18
5. Tests biochimiques.....	18
5.1. L'étude de métabolisme respiratoire.....	18
a. Test de catalase.....	18
b. Recherche de l'oxydase.....	18
c. Type respiratoire.....	19
5.2. Le métabolisme glucidique.....	19
a. Utilisation de l'amidon.....	19
b. Utilisation du lactose et du saccharose, fermentation du glucose et la production d'H ₂ S (gélose TSI).....	20
c. Réaction de voges-proskauer (VP).....	20
d. Test au rouge de méthyle (RM).....	20
5.3. Le métabolisme protéique.....	21

a. Production d'indole.....	21
5.4. Recherche des staphylocoques.....	21

Chapitre 3 : Résultats et discussion

1. Caractérisation du sol.....	22
2. Dénombrement des bactéries sur milieu solide.....	22
3. Isolement et purification des souches.....	24
4. Caractérisation morphologique des isolats.....	24
a. Etude macroscopique.....	24
b. Etude microscopique.....	25
5. la sélection des souches productrices des biosurfactants.....	27
5.1. Test d'émulsification.....	27
5.2. Test de parafilm.....	29
5.3. Test de déplacement d'huile.....	30
6. Tests biochimique.....	32
6.1. Etude de métabolisme respiratoire.....	34
a. Test de catalase.....	34
b. Test de la recherche de l'oxydase.....	34
c. Type respiratoire.....	35
6.2. Métabolisme glucidique.....	35
a. Utilisation de l'amidon.....	35
b. Utilisation du lactose, fermentation du glucose, production d'H ₂ S.....	36
C. Test de VP et RM.....	36
6.3. Métabolisme protéique.....	37
6.4. Recherche des <i>Staphylococcus</i>	37
7. Clés dichotomiques pour une orientation présumée vers les genres.....	38

Annexes

Références bibliographiques

Liste des figures

Figure 1 : Les diverses formes de contamination sols et leurs conséquences.....	3
Figure 2 : Structure chimique des hydrocarbures pétroliers.....	5
Figure 3 : Les fonctions des biosurfactants les plus demandées pour usage industriel.....	12
Figure 4 : Présentation du site d'échantillonnage (Google Earth Maps).....	13
Figure 5 : Dénombrement sur la Gélose nutritive.....	23
Figure 6 : L'aspect macroscopique de deux isolats.....	25
Figure 7 : a, b, c, L'aspect microscopique des isolats après coloration de Gram (G x 100).....	26
Figure 8 : la réalisation de test d'émulsification.....	27
Figure 9 : Histogramme représente l'estimation d'émulsion par E24 pour le pétrole et le kérosène.....	28
Figure 10: Histogramme représente l'estimation de la qualité d'émulsion par E24 après 24h et 7jrs (kérosène).....	28
Figure 11 : Effondrement des gouttelettes lors du test de parafilm M.....	29
Figure 12 : Résultat positif pour le test catalase.....	34
Figure 13 : résultat pour le test d'oxydase.....	34
Figure 14 : Les différents résultats de type respiratoire.....	35
Figure 15 : Les différents résultats de test de l'amidon.....	35
Figure 16 : Test de TSI.....	36
Figure 17 : résultats de test RM et VP.....	36
Figure 18 : Les <i>Staphylococcus</i> sur le Baird Parker.....	37

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Numéro de tableau	Titre	Page
1	Exemple de micro-organismes dépollueurs	7
2	Principales classes de surfactants biologiques	11
3	Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de sol	22
4	Nombre des colonies sur la gélose nutritive	23
5	Résultats de l'étude macroscopiques des souches isolées	24
6	Résultats de l'étude microscopique ses souches isolées	25
7	Indice d'émulsion pour le pétrole et le kérosène à différents temps d'incubation	27
8	Résultats de test de parafilm	30
9	Résultats de déplacement d'huile	31
10	Résultats des tests biochimiques	32
11	Les différents genres bactériens suspectés.	41

Résumé

Les sols pollués sont peuplés de microorganismes efficaces dans la dégradation biologique du polluant.

Le pétrole représente l'un des polluants récalcitrants qui perturbent la flore autochtone permettant ainsi l'installation de bactéries qui s'adaptent et utilisent cette source de carbone et ou l'un de ces dérivés. L'un des modes d'assimilation est la production de biomolécules appelées biosurfactants présentant un grand nombre d'applications environnementales et industrielles.

A ce titre, les objectifs de notre travail sont d'isoler et de caractériser les souches hydrocarbonoclastes productrices de biosurfactant, présentes dans nos échantillons de sols contaminés par le pétrole brut.

La méthode d'isolement et d'identification a été mise en œuvre. Elle repose sur un isolement sur un milieu de culture contenant le pétrole brut à 1 %, ce qui nous a permis d'isoler 19 souches productrices de biosurfactants : dix souches à Gram (+) et neuf souches à Gram (-).

La réalisation des tests de détection des biosurfactants incluant : le test d'émulsification, test de parafilm et le test de déplacement d'huile a montré une capacité synthétique de nos isolats avec une différence d'efficacité.

Mot clés : hydrocarbonoclaste, biosurfactans, bactérie, biodégradation

إن التربة الملوثة تعجبتنا بمجهرية تساهم بفعالية في التحلل البيولوجي للعنصر الملوث.

أكلة البترول فاسحة المجال للموضوعات البكتيرية التي تتأقلم وتستعمل مصدر الكربون أو أحد مشتقاته. إحدى طرق الامتصاص تتمثل في إنتاج الجزيئات الحيوية تسمى Biosurfactant التي لها العديد من التطبيقات البيئية والصناعية.

وبهذا الصدد، فإن الهدف من عملنا هذا هو العزل والكشف عن خصائص البكتيريا الهيدروكربونوكلاستية «أكلة البترول»، المنتجة للـ biosurfactants الموجودة في عينات التربة الملوثة للبترول الخام.

ترتكز طريقة العزل على استخدام وسط غذائي يتضمن بترول خام بنسبة 1% وهذا ما سمح لنا بعزل 19 عينة منتجة للـ biosurfactant: 10 عينات غرام + 9 عينات غرام -

إن إنجاز اختبارات الكشف عن biosurfactant المتضمنة: اختبار الاستحلاب، اختبار بالبارافيلم، واختبار حركة الزيت، أظهرت قدرة عزلاتنا على إنتاج الـ biosurfactant مع مع اختلاف في النجاعة

الكلمات المفتاحية:

هيدروكربون، biosurfactant، بكتيريا، تحلل حيوي.

Abstract

Polluted soils are full of microorganisms effective to biologic degradation of the pollutant.

Oil is one of the contrary pollutants that disturb the autochthonous flora thereby enable the installation of bacteria, which adapt themselves and use this source of carbon or one of its derivatives. One way of assimilation is the production of biomolecules called biosurfactants presenting a huge number of environmental and industrial applications.

As such, the aim of our work is to isolate and characterize hydrocarbonoclasts strains, which produce biosurfactants present in our soils samples contaminated by pure oil.

Isolating and identifying method is implemented. It consists on isolation in a culture medium containing pure oil of 1%, it allow us to get 19 productive strains of biosurfactants: 10 strains of Gram + and 9 strains of Gram-.

The realization of biosurfactants detection tests include: emulsification test, parafilm test and oil movement test, showing the capacity of our isolates to produce biosurfactants with a different efficiency.

Key words: hydrocarbonoclast, biosurfactants, bacteria, biodegradation.

INTRODUCTION

La pollution par les hydrocarbures en milieu terrestre, qu'elle soit chronique ou accidentelle constitue l'un des phénomènes de pollution les plus préoccupants, Cette pollution peut avoir un impact soit direct ou indirect, sur la santé humaine et l'équilibre des écosystèmes.

Le pétrole brut qui est déversé dans le sol nécessite l'intervention de différents facteurs pour l'élimination de ce dernier. Parmi ces facteurs, la biodégradation par les microorganismes et en particulier les bactéries est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement.

Les bactéries ont un pouvoir de synthétiser des biomolécules appelées biosurfactants, qui ont des propriétés fonctionnelles, leur permettant d'utiliser ces hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie. Ces biosurfactants servent à plusieurs applications comme la remédiation biologique, l'extraction du pétrole, les applications cosmétiques, détergentes ou émulsifiantes pour l'industrie alimentaire ainsi que dans beaucoup d'applications industrielles et environnementales grâce à leur biodégradation et l'absence de toxicité.

Ce travail a pour but d'étudier la capacité de dégradation des bactéries du sol contaminé par les hydrocarbures pétroliers et d'autre part, la caractérisation et isolement des souches bactériennes hydrocarbonoclastes, présente dans notre échantillon qui se trouve autour des bacs de stockage au niveau de la zone industrielle SONATRACH de Skikda.

La réalisation de ce modeste mémoire est structurée en trois chapitres : le premier chapitre présente une synthèse bibliographique, le second décrit le matériel et les méthodes utilisés, et un troisième chapitre consacré aux résultats et discussion qui sera suivi d'une conclusion

Chapitre I: Les sols pollués par les hydrocarbures

1. La Pollution

1.1. Définition

Il y a des nombreuses définitions qui en été données par les experts. Parmi celles-ci nous retiendrons la suivante publiée dans un rapport rédigé par le comité scientifique de la maison blanche intitulé : Pour restaurer la qualité de notre environnement. « C'est une modification défavorable du Milieu naturel qui apparait en totalité ou en partie comme un sous-produit de l'action humaine, au travers d'effets directs ou indirects altérant les critères de répartition des flux d'énergie .des niveaux de radiation, de la constitution physico-chimique du milieu naturel et de l'abondance des espèces vivantes (8).

Ces modification peuvent affecter l'homme directement ou à travers des ressources agricoles, en eau et autres produits biologiques. Elles peuvent aussi l'affecter en altérant les objets physiques qu'il possède, Les possibilités du milieu ou encore en enlaidissant la nature. (8)

Les classifications des types des pollutions selon le milieu considéré sont :

• **Pollutions de l'hydrosphère**

La pollution de l'eau est la contamination par des produits chimiques, les effluents d'une usine, les égouts d'une ville ou des micro-organismes (17).

• **Pollutions de l'atmosphère**

Les principaux polluants atmosphériques sont les particules fines, le dioxyde de soufre (SO₂), l'ozone, les oxydes d'azote (NO et NO₂), les composés organiques volatils (COV) (25).

• **Pollution du sol**

On dit qu'un sol est pollué lorsqu'il contient une concentration anormale de composés chimiques potentiellement dangereux pour la santé, des humains, des plantes ou des animaux (25).

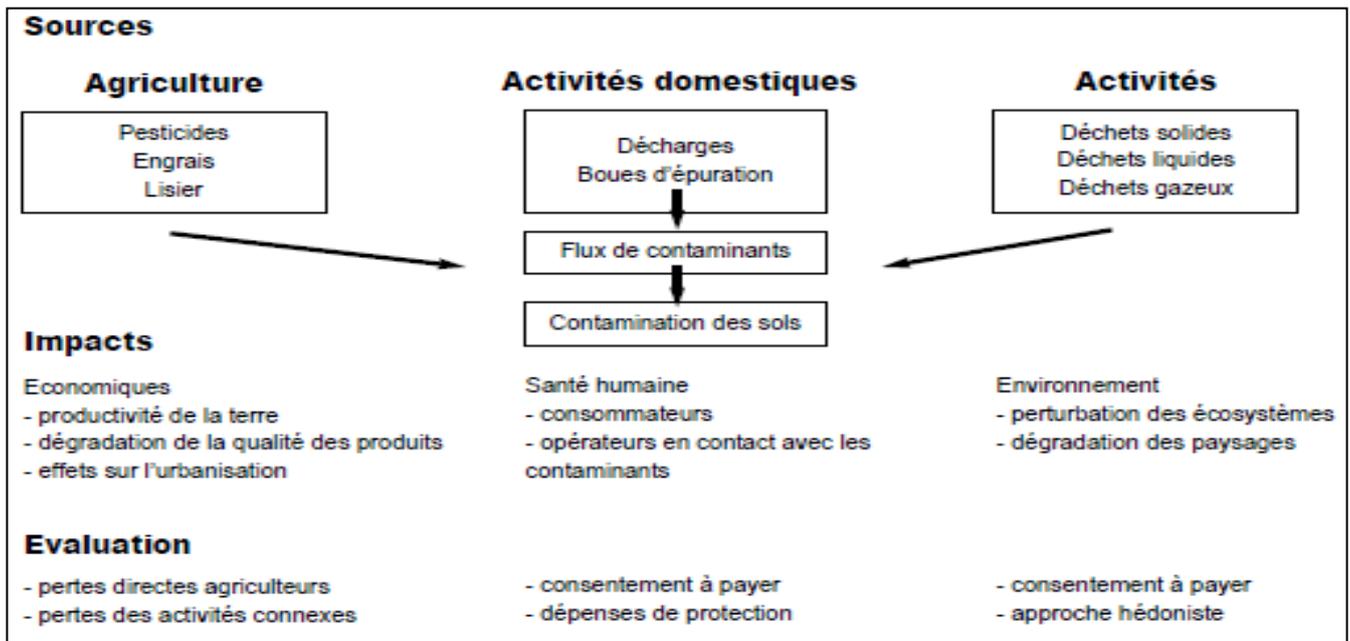


Figure 1 : Les diverses formes de contamination sols et leurs conséquences (25)

1.2. Pollution du sol par les hydrocarbures

L'exploitation des hydrocarbures nécessite et engendre des opérations et activités importantes qui perturbent notre environnement provoquant des effets néfastes pour la santé humaine (2).

En effet, la présence de polluants dans le sol pose des problèmes de toxicité dès lors que ces polluants peuvent migrer (sous l'effet de l'écoulement des eaux, de la manipulation de la terre, de plantations, de l'acidification du milieu...) ; une fois dans la chaîne alimentaire ils entrent en contact avec l'homme via son alimentation.

1.2.1. Types de polluants et origines

Les groupes de composés pétroliers polluants possibles sont : Les hydrocarbures pétroliers (gasoils, fuel, kérosène, huiles minérales) et les déchets d'exploitation du pétrole (boues et résidus d'huiles, goudrons) (5). On distingue deux origines de ces pollutions :

- **Pollutions accidentelles** : Ou une grande quantité de polluant est déversée en fonction du temps (déversement ou dépôt ponctuel de polluants).
- **Pollutions chroniques** : Dont les effets cumulés peuvent être plus importants que ceux d'une pollution accidentelle (17).

2. Le Polluant

2.1. Les hydrocarbures pétroliers

2.1.1. Définition et caractérisation

Composés exclusivement d'atomes de carbone et d'hydrogène, les hydrocarbures sont des composés organiques de formules brute : C_nH_m . De par leur abondance naturelle, ils font partie de produits chimiques les plus importants pour l'humanité et sont notamment utilisés comme source d'énergie primaire [7].

Leur structure moléculaire varie et influe sur les propriétés de ces hydrocarbures. Plus le nombre de carbones est important, plus la masse volumique, le point de fusion et le point de d'ébullition seront, d'une manière générale, élevés [18]. En revanche la solubilité, la volatilisation et surtout la biodégradabilité diminuent.

2.1.2. Classification

Les hydrocarbures sont regroupés en différentes classes parmi lesquelles on distingue : Les hydrocarbures saturés (30 à 70%), les hydrocarbures aromatiques et polyaromatiques (20 à 40%) les composés polaires (5 à 25%) et les Asphaltènes (0 à 10%).

- **Hydrocarbures saturés** : on distingue les alcanes linéaires, les alcanes ramifiés et les cycloalcanes
- **Hydrocarbures aromatiques** : Sont moins abondants que les alcanes, et ne représentent que 10 à 30% des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier.
- **Composés polaires** : ça correspond à des molécules hétérocycliques, telles que : Les composés oxygénés (phénol, acides carboxyliques, alcools, aldéhydes), les composés soufrés, (mercaptans, sulfures, disulfures) et les composés azotés (pyridines, quinoléines). (21)

Asphaltènes : Les asphaltènes regroupent dans une classe des composés de hauts poids moléculaires, insolubles dans le pentane ou l'hexane. Leur structure est mal connue à cause de leur composition chimique complexe

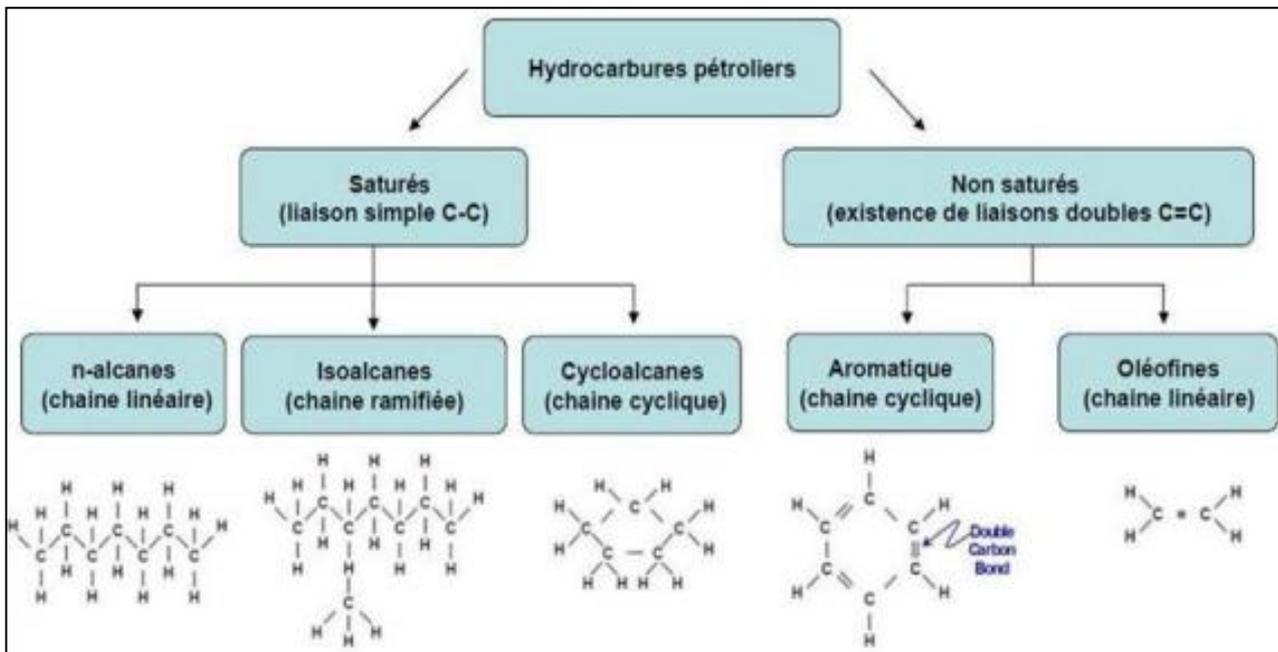


Figure2 : Structure chimique des hydrocarbures pétroliers (21)

2.2. Le Pétrole

2.2.1. Définition

Le mot pétrole veut dire huile qui est issu des deux mots latins « Pétra » et « oléum »; c'est le nom donné dans le langage courant à des composés chimiques comportant essentiellement des atomes de carbone (C) et des atomes d'hydrogène (H) que les chimistes appellent les hydrocarbures.

Il s'agit d'un mélange complexe d'hydrocarbures, saturés, à chaînes linéaires, ramifiés ou cycliques, ainsi que des traces de soufre, d'azote, d'oxygène, d'eau salée et de métaux (Fer, nickel). On le trouve en grandes quantités dans des gisements enfouis sous la surface des continents ou au fond des mers (1).

Les pétroles bruts sont des liquides dont la couleur va de l'ombre clair au noir opaque (brut asphalténique). Ils peuvent être d'un vert fluorescent (paraffiniques) ou bleu (naphténique). La présence de composés sulfureux leur donne une odeur déplaisante. Leur viscosité varie en fonction de leur teneur en fractions légères. Ils sont hautement Inflammables (point d'éclair inférieur à 30°C) (20).

2.2.2. Origine du pétrole

Il y a plusieurs millions d'années, les restes de nombreux organismes marins se sont déposés au fond des océans. Avec le temps ils se sont accumulés et se sont mélangés à la boue et au limon pour former des couches de sédiments riches en matière organique : **le kérogène**. Ce dernier provient de la décomposition des matières organiques par des bactéries. Le kérogène est disséminé dans une masse minérale (la "roche mère") sous forme de petits filets. Les sédiments s'enfoncent lentement dans le sol, sous l'effet de la tectonique des plaques (les mouvements de convection de la croûte terrestre). Sous l'effet de la compression due aux fortes profondeurs, ces couches de sédiments se sont transformées en roche. Avec l'augmentation de l'épaisseur de ces couches de sédiments et des apports de chaleur géothermique, la température s'est élevée et a entraîné une décomposition des matières organiques en substances plus simples : les hydrocarbures. Cette décomposition d'origine thermique est nommée la pyrolyse (20).

Chapitre II: La biodégradation des hydrocarbures

1. Définition de la biodégradation

L'utilisation de méthodes biologiques dans la dépollution des zones contaminées par les hydrocarbures se basant sur le phénomène de la biodégradation par les microorganismes appelés **hydrocarbonoclastes** a été mise en évidence dès 1946 par ZoBell. Depuis cette date le nombre d'espèces bactériennes identifiées possédant cette propriété n'a cessé d'augmenter (24).

2. Les microorganismes dégradants les hydrocarbures

Les composants du pétrole brut constituent une grande source d'énergie qui permet d'alimenter non seulement les moteurs à combustion interne, mais aussi les microorganismes. Ces derniers ont développé des mécanismes d'utilisation de ces hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie (4)

Les micro-organismes capables de décontaminer le site d'un déversement de pétrole sont essentiellement des bactéries et des champignons. Les bactéries peuvent décomposer le pétrole en dioxyde de carbone et en eau. Cependant, aucun micro-organisme ne peut à lui

Seul dissoudre tous les composants du pétrole brut ou des carburants raffinés qui sont déversés dans l'environnement. Les dizaines de milliers de composés différents qui forment le pétrole ne sont biodégradables que par une communauté de micro-organismes agissant de concert. Certaines bactéries peuvent dégrader plusieurs hydrocarbures ou toute une classe d'hydrocarbures. L'action combinée de la communauté bactérienne peut arriver à dégrader presque tous les composants (4).

De nombreux genres bactériens ont été recensés et décrits comme aptes à dégrader des hydrocarbures, quelques exemples sont cités dans le tableau (4).

Parmi les microorganismes aptes à se développer sur les hydrocarbures, les bactéries restent qualitativement et quantitativement prépondérantes pour métaboliser ces substrats

Tableau 1 : Exemples de microorganismes dépollueurs. (4)

Bactéries	
Gram -	Gram +

<i>Pseudomonas</i>	<i>Micrococcus</i>
<i>Xanthomonas</i>	<i>Arthrobacter</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Rhodococcus</i>
<i>Flavobacterium</i>	/
<i>Agrobacterium</i>	/

3. Les facteurs influençant la biodégradation

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

3.1. Structure et nature du sol

Les bioprocédés s'appliquent à une grande variété de sol. Pour cela, il est important de connaître la structure et la nature de sol (5). NAM et al. (2003) ont observé que les agrégats de sols réduisaient la biodégradation.

3.2. Composition chimique des hydrocarbures :

Les hydrocarbures pétroliers diffèrent par leur susceptibilité aux attaques microbiennes. Ainsi, la vitesse de biodégradation est plus élevée pour les hydrocarbures saturés, viennent ensuite les aromatiques légères, les aromatiques à haut poids moléculaire et les composés polaires ayant la vitesse de dégradation la plus faible (5).

3.3. L'humidité :

L'humidité est un paramètre important dans les processus de dégradation des composés organiques simples ou complexes. Il est connu que les faibles humidités inférieures à 2% limitent la vitesse de biodégradation (5).

Inversement, des teneurs trop élevées vont influencer sur la perméabilité des sols aux gaz et générer des conditions de limitations de transfert d'oxygène et donc de limitation de métabolisme microbien aérobie (5).

3.4. Température :

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

3.5. Salinité

La salinité diminue le nombre de micro-organismes dans le sol. Elle ralentit les processus de l'humification et de la minéralisation des matières organiques. En effet, de tous les processus biologiques, la nitrification est la plus touchée, ainsi que le dégagement de CO₂. Les fortes salinités constituent donc une barrière naturelle pour la biodégradation (5).

3.6. Potentiel d'hydrogène (pH)

L'activité microbienne est largement influencée par le pH. Il doit être situé entre 5 et 9 avec un optimum aux alentours de 7 (5). Si le pH est acide, il peut favoriser la solubilisation des métaux lourds qui sont très toxiques pour les bactéries.

3.7. Taux d'oxygène

Le processus biologique aérobie est souhaitable pour la bioremédiation de sol pollué par le diesel (5). Ainsi, la respiration aérobie semble être le mécanisme primaire pour la biodégradation des hydrocarbures (5).

Plusieurs auteurs montrent que la biodégradation anaérobie est plus lente que la biodégradation aérobie (5).

3.8. Contenu en nutriments

Les nutriments sont indispensables à l'activité et au développement des micro-organismes. Ce sont des corps simples qui peuvent être assimilés, sans transformation digestive par les organismes et favoriser la croissance des populations de bactéries. Les plus importants sont l'azote et le phosphore(5).

4. Les voies de la biodégradation des hydrocarbures

Deux types de biodégradation sont distingués :

4.1. La biodégradation primaire

La dégradation de la molécule organique par les micro-organismes est couplée à une production d'énergie et de carbone à travers une série de réactions complexes d'oxydation. Dans ce cas les substances impliquées sont considérées comme des sources de croissances primaires.

La biodégradation des composés organiques dans l'environnement dépend de deux voies métaboliques principales : aérobie et anaérobie (15).

4.2. Le Co-métabolisme

Dans ce cas, le polluant ne sert pas de source principale de carbone ou d'énergie. Le micro-organisme a besoin d'une source de substrat, et le polluant est considéré comme un substrat secondaire. Il s'agit alors d'une biodégradation par co-métabolisme, dans laquelle un substrat secondaire est biodégradé en même temps qu'un substrat primaire. Ce mode de dégradation est essentiel pour la plupart des polluants organochlorés un exemple d'alcane cométabolisé est le cyclohexanedégradé par *Mycobacterium austrafricanum* en présence d'isooctane (16).

5. La biodégradation des hydrocarbures par les biosurfactants

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

Chapitre III : Les Biosurfactants

1. Définition des biosurfactants

Les surfactants (**SUR**Face **ACT**ive **Age**NTS) sont des agents à activité de surface (tensioactifs), synthétisés chimiquement ou par voie biologique (biosurfactants).

Ces molécules de haute énergie se répartissent à l'interface entre liquides non miscibles réduisant ainsi l'énergie libre du système et formant des microémulsions des solutions aqueuses ou des mélanges d'hydrocarbures. (9)

La tension superficielle de l'eau peut être réduite de 72 mN/m jusqu'à 27 mN/m en présence d'un surfactant, synthétique ou naturel mais cette capacité reste relative et varie d'un surfactant à un autre. (9)

2. Types, structures et classification

La portion hydrophile de la molécule permet de distinguer quatre types chimiques ; à savoir ; les cationiques, les anioniques, les non ioniques, sans charge et les amphotères. (25)

Les biosurfactants sont constitués d'une partie hydrophile et d'une partie hydrophobe. Généralement, le groupement hydrophile est constitué d'acide aminés, peptides ou de polysaccharides (mono ou di) ; le groupement hydrophobe est constituée d'acides gras saturés ou non saturés.

Ces molécules ont la capacité de réduire les tensions inter-faciales entre une ou deux phases de polarités différentes comme l'huile, l'eau, l'air et l'eau ou encore l'eau et un solide. Les surfactants chimiques généralement toxique et non biodégradables par contre les biosurfactants sont biodégradables et moins toxiques.

Les biosurfactants sont classés suivant la nature biochimique du surfactant produit par le microorganisme. On distingue cinq grandes classes de biosurfactants :

les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les liposaccharides et les lipides neutres. (25)

Tableau 2: Principaux classes de surfactants biologiques (5).

Groupe	Biosurfactant	Micro-organisme
Glycolipides	Rhamnolipides	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Trehalolipides	<i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Mycobacterium</i>
	Sophorolipides	<i>Candida bombicola</i> , <i>Candida antartica</i>
Lipopeptides et lipoprotéines	Surfactine Viscosine	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Phospholipides	Phospholipide	<i>Corynebacterium insidiosum</i>
Acides gras	Acide gras	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipides neutres	Lipides neutres	<i>Clostridium pasteurianum</i>
Lipopolysaccharides ou polymériques	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

3. Rôle physiologique des biosurfactants

Le principe rôle physiologique du tensioactif est de permettre aux microorganismes de se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension inter-faciale entre l'eau et le substrat, rendant ce dernier plus facilement accessible (10).

Cependant, les biosurfactants peuvent avoir d'autres rôles aussi importants que l'émulsification, par exemple : l'adhésion aux surfaces solides et la formation de Biofilms (Alasan d'*Acinetobacter*), la régulation du niveau énergétique cellulaire (sophorose de *T. bombicola*), l'activité bactéricide (gramicidine, polymexine, surfactine), la pathogénicité de certaines bactéries (rhamnolipides de *Pseudomonas*), ainsi que le piégeage des métaux lourds (3).

4. Différentes applications des biosurfactants

Une grande attention a été portée vers les biosurfactants en raison de leur vaste gamme de propriétés fonctionnelles. Ces propriétés uniques permettent leur utilisation et le remplacement possible des surfactants synthétisés chimiquement contenus dans un grand nombre d'opérations industrielles. (11). Ces applications sont résumées sur la figure 2

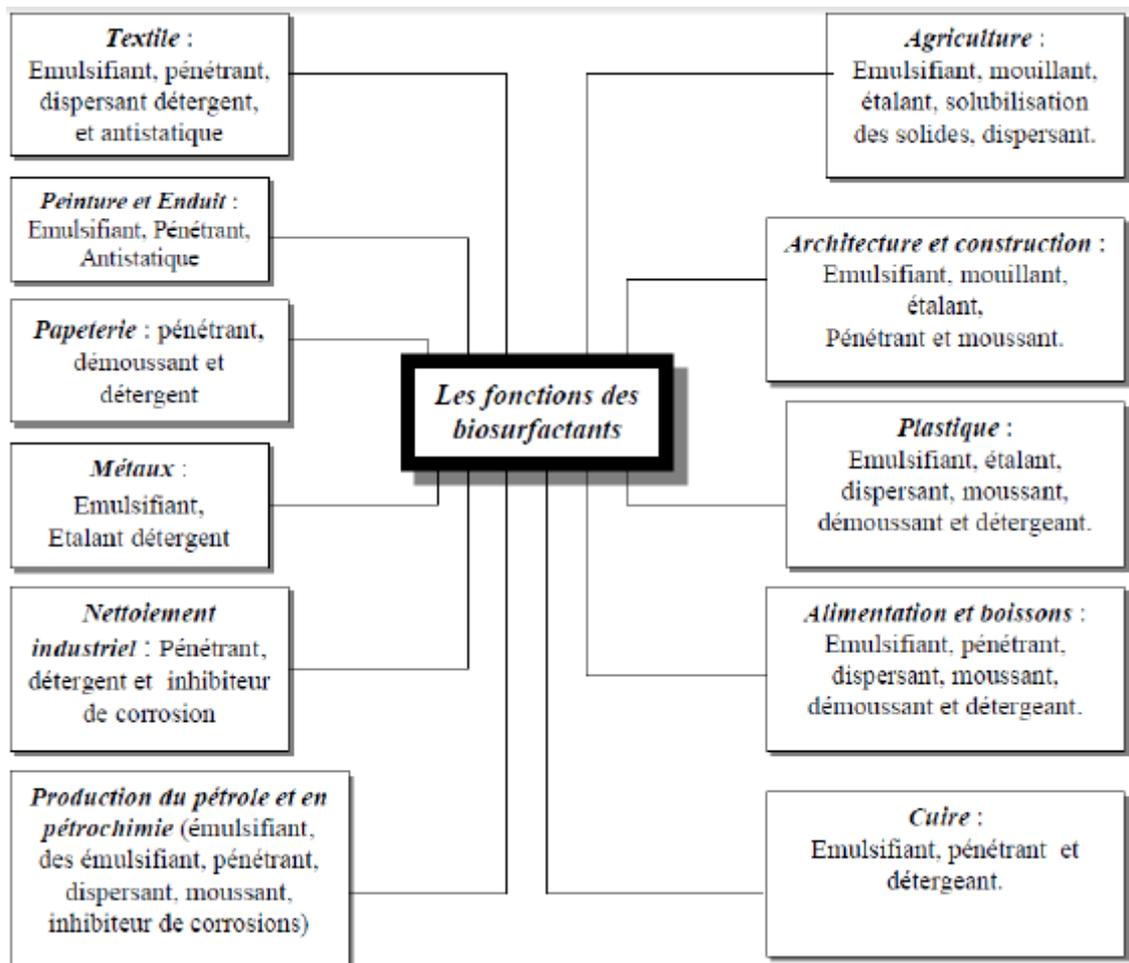


Figure 3 : Les fonctions des biosurfactants les plus demandées pour usage industriel (6).

1. Echantillonnage

1.1 Matériel biologique

Les échantillons de sols contaminés par les hydrocarbures, utilisés dans cette étude sont prélevés par Mlle *Benhafed N.* et Mlle *Belmenai M.* à partir de la zone industrielle de Skikda selon des distances et profondeurs bien déterminées.

1.2. Présentation de raffinerie de Skikda

La raffinerie de Skikda est située dans la zone industrielle à 7Km à l'est de Skikda et à 2Km de la mer. Elle couvre une superficie de 190 ha avec un effectif à l'heure actuelle de 1280 travailleurs. La raffinerie de Skikda a pour mission le traitement du pétrole brut provenant de Hassi-Messaoud et le but réduit importé pour fabriquer une gamme de produits destinés à la satisfaction du marché national et à l'exportation(12).



Figure4 : Présentation du site d'échantillonnage (Google Earth Maps)

L'échantillon est du type solide, c'est un sol contaminé, prélevé autours de trois bacs de stockage de pétrole brut (Tank S116, S122 et S125) au niveau du service d'exploitation dans la raffinerie de SONATRACH à Skikda.

Ces bacs ont étaient construits en 1971 (par la CMP France). Leur diamètre est de 66,75m, la hauteur est égale à 14,64m avec une capacité de stockage de 51200m de pétrole brut (2)

1.3. Technique d'échantillonnage

L'échantillonnage été effectué en utilisant un matériel stérilisé par flambage à l'alcool sur le site. La terre est creusée après avoir écarté les 5 premiers centimètres de sol, allant jusqu'à 10 centimètre de profondeur afin de varier la flore bactérienne selon son type respiratoire. Les échantillons sont récupérés aseptiquement dans des flacons stériles qui sont ensuite acheminés jusqu'au laboratoire.

2. Analyses physicochimiques du sol

La caractérisation physicochimique de l'échantillon du sol a porté essentiellement sur la couleur, la composition granulométrique (la texture) et la valeur du pH. La mesure de leur pH s'est fait selon la technique écologique-AFNOR-ISO 10390- (Annexe2)

Une suspension formée de 5 g du sol dans 45 ml d'eau distillé stérile est mélangée à l'aide d'un agitateur puis laissée au repos durant 30 minutes. La mesure s'effectue en plongeant l'électrode de pH mètre dans le liquide surnagent. La lecture se fait après stabilisation de la valeur.

3. Isolement et purification des souches bactériennes

3.1. Préparation de la solution mère

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

3.2. Préparation des dilutions

Dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile, 1 ml de la solution mère et ajouté, ce qui représente la dilution 10^{-1} . Un ml de cette dilution mélangé à 9ml d'eau

physiologique stérile, ce qui correspond à la dilution 10^{-2} . on continue ainsi jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-4} .

3.3. Dénombrement des bactéries

La gélose pour dénombrement est un milieu utilisé pour le comptage des microorganismes. C'est un milieu nutritif sans inhibiteurs, dont l'intérêt est de favoriser le développement à 30 °C de tous les micro-organismes qu'on y a déposés. L'ensemble de tous les micro-organismes s'appelle la flore totale.

3.4. Isolement des bactéries

Cette étape permet de mettre en évidence la flore microbienne existante dans les deux échantillons de sol. Nous procédons à l'ensemencement sur un milieu de culture solide synthétique M2 modifié. Le milieu M2 est un milieu utilisé pour confirmer la capacité des bactéries à utiliser le pétrole comme unique source de carbone additionné à une concentration de 1%.

A l'aide d'une anse de platine, une goutte de chaque dilution est ensemencée (solution mère, ... 10^{-4}) sur toute la surface du milieu par la technique d'épuisement en stries serrées. L'incubation se fait à 30° C pendant 24h. (15).

3.5. La purification

Après 24h d'incubation, différentes colonies sont obtenues. Chaque colonie d'aspect macroscopique différent (diamètre, couleur, forme, opacité) est ensemencée à part dans un milieu liquide. Les tubes ensemencés seront incubés 18 à 24h à 30°C. La purification des souches se fait par des passages successifs et alternés en milieu liquide, puis en milieu solide jusqu'à l'obtention au sein d'une boîte de pétri de colonies identiques par l'aspect et la couleur. La pureté des souches sera confirmée par la coloration de Gram avant l'étape de conservation.

3.6. La conservation :

Les souches isolées dans des tubes à essai contenant un milieu GN inclinée (annexe2)...Les souches sont ensemencées sur la pente des tubes par les méthodes des stries serrées, puis incubées à 30°C pendant 24 heures. Les tubes dans lesquels il y a une croissance seront conservés à 4°C pour une durée de 4 à 6 semaines à fin de pouvoir toujours disposer des souches viables.

3.7. Caractérisation des isolats purifiés

3.7.1. Etude morphologique

A. Aspect macroscopique

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification. (15)

Les éléments d'identifications macroscopiques sont :

- **La forme des colonies** : rondes, irrégulières,... etc.
- **La taille des colonies par la mesure du diamètre** : punctiformes ou plus
- **La chromogénèse** : couleur de la colonie. et celle de la gélose (pigments diffusibles)
- **L'élévation** : convexe, concave, plate.
- **L'opacité** : opaque, translucide ou transparente.
- **La surface** : lisse, rugueuse, sèche, dentelée,... etc.

B. Aspect microscopique

❖ L'état frais

Ce test permet de mettre en évidence la **mobilité, mode de groupement et la morphologie** des bactéries. L'observation se fait au microscope photonique. (**Annexe2**). (26).

❖ Coloration au bleu de méthylène

La coloration au bleu de méthylène peut apporter des informations concernant la morphologie des germes. (**Annexe2**). (26)

❖ Coloration de Gram

C'est une double coloration qui nous permet de connaître la forme, l'arrangement, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées. Cette coloration est réalisée systématiquement sur les différentes colonies purifiées pour préciser le caractère Gram+ ou Gram-. Avec cette coloration double, les bactéries Gram positive apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries Gram négatives sont colorées en rose ou en rouge. (**Annexe2**)

❖ Recherche de spores

La coloration au vert de malachite permet l'observation de la morphologie cellulaire et la présence ou l'absence des spores. (**Annexe2**).

4. La sélection des souches productrices des biosurfactants

4.1. Test d'émulsification

C'est un test qualitatif qui permet de vérifier la capacité des souches à émulsionner une phase hydrophobe (kérosène ou pétrole) dans une phase hydrophile (milieu de culture liquide) donc d'estimer la production ou non de biosurfactant par les isolats.

Ce test consiste à colorer le kérosène avec un colorant rouge (soluble dans l'huile, oil-red-O) à fin de distinguer les deux phases : kérosène et bouillonensemencé. Dans un tube à essai, 4 ml de kérosène coloré sont ajoutés à 4 ml de bouillonensemencé. Le mélange obtenu est agité au vortex pendant 2 minutes à la vitesse maximale, puis laissé au repos pendant 24 heures de temps. La qualité d'émulsion est estimée à l'œil nue par comparaison à un témoin ou le bouillon est remplacé par de l'eau distillée.

On applique le même principe de ce test au lieu de kérosène on ajoute le pétrole brut.

On a fait une deuxième répétition de ce test, suivie par des modifications. Dans des tubes contenant 4 ml de bouillonensemencé on rajoute 1% de pétrole et on les incube dans un agitateur à 30°C pendant 7jours.

Le même test était réalisé en utilisant le pétrole brut à la place du kérosène.

Un deuxième essai consiste à incuber les bouillons des isolats en présence de 1% de pétrole brut sous agitation pendant une semaine afin de favoriser la production de biosurfactants. Le test d'émulsification est ensuite réalisé.

4.2. Index d'émulsion E24

Après l'estimation de l'activité d'émulsification, on procède au calculer l'indice d'émulsion E24 qui représente le rapport de la hauteur de l'émulsion formée (h_e) sur la hauteur (h_t) du mélange, multiplié par 100

$$\mathbf{E24 = (H_e / H_t) .100}$$

4.3. Test de déplacement d'huile

Dans une boîte de pétri de 10 cm de diamètre, 20ml d'eau distillée sont déposés, puis une quantité de 10µl de pétrole est rajoutée à l'aide d'une micropipette, sur la surface de l'eau. 10 µl de la suspension bactérienne sont déposés au centre délicatement. En dernier lieu, le diamètre des zones claires est mesuré.

4.4. Test de parafilm M

Le test de parafilm est utilisé comme un essai préliminaire pour la détection de la production des biosurfactants.

On prélève 25 µl à partir du surnageant bactériens et on le dépose à l'aide d'une micropipette sur la surface hydrophobe du parafilm.

5. Tests biochimiques

5.1. L'étude de métabolisme respiratoire

Les tests effectués pour étudier le métabolisme respiratoire sont :

Recherche de la catalase, recherche d'enzyme oxydase et la recherche du type respiratoire sur milieu VF (viande-fois).

a. Test de catalase

Une ou deux gouttes d'eau oxygénée à 10 volumes sont déposées sur une lame en verre.

Prélever à l'aide de l'effilure d'une pipette pasteur un fragment de colonie et dissocié la culture dans l'eau oxygénée. On fait la lecture immédiatement.

➤ Lecture

- Catalase⁺ : effervescence
- Catalase⁻ : pas d'effervescence

b. Recherche de l'oxydase :

On utilise ce Test pour la détection de l'enzyme cytochrome oxydase chez les bactéries Gram négative qui produisent cette enzyme.

A l'aide de pinces placer un disque dans une boîte de pétri. Choisir une colonie bien isolée et représentative de la culture fraîche à tester. Prélever la colonie choisie à l'aide d'une öse. Ne pas utiliser d'öse de métal (à l'exception du platine). Frotter doucement la colonie sur le disque et observer l'apparition d'une coloration violette dans un délai de 30 secondes.

➤ Lecture

Oxydase + : couleur mauve

Oxydase - : absence de la couleur mauve

c. Type respiratoire

Le milieu utilisé est la gélose VF (viande-fois), coulée dans des tubes et étroits. L'effilure d'une pipette pasteur stérilisée par flambage, est plongée dans une suspension de la bactérie à étudier. L'inoculum est transporté dans le fond du tube puis on remonte la pipette en décrivant des tours de spires très serrés en prenant soin de ne pas aérer le milieu. L'incubation se fait à 37°C durant 4 jours.

➤ **Lecture**

Après incubation, on peut reconnaître quatre types respiratoires :

- Bactéries aérobies strictes : croissance uniquement dans la zone superficielle de la gélose.
- Bactéries anaérobies strictes : croissance uniquement dans la zone profonde de la gélose.
- Bactéries aéro-anaérobie facultatives : croissance sur toute la hauteur de la gélose.

5.2. Le métabolisme glucidique

Le métabolisme des glucides est aperçu par l'utilisation de milieux de culture contenant l'un des glucides comme source de carbone et d'énergie. Les milieux utilisés sont respectivement : gélose à l'amidon, bouillon Clark et Lubs pour l'étude des dérivés d'acide pyruvique.

a. Utilisation de l'amidon

Le milieu utilisé contient 1% d'amidon. La gélose à l'amidon estensemencée par les stries à partir du bouillon de la souche à étudier. Elle est ensuite incubée à 30°C, durant 5 jours.

➤ **Lecture**

L'hydrolyse de l'amidon s'exprime par un éclaircissement autour de chaque colonie, une observation nette est obtenue par l'inondation de la surface de gélose avec du lugol :

- Zone claire jaunâtre autour des colonies amylase : bactéries amylase (+)
- Persistance de la couleur du Lugol autour des colonies : bactérie amylase (-).

b. Utilisation du lactose et du saccharose, fermentation du glucose et la production d'H₂S (gélose TSI) :

Le TSI c'est une gélose inclinée utilisée généralement pour l'identification des Entérobactéries. On ensemence le culot par une piqure centrale et la pente par une ou plusieurs stries longitudinales pour avoir une culture abondante. Incubation pendant 24 heures à 30°C.

➤ **Lecture**

- Pente jaune : lactose et saccharose +
- Pente rouge : lactose et saccharose-
- Culot jaune : glucose+ ou aéro-anaérobie.
- Culot rouge : glucose- ou aérobie stricte.
- Présence d'un précipité noir : production d'H₂S dans la région joignant la pente au culot.
- Production de gaz : bulles dans la gélose ou décollement de celle-ci.

c. Réaction de voges-proskauer (VP)

Elle permet de déceler dans la présence d'acétylméthylcarbinol (AMC) ou acétoine, métabolite intermédiaire de la fermentation butane diolique.

Après l'incubation du milieu Clark et Lubs pendant 24h ensemencé à partir de la culture à étudier, ajouter 3 gouttes de VP1 et VP2 agiter énergiquement et laisser 10 minutes à température ambiante.

➤ **Lecture**

- VP + : virage de couleur vers le rose ou rouge.
- VP- : aucun virage de couleur.

d. Test au rouge de méthyle (RM)

Ensemencer le bouillon et incuber pendant 24h à 30°C. Après incubation on ajoute deux gouttes de RM et observer.

➤ **Lecture**

- RM+ : coloration du milieu en rouge
- RM- : pas de coloration du milieu

5.3. Le métabolisme protéique

a. Production d'indole

Ce test est effectué en utilisant l'eau peptonée exempte d'indole. Le milieu est inoculé par la souche à tester incubé pendant 24 heures puis additionné de quelques gouttes de réactif de Kovacs.

➤ **Lecture**

- Après agitation :
- Anneau rouge en surface : indole positif.
- Anneau brunâtre (couleur de milieu) : indole négatif

5.4. Recherche des staphylocoques

La gélose Baird Parker est le milieu sélectif des *Staphylococcus aureus*. Milieu semi-synthétique, permettant la détection et la numération directe des staphylocoques pathogènes. Additionné de tellurite de potassium et de jaune d'œuf, ce milieu permet de mettre en évidence deux caractères chez la *Staphylococcus aureus* ; la réduction de tellurite en tellure noir et la lécithinase.

1. Caractérisation du sol

La caractérisation physico-chimique des échantillons de sol pollué par le pétrole prélevés à différentes distances de 1 mètre, 5 mètres et près de la végétation à proximité des bacs est réalisée

Ce tableau nous montre que la couleur et la texture diffèrent d'un échantillon à un autre par contre ont un pH proche de la neutralité

Tableau3 : Caractéristiques physico-chimique des échantillons de sol.

Echantillon		pH	couleur	Texture
S116	(1m)	6,58	noire	Agrégats
	(5m)	6,99	claire Marron	Agrégats
	(PV)	6,90	jaunâtre	Agrégats
S122	(1m)	6,62	foncé Marron	Agrégats
	(5m)	7,12	claire Marron	Agrégats
	(PV)	6,25	jaunâtre	Agrégats
S125	(1m)	7,30	foncé Marron	Agrégats
	(5m)	7,18	claire Marron	Agrégats
	(PV)	6,80	jaunâtre	Agrégats

Les échantillons de sol prélevés à différentes distances du bac de stockage de pétrole brut, contiennent probablement des concentrations différentes de pétrole logiquement, plus on s'approche du bac, plus l'échantillon sera saturé par le pétrole, chose qui explique la différence de couleur et de texture de nos échantillons et la diminution de populations microbiennes.

2. Dénombrement des bactéries sur milieu solide

Après 24heures d'incubation on obtient les résultats suivants :

Tableau4 : Dénombrement des colonies sur la gélose nutritive à trois distances du bac de stockage S116.

Echantillons	SM	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
--------------	----	-----------	-----------	-----------	-----------

S116 (1m)	Tapis bactériens	Tapis bactériens	96	44	22
S116 (5m)	Tapis bactériens	Tapis bactériens	73	36	19
S116(P V)	Tapis bactériens	102	55	28	7

$$N = \frac{C}{V(n_1 + 0,1n_2)} \times \frac{1}{D}$$

Sachant que :

C : somme des colonies comptées sur les boites

V : volume de l'inoculum

D : la dilution la plus faible

Exemple de calcul :

$$N_{1m} = \frac{162}{1[22+0,1(96)]} \times \frac{1}{10^{-4}} = 5,12 \times 10^4 \text{ UFC/ml}$$

Les résultats obtenus de notre dénombrement montrent une charge microbienne importante selon les trois distances 1m, 5m et PV. Plus on s'éloignant du bac de pétrole brut plus la charge microbienne diminue.

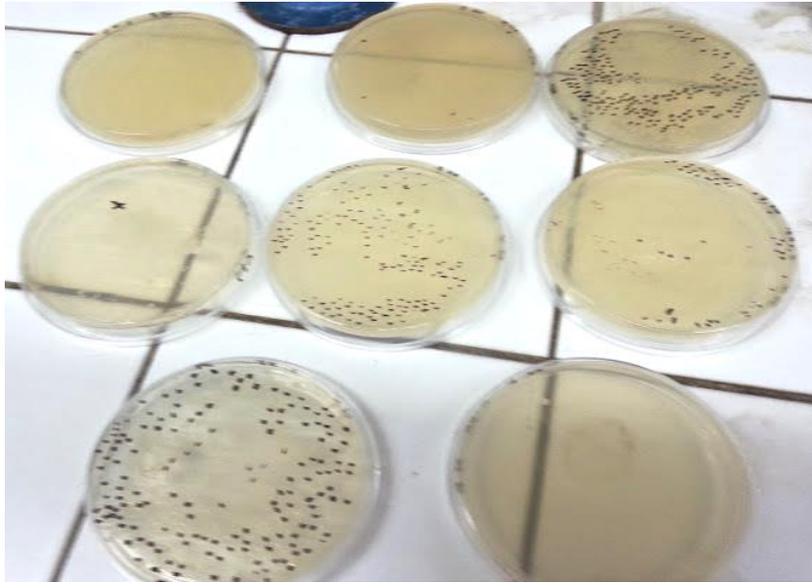


Figure5 : Dénombrement sur la Gélose nutritive.

3. Isolement et purification des souches

La croissance des isolats issus des échantillons sur le milieu de culture M2 contenant le pétrole comme seule source de carbone indique la capacité des isolats à métaboliser ce dernier ainsi que ces dérivés. Certaines bactéries ont besoin de la présence d'un autre composé organique pour un métabolisme efficace []. L'utilisation de milieu M2 contenant le pétrole permet une croissance rapide et abondante de nos isolats après 24h d'incubation.

4. Caractérisation morphologique des isolats

a. Etude macroscopique

Tableau 5 : Résultats de l'étude macroscopique des colonies isolées.

Critères	Taille	Forme	Couleur	Conteur	Opacité	Surface	Consistance
souches							
WS 2	grande	irrégulière	transparente	ondulé	translucide	Sèche	crémeuse
WS 3	moyenne	filamenteuse	blanche	régulier	opaque	rugueuse	crémeuse
WS 4	moyenne	circulaire	rose	régulier	opaque	lisse	crémeuse
WS 5	petite	circulaire	blanche	régulier	opaque	lisse	crémeuse
WS 7	moyenne	circulaire	blanche	régulier	translucide	lisse	crémeuse
WS 8	grande	régulière	transparente	régulier	translucide	lisse	crémeuse
WS 9	grande	fusiforme	transparente	régulier	translucide	lisse	crémeuse
WS 10	moyenne	circulaire	blanche	régulier	translucide	lisse	crémeuse
WS 11	petite	circulaire	blanche	régulier	opaque	lisse	crémeuse
WS 12	grande	circulaire	blanche	régulier	translucide	lisse	crémeuse
WS 14	moyenne	régulière	transparente	régulier	opaque	lisse	crémeuse
WS 15	petite	circulaire	transparente	régulier	translucide	lisse	crémeuse
WS 16	grande	irrégulière	blanche	régulier	translucide	lisse	crémeuse
WS 17	petite	régulière	blanche	régulier	opaque	lisse	crémeuse
WS 18	petite	circulaire	blanche	régulier	opaque	lisse	crémeuse
WS 19	petite	circulaire	blanche	régulier	opaque	lisse	crémeuse
WS 20	grande	circulaire	blanche	régulier	translucide	lisse	crémeuse
WS 21	moyenne	circulaire	blanche	régulier	opaque	lisse	crémeuse
WS 22	grande	irrégulière	transparente	régulier	opaque	lisse	crémeuse

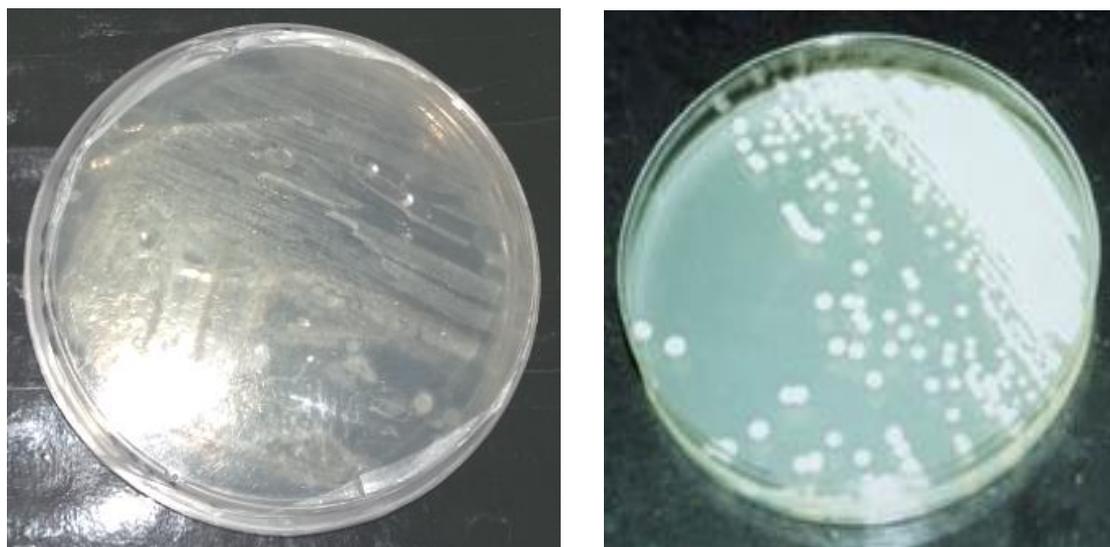


Figure6 : L'aspect macroscopique de deux isolats.

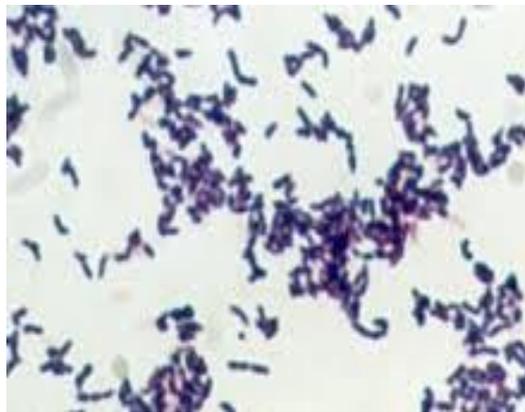
b. Etude microscopique

Tableau6 : Résultats de l'étude microscopique des souches isolées

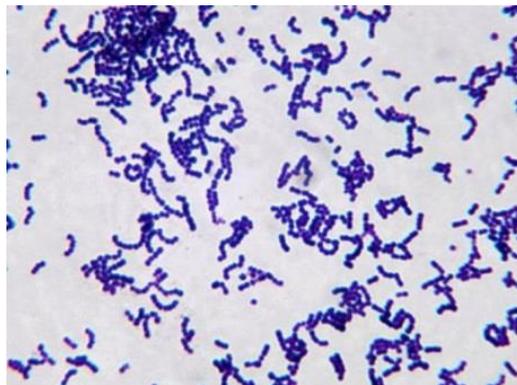
Critères	Coloration de Gram		Présence des spores
	Gram	Forme des cellules	
WS2	+	bacille	+
WS3	+	bacille	-
WS4	-	bacille	-
WS5	-	bacille	-
WS7	-	bacille	-
WS8	-	bacille	-
WS9	-	Cocco-bacille	-
WS10	+	bacille	-
WS11	-	bacille	-
WS12	+	bacille	+
WS14	+	bacille	-
WS15	+	bacille	+
WS16	-	bacille	-
WS17	-	bacille	-
WS18	+	bacille	-
WS19	+	bacille	-
WS20	-	Cocco-bacille	-
WS21	+	Cocci	-
WS22	+	bacille	+



a :bacille Gram -



b :bacille Gram+



c : Cocci Gram+

Figure7 : a, b, c, L'aspect microscopique des isolats après coloration de Gram (G x 100).

5. la sélection des souches productrices des biosurfactants

5.1. Test d'émulsification

La réalisation de test d'émulsification nous a permis d'estimer la production des biosurfactants par les bactéries isolées. L'utilisation de plusieurs hydrocarbures permet de comparer cette production.



Figure8 : la réalisation de test d'émulsification.

Tableau7 : Indice d'émulsion pour le pétrole et le kérosène à différents temps d'incubation

souches	Indice d'émulsion après 24 heures (pétrole)	Indice d'émulsion après 24 heures (kérosène)	Indice d'émulsion après 7jrs (Kérosène)
W S 2	0	26,19	24,90
W S 3	0	0	54,76
WS 4	14,28	52,38	0
WS 5	52,38	66,66	72,14
WS 7	2,38	52,38	43,95
WS 8	19,04	50	51,40
WS 9	14,28	0	0
WS 10	7,14	0	7,14
WS 11	0	69,04	69,09
WS 12	28,57	38,09	64,28
WS 14	11,90	47,61	51,03
WS 15	14,28	0	9,52
WS 16	9,52	33,33	61,90
WS 17	4,76	52,38	54,76
WS 18	45,23	0	4,76
WS 19	0	21,42	37,45
WS 20	11,90	0	11,90
WS 21	19,04	9,52	11,90
WS 22	0	7,14	0
témoin	2,52	0	0

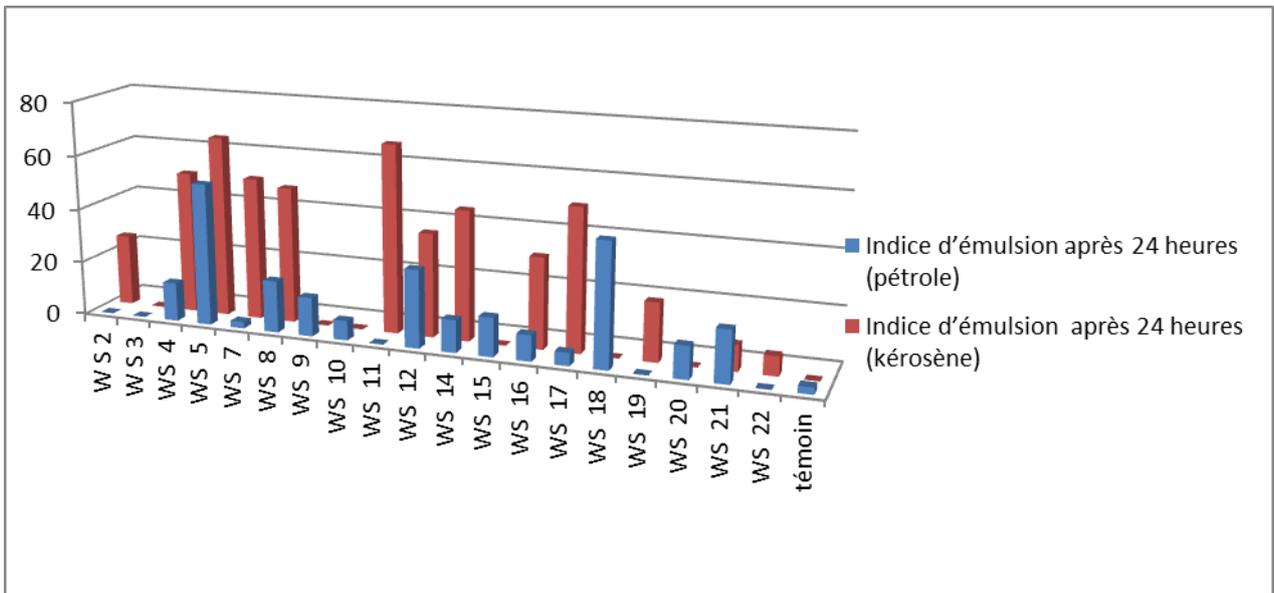


Figure 9 : Histogramme représente l'estimation d'émulsion par E24 pour le pétrole et le kérosène.

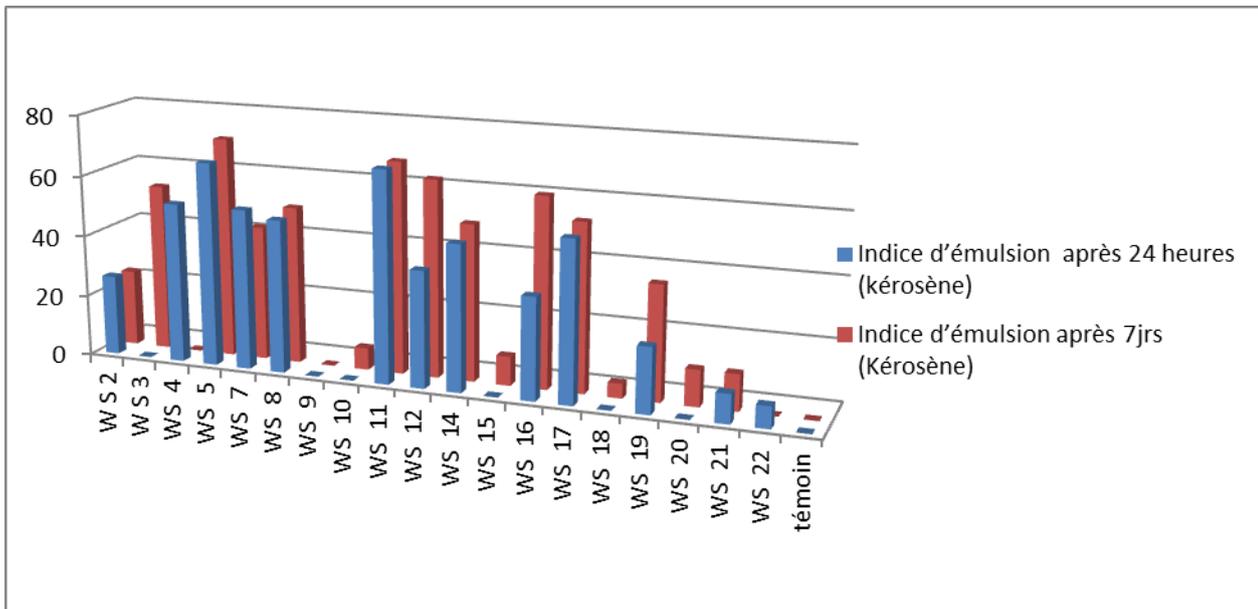


Figure 10: Histogramme représente l'estimation de la qualité d'émulsion par E24 après 24h et 7jrs (kérosène)

Il est à constater sur le premier histogramme que le taux de production de biosurfactants est nettement supérieur lorsqu'on utilise le kérosène au lieu du pétrole. Ceci peut-être dû à la structure du dérivé qui est moins complexe donc facilement assimilable que celle du pétrole brut.

Le deuxième histogramme montre que si le temps d'incubation augmente l'indice d'émulsion augmente, on parle ici de l'influence de temps d'incubation sur la production des biosurfactants.

D'après les résultats obtenus, les souches à Gram+ sont plus émulsifiantes que les souches à Gram- donc les plus productrices des biosurfactants avec un taux de 45,23 de la souche WS18, contrairement aux résultats concernant le Kérosène montre que les souches à Gram- sont les plus émulsifiantes avec un taux 69,04 de la souche WS11.

Ces résultats peuvent être comparés aux résultats obtenus par Guregouri Len 2010. Qui a trouvé un indice $E_{24}=63$ de la souche C (bactérie à Gram négatif) correspondante à la souche la plus productrice des biosurfactants. Donc le taux de biodégradation des hydrocarbures est différent d'un groupe bactérien à un autre.

5.2. Test de parafilm

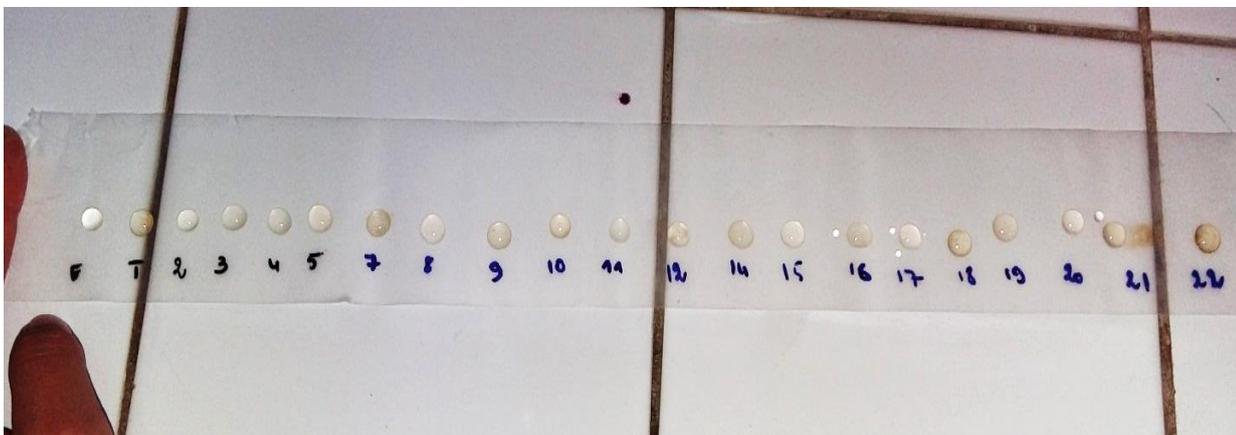


Figure11 : Effondrement des gouttelettes lors du test de parafilm M.

Les résultats du test de parafilm montrent que les diamètres des gouttelettes obtenus (après effondrement sur papier parafilm par comparaison à une goutte de bouillon nutritif stérile et d'eau comme témoins stables) s'échelonnent entre 7,2 et 8,7 mm pour la souche WS 17 et la souche WS 19. Ce résultat nous a permis de dire que parmi les résultats les souches testés nous a permis de dire que la souche WS19 est la plus productrice de biosurfactants. Nos résultats sont comparables avec celles apportés par Sari et al (2014) qui enregistre des valeurs de diamètres allant de 8 à 10 mm.

Tableau 8: Résultats de test de parafilm.

Souches	Résultat	Le diamètre (mm)
Témoin	-	6,3 mm
Eau	-	6 mm
WS2	+	7,3 mm
WS3	+++	8,2 mm
WS4	++	7,6 mm
WS5	++	7,9 mm
WS7	+	7,4 mm
WS8	+++	8,3 mm
WS9	+++	8,3 mm
WS10	-	6,5 mm
WS11	-	6,7 mm
WS12	++	7,7 mm
WS14	+++	8,3 mm
WS15	+++	8,1 mm
WS16	+++	8,3 mm
WS17	+	7,2 mm
WS18	+	7,4 mm
WS19	+++	8,7 mm
WS20	++	7,5 mm
WS21	++	7,5 mm
WS22	+++	8,5 mm

5.3. Test de déplacement d'huile

Les résultats obtenus montrent que les surnageants de la plus part des souches ont généré des zones de déplacement d'huile comme indication de la production de biosurfactant.

Les résultats du test déplacement d'huile montrent que les diamètres obtenus varient de 3 à 17 mm, la souche WS2 présente le diamètre le plus élevé, ce qui nous a permis de dire que c'est la souche la plus productrice de biosurfactant.

Nos résultats sont relativement différents à ceux apportés par Sari et al (2014) qui a trouvé des valeurs de diamètre allant de 45 à 75 mm.

Tableau9 : Résultats de test de déplacement d'huile.

souches	Résultats	Les diamètres (mm)
WS 2	+++	17
WS 3	-	0
WS 4	-	0
WS 5	+	4.85
WS 7	-	0
WS 8	+++	10.12
WS 9	+	3
WS 10	+	4.1
WS11	++	6.5
WS12	+	4.6
WS14	+	4.5
WS15	+	4.5
WS16	++	7.5
WS17	++	7
WS18	+	5.5
WS19	+++	16.5
WS20	++	6.8
WS21	+	5.9
WS22	+	5.2

6. Tests biochimique :

Les résultats des tests biochimiques sont regroupés dans le tableau 10

Tableau10 : Résultats des tests biochimiques

souches	Métabolisme respiratoire			Métabolisme glucidique						Métabolisme protéique (indole)	Recherche des staphylococcus
	Catalase	oxydase	Type respiratoire	amidon	lactose	glucose	H ₂ S	VP	RM		
Bacille Gram+											
WS2	+	+	AAF	-	+	-	-	-	+	-	-
WS3	+	+	AAF	+	+	-	-	-	+	-	-
WS10	+	+	AAF	+	+	+	-	-	+	-	-
WS12	+	+	AS	+	+	+	-	-	+	-	-
WS14	+	+	AAF	+	+	+	-	-	+	-	-
WS15	-	+	AS	+	+	+	-	-	+	-	-
WS18	+	+	AS	+	+	+	-	-	+	-	-
WS19	+	+	AAF	+	+	+	-	-	+	-	-
WS22	+	+	AS	+	+	+	-	-	+	-	-

Bacille Gram-											
WS4	+	+	AAF	+	+	-	-	-	+	-	-
WS5	+	+	AAF	-	-	-	-	-	+	-	-
WS7	+	+	AAF	-	-	-	-	-	+	-	-
WS8	-	+	AS	-	-	-	-	-	+	-	-
WS9	-	+	AAF	-	-	-	-	-	+	-	-
WS11	+	+	AAF	-	-	-	-	-	+	-	-
WS16	+	+	AAF	-	+	-	-	-	+	-	-
WS17	+	-	AAF	+	+	+	-	-	+	-	-
WS20	+	+	AAF	+	+	+	-	-	+	-	-
Cocci Gram +											
WS21	+	-	AAF	+	+	+	-	-	+	-	+

6.1. Etude de métabolisme respiratoire

a. Test de catalase

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

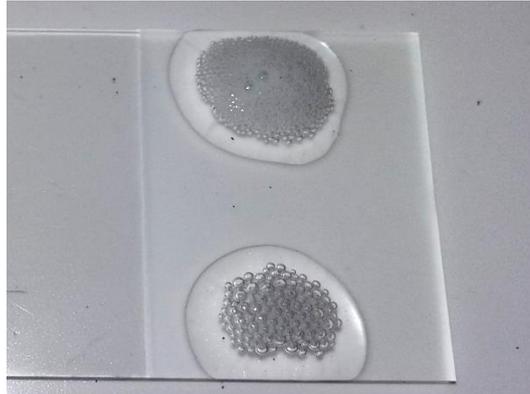
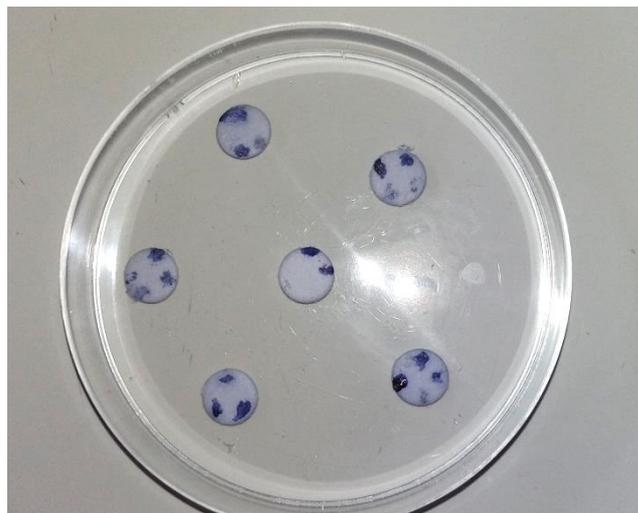


Figure12 : Résultat positif pour le test catalase.

b. Test de la recherche de l'oxydase



Figure&13 : résultat pour le test d'oxydase

Ces taches violettes indiquent que la souche possède l'oxydase.

c. Type respiratoire

Les résultats obtenus sur le milieu VF montrent que les isolats (WS5, WS8, WS9, WS11 et WS16) se développent uniquement dans la partie supérieure du milieu dans les tubes, ce sont des bactéries aérobies strictes. Les autres isolats (WS2, WS3, WS4, WS7, WS10, WS12, WS14, WS15, WS17, WS18, WS19, WS20, WS21 et WS22) peuvent croître tout au long du milieu, il s'agit donc de bactéries aérobies-anaérobies facultatives.

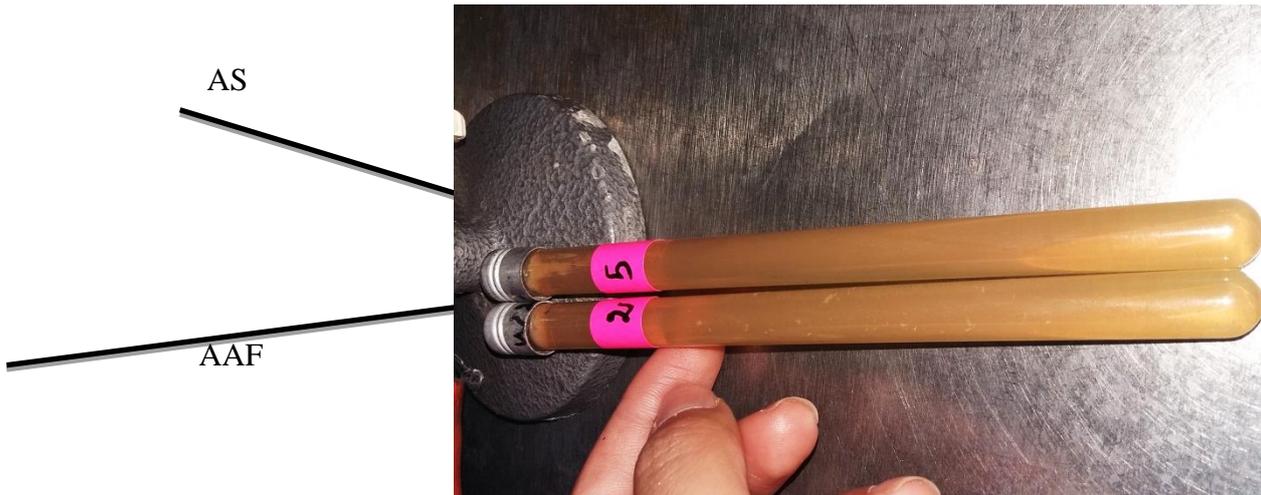


Figure 14 : Les différents résultats de type respiratoire.

6.2. Métabolisme glucidique

a. Utilisation de l'amidon

L'amidon est un glucide complexe dont la dégradation nécessite une amylase présente chez les isolats (WS3, WS4, WS10, WS12, WS14, WS15, WS17, WS18, WS19, WS20, WS21 et WS22) cependant les autres isolats (WS2, WS5, WS7, WS8, WS9, WS11 et WS16) sont incapables d'utiliser ce polymère.

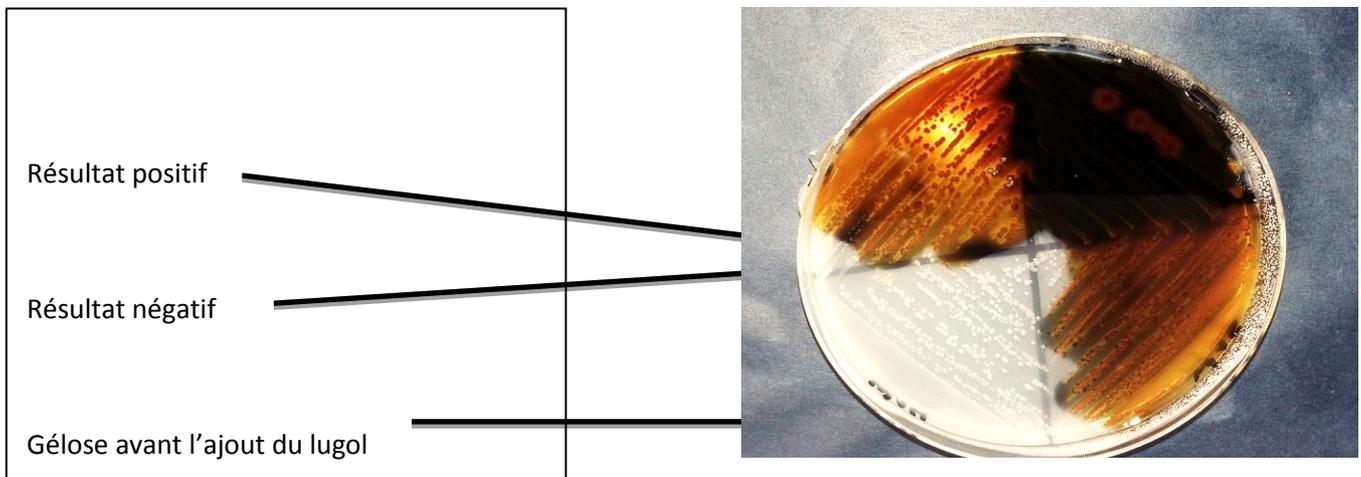


Figure 15 : Les différents résultats de test de l'amidon.

b. Utilisation du lactose, fermentation du glucose, production d'H₂S

D'après les résultats obtenus nous remarquons que le lactose est utilisé par 14 souches : (WS2, WS3, WS4, WS10, WS12, WS14, WS15, WS16, WS17, WS18, WS19, WS20, WS21, WS22), par contre le glucose est fermenté par 10 souches : (WS10, WS12, WS14, WS15, WS17, WS18, WS19, WS20, WS21, WS22). Tandis que l'absence de production de gaz et H₂S chez toutes les isolats.



Figure 16 : Test de TSI.

C. Test de VP et RM

Ces tests permettent de mettre en évidence la fermentation butylique glycolique et la fermentation de l'acide mixte. Tous nos isolats sont (RM+ et VP-), donc ils provoquent une forte acidification du milieu, et absence de catalysation.



Figure 17 : résultats de test RM et VP

6.3. Métabolisme protéique

Production d'indole

D'après nos résultats tous les isolats ne donnent pas des molécules d'indole, donc ne désaminent et n'hydrolysent pas le tryptophane.

6.4. Recherche des *Staphylococcus*

La formation des colonies noire sur la gélose Baird Parker indique la présence des staphylococcus.

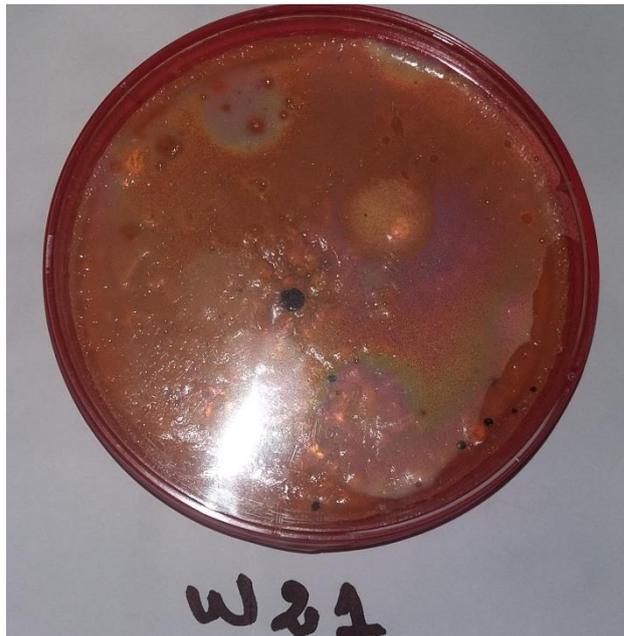
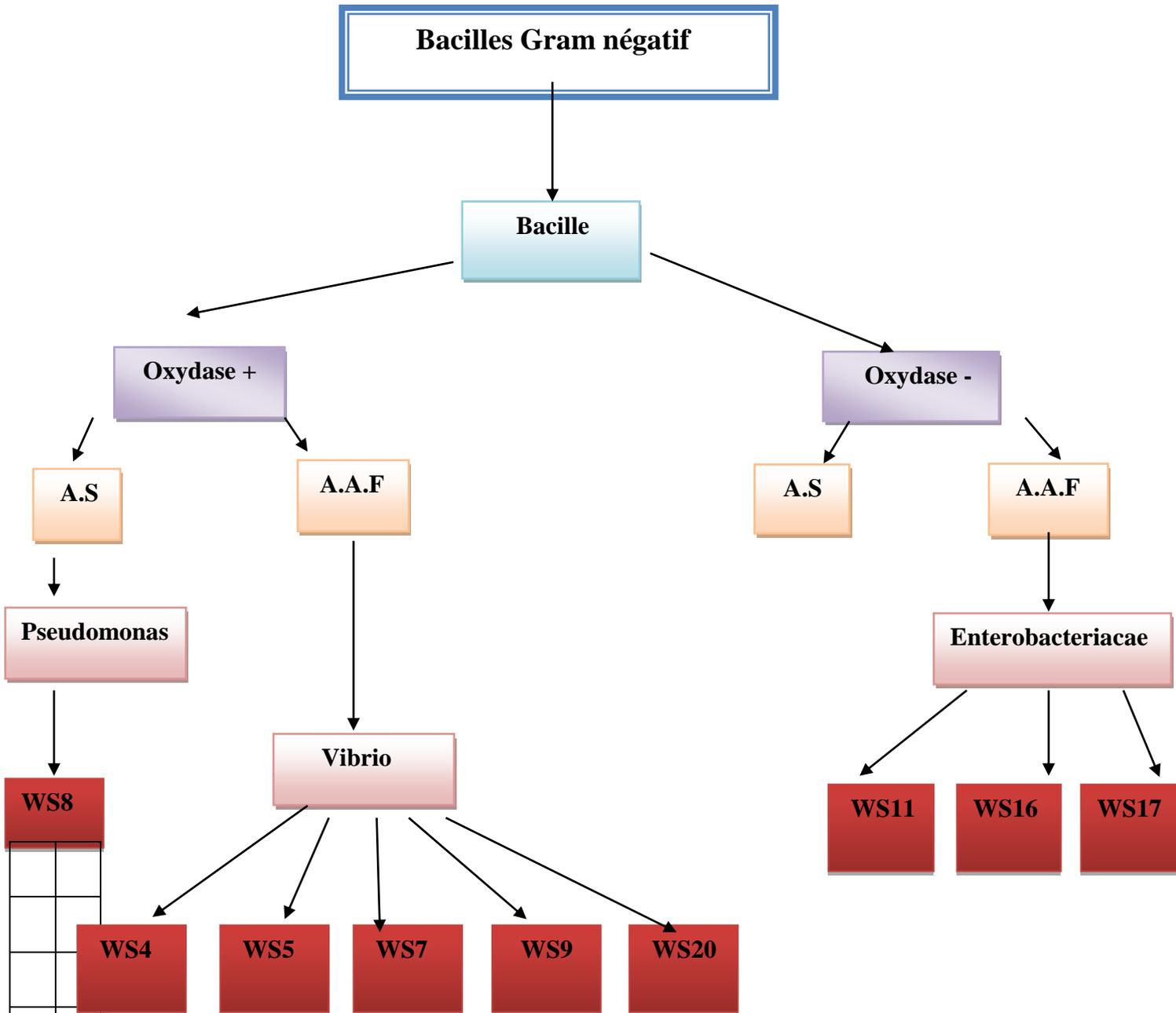
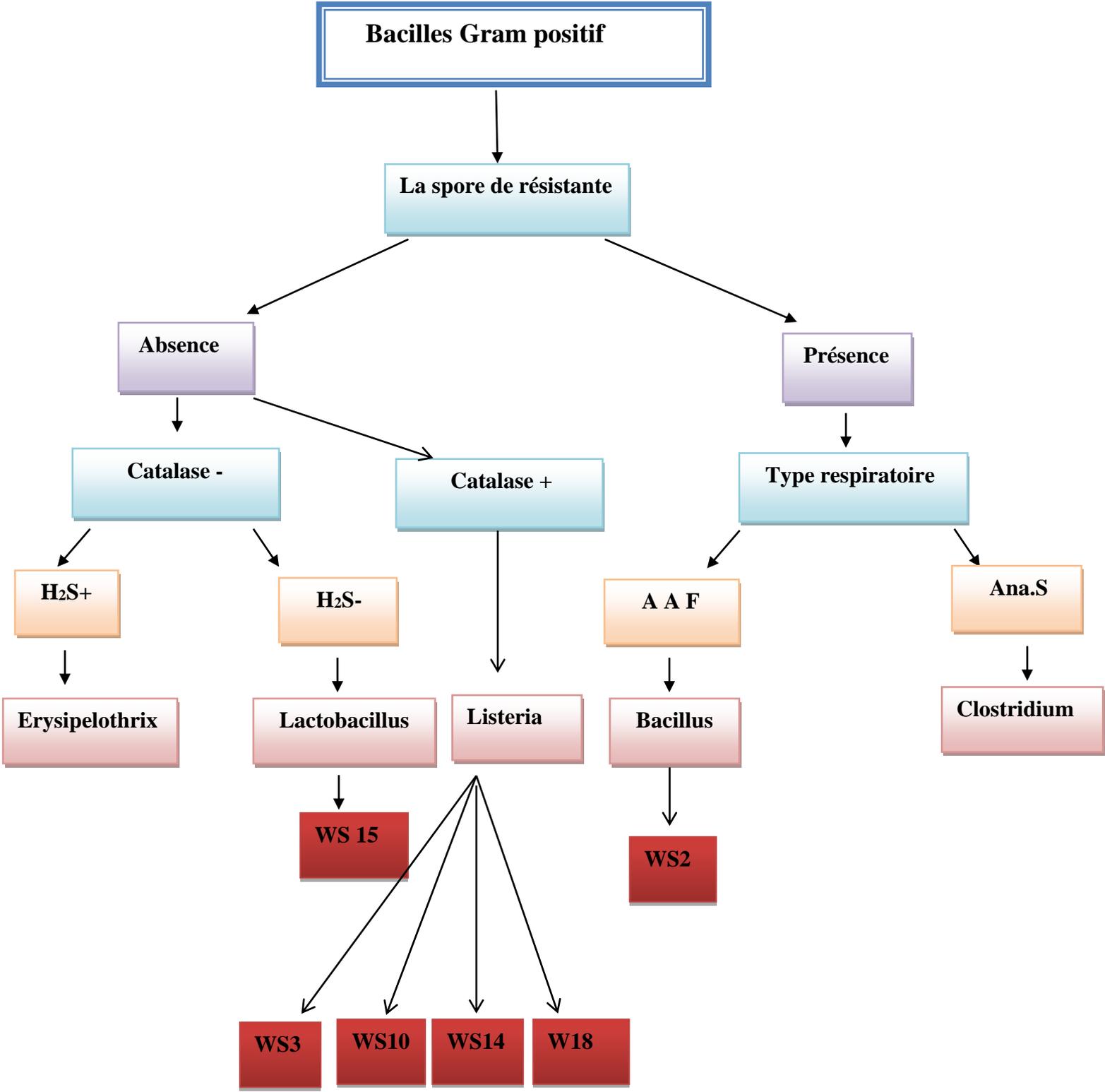


Figure 18 : Les *Staphylococcus* sur le Baird Parker.

7. Clés dichotomiques pour une orientation présumée vers les genres





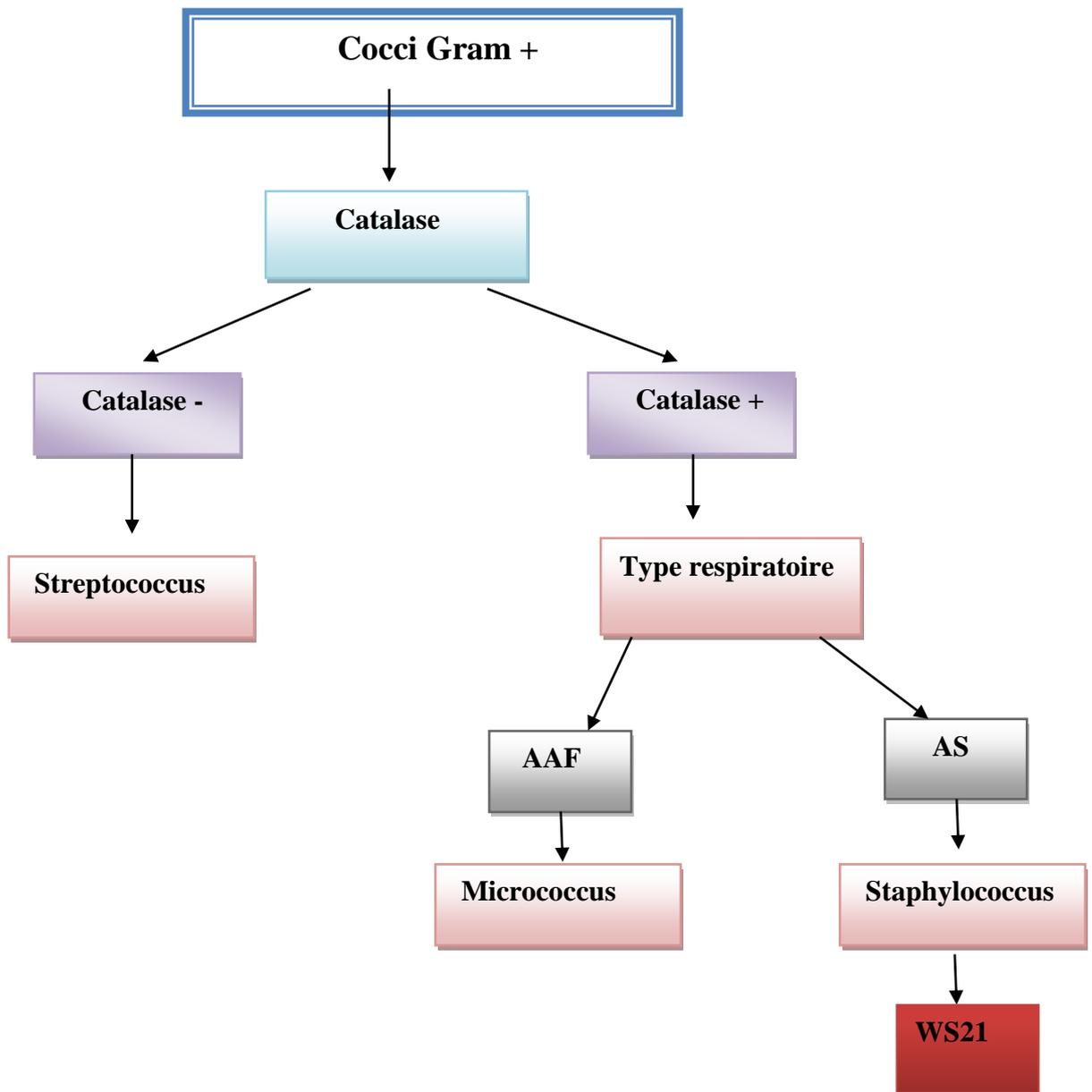


Tableau11 : Les différents genres bactériens suspectés.

Gram	souches	Genre suspecté
Bacille Gram+	WS2	<i>Bacillus.sp</i>
	WS3	<i>Listeria.sp</i>
	WS10	<i>Listeria.sp</i>
	WS12	<i>Bacillus.sp</i>
	WS14	<i>Listeria.sp</i>
	WS15	<i>Lactobacillus.sp</i>
	WS18	<i>Listeria.sp</i>
	WS19	<i>Listeria.sp</i>
Bacille Gram -	WS4	<i>Vibrio.sp</i>
	WS5	<i>Vibrio.sp</i>
	WS7	<i>Vibrio.sp</i>
	WS8	<i>Pseudomonas.sp</i>
	WS9	<i>Vibrio.sp</i>
	WS11	<i>Enterobacter.sp</i>
	WS16	<i>Enterobacter.sp</i>
	WS17	<i>Enterobacter.sp</i>
	WS20	<i>Vibrio.sp</i>
Cocci Gram+	WS21	<i>Staphylococcus.sp</i>

D'après ces clés dichotomiques on suspecte l'appartenance de nos Isolats aux genres suivants :

Bacillus.sp, Enterobacter.sp, Pseudomonas.sp, Vibrio.sp, Listeria.sp, Staphylococcus.sp.

Ces résultats concordent avec les résultats obtenus avec Gurgouri.I en 2010, qui a montré que parmi les souches testées elle présume ces différents genres : *Pseudomonas.sp, Bacillus.sp, Enterobacter.sp.*

Conclusion :

Les sols contaminés par le pétrole brut permettent aux différents microorganismes de dégrader les hydrocarbures de vivre. Ces derniers peuvent accélérer la biodégradation des produits la production de substances dénommées bactéries hydrocarbonoclastes.

De nombreux genres bactériens qui augmentent l'accessibilité des hydrocarbures et facilite leur dégradation ont été isolées à partir des échantillons de sols prélevés de différents endroits autour des bacs de stockage au niveau de la raffinerie de Skikda.

Les résultats d'isolement bactériens de sol contaminés, nous ont permis d'isoler dix-neuf souches bactériennes. En se basant sur leurs caractères microscopiques (dix souches à Gram+ et neuf souches à Gram-), macroscopique et biochimique.

La réalisation des tests de détection des biosurfactants inclue le test d'émulsification qui nous permet de détecter la souche WS 11 ainsi le test de parafilm la souche WS19 et le test de déplacement d'huile la souche WS2. Sont les plus productrices des biomolécules ayant de propriété tension actives.

La caractérisation phénotypique de nos isolats permis de différencier ces genres bactériens :

Enterobacteriaceae, Pseudomonas, Bacillus, Staphylococcus, Listeria et Vibrio.

Les genres bactériens isolés et identifiés peuvent être exploités, utilisés dans la remédiation des zones polluées par les hydrocarbures et dans la production des biosurfactants qui représentent des substances intéressantes dans différentes applications.

Annexes

Annexe 1 : composition des milieux de cultures

➤ Milieu de dénombrement et de conservation :

Gélose nutritive

-Extrait de viande	1g
-Extrait de levure	3g
-Peptone	5g
-NaCl	5g
-Glucose	10g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH=7.4

➤ Milieu M2 (Margaritis et al., 1979)

-NH ₄ CL	2g
-KCL	0.1g
-K ₂ HPO ₄	1g
-CaCl	0.01g
-KH ₂ PO ₄	0.5g
-FeSO ₄ 7H ₂ O	0.01g
-MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5g
-Extrait de levure	1g
-Agar	15g
-Eau distillée	1000ml

pH=6.5

➤ **Gélose à l'amidon**

-Peptone	5g
-Amidon	10g
-Agar	20g
-Eau distillée	1000ml

pH=6.8

➤ **Bouillon nutritif**

-Tryptone	10g
-Extrait de viande	5g
-Peptone	5g
-Chlorure de sodium	5g

pH=7.2

➤ **L'eau physiologique**

-Chlorure de sodium	9g
-Eau distillée	1000ml

➤ **Baird Parker**

-Tryptone	10g
-Extrait de bœuf	5g
-Extrait de levure	1g
-Chlorure de lithium	5g
-Glycine	12g
-Pyruvate de sodium	10g
-Tellurite de potassium	0.1g
-Gélose	20g
-Emulsion de jaune d'œuf	

pH=6.8

Annexe2 : Les techniques utilisées

➤ **Coloration de Gram**

Les différentes étapes de cette coloration :

-préparer et fixer un frottis bactérien à la chaleur du bec bunsen.

-coloration par le violet de gentiane. Laisser agir 1 minute. Rincer à l'eau déminéralisée

-Ajouter du lugol (solution d'iode iodo-iodurée) : étaler le lugol et laisser agir 20secondes. Rincer à l'eau déminéralisée. On peut réaliser une deuxième fois l'opération identiquement pour plus de sécurité.

-Décoloration de l'alcool : verser goutte à goutte l'alcool sur la lame, et surveiller la décoloration (5à10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous filet d'eau déminéralisée.

-Recoloration à la fuchsine. Laisse agir de 30secondes à 1 minute. Rinçage à l'eau puis séchage.

-Observer avec une goutte d'huile à immersion, objectif 100(grossissement x100). Les bactéries à Gram positif se colorent en violet alors que les bactéries à Gram négatif se colorent en rose.

➤ **Etat frais**

Déposer une goutte d'une culture en milieu liquide sur une lame de verre.

Recouvrir la goutte d'une lamelle couvre objet (la culture ne doit pas déborder les contours de la lamelle).

Luter la lame avec de la paraffine fondue.

Observer immédiatement au microscope (objectifx40, condenseur non relevé au maximum, diaphragme non complètement ouvert).

➤ **La coloration des spores**

-Réaliser un frottis et le fixer.

-Coloration : recouvrir la lame d'une solution de vert de malachite. Chauffer jusqu'à émission de vapeurs. Laisser refroidir et chauffer à nouveau. L'opération doit durer 10 minutes.

-Epreuve : laver soigneusement

-Contre coloration : recouvrir la lame fuchsine pendant 1 minute

-Laver, sécher entre deux feuilles de papier absorbant

-Observer à l'objectif 100 à immersion

Les spores apparaissent en vert foncés, les sporanges en vert pale et les corps bactériens en rose

➤ **Ph-métrie : pH du sol (iso 10390-AFNOR, 1994)**

But : mesure de pH du sol.

Principe :

Le pH est mesuré dans une suspension de sol dans l'eau (pH eau) et dans laquelle on mesure le pH, c'est-à-dire la concentration en ions H^+ à l'état dissocié dans le liquide surnageant.

Mode opératoire :

-Etalonnage du pH-mètre (suivre les indications propre à chaque appareil).

En principe :

-Sortir les solutions tampon du réfrigérateur suffisamment à l'avance afin qu'elles prennent la température ambiante.

-Mettre en circuit le pH-mètre au moins une demi-heure avant l'emploi.

-Régler le bouton « To » par rapport à la température ambiante.

-Placer le bouton sur « pH »

-Pour les mesures de pH de solution à pH=7.

-Rincer l'électrode à l'eau déminéralisée et essuyer avec du papier absorbant, la plonger dans la solution dans la solution étalon à pH=7. Laisser la lecture se stabiliser et appuyer à l'aide du bouton « pH »

-Respecter ces opérations jusqu'à ce que les lectures pH=7 et pH=4 soient stables. Pour les mesures de pH de solution à pH=7.

-opérer de la même façon avec des solutions étalon à pH=7 et 10.

- ABBIA, S et GUITON, L** .Les méthodes de traitement des sols pollués par les hydrocarbures. Mémoire de licence en Microbiologie appliquée. *Université kasdi merbah-ouargla*.P9.....(1)
- ARBAOUI NASREDDINE et AFFANE Ben Ahmed. (2005)**.Traitement des rejets pétroliers en Algérie. P4.....(2)
- BANAT M., MAKKAR R. S. et CAMEOTRA S. S., (2000)**.Potential commercial applications of microbial surfactants, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53 : 495-508, 816 p (3)
- BOUDRAHAM A. (2011)** Etude de la diversité bactérienne d'un sol pollué aux hydrocarbures.....(4)
- BLIFERT et PERRAUD, (2004)**. Chimie de l'environnement air, eau, sols, déchet. De Boeck université. P (369 ,372-375).....(5)
- DESAI J. D. et BANAT I. M., (1997)**. Microbial production of surfactants and their Commercial potential, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61 (1): 47-64..... (6)
- CHARKABORTY R, Coates J.D.** Anaerobic degradation of monaromatic hydrocarbons. *ApplMicrobialBiotechnol.* 2004. 63: 437-446..... (7)
- EMILIA KOLLER, (2004)**. Traitement des pollutions industrielles : Eau, Air, Déchets, Sols, Boues..... (8)
- GUERGOURI I. (2010)** Caractérisation des bactéries isolées de sol contaminées par les hydrocarbures (zone de Skikda) et productrices des biosurfactants. Thèse de magistère de l'Université Mentouri Constantine. Spécialité : Microbiologie.90p..... (9)
- GHERBAL.A.**Effet de la salinité sur la stabilité des biosurfactants par des souches bactériennestelluréeque en présence de pétrole brut. Mémoire de Master Académique en Microbiologie Appliquée .Université Kasdimrabah.Ourgla.....(10)
- HAMELIN R, LAPRTE J.et PTC A, (2000)** – Environnement et nuisances Edition Clartés. P 157..... (11)
- HADEF H.et SOUKEHAL B. (2004)** Rapport de l'urbanisation et les risques naturels et industriels en Algérie : inquiétudes actuelles et futures. Université de Jijel.13p..... (12)

- HAMBRICK G.A., DELAUNE R.D. et PATRICK W.H.JR., (1980).** Effect of estuarine sediment pH and oxidation-reduction potential on microbial hydrocarbon degradation. *Applied Environmental Microbiology*, 40:365-369..... (13)
- WAUQUIER JP, (1994) , LEPRINCE P., TREMBOUZE P., FAVENNEC J., EDERN Y.,** Le raffinage de pétrole : exploitation des gisements de la raffinerie. Tome 5. Ed technip..... (14)
- JOURDAIN M. et CHARISSOU A. (2007)** devenir des polluants organiques dans les sols lors de la biodégradation naturelles et après biotraitement : Identification des composés métabolites et des cinétique. Edition Record. P : 32-61.....(15)
- MARCHAL R., PEET S., SOLANO-SERENA F. and VANDECASTEELE J.P. (2003)** Gasoline and diesel oil biodegradation. *Oil & Gas Science and technology*. 58: 441-448..... (16)
- JEANNOT.R, LEMIERE.B, CHIRON.S** avec la collaboration de : F. Augustin, D.Darmendrail, (2001)- Guide méthodologique pour analyse des sols pollués (Document du BRGM 298). Editions BRGM.....(17)
- RABBABAH A. and MATSUZAWA S. (2002)** Treatment system for solid matrix contaminated with fluoranthene- Recirculating photodegradation technique. *Chemosphere*. 46: 49-57..... (18)
- RONALD M., TERRY C. HAZEN L. and JOSEPH M. (2011)** Microbes and déversement of petrol. *Rapport of american academy of microbiology*. P: 06-12..... (19)
- SALLE C, DEBYSER J, (1979).** Formation des gisements de pétrole, étude des phénomènes géologiques fondamentaux. Technip,..... (20)
- 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 analytique. P: 45-47..... (21)
- SADOUK Z., H. and TAZAROUTI A. (2008)** Biosurfactants production from low Cost Substrate and degradation of diesel oil by a *Rhodococcus* Strain. *Science and Technology*. 63 : 747-753..... (22)
- TINDALL B.J. (1992)** The family Halobacteriaceae . New York: Springer. P: 768-808.(23)
- Zobell S. (1946)** Microbial degradation of petroleum hydrocarbons an environmental perspective. 108-119..... (24)

Références électroniques:

<https://sites.google.com/site/pollusiond-elenvironnement/les-types-de-pollution>..... (25)

<http://www.microbiologie-medicale.fr/examenmicroscopique/etatfrais.htm>.....(26)

Le **corfecyves** (editiondunod)-sites et sols pollués ; gestion des passifs environnementaux.....(27)

BELMENAI Maha	Date de soutenance
BENHAFED NihedEsm	15/06/2015
<p>Titre : Isolement et caractérisation des bactéries hydrocarbonoclastes.</p>	
<p>Résumé</p> <p>Les sols pollués sont peuplés de microorganismes efficaces dans la dégradation biologique du polluant.</p> <p>Le pétrole représente l'un des polluants récalcitrants qui perturbent la flore autochtone permettant ainsi l'installation de bactéries qui s'adaptent et utilisent cette source de carbone et ou l'un de ces dérivés. L'un des modes d'assimilation est la production de biomolécules appelées biosurfactants présentant un grand nombre d'applications environnementales et industrielles.</p> <p>A ce titre, les objectifs de notre travail sont d'isoler et de caractériser les souches hydrocarbonoclastes productrices de biosurfactant, présentes dans nos échantillons de sols contaminés par le pétrole brut.</p> <p>La méthode d'isolement et d'identification a été mise en œuvre. Elle repose sur un isolement sur un milieu de culture contenant le pétrole brut à 1 %, ce qui nous a permis d'isoler 19 souches productrices de biosurfactants : 10 souches a Gram + et 9 souches a Gram-.</p> <p>La réalisation des tests de détection des bisurfactants inclue : le test d'émulsification, test de parafilm et le test de déplacement d'huile, montrent la capacité de nos isolats à produire les biosurfactants avec une différence d'efficacité.</p> <p>Mot clés : hydrocarbonoclaste, biosurfactans, bacterie, biodégradation</p>	
<p>Laboratoire de recherche : Laboratoire d'Ecologie Microbienne, Département de Biochimie et Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, U.F.M. Constantine.</p>	
<p>Jury d'évaluation :</p> <p>Président du jury : M. BENHAIZIA Yacine Professeur. U.F.M. Constantine</p> <p>Rapporteur : M^{me}. GURGOURI Ibtissem M. A.A. U.F.M. Constantine</p> <p>Examineur : M. BENGUEDOUAR Amar Professeur. U.F.M. Constantine</p>	