



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

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



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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

**Département : Microbiologie**

**قسم : ميكروبيولوجيا**

**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 :

---

**Analyse de la diversité bactérienne d'une boue à base d'huile  
et recherche de bactéries hydrocarbonoclastes**

---

**Présenté et soutenu par : ZEBIRI Ouiem**

**Le : 20/06/2017**

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** Mme Alatou Radia (Maitre de conférences «A» à UFC).

**Rapporteur :** Mme Guergouri Ibtissem (Maitre Assistant «A» à UFC).

**Examineurs :** M Chabbi Rabah (Maitre Assistant «A» à UFC).

**Année universitaire  
2016- 2017**

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le bon Dieu tout puissant de ma aidé à réaliser ce modeste travail.

Je remercie très chaleureusement mon encadreur Mme GUERGOURI IBTISSEM Maitre-Assistante «A» à UFC qui n'a ménagé aucun effort pour que ce mémoire puisse voire le jour.

Je remercie les membres de jury Mme ALATOU RADIA Maitre de conférences «A» à UFC et Monsieur CHABBI RABAH Maitre-assistant «A» à UFC.

Je remercie tous les enseignants de mon cursus qui ont contribué à ma formation.

**Dédicaces**

*A mes parents*

*A Roumaïssa*

*A Aymen*

*OUIEM*

## Résumé

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

A cet égard, l'Homme doit prendre des mesures et adopter des stratégies basées sur des technologies du vivant, pour limiter l'impact des déversements du pétrole brut sur l'environnement.

L'objectif de notre travail est d'isoler et caractériser des bactéries ayant le pouvoir d'utiliser les hydrocarbures comme unique source de carbone tout en synthétisant des produits appelés biosurfactants. L'échantillonnage de sol est fait au niveau d'une boue de forage pétrolier (boue à base d'huile) dans la région d'In Salah située dans l'extrême sud algérien.

L'ensemble des isolats sont purifiés et testés pour leur capacité d'émulsification grâce à la production de biosurfactants. L'estimation de ce pouvoir par l'indice d'émulsification E24, a permis de sélectionner cinq souches comme étant les plus émulsifiantes.

Une étude de l'influence des paramètres physicochimiques à savoir : le pH, la température et l'NaCl est réalisée sur les souches dans le but d'optimiser leur conditions de croissance.

Une extraction de biosurfactants par précipitation acide est réalisée sur les fermentations des cinq souches émulsifiantes. Aucun extrait n'est obtenu. Cela laisse supposer que le type de biosurfactants chez ces bactéries n'est pas extracellulaire mais lié aux cellules.

**Mots clés :** hydrocarbures, biosurfactants, souches émulsifiantes, boue à base d'huile.

## **Abstract**

The soils contaminated by the hydrocarbons represent a danger during direct contact with humans or animals or during the transfer in the food chain.

In this respect, man has to take measures and adopt strategies based on life technology, to restrict the impact of crude oil spills on the environment.

The aim of our work is to isolate and characterize bacteria which can be use hydrocarbons as a unique source of carbon by synthesizing the products called biosurfactants. The soil sampling has been done on drilling mud (oil based mued) coming from the region of In Salah in the extreme south of Algeria.

All the isolated items are purified and tested for their emulsification capacity thanks to the production of biosurfactants. The assessment of this capacity by means of the emulsification index E24, which allowed the selection of 5 strains considered the most emulsifying one.

A study of the influence of these physiochemical parameters namely: pH, temperature and the NaCl is conducted on the strains in order to optimize their growth conditions.

The extraction of biosurfactants by acid precipitation is conducted on the fermentations of the five emulsifying strains. No extract is obtained. This suggests that the type of biosurfactants in these bacteria is not extracellular but related to cells.

**Keywords:** hydrocarbons, biosurfactants, emulsifying strains, oil based mued

## الملخص

الأتربة الملوثة بالهيدروكربونات تمثل خطر اثر احتكاكها المباشر بالإنسان او الحيوان او اثر انتقالها ضمن السلسلة الغذائية.

في هذه الظروف وجب على الإنسان اتخاذ مقاييس و تبني استراتيجيات مبنية على تكنولوجيا الأحياء لتحديد اثر انتشار البترول في المحيط.

الهدف من هذا العمل هو عزل و تنقية بكتيريا قادرة علي استعمال الهيدروكربونات كمصدر وحيد للكربون مع انتاج مركبات تسمى السرفكتونات. العينة مأخوذة من وحل التنقيب البترولي في منطقة عين صالح المتوقعة بأقصى الجنوب الجزائري .

العينات المعزولة والمنتقة اختبرت على أساس قدرتها على الاستحلاب بفضل إنتاجها للسرفكتونات الحيوية. تم تقييم هذه القدرة من خلال مؤشر الاستحلاب E24 مما سمح باختيار 5 سلالات الاكثر استحلابا .

تم إجراء دراسة فيزيوكيميائية حول تأثير العوامل التالية : pH، الحرارة ، Na cl على السلالات المدروسة بهدف تحديد شروط النمو .

استخراج السرفكتونات الحيوية بإتباع طريقة الترسيب الحمضي أنجزت على مخمرات السلالات الخمسة الأكثر استحلابا . عدم الحصول على أي مستخلص ادي للافتراض ان السرفكتون الحيوي ليس بمركب خارج خلوي و انما مرتبط بالخلية.

الكلمات المفتاحية : الهيدروكربونات، السلالات المستحلبة، السرفكتون الحيوي. وحل دو اساس زيتي.

## Table de matières

Remerciements	
dédicaces	
Résumés	
Liste des Figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction .....	1
<b>CHAPITRE1 :SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
1-le sol .....	2
1-1-definition écologique du sol .....	2
1-2- Intérêt du sol.....	2
1-3- pollution des sols .....	2
2-pollution des sols par les hydrocarbures.....	3
2-1-devenir et mobilité des hydrocarbures dans l'environnement.....	4
2-2-Transformations abiotiques .....	4
2-2-1-Evaporation.....	4
2-2-2-Solubilisation.....	5
2-2-3-Emulsification.....	5
2-2-4-Photo-oxydation.....	5
2-2-5-Sédimentation.....	5
2-2-6-L'hydrolyse.....	6
2-3-Transformation biotique .....	6
3-microorganismes de sol dégradant les hydrocarbures .....	6
4-facteurs biologiques favorisant l'accessibilité et la dégradation des HAP.....	7
5-remediation des sols pollués par les hydrocarbures.....	7
6- les biosurfactants.....	8
7-Les boues de forage pétrolier .....	10
7-1-Le forage pétrolier.....	10
7-2-Les boues de forage .....	10
7-3-Fonctions .....	11
7-4-La boue à base d'huile (Oil-basedmuds) .....	12
<b>CHAPITRE2 : MATERIEL ET METHODES</b>	

1-Localisation du site d'étude.....	13
2-Matériel biologique.....	13
3- Méthodes.....	14
3-1 Préparation de sol .....	14
3-2-Mesure de pH-eau / pH-KCl .....	14
3-3-Analyse microbiologique de sol .....	15
3-3-1-Enrichissement.....	15
3-3-2-Isolement.....	15
3-3-3-Dénombrement .....	16
3-3-4-Purification.....	16
3-4-Determination d'indice d'emulsification.....	17
3-5-Realisation des tests physiologiques.....	17
3-5-1- Influence de température.....	17
3-5-2- Influence de pH.....	17
3-5-3- Influence de NaCl.....	18
3-5-4- Influence de polluant.....	18
3-6-Extraction de biosurfactant par précipitation acide.....	18
<b>CHAPITRE3 : RESULTATS ET DISCUSSION</b>	
1-Characteristique du sol étudié.....	20
2-Mesure de pH-eau, pH-KCl.....	20
3-Analyse microbiologique du sol.....	21
3-1-Characteristique des isolats purifiés.....	21
4-Détermination d'indice d'emulsification.....	32
5-Résultats des tests physiologiques.....	35
5-1-Influence de température.....	35
5-2-Influence de pH.....	36
5-3-Influence de NaCl.....	37
5-4-Influence de polluant.....	38
6-Extraction de biosurfactant.....	39
Conclusion.....	41
Références Bibliographiques	
Annexes	

## Liste des figures

<b>éero de figure</b>	<b>Intitule</b>	<b>Page</b>
Figure1:	Structure moléculaire de base des principaux hydrocarbures	4
Figure2:	Représentation schématique d'un micelle de bio surfactant	8
Figure3:	Cycle de fluide sur le site de forage	11
Figure4:	Photo du site de prélèvement	13
Figure5:	Préparation d'échantillon pour le séchage	14
Figure6:	Schéma des étapes d'extraction de biosurfactants par précipitation acide	19
Figure7:	Diagramme montrant la capacité des souches d'OBM1 à emulsionner le Kéroséne	32
Figure8:	Diagramme montrant la capacite des souches d'OBM2 à emulsionner le Kérosene	32
Figure9:	Un exemple d'émulsification en présence de témoin négatif	34
Figure10:	Croissance bacterienne a pH4 et pH 9	37
Figure11:	Croissance bacterienne en presence d'NaCL(10%, 0%)	38
Figure12:	Variation du taux d'émulsion des souches testes	40
Figure13:	Taux d'emulsification de la souche 16	40

## Liste des tableaux

<b>Numéro de tableau</b>	<b>Intitule</b>	<b>page</b>
Tableau1:	Caractéristique des deux sols étudiés.	20
Tableau2:	Résultat de mesure de pH-eau et pH-KCl des deux sols.	20
Tableau3:	Dénombrement de la microflore chez les deux échantillons.	21
Tableau4:	Aspect macroscopique de souches isolées OBM 1.	23-24
Tableau5 :	Aspect macroscopiques des souches isolés OBM2.	29
Tableau6 :	Résultat du test d'emulsification après 24 h de repos.	33
Tableau7:	Résultat du test de température après 24h d'incubation.	35
Tableau8:	Résultat du test de pH après 24 h d'incubation.	36
Tableau9:	Résultat de test Na Cl après 24hd'incubation.	37
Tableau10:	Variation du taux d'emulsification entre les souches.	39

## Liste des abréviations

**GN** : gélose nutritive

**HAP** : hydrocarbure aromatique polycyclique

**HCB** :hydrocarbonoclastes

**LB** : bouillon lysogène

**pH** : potentiel d'hydrogène

**N**: azote

**P**:phosphore

**OBM**: oil Based mued

**BN** : bouillon nutritif

**DO** : densité optique

**E<sub>24</sub>** : indice d'émulsion

**h** : heure

**KCl** : chlorure de potassium

**rpm** : rotation par minute

**NaCl** : chlorure de sodium

**CO<sub>2</sub>** : dioxyde de carbone

Depuis le siècle dernier et jusqu'à nos jours, l'importance de l'industrie pétrolière n'a cessé de croître et ceci grâce au rôle stratégique et politique que le pétrole joue sur la scène mondiale (Soltani M., 2004)

La perturbation d'équilibre des écosystèmes, ainsi que la dégradation de la santé humaine sont dues principalement aux phénomènes de pollution par les hydrocarbures en milieu terrestre. Ceci touche principalement l'alimentation humaine à travers la contamination dans la chaîne alimentaire (les animaux et végétaux) ainsi que les nappes phréatiques.

Pour cela les chercheurs sont mobilisés pour mettre en place des plans d'action afin de cerner ce genre de problèmes en faisant des recherches sur des organismes vivants ayant le pouvoir de dépollution des sites pollués de façon accidentelle ou chronique.

Ce travail a pour but de trouver des bactéries capable d'assurer une biodégradation des hydrocarbures, prévenant des boues de forage pétrolier prélevés en deux années successifs à partir du même site, et d'étudier la modification de la population indigène d'un site pollué au fil du temps.

Ce mémoire est structuré en trois chapitres. le premier chapitre présente une synthèse bibliographique, le second décrit le matériels et méthodes utilisées, et le troisième chapitre est consacré aux résultats et discussion suivi d'une conclusion.

## **1-Le sol :**

### **1-1-Définition écologique :**

Écologiquement, le sol est un milieu tri-phasique avec une phase solide, minérale et organique, comprenant les éléments constituant la structure du sol, une phase liquide avec des éléments dissous «la solution du sol» et en fin une phase gazeuse remplissant les pores vides. Ce milieu, poreux, hautement réactif vis à vis de la phase liquide et intégrant des fractions présentant les propriétés des substances colloïdales est un lieu d'échanges fonctionnant comme un réacteur chimique. Grâce au pouvoir adsorbant du sol et de ses capacités d'échanges, il constitue le milieu nutritif essentiel des écosystèmes terrestres. Il demeure aussi le lieu privilégié des fonctions bio-transformatrices des écosystèmes, au regard du stockage et de la dynamique des flux du carbone et de l'azote mais aussi au regard de l'altération des minéraux donc des processus initiateurs de la pédogenèse, grâce à l'activité des microorganismes(Walid N.,2015).

### **1-2- Intérêt du sol :**

Le sol présente une très grande diversité de structure, de texture et d'activité biologique, ce qui lui permet de transformer un grand nombre de débris et de déchets en composés organiques et minéraux et ainsi de recycler les ressources dont dépend la vie sur notre planète. Le sol est un milieu idéal pour la vie des microorganismes, et aucun autre milieu naturel ne peut supporter une si grande diversité biologique dans une même échelle de temps et d'espace. Il représente un milieu qui peut être favorable pour leur croissance. En effet, un sol influence fortement la croissance de ces microorganismes par son état hydrique, sa composition minérale et organique, sa teneur en oxygène, sa température et son pH. Les constituants du sol possèdent une très grande surface spécifique, une hétérogénéité de composition, de taille des particules et de nature des constituants organiques et inorganiques.

La complexité des sols et leur hétérogénéité à petite échelle, qui créent une multitude de niches microbiennes différentes, font que les microorganismes du sol et les processus qui s'y déroulent sont mal connus(Amallal N., 2009).

### **1-3-La pollution des sols :**

La pollution des sols et des sous-sols résulte des conséquences des diverses activités humaines (industrielles, agricoles...) cumulées au cours des temps.

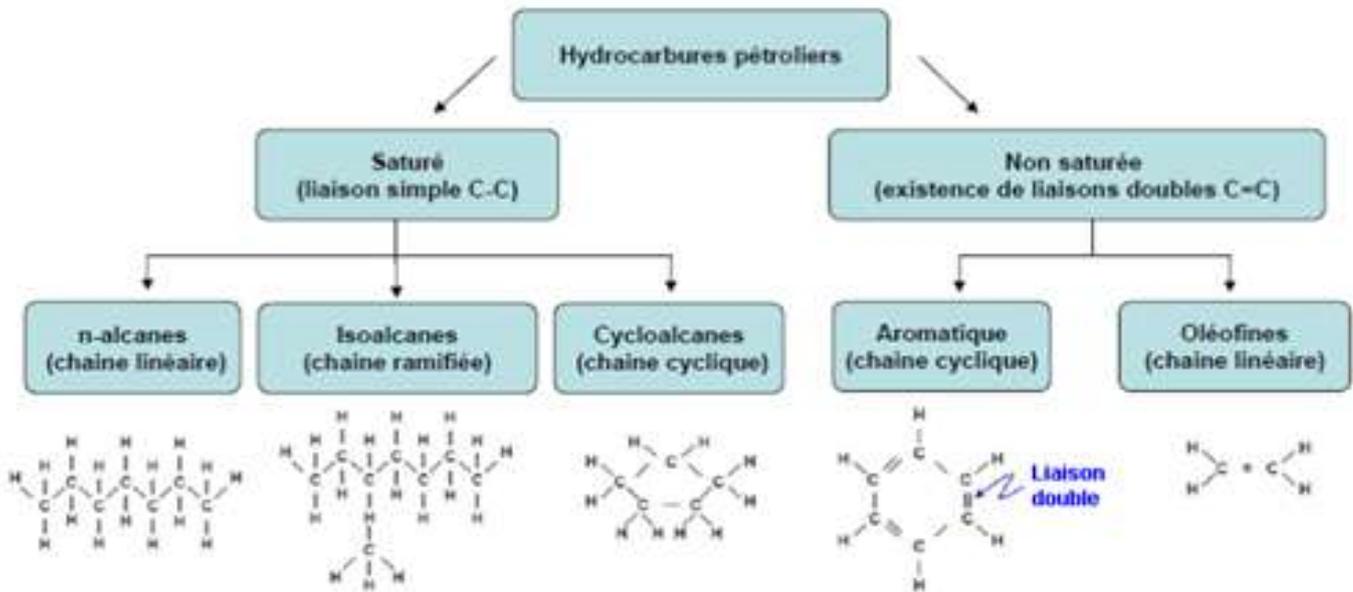
Ces pollutions négligées jusqu'à une époque relativement récente deviennent aujourd'hui, environnementales et socio-économiques, il y'a contamination lorsqu'une telle substance potentiellement dangereuse est introduite artificiellement dans un milieu naturel, qu'elle que soit sa teneur (contaminant). Il y'a pollution quand la teneur est potentiellement dangereuse, ou lorsqu'elle atteint les valeurs limites fixées par les normes (valeur guides).

On distingue deux types de pollution du sol : Une pollution ponctuelle: qui est un dépôt ou épandage de polluants sur une surface restreinte, que l'on peut assimiler à une source et une pollution diffuse: qui est un épandage ou retombée du polluant sur une grande surface (Abbia S Guittoun l., 2014)

### **2- Pollution des sols par les hydrocarbures :**

Le développement industriel a entraîné un accroissement de la pollution des écosystèmes naturels. Les pollutions chimiques, dans le cas des hydrocarbures, peuvent être soit naturelles (par transformation de la matière organique), soit accidentelles (dégazage ou naufrage de pétroliers) dans les milieux aquatiques. Ou par les rejets, les déversements volontaires ou accidentellement par des fuites de pétrole dans le milieu terrestre. Ces pollutions présentent un impact direct ou indirect sur la santé humaine et l'équilibre des écosystèmes. (Bireche Y Berregui., 2014).

Les hydrocarbures sont composés exclusivement d'atomes de carbone et d'hydrogène, les hydrocarbures sont donc des composés organiques de formule brute  $C_nH_m$  où n et m sont des entiers naturels. De part leur abondance naturelle, ils font partie des produits chimiques les plus importants pour l'humanité et sont notamment utilisés comme source d'énergie primaire, Ces hydrocarbures sont souvent classés selon leur nature. On distingue ainsi les hydrocarbures saturés et insaturés. Ceux-ci peuvent être linéaires, ramifiés ou cycliques. Leur structure moléculaire varie et influe sur les propriétés de ces hydrocarbures, le point de fusion et le point d'ébullition seront, d'une manière générale, élevés. On distingue donc parmi les hydrocarbures: les alcanes, les alcènes et alcynes et les composés aromatiques. (Gaudi F., 2014).



**Figure1:** Structure moléculaire de base de principaux hydrocarbures pétroliers (Gabet S., 2004).

## 2-1-Devenir et mobilité 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 répandu dans l'environnement. (Abbia S Guittoun L., 2014).

### 2-2-Transformations abiotiques:

Les pertes abiotiques des hydrocarbures sont uniquement dues à des phénomènes d'ordre physique et chimique. Aucune action d'organismes vivant n'intervient. Elles seraient responsables de la perte de à 20% des hydrocarbures aromatiques à 2 et 3 cycles dans les sols. Les phénomènes de transformation abiotique des hydrocarbures peuvent se traduire principalement par :

#### 2-2-1-Evaporation :

L'évaporation est un phénomène qui touche les fractions de faible poids moléculaire et dépend des conditions atmosphériques (vent, vagues, température,...). Les hydrocarbures les plus légers, ayant de 4 à 12 atomes de carbone ( $T^{\circ}$  ébullition  $< 270^{\circ}\text{C}$ ), qui représentent généralement près de 50 % des hydrocarbures totaux d'un brut moyen, sont éliminés

rapidement dès les premiers jours, pouvant conduire à une pollution de l'atmosphère. (Soltani M., 2004)

### **2-2-2- Solubilisation :**

La solubilité des hydrocarbures dans l'eau est très faible. un hydrocarbure est d'autant plus soluble que sa masse moléculaire est faible et que sa polarité est élevée. Il est important de noter que ces hydrocarbures solubles sont parmi les plus dangereux pour l'environnement. Ils sont difficiles à éliminer et sont adsorbés par la faune et la flore.

### **2-2-3-Emulsification :**

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

### **2-2-4- Photo –oxydation :**

La photo-oxydation est observée au niveau de la surface de l'eau où l'air (oxygène) et la lumière (radiations solaires) sont présents pour la transformation des hydrocarbures. L'efficacité de ce phénomène dépend de la nature des hydrocarbures et de la présence de composés non hydrocarbonés. Ainsi, la photo oxydation touche plus particulièrement les composés aromatiques qui sont plus photosensibles que les composés aliphatiques. Parmi ces derniers, les composés ramifiés sont plus facilement photo-oxydés que les n-Alcane.

### **2-2-5- Sédimentation :**

La sédimentation est le passage du pétrole de la surface vers le fond. Ce phénomène concerne les résidus goudronneux constitués de la fraction pétrolière la plus lourde et dont la densité est supérieure à celle de l'eau de mer .La sédimentation conduit à la constitution d'agrégats de haute densité difficilement dégradable par voie naturelle.

### **2-2-6-L'hydrolyse :**

Processus de dégradation des molécules organiques sous l'action de l'eau, fortement influencé par le pH et la température du sol.

### **2-3-Transformation biotique :**

La biodégradation est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement. Les microorganismes en sont responsables en particulier les bactéries. (Guermouche M'rassi A., 2014).

La biodégradation des hydrocarbures est influencée par plusieurs facteurs dont les principaux sont la texture du sol, ses caractéristiques biologiques, sa structure, la concentration et les caractéristiques physico-chimiques des polluants ainsi que les paramètres environnementaux. Le processus se développe selon une réaction en chaîne, où les composés carbonés sont transformés, par cassures successives en molécules de moins en moins complexes, jusqu'à l'obtention de sous produits simples, généralement le CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O. En conditions oxydantes on parle de transformation aérobie, en conditions réductrices on parle d'anaérobie (Ali Ahmed S., 2011).

### **3-Microorganismes de sol dégradant les hydrocarbures :**

Un sol qui contient des hydrocarbures modifie l'activité des microorganismes, Ceux-ci doivent donc adapter leur activité enzymatique afin de pouvoir s'y attaquer. Les bactéries et les champignons vont ensuite subir une période de forte croissance au cours de laquelle ils seront capables d'assimiler les produits de la dégradation des hydrocarbures. Cette biodégradation peut prendre plusieurs mois. Une fois qu'ils ont consommé les composés les plus facilement dégradables, leur nombre diminue jusqu'à atteindre de nouveau la taille d'une population normale. Parfois, seule une partie des polluants est dégradés car les hydrocarbures se lient partiellement à la matière organique du sol et deviennent alors moins accessible aux microorganismes, ces derniers sont des êtres vivants microscopiques généralement unicellulaires qui prolifèrent naturellement dans tous les milieux et dans des conditions très variables (Bouderhem A., 2011)

Certains microorganismes du sol ont développé des stratégies pour utiliser les HAP comme sources de carbone et d'énergie, assurant la dépollution directe et naturelle de l'environnement, ou pour les transformer en substrats métabolisables par d'autres

microorganismes. Par exemple, de nombreuses bactéries ont été caractérisées comme capables de dégrader le pyrène. Les espèces à gram positif *Mycobacterium* ont été largement étudiées et ont montré de bonnes capacités à dégrader le pyrène par l'utilisation de celui-ci comme unique source de carbone et d'énergie d'autres espèces ont montré des capacités à dégrader le pyrène, parmi lesquelles *Rhodococcus*, *Bacillus cereus*, *BurkholderiacepaciaCycloclasticussp*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonasstutzeri* *Sphingomonassp.*, *Sphingomonaspaucimobilis*, *Stenotrophomonasmaltophilia* A ce jour, il y a relativement peu d'informations sur la dégradation bactérienne des HAP à 5 ou plus de 5 cycles aromatiques (Crampon M., 2015).

#### **4-Facteurs biologiques favorisant l'accessibilité et la dégradation des HAP :**

La biodégradation est influencée par des facteurs abiotiques tels que le pH, la température, l'humidité, L'oxygénation, la disponibilité des nutriments (N, P), la salinité du sol. La composition du mélange de HAP détermine également leur niveau de solubilité et indirectement leur résistance à la dégradation. Les bactéries, via des voies métaboliques spécifiques, tiennent un rôle central dans les phénomènes de biodégradation des HAP. Certaines d'entre elles ont développé un système de signalisation, le chimiotactisme, favorisant l'accès aux HAP. Ces mécanismes interviennent via des chimiorécepteurs et des voies de signalisation, et provoquent un déplacement des bactéries selon le gradient de concentration du polluant. Les bactéries s'accumulent alors à l'interface entre le polluant hydrophobe et le milieu hydrophile (frontière de diffusion), provoquant une augmentation du taux de dégradation des composés, souvent précédé d'une augmentation de leur désorption(Crampon M., 2015)

#### **5-Remediation des sols pollués par les hydrocarbures :**

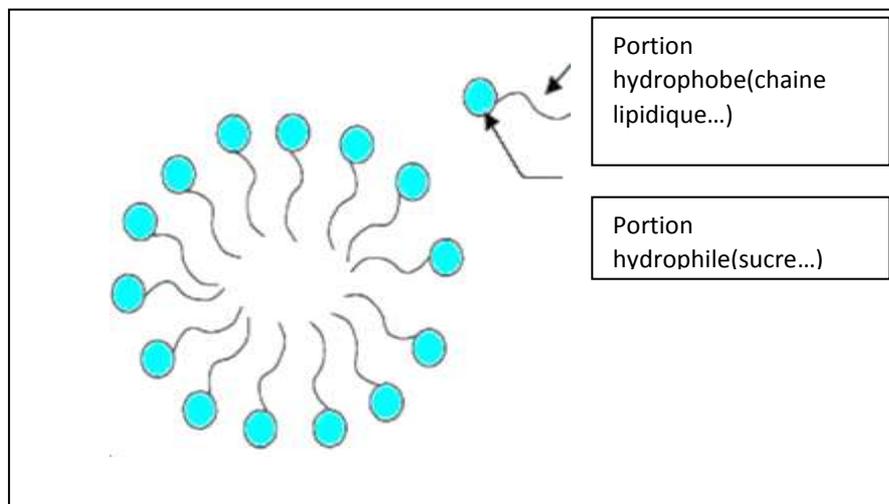
Parmi les techniques de dépollution et de réhabilitation des sols (physiques, chimiques et biologiques), la bioremédiation (détoxification ou minéralisation d'un polluant par les organismes vivants) des sols In situ semble être une méthode d'intérêt d'un point de vue économique et écologique. Contrairement aux autres procédés (incinération, lessivage du sol...) où les polluants sont souvent transférés et non détruits, la biodégradation peut permettre la minéralisation du xénobiotique, et donc sa disparition. De plus, cette technique est particulièrement adaptée pour le traitement des hydrocarbures polycycliques aromatiques contaminants comptant parmi les plus récalcitrants et les plus toxiques (pouvoirs cancérigène et mutagène) (Lounes Hadj Sahraoui A et al. ,2004).

Cependant, du fait de la faible solubilité des hydrocarbures, les rendements obtenus demeurent faibles, et il est souvent nécessaire d'ajouter des substances supplémentaires pour favoriser leur désorption. Dans la plupart des cas, des Co-solvants organiques ou des surfactants sont employés (Gabet S., 2004).

### 6-Les biosurfactants :

La plupart des surfactants commercialement disponibles sont d'origine chimique et sont des produits dérivés du pétrole. Ils présentent un risque pour l'environnement car ils sont généralement toxiques et non biodégradables. C'est pourquoi, depuis quelques années, et grâce à l'essor de la biotechnologie, les scientifiques se sont intéressés à des surfactants produits par des microorganismes : les tensioactifs biologiques ou biosurfactants. Ceux-ci possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ont l'avantage d'être biodégradables, non toxiques. (Djerbaoui A., 2011)

Le terme de biosurfactants se réfère à un grand groupe de molécules produites par des microorganismes, et qui ont diverses structures. La caractéristique commune de ces molécules est qu'elles possèdent des propriétés actives sur les surfaces, récemment les agents de surface microbienne ces agents ont gagné une importance considérable dans les domaines de nourriture, les produits pharmaceutiques, cosmétiques et pétrochimie industrielle. Ces molécules amphiphiles contenant des parties polaires (hydrophiles) et non polaires (hydrophobes), avec des propriétés tensioactives qui les rendent capables de réduire les tensions superficielles et interfacielles. En outre, ils sont non toxiques, biodégradables et hautement sélectifs ils peuvent être actifs dans des conditions extrêmes de température, pH, et salinité et peuvent être synthétisés à partir d'éléments renouvelables. (Pruthi V., 2003).



**Figure2 :** Représentation schématique d'une micelle de biosurfactant(Gabet S., 2004)

On distingue cinq grandes classes de biosurfactants : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les liposaccharides et les lipides neutres.

- les glycolipides sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acides hydrox aliphatiques Les glycolipides les plus étudiés sont les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides.
- Les lipopeptides sont composés d'un lipide attaché à une chaîne polypeptide. Les lipids d'ornitinessont les plus connus.
- Les phospholipides sont formés de groupements alcool et phosphate et de chaîne lipidique.
- Les lipo polysaccharides ou polymériques sont constitués d'une ou plusieurs unités saccharides et d'acides gras. Ce sont les bio surfactants qui possèdent la masse molaire la plus élevée.
- Les acides gras et lipides neutres. (Gabet S.,2004)

## **7-Les boues de forage pétrolier :**

### **7-1-Le forage pétrolier**

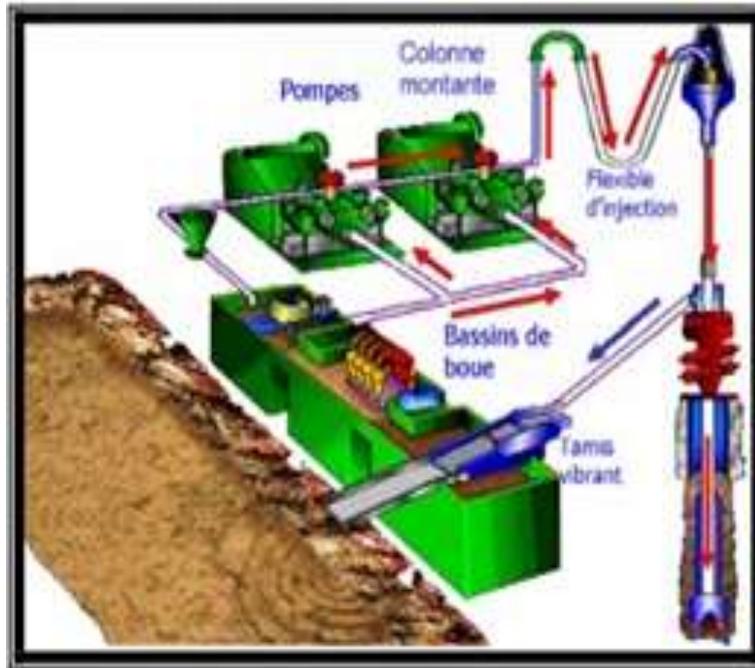
On appelle "forage pétrolier" l'ensemble des opérations permettant d'atteindre les roches poreuses et perméables du sous-sol, susceptibles de contenir des hydrocarbures liquides ou gazeux, L'implantation d'un forage pétrolier est décidée à la suite des études géologiques et géophysiques effectuées sur un bassin sédimentaire. Ceci nous permet d'avoir une idée de la constitution de sous-sol et de possibilité de gisement, sans pourtant préciser la présence d'hydrocarbures. L'opération de forage peut alors confirmer les hypothèses faites et mettre en évidence la nature des fluides contenus dans les roches(Belhabib A.,2012).

### **7-2-Les boues de forage :**

Composées de différents constituants liquides (eau, huile) et/ou gazeux (air ou gaz naturel) contenant en suspension d'autres additifs minéraux et organiques (argiles, polymères, tensioactifs, déblais, ciments ...). Le fluide de forage était déjà présenté en 1933 lors du premier Congrès Mondial du Pétrole, où il a fait l'objet de cinq communications. (Khodja M.,2008).

Durant le forage d'un puits, un fluide (appelé boue de forage), est injecté à haute pression à l'intérieur des tiges de forage. La boue de forage sort au niveau de l'outil de forage à une vitesse suffisante pour pouvoir entraîner les morceaux de roche forés jusqu'en surface dans l'espace annulaire situé entre les tiges de forage et les parois du puits.

En surface, les débris de roches sont séparés de la boue en passant sur des tamis vibrants qui retiennent la roche en laissant passer le fluide. Si nécessaire, des traitements complémentaires sont effectués de manière à ce que la boue nettoyée ait retrouvé ses propriétés initiales (viscosité, densité, ...). Elle est alors envoyée dans les bacs à boue où elle est pompée afin d'être réinjectée dans la garniture de forage. Elle circule donc en circuit fermé.



**Figure 3:** Cycle de fluide sur le site de forage. (Belhabib A et al., 2013)

On peut, malgré la particularité de chaque formulation, classer les fluides de forage suivant la phase continue qui les compose. On retrouve ainsi:

- Les fluides de forage à base d'eau (principalement des suspensions).
- les fluides de forage à base d'huile (principalement des émulsions).
- Les mousses, dont la phase dispersée est un gaz. (Ragouilliaux A., 2007)

### 7-3-Fonctions:

La plupart des manuels et des ouvrages de forage énumèrent de 10 à 20 fonctions qu'un fluide de forage doit posséder lors du forage d'un puits pétrolier.

Généralement les fonctions principales sont :

- transport des déblais du trou vers la surface.
- lubrification et le nettoyage de l'outil de forage.
- réduction de frottement entre la tige de forage et le puits ou le tubage.
- Le maintien de la stabilité des parois du puits.
- empêchent la venue des fluides dans le puits.
- formation d'un filtre cake.
- n'endommage pas la formation productrice.

- ne présente pas un danger pour l'environnement et pour le personnel. (Mellak A *etal.*,2007)

### **7-4- La boue à base d'huile (Oil-basedmuds) :**

complétion constitués d'une phase continue huile et d'une phase dispersée aqueuse,(Belhabib A et *al.*,2013) dont la phase continue est une huile minérale (pétrole brut, fuel, gazole, ...) et la phase dispersée est de l'eau. Par définition les fluides de forage à base d'huile contenant plus de 5%d'eau sont appelés boues de forage en émulsion inverse ; avec moins de 5%d'eau, on a les boues à l'huile Ces fluides sont souvent désignés par "Oil-BasedMuds" ou OBM. La phase continue la plus utilisée jusqu'à ces dernières années était le gazole, mais actuellement la législation relative à la protection de l'environnement impose l'utilisation d'huiles minérales ou "synthétiques", ne contenant plus de composés aromatiques. Des agents émulsifiants et mouillants sont alors utilisés pour favoriser la stabilité de l'émulsion .Les propriétés rhéologiques (thixotropie) de cette émulsion sont ajustées par l'addition d'agents viscosifiant, généralement des argiles organophiles. Les formulations peuvent contenir également des agents réducteurs de filtrat (composés asphalténiques et polymères) et d'autres additifs spéciaux (Khoja M .,2008).

Dans les terrains ayant la propriété, en s'hydratant, d'augmenter considérablement de volume, à tel point que l'outil risque de se bloquer au fond du trou, ce qui peut occasionner de grosses pertes de temps pour tenter de le dégager par des instrumentations délicates. Dans ce cas, il est conseiller d'ajouter à la boue du silicate de soude ou de la chaux ou de l'amidon dont ces matières ayant également la propriété de réduire l'hydratation. Autrement, l'emploi de la boue à l'huile qui est également indiqué. Il s'agit d'émulsion soit d'eau dans l'huile ou d'huile dans l'eau suivant les pourcentages relatifs (Metaiche M.,2013).

**1-localisation du site d'étude :**

Le prélèvement de sol s'est effectuée dans un site de forage pétrolier, précisément dans une boue de forage (endroit de rejet d'un mélange de produits chimique utilisés dans le procédé de récupération de pétrole brut à partir d'un puit.) Ce champ se trouve à In Salah, région de l'extrême sud algérien.



**Figure 4 :** photo du site de prélèvement

**2-Matériel biologique :**

Pour la réalisation de nos expérimentations, nous avons utilisés deux échantillons de sol prélevés des boues de forage au niveau des champs d'In Salah, només OBM1et OBM2 respectivement, les deux échantillons sont prélevés a un écart de temps deux ans.(le premier échantillon est prélevé en 2014 et le deuxième en 2016).

### 3-Méthodes:

#### 3-1-Préparation du sol :

Les deux échantillons (OBM1, OBM2) destinés à l'analyse chimiques sont séchés a l'air durant 5 jours. Après, on a retiré les débris des végétaux et les cailloux, en suite, chacun des sols est tamisé en utilisant un tamis de 2 mm.( le sol destiné a l'analyse microbiologique ne va subir les mêmes étapes de préparation).



**Figure 5 :** Préparation d'échantillon de sol pour l'analyse.

#### 3-2-Mesure de pH-eau et pH-KCL (Pétard J., 1993)

Après avoir fait une pesé stérile sous la hotte à flux laminaire, 2g de chaque sol contaminé (OBM1 et OBM2) est introduit dans un tube contenant 5ml d'eau physiologiques.

Une agitation est réalisée à l'aide de vortex pendant 5 minutes pour chacun des tubes dans le but d'homogénéiser leur contenu.

Laisser les tubes au repos pendant 24 heures ce qui permet une décantation des particules de sol au fond de tube.

Le même tube contenant la solution de sol était utilisé pour la réalisation des deux mesures (pH- eau et pH- KCl).

La mesure de pH –eau se réalise en plongeant la sonde de pH mètre dans la solution, la valeur de pH est affichée.

Le pH-eau est déterminé en mesurant le taux d'acidité dans un mélange sol /eau il reflète la concentration de proton dans la solution de sol.

Le pH-KCl est déterminé en ajoutant à chaque tube une quantité de 0,4 g de KCl. Après agitation et décantation, la mesure est effectuée.

Le pH-KCl consiste à mesurer le pH après ajout de chlorure de potassium, celui-ci va chasser les protons fixés sur le complexe argileux-humique et permettre de refléter également l'acidité potentielle ou d'échange de sol :fixée sur le complexe d'échange : le pH-KCl sera ainsi toujours plus bas que le pH-eau.

La mesure de pH d'un sol définit son acidité et donne une indication sur la richesse chimique de sol. Aussi le pH a une influence sur trois composantes : la biodisponibilité des nutriments, les éléments toxiques ,l'activité biologique et la stabilité structurale.

Ce facteur est très intéressant pour l'assimilation des éléments nutritifs, pour un sol un pH optimal est compris entre 6.5et 8 car la plupart des éléments nutritifs sont assimilables dans cette zone de pH. (Limam I.,2014).

### **3-3-Analyse microbiologique de sol :**

#### **3-3-1-Enrichissement :**

Avant de passer à l'étape dilution un enrichissement des sols est effectué.

10g de chaque sol sont prélevés puis mélangé avec 90ml de bouillon nutritif, ensuite chacun des mélanges est mis sous agitation pendant 24 heures.

A partir de la solution enrichies des dilutions variant de ( $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-5}$ ) sont préparées.

#### **3-3-2-Isolement :**

Le milieu gélosé (GN) préalablement fondu est reparti dans des boites de pétri en condition d'asepsie sous une hotte a flux laminaire.

Après avoir bien étalé à l'aide d'un râteau 0.1ml de chaque dilution sur boite contenant de la GN ordinaire, les boites sont incubées pendant 24heures à 30°C.

### 3-3-3-Dénombrement:

Le dénombrement des colonies bactériennes rentre dans l'ensemble d'analyse microbiologique qui permettant de quantifier la charge du sol et sa richesse en microorganismes.

Le dénombrement après culture concerne évidemment les cellules viables de l'échantillon autrement dit les cellules capables de croître sur milieu gélosé et former une colonie visible à l'œil nu.

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

$$N = n / d .v$$

N : nombre des microorganismes en UFC/ ml.

n: nombre d'unité formant colonie.

v: Volumeensemencé (0.1ml).

d: Taux de Dilution.

### 3-3-4-Purification :

La technique classique des cadrant a été appliqué qui repose sur un épuisement par stries de l'inoculum correspondant a un aspect sélectionné a partir de la boîte d'origine (du dénombrement), le milieu préconisé est la GN.

Les colonies poussées après 24heures d'incubation 30°C ont été purifiées par repiquage successifs sur le même milieu d'isolement dans le but d'obtenir des colonies bien distincts.

La sélection est basée sur l'aspect macroscopique des colonies : la couleur, la forme, le diamètre, l'opacité...etc. Un échantillon de chaque type de colonie est prélevé et ensuite

purifié par repiquage successif selon la méthode de stries comme on l'a cité ci-dessus (Martinneuet *al.*, 1996) cité dans (Djaoud M., 2013).

### 3-4-Détermination d'indice d'émulsification :

Le test d'émulsification permet de vérifier la capacité des souches à émulsionner une phase hydrophobe (le kérosène coloré) dans une phase hydrophile (BN).

Ce test consiste à mélanger 6ml de Kérosène coloré (Kérosène additionné de 0.01 de colorant Red oil) avec 4 ml de la suspension bactérienne de 24 heures, après homogénéisation des 2 phases au vortex pour 2 minutes, les tubes sont laissés au repos pour 24 heures, à température ambiante. (Bodoor *et al.*, 2003)

Le calcul d'indice d'émulsion s'effectue après 24 h selon l'équation suivante :

$$E_{24} = (he / ht) \cdot 100$$

**he**: hauteur d'émulsion

**ht**: hauteur total

### 3-5-Réalisation des tests physiologiques :

L'activité métabolique des souches bactérienne peut être influencée par plusieurs facteurs physico-chimiques. De ce fait les souches les plus émulsifiantes sont testés à différentes valeurs de pH de température et différents taux de NaCl. Ces trois tests sont réalisés à partir de suspension bactérienne des souches de 24 heures (culture jeune).

#### 3-5-1- Influence de la température :

Cette étude a été réalisée en utilisant de la GN préalablement autoclavée coulée dans des boîtes compartimentées en quatre cadrans, et ensemencé par un seul strie ensuite incubés à différentes températures (4°C, 30°C, 37°C, 45°C).

#### 3-5-2-Influence de pH :

Pour réaliser ce test la GN est préparée mais ajustée à différentes valeurs de pH (4, 5,5, 7, 8,9) chaque une des boîtes compartimentées est ensemencé par un seul strie et incubé à 28°C.

### **3-5-3-Influence d'NaCl :**

Cette étude est réalisée en utilisant la GN additionnée de (0% ,0.1%, 1%, 10% ) d'NaCl, afin de détecter et mettre en évidence la tolérance des souches isolées à la salinité. Les boîtes sont compartimentées, ensemencées et incubées de la même manière précédente.

### **3-5-4-Influence du polluant :**

Afin de détecter la capacité des souches bactériennes à croître sur un milieu de culture contenant le polluant, la GN est additionnée de ( 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%) de pétrole brut, les boîtes compartimentées sont ensemencées et incubées de la même manière précédente.

### **3-6- Extraction de biosurfactant par précipitation acide (Lapointe M.,1996) :**

Le bouillon lysogène (LB) préparé est reparti dans des flacons de 200 ml à raison de 100 ml par flacon.

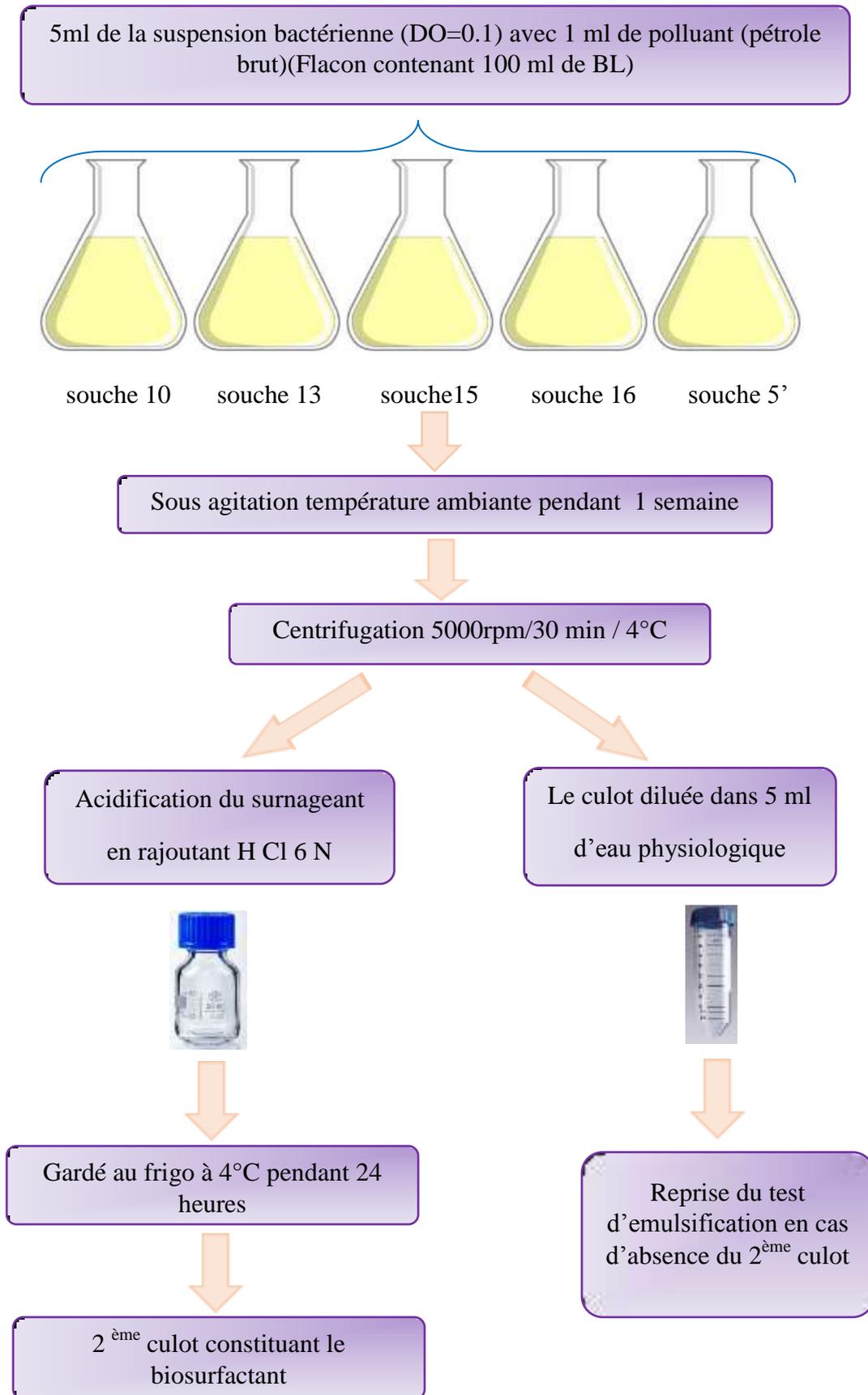
La suspension bactérienne de 24 h de chaque souche est diluée en rajoutant le BN stérile jusqu'à atteindre la  $DO=0.1$ .

Chaque flacon est inoculé avec 5 ml de la suspension bactérienne diluée et 1 ml de polluant (pétrole brut), l'incubation s'effectue à température ambiante dans un système d'agitation sur une plaque d'agitation pendant 1 semaine.

Une fois les flacons récupérés, ils sont centrifugés à 5000rpm pendant 30 min à 4°C, afin de concentrer les cellules en culot et laisser les biosurfactants en suspension dans le surnageant.

Le surnageant contenant le biosurfactant est acidifié en rajoutant de l'HCl 6N jusqu'à pH 2 et gardé pendant une nuit au frigo à 4°C. Le lendemain il subit une deuxième centrifugation pour concentrer le produit en culot.

Le culot de la première centrifugation contenant les cellules bactériennes est utilisé par la suite pour la réalisation du test d'emulsification (test confirmatif).



**Figure 6:** Schéma des étapes d'extraction de biosurfactant par précipitation acide.

**1- Caractéristique du sol étudié :**

**Tableau 1 :** Caractéristique des deux sols étudiés.

Echantillon	Site de prélèvement	Description
<b>OBM1</b>	Boue de forage pétrolier	couleur noir avec des particules marron foncé, argileux, forte odeur de polluant
<b>OBM2</b>	Boue de forage pétrolier	Couleur marron, sableux, sèche

**2- Mesure du potentiel d'hydrogène :**

**Tableau 2 :** résultat de mesure pH -eau et pH-KCL des deux sols.

Échantillon	pH- eau	pH-KCl
<b>OBM1</b>	7.25	7.29
<b>OBM2</b>	6.91	7.68

Les valeurs de pH obtenus pour les 2 sols étudiés varient entre 6.91 et 7.25. L'échantillon de sol appartenant à OBM1 est un sol alcalin alors que OBM2 est un sol acidifié mais présente une valeur proche de l'alcalinité.

On constate aussi une légère diminution de la valeur de pH pour OBM1. (Deux échantillons prélevés en deux années successives à partir du même site).

Le pH apparaît ainsi comme un paramètre qui influence de manière majeure la structure et la diversité des communautés bactériennes dans les sols, et impose directement une contrainte physiologique sur les bactéries du sol. (Nicolas T., 2013).

L'activité biologique d'un sol varie avec le pH, la diversité, l'abondance et l'activité de la microflore (bactéries) sont en effet influencées par le pH. Chaque espèce possède une plage optimale de pH, par exemple, l'activité bactérienne diminue lorsque le pH-KCl est inférieur à 5,5.

Un pH-eau de 7 est optimal pour l'activité des bactéries responsables des transformations de la matière organique, et par conséquent il assure un bon déroulement de la biodégradation des hydrocarbures.

**3-Analyse microbiologique du sol :**

Le résultat de dénombrement permet d'avoir une idée sur la charge bactérienne des deux sites pollués. Les résultats obtenus sont motionnés dans le tableau suivant :

**Tableau 3 :** Dénombrement de la microflore chez les deux échantillons.

Dillutions	OBM1	OBM2	Nombre de microorganisme en UFC/ml	
			OBM1	OBM2
10 <sup>-1</sup>	Supérieur à 300	Supérieur à 300	Indénombrable	Indénombrable
10 <sup>-2</sup>	89	Supérieur à 300	8.9.10 <sup>4</sup>	Indénombrable
10 <sup>-3</sup>	11	Indénombrable	Indénombrable	Indénombrable
10 <sup>-4</sup>	0	15	Indénombrable	Indénombrable
10 <sup>-5</sup>	0	1	Indénombrable	Indénombrable

**3-1- Caractéristiques des isolats purifiés :**

L'ensemencement sur GN nous a permis d'isoler 25souches (OBM1) et 11souches (OBM2).

Un sol qui contient des hydrocarbures va modifier l'activité des microorganismes. Ceux-ci doivent donc adapter leur activité enzymatique afin de pouvoir s'y attaquer. Les bactéries vont ensuite subir une période de forte croissance au cours de laquelle ils seront capables d'assimiler les produits de la dégradation des hydrocarbures. Cette biodégradation peut prendre plusieurs mois. Une fois qu'ils ont consommé les composés les plus facilement dégradables, leur nombre diminue jusqu'à atteindre de nouveau la taille d'une population normale. (ce qui explique l'écart au niveau de nombre des souches isolées entre les deux échantillons).

Parfois, seule une partie des polluants est dégradés car les hydrocarbures se lient partiellement à la matière organique du sol et deviennent alors moins accessibles aux microorganismes.

Le niveau de dégradation des pétroles (mélange de composés facilement dégradables et de composés récalcitrants) est donc totalement dépendant de la diversité métabolique des bactéries hydrocarbonoclastes présentes dans l'environnement pollué. La diversité des espèces bactériennes est un facteur décisif dans la réponse des communautés bactériennes à ce type de variation environnementale.(Sauret C.,2011).

les colonies sont généralement lisses et ont un diamètre de plus de 1mm, de tous les microorganismes du sol, les bactéries sont les plus nombreuses et les plus petites : la taille de leurs colonies ne dépasse pas en général, 0.5 à 2 mm de diamètre .(Roget et *al.*,2001) cité dans (Djaoud M.,2013)

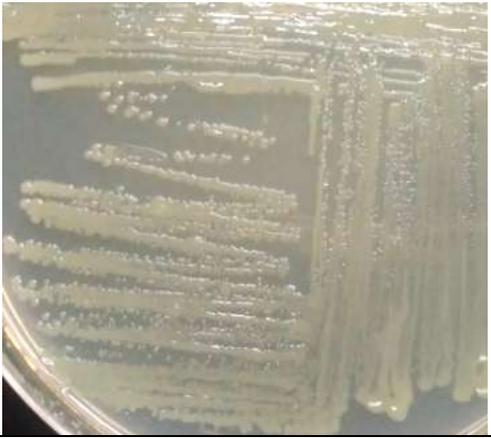
Les résultats obtenus sont regroupés dans les deux tableaux 4 et 5 respectivement.

Et les figures juste en dessous illustrent les différents aspects macroscopiques et quelques aspects microscopiques

**Tableau4** : Aspect macroscopique des souches isolées « OBM1 ».

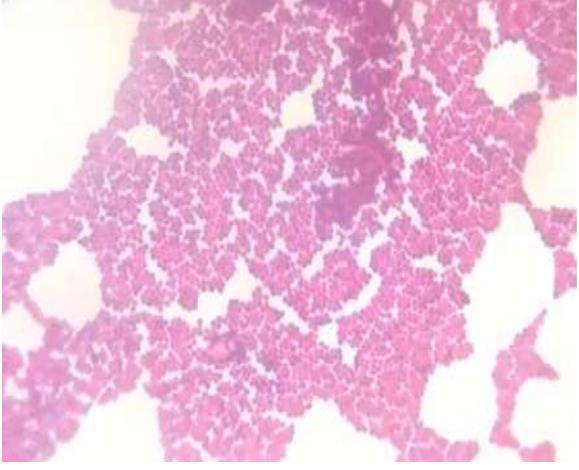
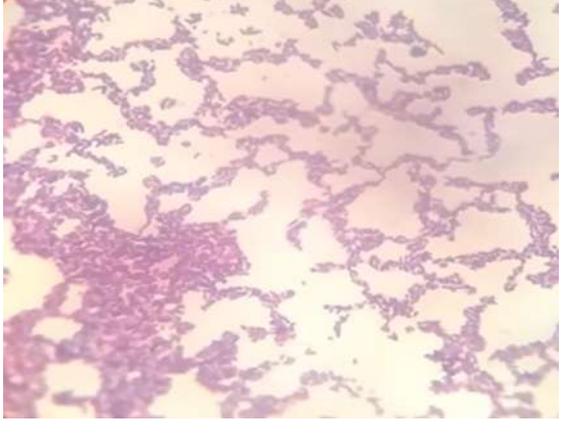
Souche	Couleur	Forme	Elevation	Contour	Opacite	Surface	Gram	Forme
1	Rose	Circulaire	convex	Regulier	Opaque	Lisse	Rose(-)	Coccobacille
2	Beige	Circulaire	Plate	Regulier	Opaque	Lisse	Rose(-)	Bacille
3	Blanchatre	Circulaire	Elevee	Regulier	Opaque	Lisse	Rose(-)	Bacille
4	Beige	Circulaire	Plate	Regulier	Opaque	Lisse	Rose(-)	Bacille
5	Beige	Circulaire	convexe	Regulier	Opaque	Lisse	Rose(-)	Cocci
6	Beige	Circulaire	convexe	Regulier	Opaque	Lisse	Rose(-)	Bacille
7	Jaune	Circulaire	Plate	Regulier	Opaque	Lisse	Rose(-)	Bacille
8	Jaune	Circulaire	convexe	Regulier	Opaque	Lisse	Violet(+)	Bacille
9	Blanchatre	Circulaire	Plate	Regulier	Opaque	Lisse	Rose(-)	Coccobacille
10	Oranger	Circulaire	convexe	Regulier	Opaque	Lisse	Violet(+)	Cocci
11	Beige	Circulaire	Plate	Regulier	Opaque	Lisse	Rose(-)	Bacille
12	Jaune	Circulaire	Plate	Regulier	Opaque	Lisse	Violet(+)	Bacille
13	Beige	Circulaire	Plate	Regulier	Opaque	Lisse	Rose(-)	Bacille
14	Blanchatre	Circulaire	convexe	Regulier	Opaque	Lisse	Violet(+)	Cocci
15	Jaune	Irregulier	Plate(incruste)	irregulier	Opaque	Rugueuse	Violet(+)	Bacille
16	Beige	Irreguliere	Plate	irregulier	Opaque	Lisse	Rose(-)	Bacille

17	Oranger	Circulaire	Plate	Regulier	Opaque	Lisse	Rose(-)	Cocci
18	Jaune	Circulaire	Eleve(incrustedans La gelose)	irregulier	Opaque	Rugueuse	Rose(-)	Coccobacille
19	Jaune	Irregulier	Plate (incruste dans La gelose)	irregulier	Opaque	Rugueuse	Violet(+)	Bacille
20	Jaune	Irregulier	Plate (incruste dans la gelose)	irregulier	Opaque	Rugueuse	Violet(+)	Coccobacille
21	Jaune	Irregulier	Plate (incrustedans la gelose)	irregulier	Opaque	Rugueuse	Rose(-)	Bacille
22	Beige(tres Clair)	Circulaire	Elevee	Regulier	Opaque	Lisse	Violet(+)	Coccobacille
23	Jaune	Circulaire	Eleve	Regulier	Opaque Poudreusee	Lisse	Violet(+)	Bacillefilamenteux
24	Blanchatre	Circulaire	Plate	Regulier	Transparente	Lisse	Rose(-)	Cocci
25	Jaune	Circulaire	Eleve	Regulier	Opaque	Lisse	Rose(-)	Bacille

	
<p><b>La souche 1</b></p>	<p><b>La souche 3</b></p>
	
<p><b>La souche 6</b></p>	<p><b>La souche 11</b></p>
	
<p><b>La souche 12</b></p>	<p><b>La souche 17</b></p>

	
<b>La souche 14</b>	<b>La souche 22</b>
	
<b>La souche 10</b>	<b>La souche 13</b>
	
<b>La souche 15</b>	<b>La souche 16</b>

	
<p><b>La souche 23</b></p>	<p><b>La souche 18</b></p>
	
<p><b>La souche 21</b></p>	<p><b>La souche 25</b></p>
	
<p><b>La souche 5</b></p>	<p><b>La souche 20</b></p>

	
<p><b>La souche 17</b></p>	<p><b>La souche 23</b></p>
	
<p><b>La souche 21</b></p>	<p><b>La souche 25</b></p>
	
<p><b>La souche 18</b></p>	

Les aspects macroscopiques ainsi que les résultats de la coloration de Gram des bactéries issues de l'échantillon OBM2 sont rapportés sur le tableau 5, et en dessous quelques exemples de d'aspects sur gélose et observations microscopiques faites.

**Tableau 5:** Aspect macroscopiques des souches isolées « OBM2 »

Souche	Couleur	Forme	Elevation	Contour	Opacité	Surface	Gram	Forme
1'	Blanchâtre	Circulaire	Plate	Régulier	Opaque	Lisse	Rose(-)	Bacille
2'	Beige	Circulaire	Plate	Régulier	Opaque	Lisse	Violet(+)	Bacille
3'	Beige	Circulaire	Plate	Régulier	Opaque	Lisse	Violet(+)	Coccobacille
4'	Rose	Circulaire	Plate	Régulier	Opaque	Lisse	Rose(-)	Coccobacille
5'	Blanchâtre	Circulaire	Plate	Régulier	Opaque	Lisse	Violet(+)	Coccobacille
6'	Jaune	Circulaire	Plate	Régulier	Opaque	Lisse	Rose(-)	Coccobacille
7'	Jaune	Lobe	Elevé	Irrégulier	Opaque	Rugueuse	Violet(+)	Coccobacille
8'	Jaune	Circulaire	Plate	Régulier	Opaque	Lisse	Rose(-)	Cocci
9'	Beige	Circulaire	Plate	Régulier	Transparente	Lisse	Rose(-)	Bacille
10'	Beige	Circulaire	Plate	Régulier	Opaque	Lisse	Violet(+)	Bacille
11'	Jaune	Circulaire	Plate	Regulier	Opaque	Lisse	Rose(-)	Cocci

:



**La souche 2'**



**La souche 7'**



**La souche 9'**



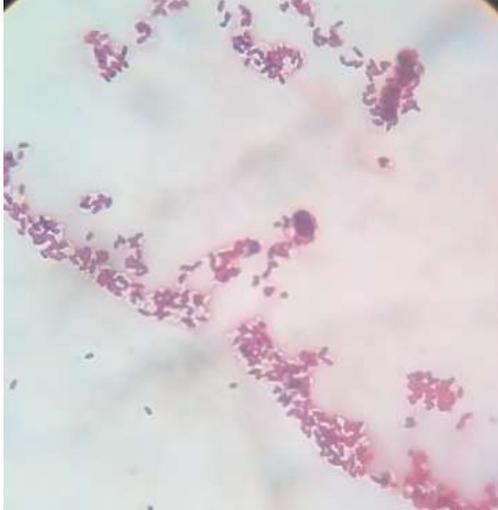
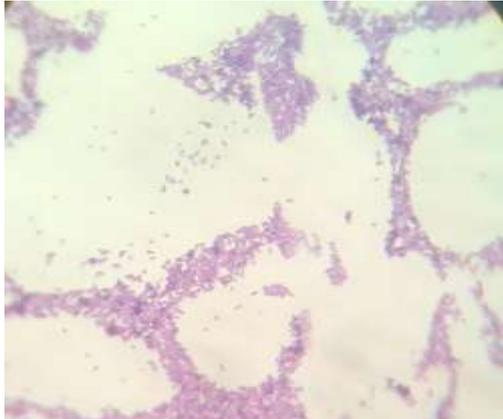
**La souche 11'**



**La souche 1'**

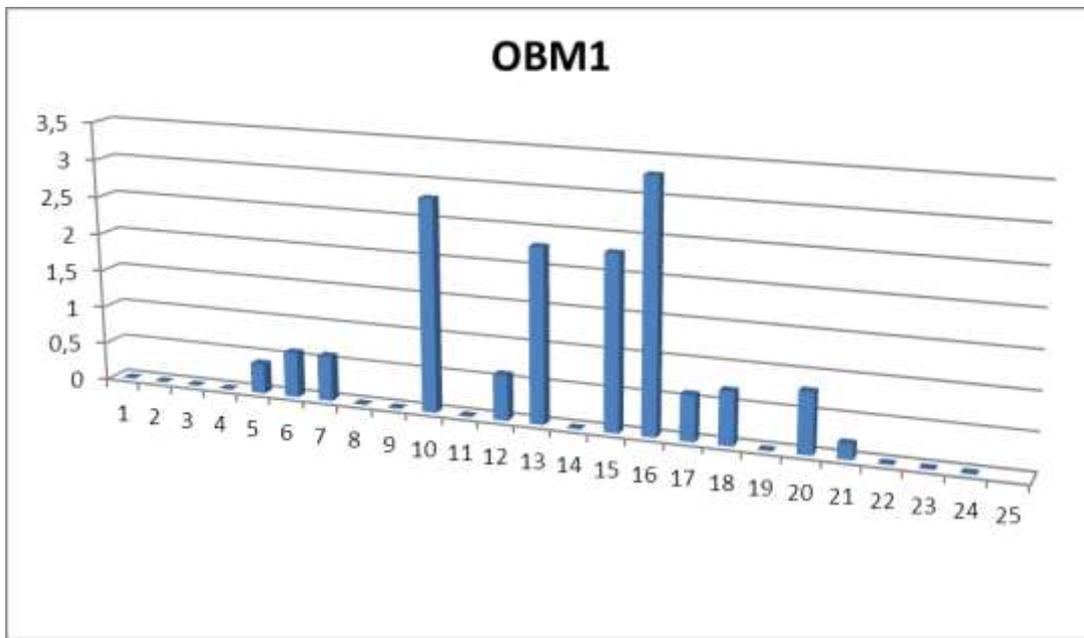


**La souche 6'**

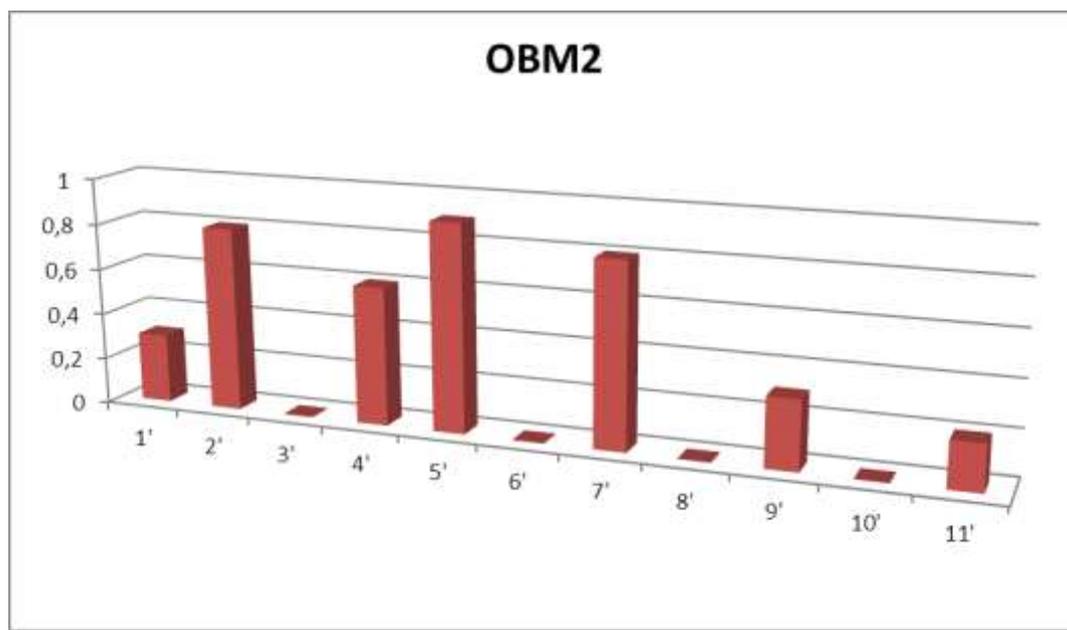
	
<p><b>La souche 2'</b></p>	<p><b>La souche 7'</b></p>
	
<p><b>La souche 9'</b></p>	<p><b>La souche 11'</b></p>

**4-Détermination de l'indice d'émulsification :**

Après avoir réalisé le test d'émulsification et mesuré ensuite la hauteur d'émulsion l'ensemble des résultats obtenus sont mentionnés dans les deux diagramme a bâtons ci-dessous.



**Figure : 7** Diagramme montrant la capacité des souches d'OBM1 à émulsionner le Kérosène.



**Figure : 8** Diagramme montrant la capacité des souches d'OBM2 à émulsionner le kérosène.

D'après les deux diagramme on constate que l'échantillon OBM 1 présente un nombre important de souches formatrice d'émulsion après 24 heures de la réalisation de test d'émulsification mais seuls les souches 10, 13, 15, 16, 5' seront choisis pour la poursuite de notre travail .

Après avoir mesuré la hauteur de Kérosène émulsionné et calculer l' $E_{24}$ , les résultats obtenus sont restitués dans le tableau 5.

**Tableau 6:** résultat du test d'émulsification après 24 h de repos.

La souche	Hauteur de Kérosène émulsionné (cm)	Indice $E_{24}$	Sol
16	3.3	62.26%	OBM1
10	2.8	52.83%	OBM1
13	2.3	43.39%	OBM1
15	2.3	43.39%	OBM1
5'	0.9	16.98%	OBM2

D'après le tableau on constate que la souche 16 apparait la plus émulsifiante avec  $E_{24}$  de 62.26% , alors que la souche 5' présente le plus faible pourcentage.



**Figure 9:** Un exemple d'emulsification en présence de témoin négatif.

La production de biosurfactants est un phénomène communément observé lors de la croissance d'un microorganisme sur des substrats insolubles dans l'eau et la réduction de la tension superficielle du milieu ainsi que la formation d'une émulsion stable indiquent une Production efficace. (Pruthi et *al.*, 1995).

Cameotra et *al.*(2009) explique ce phénomène comme étant l'un des comportements des microorganismes pour augmenter la biodisponibilité de plusieurs substrats hydrophobes, qui sont peu utilisés à cause de leur insolubilité dans l'eau.

Le principal 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.(Fiechter A ., 1992 )

Les milieux pollués chroniquement sont plus riches en bactéries hydrocarbonoclastes (HCB). En cas d'apport soudain de pétrole, l'abondance relative de ces HCB permet d'assurer la mise en place rapide d'un consortium de dégradation (Atlas M ., 1981).

Ensuite, les bactéries sont capables de transférer des gènes du catabolisme des hydrocarbures par conjugaison. Toujours en raison du nombre d'HCB, la probabilité pour que ce type d'échange survienne dans un environnement chroniquement pollué est plus grande (Leahy et *al.*,1990)

Vu la nature complexe et la variété de ces composés la dégradation effectuée par un consortium est souvent plus efficace. (Laforune I., 2007).

**5-Résultats des tests physiologiques :**

**5- 1-Influence de température :**

Afin d'étudier l'influence de la température sur la croissance des souches isolées et déterminer leur température optimales correspondante, différentes valeurs de température allant de 4°C à 45°C ont été testées, les résultats obtenus après 24 h sont présentés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 7:** résultat du test de température après 24 heures d'incubation.

Souche	4°C	30°C	37°C	45°C
16	-	+	+/-	-
15	-	+	+	-
13	-	+	+	+
10	-	+	+	-
5'	-	+	+	-

**+ : croissance forte      +/- : croissance faible      - : pas de croissance**

D'après les résultats obtenus, toutes les souches testées ne poussent pas à 4°C par contre elles sont toutes capables de croître à 30°C et 37°C.

On constate que la souche 13 est la seule qui a poussé à 45°C.

L'activité métabolique des microorganismes est généralement observée à une température comprise entre 30 et 40 °C. Au-delà de la température optimale de croissance et de biodégradation on assiste à une augmentation de la toxicité des hydrocarbures et une diminution de l'activité métabolique (Soltani M., 2004).

Une diminution de la température est généralement accompagnée par une diminution de la vitesse de biodégradation qui peut être expliquée par une décroissance de l'activité

enzymatique. Des températures plus élevées ont pour effet d'augmenter la vitesse de biodégradation (Walworth *et al.*, 2001).

Djaber tazdait *et al.*, montrent que les températures 27°C et 30°C semblent être les plus indiqués pour la production de biosurfactant.

**5-2- Influence de pH :**

L'effet de la variation de pH sur la croissance des 5 souches sélectionnés a été étudié, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 8:** résultat du test de pH après 24 heures d'incubation.

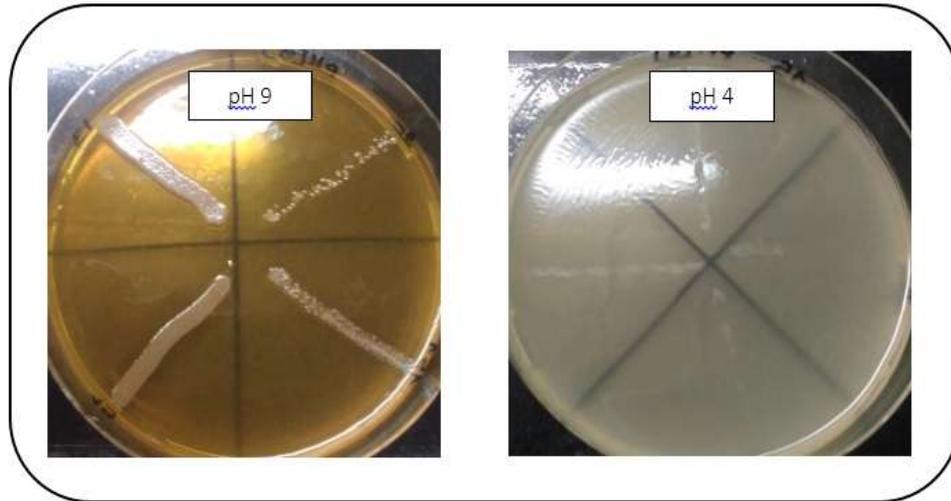
Souche	pH4	pH5.5	pH7	pH8	pH9
16	-	+/-	+	+	+
15	-	+	+	+	+
13	-	+	+	+	+
10	-	+/-	+	+	+
5'	-	+/-	+	-	+/-

A pH 4 aucune des souches n'a pu croître même après 48 heures d'incubation, alors que toutes les souches poussent quand le pH est 7 et 9 .

A pH 5.5 les deux souches (15,3) montrent une croissance forte alors que les souches (16,10,5') montrent une croissance très faible après 24 h d'incubation.

A pH 8 on constate une croissance forte chez toutes les souches testées à l'exception de 5' qui ne pousse pas même après 48 heures d'incubation.

la biodégradation a pH5 : est moins bonne que dans pH égal a7, un pH acide aurait du favoriser les champignons et les levures par rapport aux bactéries .L'ajustement de pH de sol a 5 ralentit la biodégradation des HAP, il s'agit de la diminution de la vitesse de dégradation du a la baisse de pH.(Bidaud C.,1998) .



**Figure 10:** croissance des bactérienne à pH 4 et pH 9.

### 5-3-Influence d'NaCl :

**Tableau 9 :** résultat test NaCl après 24 heures d'incubation :

Souche	NaCl 0%	NaCl 0.1%	NaCl 1%	NaCl 10%
16	+	+	+	-
15	+	+	+	-
13	+	+	+	-
10	+	-	-	-
5'	+	+	- (+ a 48h)	-

Après 24 heures d'incubation toutes les souches ne poussent pas en présence d'NaCl a 10%, en revanche toutes ses souches présentent une meilleur croissance en milieu exempté d'NaCl.

La souche 10 ne pousse pas quand le pourcentage d'NaCl est de 1% et 0.1% même après 48 heures d'incubation.

Après 24 heures d'incubation 5' ne montre pas une croissance quand le pourcentage d'NaCl est de 1% alors qu'elle pousse après 48 heures d'incubation.

La souche 10 ne pousse quand en absence total d'NaCl.

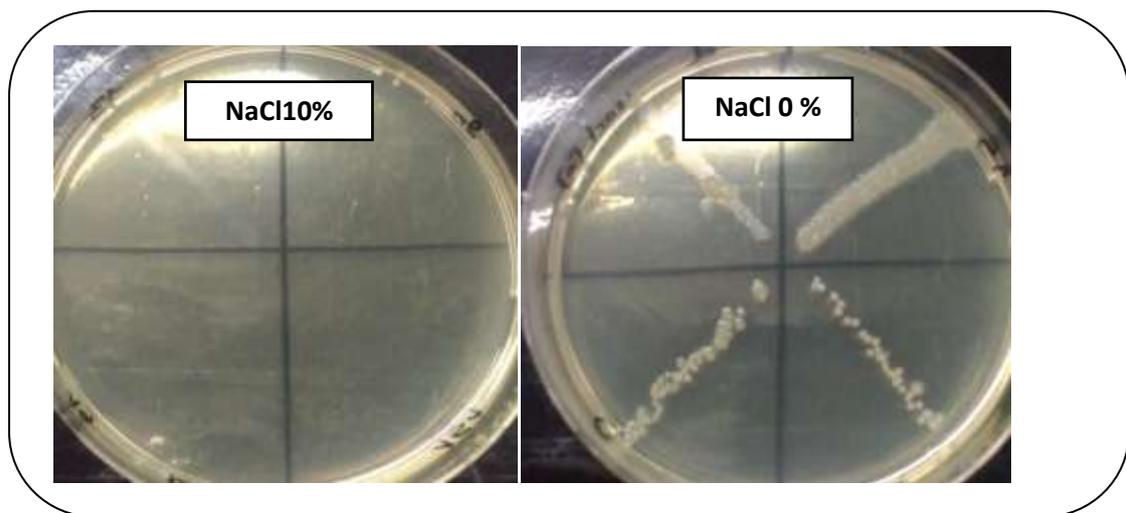
La salinité diminue le nombre de micro-organismes dans le sol. Elle ralentit les processus de l'humification et de la minéralisation des matières organiques. En effet, de tous les processus biologiques, la nitrification est la plus touchée, ainsi que le dégagement de CO<sub>2</sub>. (Mallouhi N., 1989).

Des chercheurs ont trouvé que la biodégradation des hydrocarbures est maximale pour une concentration en sel de 0,4 M et diminue lentement pour des valeurs supérieures et inférieures à celle-ci. (Soltani M., 2004).

Ward et *al* (1978) ont montré que la vitesse de la biodégradation des hydrocarbures décroît lorsque la salinité passe de 3,3 à 28,4%, et ils ont attribué ces résultats à une réduction générale des vitesses métaboliques des microorganismes.

Quand la concentration en chlorure de sodium dépasse 1 M, l'élimination du pétrole brut diminue rapidement. Pour ce type de substrat, les fortes salinités constituent donc une barrière naturelle pour la biodégradation. (Soltani M., 2004).

Les figures suivantes illustrent la croissance des isolats à différents pourcentages de NaCl.



**Figure 11** : croissance bactérienne en présence de NaCl (10% ,0%).

### 5-4-Influence du polluant :

Ce test est raté à cause du milieu de culture. Lorsque le polluant est ajouté à différentes concentrations à la gélose, cette dernière ne se solidifie pas.

**6 -Extraction de biosurfactant :**

La technique d'extraction par précipitation acide permet de récupérer un culot concentré produit après centrifugation. Dans notre cas, aucun culot n'est formé. Le résultat est alors négatif, il n'y a pas de biosurfactant extracellulaires.

Cependant, ces mêmes bactéries ont montré une activité émulsifiante du kérosène avec le test d'émulsification. Ce qui nous pousse à penser que ces souches sont aptes à produire un biosurfactant intracellulaire.

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

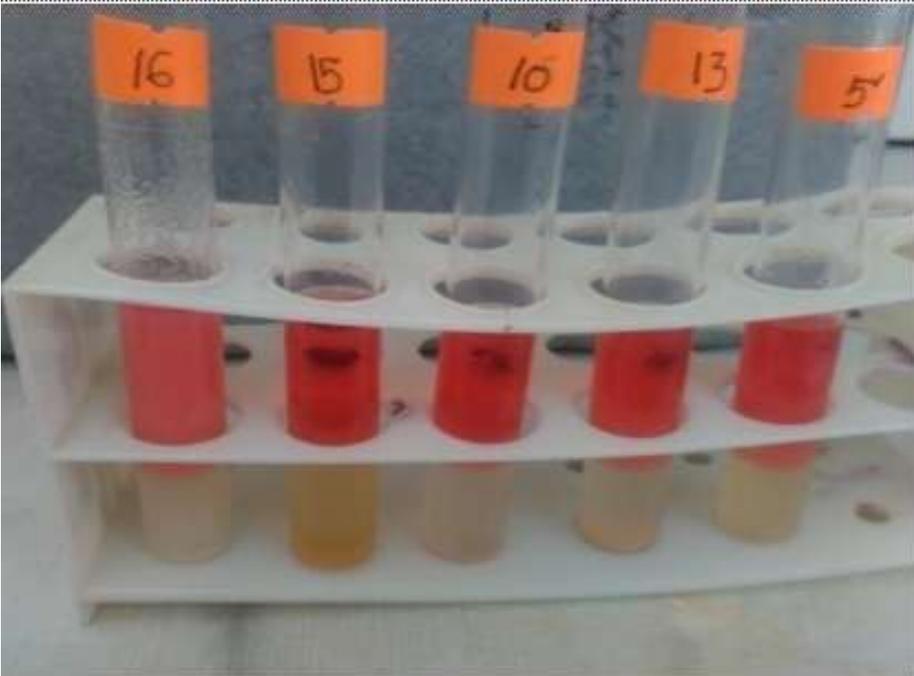
Les résultats obtenus après réalisation du test d'émulsification à partir du culot de la première centrifugation sont présentés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 10:** variation du taux d'émulsification entre les souches (test confirmatif)

La souche	Hauteur de Kérosène émulsionné (cm)	E <sub>24</sub>
16	4	75.47%
5'	2.6	49.05%
13	1.4	26.41%
10	0.9	16.98%
15	0.2	3.77%

D'après le tableau, toutes les souches sont émulsifiantes, ce qui confirme l'hypothèse de production de biosurfactant intracellulaire, avec un E<sub>24</sub> variable d'une souche à l'autre.

La souche 16 apparaît comme étant la plus émulsifiante avec un E<sub>24</sub>=75.47%.



**Figure 12 :** variation du taux d'émulsion des souches testés



**Figure 13 :** Taux d'emulsification de la souche 16

## Conclusion

L'objectif principal de cette étude était d'étudier la biodiversité bactérienne des boues de forage pétrolier et d'isoler des bactéries aptes à dégrader des hydrocarbures grâce à la production de biomolécules nommées « biosurfactants ».

Dans un premier temps nous avons réalisé une étude du potentiel hydrogène qui influence considérablement la population colonisant le sol, en mesurant le pH-eau et pH-KCl. La communauté bactérienne cultivable est mise en évidence à travers l'isolement de souches bactériennes à partir de deux échantillons prélevés au même site dans un espace de temps de 2 années.

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

1-l'isolement sur gélose nous a permis de sélectionner 25 souches à partir d'OBM1 et 11 souches à partir d'OBM2 qui diffèrent dans l'aspect macroscopique et microscopique.

2- la réalisation du test d'émulsification et le calcul d' $E_{24}$  nous a permis de déceler un pouvoir tensioactif dû à la présence de biomolécules spécifiques qui sont les biosurfactants.

3-le test d'émulsification nous a montré que les souches (10, 13, 15, 16, 5') sont les plus émulsifiantes dont l'ensemble sont des bacilles à Gram positif à l'exception de la souche 16 qui est une bactérie à Gram négatif .

4-Une étude de l'influence du pH et d' NaCl est réalisée sur les 5 souches ce qui a démontré que :

La croissance des bactéries sélectionnées est favorisée par des pH variant de 5.5 à 9 sauf la souche 5' qui ne pousse pas à pH 8

Le maximum d'activité métabolique est observé à une température allant de 30 à 37°C

Les souches étudiées tolèrent jusqu'à 1% d'NaCl à l'exception de la souche 10 qui ne pousse que dans un milieu dépourvu d'Na Cl.

5-un essai d'extraction de biosurfactant en suivant la méthode de la précipitation acide a abouti à un résultat négatif. La réalisation du test d'émulsification à partir des cellules condensées en culot a révélé un résultat positif pour toutes les souches. Il ressort que ces bactéries ont des biosurfactants liés à la cellule et qui ne sont pas sécrétés dans le milieu.

La souche 16 apparait la plus émulsifiantes avec un  $E_{24} = 74.47\%$

A la lumière de ces résultats obtenus il est souhaitable de compléter cette étude par des approches plus approfondies à savoir :

- 1- Un test de l'efficacité d'une biomasse bactérienne de ce type dans la bioremediation de sols pollués au pétrole brut ou ses dérivés
- 2- Une étude approfondie des propriétés physico-chimiques des biosurfactants liés à la cellule pour mieux comprendre leur structure et leur nature.
- 3- un séquençage après amplification d'ADNr 16s dans le but d'une taxonomie moléculaire de ces bactéries.

## Références bibliographiques

### A

**Abbia S, Guittoun L .,(2014).** Les méthodes de traitement des sols pollués par les hydrocarbures .mémoire de licence .Microbiologie Fondamentale et appliqué : Université Kasdi Merbah Ouargla.

**Amellal, N., (2003).** Devenir des hydrocarbures poly aromatiques dans le sol : impact des paramètres chimique et microbiologiques .thèse de doctorat :université Sidi Mohamed Abdallah.

**Al arajil A , Basri ,Salah M.A.B.,(2007).** Microbiol biosurfactant. Miniriview, Vol (15).

**Atlas,M.,(1981).**Biodegradation of petrolium hydrocarbons , Microbiological reviews , vol(45).

### B

**Belhabib A ,Balla F, Tama A S .,(2013).** Les fluides de forage a base d'huile impact sur l'environnement et technique de traitement. Mémoire de master : forage : Université Kasdi Merbah Ouargla.

**Bidaud,C.,(1998).** Biodegradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques approche microbiologique et application aux traitement d'un sol pollué .these en vue d'obtention de grade de docteur en genie des pricedes :institut national polytechnique de grenoble.

**Brabhu y, Phale P.,( 2003).** Novel metabolic pathway , role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation.microbiolbiotechnol,vol( 61 ).

**Bireche y, Berregui f.,(2014) .** Effet de salinité sue l'activité des bactéries hydrocarbonoplastes .mémoire de master académique .Microbiologie appliqué : Université Kasdi Merbah Ouargla.

**Bodour A A,Gerrero-Barajas C.et MaierM.,(2003).**Structure and characterisation of flavolipids a novel class of biosurfactants produced by flavolipids.

**Bouderham, A., (2011).** Utilisation des souches bactériennes telluriques autochtones dans la bio détection et la bioremediation des sols pollués par les hydrocarbures .thèse de magister. Microbiologie appliquée : Université Gasdi Merbah Ouargla.

## Références bibliographiques

### C

**Cameotra S ,Singh L., (2009).** synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane up take by pseudomonas species .microbiol fact,vol (8).

### D

**Tazdait D, Salah R, Mezoughem S.** Etude de l'influence de quelques parametres operatoires sur la production de biosurfactant a partir d'une souche *Pseudomonas aeruginosa*.

**Djerbaoui, A N .,(2011).** Utilisation de souches bactériennes autochtones de la production de bio surfactants et la bioremediation des sols de Hassi Messaoud contaminés par les hydrocarbures .thèse de magister : Microbiologie appliquée : Université Kasdi Merbah Ouargla.

### F

**Fiechter A, Mata S., (1992).** Biosurfactant moving to wards Industrial application .Tibtech,vol(10).

### G

**Gabet, S .,(2004).** Remobilisation d'hydrocarbures aromatiques polycycliques présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. Thèse de doctorat : Université de Limoges.

**Gaudi, f., (2014).**Bioremediation des sols pollues aux hydrocarbures.  
Master2 :Université de Rennes.

**Guermouche M'rassi A .,(2014).** Caractérisation moléculaire des bactéries impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures .thèse de doctorat .Microbiologie : Université d'Oran .

## Références bibliographiques

### K

**Khoja, M .,(2008).** Les fluides de forage étude des performances et considération environnementales.these de doctorat : Génie des procédés et de l'environnement : Institut national poly technique de Toulouse.

### L

**Lafortune, I., (2007).** Etude de la diversité d'un consortium bactérien capable de dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans un système biphasique .memoire présenté en vue d'obtention de grade de maître des sciences en microbiologie appliquée .université de Québec.

**Lapointe ,M., (1996).**Mobilisation en colonne d'un hydrocarbure aromatique polycyclique (pyréne) adsorbé au sol au moyen d'un biosurfactant produit par *Pseudomonasaeruginosa*.memoire de maîtrise des sciences : Université de Québec Sainte Foy.

**LeahyJ G ,Colwell RR., (1990).** Microbial degradation of hydrocarbons .american society for microbiology.

**Limam,I.,(2014).**Etude des fonctions écologiques des sols des espaces verts urbains de la région centre de France .Biologie industrielle :Institut national des sciences appliquées et de technologie.

**Lounés hadj Sahraoui A ,Anthony V,Roger D., (2004).** Les agents de bioremediation des sols pollués par les hydrocarbures polycycliques aromatiques .Revue francophone d'écologie.

### M

**Mallouhi, N .,(1989).** Etude de la dynamique de matière organique dans les sols affectés par la salinité. Tropicultura .

**Marc ,C .,(2015).** Influence des facteurs biogéochimiques et de l'ajout de bio surfactant sur la biodégradation des HAPdans des sols contaminés de manière diffuse .thèse de doctorat : Université de Rouen.

## Références bibliographiques

**Marchal N , Bourdon j., (1982)** .Les milieux de cultures pour isolement et identification biochimique des bacteries.Ed.Doin,paris.

**Mellak, A et al.,(2007)**. Influence de carboxy methycellulose de sodium et du sel sur le comportement rhéologique d'une suspension d'argile. European journal of scientifique reserch, vol( 19).

### P

**Pétard ,J.,(1993)** .Les methods d'analyse ,analyse de sol.Document de travail ,centre de Noumea ,Institutue francais de recherche scientifique pour le developement en cooperation.

**Pruthi ,V .,(2003)**. Effect of the nutrients on optimal production of biosurfactants by *Pseudomonas putida*.

### R

**Ragouilliaux, M., (2007)**. Etude rhéologique de système émulsion inverse / argile organophile application au boue de forage petrolier.these de doctorat : physique des liquides : Université Pierre et Marie Curie.

### S

**Sauret ,C.,(2001)**.Ecologie des communautes bacteriennes soumises a une pollution petroliere , influence des facteurs envirommenteaux , de la predation et de la recurrence des polluants .these de doctorat :Microbiologie envirommental :Universite Pierre et Marie Curie.

**Soltani,M.,(2004)**. Distribution lipidique et voie métabolique chez 4 bacteries Gram hydrocarbonoclastes. Thèse de doctorat ,chimie analytique : université de Paris.

### W

**Walid, N., (2015)**. Etude pédologique et floristique de différents sols selon un gradient de pollution. Thèse de magister .Ecologie végétale appliqué et gestion de l'environnement : université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.

**Ward DM, Brock TD.,(1978)**.Hydrocarbon biodegradation inhyper salin environnement. American society of microbiology, Vol(35) .

## Références bibliographiques

**Walworth J, Braddock J, Woolard C.,(2001).** Nutrient and temperature interactions in bioremediation of cyrics soils. Cold region science and technology, vol (32).

**Annexe1 : Matériel utilisé****1. Matériel du laboratoire :**

<b>Equipments</b>	<b>Verrerie et matériels en plastique</b>
Etuve	Erlenmeyers 250ml, 500ml, 1000ml
Agitateur-plaque chauffante	Tubes a essai
Bain marrie	Pipettes Pasteur
Incubateuragitateur	Pipette graduées
Hotte à flux laminaire	La poire
Becbunsen	Anse de platine
Micopipettes	Lames lamelle
Centrifugeuse à froid	Parafilm
Réfrigérateur	Boite de pétri en plastique
Balance de pesé	Becher 75ml, 100ml, 1000ml
Microscope optique	Flacons 180ml ,250 ml
Autoclave	Pinces
Vortex	Fioles de 50ml, 100ml, 500ml, 1000ml

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

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

**1.2. Bouillon nutritif :**

<b>Ingrédients</b>	<b>Quantité</b>
<b>Extrait de viande de bœuf</b>	<b>2.0g</b>
<b>Extrait de levure</b>	<b>1.0g</b>
<b>Peptone</b>	<b>5.0g</b>
<b>Na Cl</b>	<b>5.0g</b>
<b>Eau distillée</b>	<b>1000ml</b>
<b>Glucose</b>	<b>1.0g</b>
<b>pH</b>	<b>7.2</b>

**1.3. Milieu LB :**

<b>Ingredients</b>	<b>Quantité</b>
<b>Peptone</b>	<b>10 g</b>
<b>Extrait de levure</b>	<b>5 g</b>
<b>NaCl</b>	<b>10 g</b>

**2. Réactifs et solution :**

- éthanol-Acétone
- Eau distillée
- Violet de gentiane
- Fuchsine
- Pétrole brute
- Huile a immersion
- Solution de lugol
- HCl
- Oil red (colorant d'huile)

**Annexe3 : Coloration :**

**1. Coloration de Gram :**

- Selon singleton(1999), la coloration de Gram s'effectue selon les étapes suivantes :
- Préparer le frottis bactérien à la chaleur de bec bunsen
- Recouvrir au violet de gentiane pendant 1minute. Eliminer l'excès par l'eau courante
- Ajouter du lugol : deux bains de 45 secondes, jeter l'excès par l'eau courante.
- Traiter à l'alcool 95° pendant 30 secondes, rinçage a l'eau puis séchage
- Recolorer à la fushine pendant 1 à 2 minutes, rinçage à l'eau puis séchage.
- L'observation se fait en ajoutant l'huile à immersion, les bactéries Gram positif se colorent en violet alors que les bactéries à Gram positif se colorent en rose.

Analyse de la diversité bactérienne d'une boue à base d'huile et recherche de bactéries hydrocarbonoclastes

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

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

A cet égard, l'homme doit prendre des mesures et adopter des stratégies basées sur des technologies du vivant, pour limiter l'impact des déversements du pétrole brut sur l'environnement.

L'objectif de notre travail est d'isoler et caractériser des bactéries ayant le pouvoir d'utiliser les hydrocarbures comme unique source de carbone tout en synthétisant des produits appelés biosurfactants. L'échantillonnage de sol est fait au niveau d'une boue de forage pétrolier (boue à base d'huile) dans la région d'In Salah située dans l'extrême sud algérien.

L'ensemble des isolats sont purifiés et testés pour leur capacité d'émulsification grâce à la production de biosurfactants. L'estimation de ce pouvoir par l'indice d'émulsification  $E_{24}$ , a permis de sélectionner cinq souches comme étant les plus émulsifiantes.

Une étude de l'influence des paramètres physico-chimiques à savoir : le pH, la température, et l'NaCl est réalisée sur les souches dans le but d'optimiser leur conditions de croissance.

Une extraction de biosurfactant par précipitation acide est réalisée sur les fermentations des cinq souches émulsifiantes. Aucun extrait n'est obtenu. Cela laisse supposer que le type de biosurfactant chez ces bactéries n'est pas extracellulaire mais lié aux cellules.

**Mots clés :** hydrocarbures, biosurfactants, souches émulsifiantes, boue à base d'huile

**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de biotechnologie

Jury d'évaluation :

**Président du jury :** Mme Alatou Radia (Maitre de conférences «A» à UFC).

**Rapporteur :** Mme Guergouri Ibtissem (Maitre Assistant «A» à UFC).

**Examineurs :** M.Chabbi Rabah (Maitre Assistant «A» à UFC).

**Date de soutenance :**20/06/2017