



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 والحياة

Département : Microbiologie

قسم : ميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biologie moléculaire des microorganismes*

Intitulé :

Contribution à l'étude du pouvoir dégradant de *Pseudomonas aeruginosa* et *Serratia marcescens* vis-à-vis du pétrole brut et du gasoil

Présenté et soutenu par : *Benkhalef Rania*

Le : 03/07/2019

Bouarioua Sabrina

Jury d'évaluation :

Président du jury : *Mme Sakhri Nadjoua* (Maitre de conference <<A>> UFMConstantine).

Rapporteur : *Mme Guergouri Ibtissem* (Maitre-assistant <<A>> - UFM Constantine).

Examineurs : *Mr Chabbi Rabeh.* (Maitre-assistant <<A>> - UFM Constantine).

*Année universitaire
2018 - 2019*

Remerciements

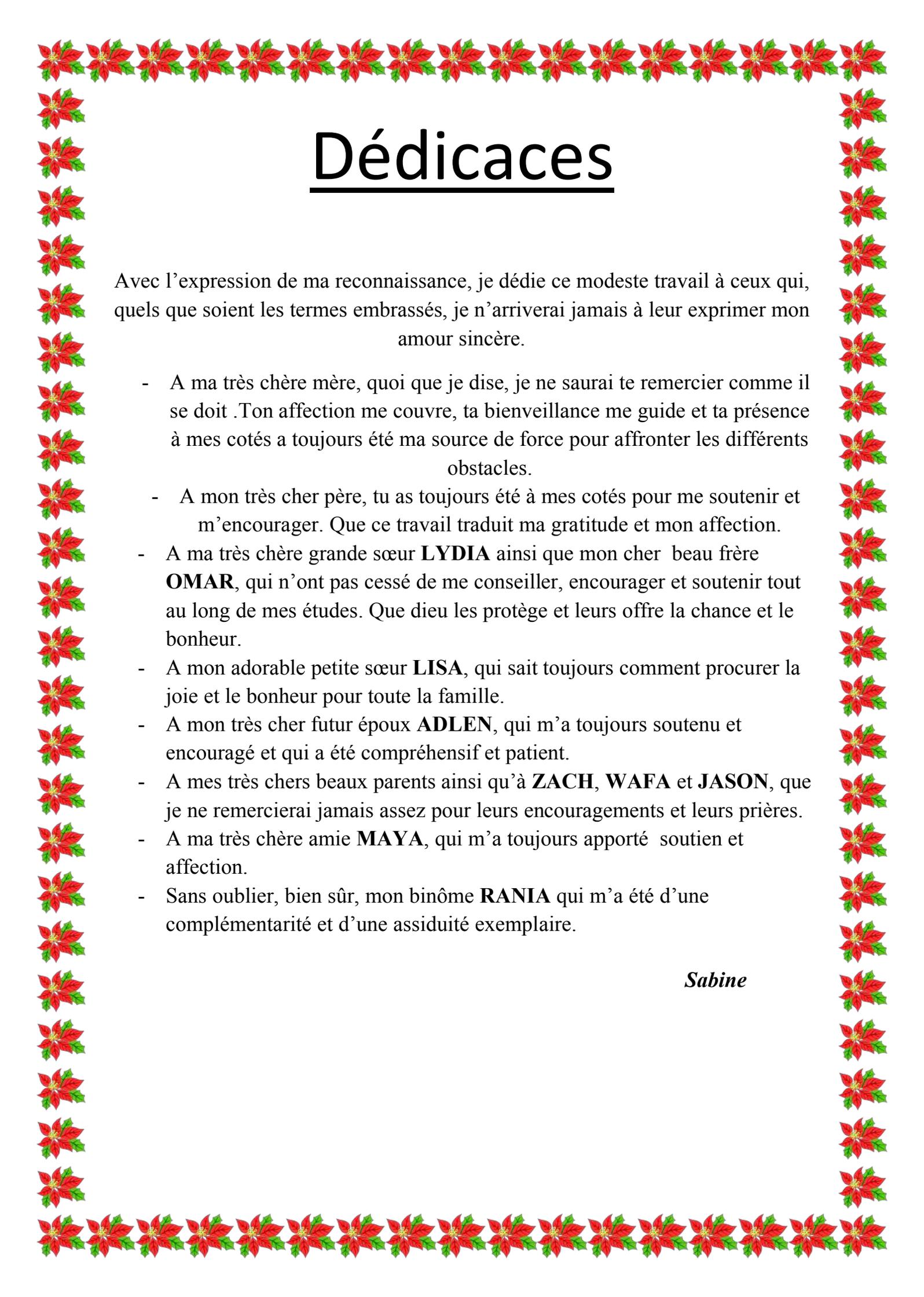
Ce travail a été mené au laboratoire de microbiologie de l'Université des frères Mentouri 1.

*On tient Tout d'abord à remercier Dieu de nous avoir donné la force et le courage
d'accomplir ce modeste travail.*

*On voudrai adresser toute notre gratitude à notre encadreur Mme GUERGOURI IBTISSEM
maitre-assistant <<A>> d'avoir accepté de nous encadrer ainsi que de sa présence, ses
orientations, son aide et ses conseils constructifs.*

*Par ailleurs, on adresse nos sincères remerciement à Mme SAKHRI NADJOUA et Mr
CHABBI RABAH de nous avoir honoré de leur présence et d'avoir accepté de juger ce
travail.*

Enfin, on remercie toute personne ayant contribué de près ou de loin à ce travail.



Dédicaces

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverai jamais à leur exprimer mon amour sincère.

- A ma très chère mère, quoi que je dise, je ne saurai te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.
- A mon très cher père, tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.
- A ma très chère grande sœur **LYDIA** ainsi que mon cher beau frère **OMAR**, qui n'ont pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Que dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur.
- A mon adorable petite sœur **LISA**, qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.
- A mon très cher futur époux **ADLEN**, qui m'a toujours soutenu et encouragé et qui a été compréhensif et patient.
- A mes très chers beaux parents ainsi qu'à **ZACH**, **Wafa** et **JASON**, que je ne remercierai jamais assez pour leurs encouragements et leurs prières.
- A ma très chère amie **MAYA**, qui m'a toujours apporté soutien et affection.
- Sans oublier, bien sûr, mon binôme **RANIA** qui m'a été d'une complémentarité et d'une assiduité exemplaire.

Sabine

Dédicace

A MA TRÈS CHÈRE MÈRE

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il le fallait. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

A MON TRÈS CHER PÈRE

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes sont-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Ta patience sans fin, ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir. Que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.

Je tiens également à remercier mes très chères frères et sœurs pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,

A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,

A tous mes amis, je vous aime énormément,

Un grand merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire

A tous ceux et celles que j'aime

Sans oublier mon binôme qui a su être un vrai partenaire tout au long de ce travail.

Rania

Résumé

Le présent travail a été mené en vue de mettre en œuvre la capacité de deux souches bactériennes à dégrader le pétrole brut et le gasoil et épurer un sol artificiellement pollué en conditions du laboratoire.

Ces bactéries proviennent de sols contaminés par le pétrole brut. I2 et H9 sont deux *Pseudomonas aeruginosa* et M6 est une *Serratia marcescens*. Elles ont fait l'objet d'étude morphologique macroscopique et microscopique pour s'assurer de leur pureté.

Cinq bacs de traitement contenant chacun un mélange de sol et de sable contaminés de l'un des polluants sont utilisés. Deux servent pour la bioaugmentation par les bactéries hydrocarbonoclastes et deux pour l'atténuation naturelle grâce aux microorganismes indigènes, un dernier étant un témoin non contaminé.

L'efficacité du traitement avec le consortium bactérien (I2+H9+M6) a été évaluée d'une part par la mesure de la biomasse microbienne et d'une autre part par un test de germination et le calcul de son indice, durant 45 jours d'expérimentation.

D'après les résultats, l'épuration du sol contenant le pétrole brut par les bactéries indigènes ou le consortium inoculé a donné un meilleur rendement (74,05%) en peu de temps par comparaison à celle du gasoil (8,55%) avec une dominance de *Serratia marcescens* pour le gasoil et *Pseudomonas aeruginosa* pour le pétrole brut.

Mots clés : Pétrole brut, gasoil, bioaugmentation, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*.

Abstract

This work was carried out to implement the ability of two bacterial strains to degrade crude oil and diesel and purify artificially polluted soil under laboratory conditions.

These bacteria come from soils contaminated with crude oil. I2 and H9 are two *Pseudomonas aeruginosa* and M6 is a *Serratia marcescens*. They have been subjected to macroscopic and microscopic morphological studies to ensure their purity.

Five treatment tanks, each containing a mixture of soil and sand contaminated with one of the pollutants, are used. Two are used for bioaugmentation by hydrocarbonoclast bacteria and two for natural attenuation by native microorganisms, the latter being an uncontaminated control.

The effectiveness of the treatment with the bacterial consortium (I2+H9+M6) was evaluated using two methods. First, by measuring the microbial biomass. Second, by germination testing and calculating its index, during 45 days of experimentation.

According to the results, the purification of the soil containing crude oil by indigenous bacteria or the inoculated consortium gave a better yield (74,05%) in a short time compared to diesel (8,55%) with a dominance of *Serratia marcescens* for diesel and *Pseudomonas aeruginosa* for crude oil.

Key-words: Crude oil, diesel, bioaugmentation, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*.

ملخص

تم إجراء هذا العمل لتفعيل قدرة سلالتين بكتيريتين على تحلل الزيت الخام والديزل وتنقية التربة الملوثة اصطناعياً في ظروف المختبر.

هذه البكتيريا تأتي من التربة الملوثة بالنفط الخام. I2 و H9 هما *Pseudomonas aeruginosa* و M6 هي *Serratia marcescens*. و قد تم دراسة مرفولوجيتها من حيث الخصائص الظاهرية والمجهريّة لضمان نقائها.

تم استخدام خمسة اوعية معالجة تحتوي كل منها على مزيج من التربة والرمل الملوث بأحد الملوثات. يتم استخدام اثنين من أجل التنشيط الأحيائي بواسطة البكتيريا التي تعتمد على الهيدروكربون واثنان للتخفيف الطبيعي بواسطة البكتيريا الأصلية، والأخير يمثل شاهد غير ملوث.

تم تقييم فعالية العلاج في وجود الاتحاد البكتيري (I2+H9+M6) من ناحية عن طريق قياس الكتلة الحيوية الميكروبية ومن ناحية أخرى عن طريق اختبار الإنبات وحساب مؤشره، خلال 45 يوم من التجريب

وفقاً للنتائج، فإن تنقية التربة التي تحتوي على النفط الخام بواسطة البكتيريا الأصلية أو الاتحاد البكتيري أعطى عائداً أفضل (74,05%) في وقت قصير مقارنةً بالديزل (8,55%) مع هيمنة *Serratia marcescens* في الديزل و *Pseudomonas aeruginosa* في النفط الخام.

الكلمات المفتاحية: الزيت الخام، الديزل، التنشيط الأحيائي، *Pseudomonas aeruginosa*،

Serratia marcescens

Table de matière

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

CHAPITRE 1 : SOL, BACTÉRIES TÉLLURIQUES ET IMPACT DE LA POLLUTION AUX HYDROCARBURES SUR CET ÉCOSYSTÈME

1. Le sol.....	3
1.1 Les diverses phases du sol.....	4
1.2 Les fractions constitutives du sol	5
1.3 Caractéristiques et propriétés physiques des sols.....	6
1.3.1 La Structure	6
1.3.2 La texture.....	6
1.3.3 La porosité des sols	7
1.3.4 La perméabilité du sol	7
1.3.5 Capacité de rétention en eau.....	7
1.3.6 Le pouvoir absorbant.....	7
1.4 La microflore du sol	8
1.4.1 Les bactéries du sol	9
2. Les Hhydrocarbures pétroliers	11
2.1 1. Le pétrole brut	11
2.1.1 Définition.....	11
2.1.2 Composition	11
2.1.3 Raffinage du pétrole	11
2.2 Le Gasoil	12
2.2.1 Définition.....	12
2.2.2 Composition du gasoil.....	13
3. Pollution de l'environnement et leur impact	13
3.1 Sur les sols et les eaux souterrains	13
3.2 Sur les végétaux et la chaîne alimentaire	14

CHAPITRE 02 : BIOREMEDIATION DES SOLS POLLUÉS

1. La bioremndiation	16
1.1 Atténuation naturelle	19

1.2	Bioaugmentation	19
2.	Dégradation microbiologique des polluants hydrocarbonés.....	20
3.	Bactéries dégradant les hydrocarbures	22

MATERIEL ET METHODES

1.	Echantillonnage du sol <i>in situ</i>	23
2.	Préparation du sol.....	25
3.	Préparation du polluant	26
4.	Les souches bactériennes.....	26
4.1	Aspect macroscopique :.....	27
4.2	Aspect microscopique	29
5.	Préparation de la suspension bactérienne (l'inoculum).....	29
6.	Inoculation.....	29
7.	Technique de bioremédiation	31
8.	Suivi de l'expérimentation	31
8.1	Irrigation et retournement.....	31
8.2	Dénombrement	23
8.3	Evaluation de l'effet de bioremédiation	34
8.3.1	Test de germination	34
8.3.2	La longueur racinaire.....	36
8.3.3	L'indice de germination (Ig):	36

RESULTATS

1.	Caractérisation des isolats dégradant les hydrocarbures	37
1.1	Aspect macroscopique.....	37
1.2	Aspect microscopique	37
2.	Suivie de la bioremediation des sols pollués.....	40
2.1	Suivie de l'évolution de la charge microbienne dans le sol pollué.....	40
2.2	Suivie de l'indice de germination.....	43

DISCUSSIONS

3.	Comparaison entre Gasoil et Pétrole	46
	Conclusion.....	49
	References.....	51

Annexes

Liste des figures

Figure 1:Profil d'un sol de rizière et principales caractéristiques biologiques et physicochimiques des différents niveaux (Watanabe et al.,1980) cité dans (Davet, 1996).....	8
Figure 2:Séparation des composants principaux par distillation.....	12
Figure 3:Fréquence (%), par type d'hydrocarbures, des événements de déversements accidentels significatifs (ampleur > 7 tonnes) ayant entraîné une pollution d'eaux continentales ou estuariennes en Europe, pour la période 2005-2009 (Cedre, 2012) citée dans (Goeur, 2012)	14
Figure 4:Famille de techniques de dépollution des sols par lieu de traitement (Brgm, 2010).	16
Figure 5:Zone de prélèvement du sol dans forêt de Chaabat Rsas (université Mentouri 1)	24
Figure 6:Zone de prélèvement du sable dans la plage de Ain Achire (Annaba)	24
Figure 7:Préparation du sol	25
Figure 8:Filtration des polluants	26
Figure 9:Préparation de l'inoculum bactérien.....	30
Figure 10: Gasoil, pétrole brut et suspension bactérienne	32
Figure 11:l'irrigation et le retournement des sols pollués.....	32
Figure 12:Suivi de la croissance bactérienne	33
Figure 13:Dispositif expérimental du test de germination	35
Figure 14:Test de germination	35
Figure 15:Evolution du nombre des microorganismes (UFC/g) pendant la durée de traitement.....	41
Figure 16:Évolution de l'indice de germination au cours du temps d'expérimentation	43
Figure 17:Germination des grains d'orges	44

Liste des tableaux

Tableau 1:Les phases composants le sol selon Duchaufour, (1984); Robert, (1996); Calvet, 2003).....	4
Tableau 2:Les constituants minéraux du sol (Massenet, 2010)	5
Tableau 3:Communautés microbiennes du sol Tiré de Bonneau et Souchier (1994)	9
Tableau 4:Les différents genres bactériens ayant la capacité de dégrader les hydrocarbures dans l’environnement	17
Tableau 5:les principales caractéristiques des technologies de bioremediation pour les sols pollués par le pétrole (Koshlaf et Ball., 2017)	18
Tableau 6:Souches bactérienne utilisées	28
Tableau 7:Dispositif expérimentale de la bioremediation.....	32
Tableau 8:Aspect macroscopique des colonies isolées sur gélose nutritive	37
Tableau 9:les différents aspects microscopiques des souches	37
Tableau 10:aspect macroscopique et microscopique des isolats.....	38
Tableau 11:Nombre des microorganismes de chaque dilution du sol	49
Tableau 12:Charge microbienne (UFC/g) aux temps T0, T15, T30, T45.....	40
Tableau 13:Indice de germination de chaque bac de traitement au cours de l’expérimentation.....	43

Liste des abréviations

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.

AT Pétrole : Atténuation naturelle pétrole brut.

AT Gasoil : Atténuation naturelle gasoil.

BG Pétrole : Bioaugmentation pétrole brut.

BG Gasoil : Bioaugmentation gasoil.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La forte augmentation du développement industriel, de la croissance démographique et celle de l'urbanisation au cours du siècle dernier a favorisé le rejet de produits chimiques dangereux dans l'environnement et une pollution mondiale générale. Plusieurs produits chimiques tels que les hydrocarbures, peuvent s'accumuler de façon persistante dans les sols et les sédiments, menaçant ainsi potentiellement la santé humaine et la qualité environnementale en raison de leurs effets carcinogènes, mutagènes et leur capacité à se concentrer sur le milieu naturel à travers la chaîne trophique (Semple *et al.*, 2001).

Le maintien de l'activité biologique et de la biodiversité passe par la sauvegarde des composants essentiels de la biosphère que sont les sols, les milieux aquatiques ainsi que l'atmosphère. La pollution des sols résulte en grande partie des activités minières et d'industries lourdes, à l'instar de l'industrie pétrolière. Cette dernière produit des polluants essentiellement organiques (phénolés, chlorés et hydrocarbures) et des métaux lourds.

Si, aujourd'hui, l'homme est plus conscient du danger que présente l'exposition permanente aux polluants organiques autant pour lui que pour l'environnement, il n'en demeure pas moins qu'il est loin de frôler la perfection dans sa lutte contre la pollution qui est essentiellement liée aux activités industrielles utilisant comme élément principal les hydrocarbures.

Ainsi, tous les efforts de dépollution des sols qui utilisent des processus chimiques, physiques ou biologiques ont pour finalité de diminuer la biodisponibilité de ces polluants tout en évitant la contamination des nappes phréatiques ou le dérèglement de la chaîne alimentaire. Après leur utilisation pendant des décennies, il s'est avéré que les processus physico-chimiques étaient trop coûteux, non écologiques et complexes pouvant causer la destruction des caractéristiques des sols.

A l'heure actuelle, l'alternative semble être la bioremédiation pour l'élimination des substances toxiques, présentant des avantages certains concernant la rentabilité, le respect de l'environnement et la simplicité technologique. Il s'agit là d'une technique douce dont le principe repose sur la minéralisation complète des produits pétroliers qui ne génèrent aucun sous-produit toxique ; contrairement aux procédés physicochimiques (Foudil, 2018).

L'objectif de la présente étude consiste à examiner les potentialités réelles de la bioremediation impliquant l'apport de flores exogènes constituées de souches bactériennes caractérisées et identifiées, dans un sol contaminé par le pétrole brut et le gasoil.

Ce travail comporte deux parties. La première, est consacrée à une recherche bibliographique sur le système sol, la contamination par les hydrocarbures pétroliers et la bioremédiation. La seconde regroupe la partie expérimentale, cette dernière est répartie en :

1. Echantillonnage du sol
2. Préparation du sol
3. Préparation du polluant
4. Les souches bactériennes
 - 4.1. Observation macro et microscopique
 - 4.2. Observation macro et microscopique
5. Préparation de la suspension bactérienne
6. Inoculation
7. Technique de bioremédiation
8. Suivi de l'expérimentation
 - 8.1. Irrigation et retournement
 - 8.2. Dénombrement
 - 8.3. Evaluation de l'effet de bioremédiation
 - 8.3.1. Test de germination
 - 8.3.2. La longueur racinaire
 - 8.3.3. L'indice de germination
9. Résultats

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : SOL, BACTÉRIES TÉLLURIQUES ET IMPACT DE LA POLLUTION AUX HYDROCARBURES SUR CET ÉCOSYSTÈME

1. Le sol

La notion de sol est très ancienne et l'étude de celui-ci a été abordée par plusieurs savants. Mais l'approche globale, historique et géographique, du sol a été le fait de V.V. Dokouchaev (1846-1903) et de ses élèves. C'est en 1883 par la publication de son livre *Le chernozem russe* que cette conception a été inaugurée et qu'a été fondée la pédologie. (Boulaine, 1983)

Les sols sont des écosystèmes multiphasiques hétérogènes ; qui constituent la fine couche externe de la croûte terrestre composés à la fois de matière minérale et de matière organique, modifiées sous l'action du climat, de l'eau, de la végétation et des organismes vivants dans le sol. (Raven *et al.*, 2009) Ils doivent accomplir cinq principales fonctions :

1. Offrir un habitat physique, chimique et biologique pour les organismes vivants;
 2. Réguler et répartir le flux d'eau, le stockage et le recyclage des cycles des nutriments et d'autres éléments ;
 3. Maintenir l'activité et la diversité biologique pour subvenir à la croissance des plantes et la productivité des animaux ;
 4. Filtrer, tamponner, dégrader, immobiliser et détoxifier les substances organiques et inorganiques ;
 5. Fournir un support mécanique aux organismes vivants et à leurs structures.
- (Nortcliff, 2002)

1.1 Les diverses phases du sol

Le sol est composé de trois phases différentes, décrites brièvement dans les tableaux suivants :

Tableau 1: Les phases composants le sol (Duchaufour, 1984; Robert, 1996; Calvet, 2003)

Phase liquide (Solution du sol)	Phase gazeuse
<ul style="list-style-type: none">- Occupe une partie assez importante de la porosité du sol,- Substances organiques et minérales dissoutes dans l'eau et particules en suspension.- Composition varie selon : le climat, les apports anthropiques (fertilisants, produits de traitement phytosanitaire, polluants...etc.) et l'activité biologique du sol (exsudats racinaires, produits de synthèse et de dégradation microbienne ...etc.)	<ul style="list-style-type: none">- Les gaz présents dans l'atmosphère d'un sol bien aéré sont : azote (78 à 80%) + oxygène (18 à 20%) + dioxyde de carbone (0,2 à 3%).- Détection de molécules gazeuses d'origine anthropique (pesticides ou les HAP) à l'état libre ou dissous dans la solution du sol.

La phase solide du sol est en général majoritairement minérale (90 à 99% de la masse du sol), ses constituants sont résumés dans le tableau 2.

Tableau 2: Les constituants minéraux du sol (Massenet, 2010)

Phase solide		
Terre fine	Argiles	< 2 μm
	Limons fins	2 μm à 20 μm
	Limons grossiers	20 μm à 50 μm
	Sable fins	50 μm à 0.2 mm
	Sable grossiers	0,2mm à 2 mm
Elements grossiers	Graviers	0,2 à 2 cm
	Cailloux	2 à 5 cm
	Pierres	5 à 20 cm
	Blocs	> 20 cm

1.2 Les fractions constitutives du sol

Le sol se compose d'une fraction minérale majoritaire constitué de : silicates, d'oxydes, oxy-hydroxydes et hydroxydes et de carbonates (Sposito, 2008), Et d'une fraction organique minoritaire correspondant à tout ce qui est composé de carbone organique, qu'il soit vivant ou non vivant (insectes, plantes, humus, Microorganismes, etc).

L'humus est une expression qui réunit la totalité de la matière organique non vivante du sol et qui peut être trié en substances humiques et non humiques (Pansu et Gautheyrou, 2003).

1.3 Caractéristiques et propriétés physiques des sols

1.3.1 La Structure

En fonction du type de particules et des colloïdes présents dans les sols, ces derniers sont classés en :

a. La structure particulaire

- Type de sol : sol caillouteux à dominance sableuse : les particules de terre sont libres, il n'y a donc pas d'agrégation entre elles (ne sont pas reliées par des colloïdes). Sa capacité d'infiltration est très élevée mais sa capacité de rétention très réduite, le sol est donc incultivable (Lisan, 2019).

b. La structure compacte :

- Type de sol : argileux, limoneux : les particules de ce type sont dispersées, non neutralisés par un liant : calcaire/humus.
Elles forment une sorte d'assemblage collant, mou si mouillé, craquelé et dur si sec (Lisan, 2019).

c. La structure grumeleuse (fragmentaire)

- Type de sol : argile + sable + humus dans des proportions équilibrées : Cette structure correspond à la structure idéale du sol. Le sol est formé d'agrégats qui permettent à la fois une rétention de l'eau et des échanges chimiques avec la solution du sol et les racines (Lisan, 2019).

1.3.2 La texture

C'est la composition du sol en éléments minéraux qui sont classés selon l'échelle granulométrique. La proportion entre les différents éléments minéraux constituant le sol permet d'en déterminer sa texture.

En fonction du triangle des textures on peut dire qu'il existe 3 noms de sols : sol argileux, sol limoneux, sol sableux.

Le triangle des textures permet également d'observer 4 types de structures :

- Texture limoneuse (dominance des limons) ;
- Texture argileuse (dominance de l'argile) ;
- Texture sableuse (dominance de sables) ;
- Texture équilibrée (maximum 30% argile, 20% limons, 50% sables) (Lisan, 2019).

1.3.3 La porosité des sols

La porosité est une grandeur physique qui représente le volume de l'ensemble des pores du sol occupés par l'eau ou l'air, exprimé en pourcents du volume total (matière solide + pores). Sa mesure permet de donner certaines indications sur les capacités de drainage ou de rétention de l'eau dans le sol. Elle peut fournir une idée assez juste de la structure du sol (Soucy, 2016).

1.3.4 La perméabilité du sol

La perméabilité du sol est la propriété qu'a le sol de transmettre l'eau et l'air ; plus le sol est perméable, plus l'eau s'infiltrera (http://www.fao.org/tempref/FI/CDrom/FAO_Training/FAO_Training/General/x6706f/x6706f09.htm).

1.3.5 Capacité de rétention en eau

C'est la quantité d'eau retenue par le sol et qui est soit utilisée par les plantes, soit liée à des particules solides par des forces physiques qui empêchent cette utilisation (Vauvillier, 2019).

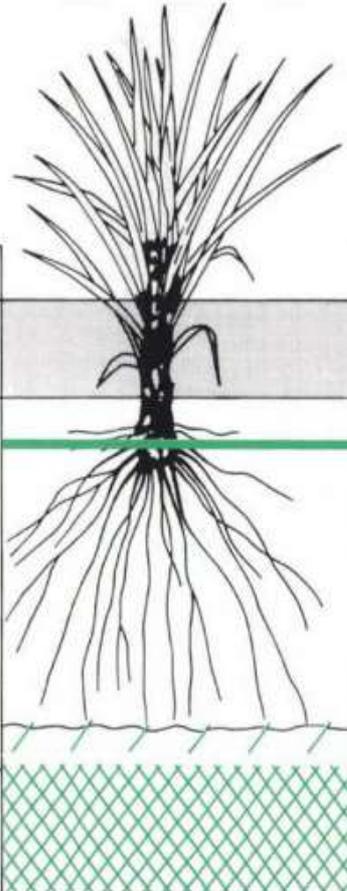
1.3.6 Le pouvoir absorbant

C'est la capacité à fixer des ions d'humus et permettre ainsi plus aisément leur passage aux racines des plantes, notamment par la création de complexes argilo-humiques, aussi appelés complexes absorbants, qui fixent des ions positifs apportés par les engrais. Leur présence dans le sol est un facteur essentiel de sa fertilité (Vauvillier, 2019).

1.4 La microflore du sol

Le sol constitue un habitat favorisant la prolifération de tous types microorganismes, ces derniers sont soit des eucaryotes (champignons, algues et protozoaires) ou des procaryotes (Bactéries, Actinomycètes). Leur biodiversité est considérable et leur distribution dépend non seulement de la présence de substrats énergétiques (essentiellement des résidus végétaux) et d'éléments minéraux, mais également de nombreux facteurs physiques et chimiques caractérisant chaque sol, notamment la structure, l'aération, le pH, la température et la teneur en eau (Dommergues, 2019).

Ces microorganismes sont localisés dans toute l'épaisseur du sol, mais ils se rencontrent préférentiellement dans les sites où les conditions nutritionnelles et énergétiques sont satisfaisantes. C'est-à-dire dans les litières, les humus et les horizons (couches) superficiels des sols, ou bien encore dans ou au voisinage des racines (rhizosphère) (Gelin et Stengel, 1998).



Groupes dominants			E_h moyens (mV)	Principaux événements	
Algues Cyanobactéries Zooplancton		couche liquide	300 à 400	respiration aérobie nitrification	minéralisation complète de la matière organique fixation aérobie de l'azote
Bactéries aérobies		couche oxydée brune			oxydation de Fe^{2+}
anaérobies facultatifs		pellicule brun- rouge (Fe^{3+})	100 à 400	réduction de NO_3^- et dénitrification réduction de Mn^{4+} et de Fe^{3+} réduction de SO_4^{2-}	oxydation de CH_4
		couche arable gris-bleu	0		minéralisation incomplète : formation de NH_4^+ et d'acides organiques
anaérobies strictes			0 à - 200		méthanogénèse
			- 200 à - 400		
Zone abiotique		sous-sol brun	$E_h > 0$		
		roche-mère			

Figure 1: Profil d'un sol de rizière et principales caractéristiques biologiques et physicochimiques des différents niveaux (Davet, 1996)

Tableau 3: Communautés microbiennes du sol (Bonneau et Souchier, 1994)

Microorganismes	Nombre (UFC/g de sol sec)
Bactéries	10^8
Actinomycètes	10^5 à 10^6
Champignons	10^5
Algues	10^4 à 10^5
Protozoaires	10^4

1.4.1 Les bactéries du sol

Le sol est considéré comme un des environnements les plus complexes de la biosphère et est à ce titre un réservoir majeur de la diversité microbienne. Dans le sol les bactéries sont soumises en permanence à des perturbations qui en modifient la structure des communautés.

Pourtant, étudier cette diversité est extrêmement complexe, du fait du faible taux de cultivabilité des espèces bactériennes et des biais liés à l'extraction des cellules et de leur ADN hors de cette matrice complexe (Faugier, 2010)

Les bactéries sont les plus abondantes de la flore microbienne du sol. On estime que pour 1 g de sol, le nombre de bactéries est en moyenne de 10^8 parmi lequel 10^4 espèces différentes seraient présentes (Bonneau *et al.*, 1994 ; Wackett *et al.*, 2000). Les plus représentés sont des bactéries aérobies telles que l'*Arthrobacter* (5 à 60 % des UFC), le *Pseudomonas* (3 à 20 %) et le genre *Bacillus* (7 à 67 %) (Alexander, 1977). On les trouve majoritairement dans les sols à granulométrie fine (2 à 20 μm), car les micropores représentent une niche écologique d'environ 80 % de microorganismes (Milton, 2007). Elle s'explique par l'abondance des matières organiques et la présence d'eau et d'air contenus dans cette section du sol. En présence de matières organiques facilement biodégradables, considérées comme une source d'énergie pour leur développement, les bactéries ont la faculté de se procurer d'autres sources d'énergie provenant de la dégradation des molécules polluantes. Elles seraient donc en mesure de

dégrader de cette façon les hydrocarbures pétroliers (Peng et *al.*, 2008) et de se développer dans un milieu à haute température (Foukou Mbogne, 2017)

La localisation des bactéries à l'intérieur de la matrice du sol est un facteur clé affectant leur survie. Leur activité et leurs fonctions écologiques déterminent la structure de la communauté bactérienne dans l'espace qui concerne. La structure du sol est d'abord fondamentale pour élucider les fonctions écologiques ; définir les populations associées avec ces niches est important pour comprendre comment des perturbations influencent la diversité microbienne des sols, leur niveau d'activité et les fonctions susceptibles d'être réalisées (Faugier, 2010)

Modeste dans leur taille, passant souvent inaperçus, ce sont pourtant eux qui font marcher la machine du sol. Les bactéries du sol ont plusieurs rôles environnementaux majeurs :

- Dans la formation des sols : Les roches récemment exposées n'offrent pas d'éléments carbone et oxygène disponibles. Les cyanobactéries, capables de fixer le carbone et l'azote atmosphérique, en sont les premiers colonisateurs et permettent l'accumulation de nutriments dans les sols.
- Dans les cycles nutritifs : les bactéries du sol sont impliquées dans la décomposition de la matière organique, formant l'humus et libérant des nutriments disponibles pour les plantes. Certaines sont même capables de décomposer des biopolymères complexes comme la cellulose et la lignine (constituants majeurs des parois végétales) ou la chitine (constituant de l'exosquelette des insectes et de la paroi des cellules de champignons).
- En association symbiotique avec les plantes : Certaines bactéries comme les *Rhizobium* forment des nodules fixateurs d'azote au niveau des racines des légumineuses : soja, trèfle, luzerne, haricot... Cette association favorise la croissance des plantes dans les sols pauvres en azote (Rebuffat et Zirah, 2018).

2. Les hydrocarbures pétroliers

2.1 1. Le pétrole brut

2.1.1 Définition

- Le pétrole est une matière minérale naturelle issue des restes modifiés d'êtres vivants. Son nom vient du latin *petra oleum*, qui signifie « huile de pierre ». C'est une substance sombre et huileuse, liquide dans sa forme typique, mais qui peut aussi paraître solide ou gazeuse. C'est un mélange complexe de différents composants chimiques, que l'on peut isoler par raffinage. Ceux-ci serviront à fabriquer une grande variété de substances.

(https://www.google.com/search?ei=otcSXYvyD6q8gwennL7wBw&q=p%C3%A9trole+et+gaz+naturel+pdf&oq=p%C3%A9trole+et+gaz+naturel+pdf&gs_l=psy-ab.3..0j0i22i30i7.13631.15179..15397...0.0..0.132.499.0j4.....0....1..gws-wiz.....0i71j0i67.9_TVSC5rHRg)

2.1.2 Composition

Il se compose de molécules exclusivement constituées d'atomes de carbone (C) et d'hydrogène (H) : les hydrocarbures.

On distingue trois catégories d'hydrocarbures présents dans les fractions du brut distillant entre 20 et 200°C : Les alcanes ou paraffines (18 à 65 %), les cyclo alcanes ou naphènes (25 à 90 %) et des composés aromatiques (jusqu'à 15 %).

D'autres éléments sont souvent présents dans le pétrole : le soufre, l'azote, des métaux. Il contient très peu d'oxygène. On nomme les pétroles en fonction de leur densité (d) par rapport à l'eau : légers si $d < 0,8$ et lourds si $d > 1$ (<https://fr-static.z-dn.net/files/df6/b08f2492eda58626288851b86b42e85e.pdf>).

2.1.3 Raffinage du pétrole

Le raffinage du pétrole désigne l'ensemble des traitements et transformations visant à tirer du pétrole le maximum de produits à haute valeur commerciale. Le pétrole brut, tel qu'il sort du puits est un mélange presque inutilisable en l'état. Il faut donc le fractionner par distillation et traiter chimiquement les fractions obtenues par de multiples opérations afin d'obtenir des produits qui conviennent le mieux à différents besoins de notre civilisation (<https://fr-static.z-dn.net/files/df6/b08f2492eda58626288851b86b42e85e.pdf>).

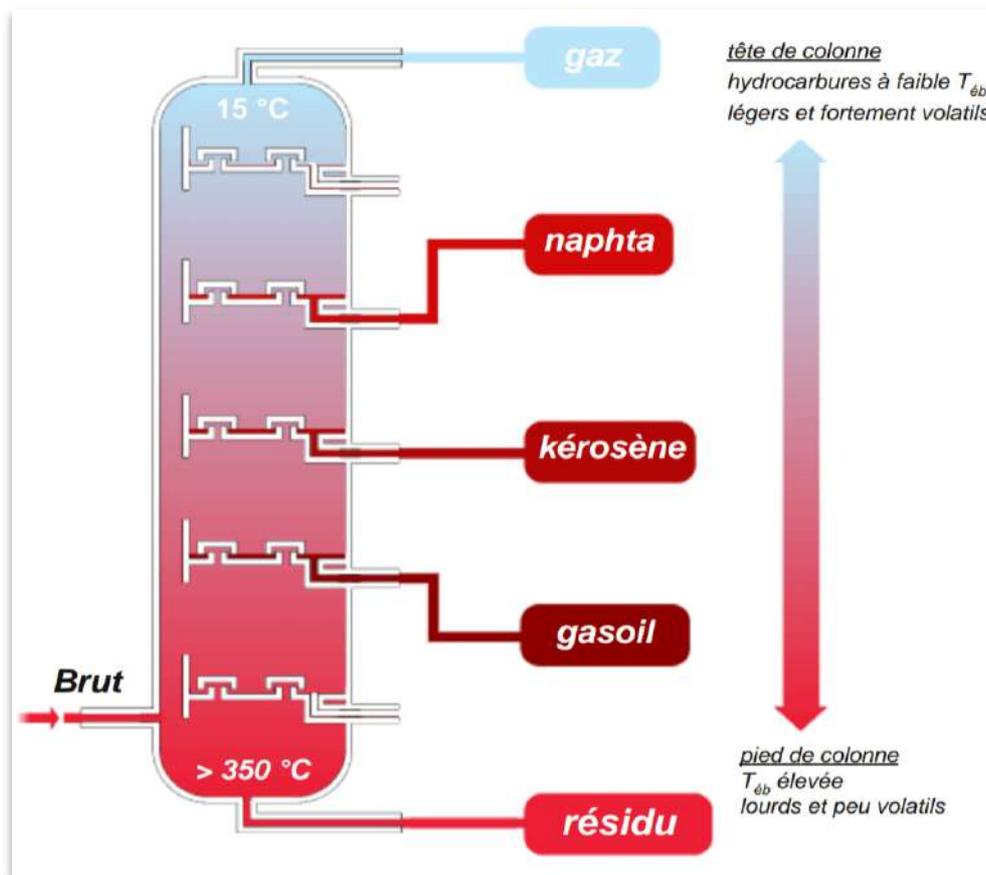


Figure 2: Séparation des composants principaux par distillation (<https://fr-static.z-dn.net/files/df6/b08f2492eda58626288851b86b42e85e.pdf>)

2.2 Le Gasoil

2.2.1 Définition

Le gasoil est une huile lourde issue du raffinage du pétrole, composée d'un mélange d'hydrocarbures (paraffiniques, naphthéniques, aromatiques et oléfiniques). Il est utilisé comme carburant dans les moteurs diesel, dont la température de distillation se situe entre 200 et 380°C, leur point d'éclair est toujours supérieur à 50 et leur densité supérieure à 0,82. (Publications Un. "2000 Annuaire des statistiques de l'énergie", pp. 114-117. Nations Unies, 2002).

Le gasoil obtenu dans la raffinerie présente des caractéristiques conformes à des applications industrielles, (camions, navires, traction ferroviaire). Cependant, le développement du moteur Diesel destiné aux automobiles et les législations anti-pollution de plus en plus sévères ont nécessité l'adaptation du carburant au moteur. Les méthodes de raffinage ont évolué

en conséquence, notamment les procédés de transformation qui permettent de modifier la structure des hydrocarbures par réactions chimiques. Grâce aux techniques contemporaines, l'industrie pétrochimique produit de nouvelles molécules et les carburants sont épurés de composés indésirables (le soufre par exemple) (Zeggane et Kassa, 2015).

2.2.2 Composition du gasoil

Le gasoil se compose majoritairement d'atomes de carbone et d'hydrogène et contient d'autres éléments de très faibles quantités : soufre, azote et métaux lourds.

3. Pollution de l'environnement et leur impact

L'ère industrielle a engendré une pollution importante des sols et sous-sols par des mélanges complexes de substances organiques et inorganiques parmi lesquelles on retrouve les hydrocarbures, les solvants chlorés, les métaux, etc. ... Ces pollutions issues pour la plupart de déversements accidentels ou ponctuels résultant de comportements délibérés ou non, de fuites de réservoirs de stockage constituent un problème environnemental majeur notamment terme de risque de transfert d'hydrocarbures vers les nappes phréatiques, vers les végétaux mais également un risque sur les humain et animaux non négligeable (Gautier, 2007)

3.1 Sur les sols et les eaux souterrains

La pollution des sols par les hydrocarbures résulte généralement de l'infiltration à partir de la surface ou de l'enfouissement de produits pétroliers ou de résidus hydrocarbonés. La pollution des aquifères par des hydrocarbures solubles résulte d'un contact de la nappe d'eau avec un produit infiltré ou enfoui ou parfois provient d'une rivière polluée en charge par rapport à une nappe alluviale. En fonction du volume déversé, de sa nature, des caractéristiques géologiques et hydrogéologiques du sous-sol, le produit pétrolier en tant que phase liquide peut rester entièrement piégé au-dessus de la nappe phréatique ou atteindre celle-ci si le volume infiltré est supérieur au volume piégé, le volume excédentaire s'étalant à la surface de la nappe (Bocard, 2006).

3.2 Sur les végétaux et la chaîne alimentaire

Les produits pétroliers rejetés dans l'environnement ont des répercussions sur les plantes, animaux et êtres humains. Les conséquences de la contamination dépendent des organismes eux-mêmes et de la structure chimique des hydrocarbures. La concentration des hydrocarbures pétroliers totale semblait être plus élevée dans les huiles extraites des plantes (Stevcevska et Jovanovic-Kolar, 1974) que dans les tissus végétaux. Cette constatation, aurait des répercussions sur certaines cultures qui poussent près des sources d'HAP, parce que les organes végétaux tels que les graines sont importantes dans l'alimentation humaine et contiennent aussi des concentrations relativement élevées d'huiles. (Kolar *et al.*, 1975)

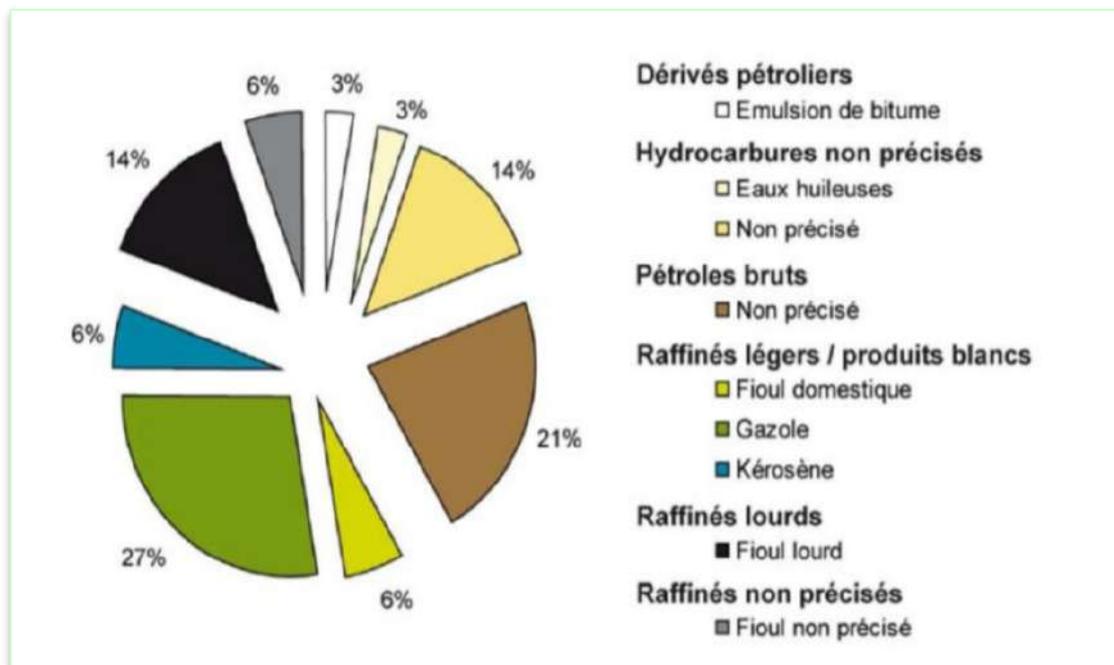


Figure 3: Fréquence (%), par type d'hydrocarbures, des événements de déversements accidentels significatifs (ampleur > 7 tonnes) ayant entraîné une pollution d'eaux continentales ou estuariennes en Europe, pour la période 2005-2009 (Goeur, 2012)

CHAPITRE 02 : BIOREMEDIATION DES SOLS POLLUÉS

L'atténuation naturelle des polluants persistants dans les sites pollués est généralement lente voire même inhibée par le caractère récalcitrant des polluants. Différents types de techniques et technologies ont été développées afin de traiter les sites contaminés. Parmi lesquelles, il y a des approches chimiques, physico-chimiques ou thermiques mais l'approche biologique reste le plus souvent recommandée qui est une alternative de traitement faisable et rentable (Rabodonirina, 2015).

Tous ces types de traitement peuvent être mis en oeuvre soit in situ, c'est à dire sans excavation des sols, soit sur site après excavation et préparation d'une aire étanche de traitement ou mise en route d'unité de traitement mobile, soit hors site dans des unités de traitement ou de stockage de grande capacité (Mougin *et al.*, 1996).

L'objectif de ces méthodes étant de supprimer ou du moins diminuer jusqu'à un niveau acceptable le niveau de risque que fait peser la pollution du sol sur la santé humaine, l'environnement ou tout autre cible identifiée comme d'importance (CEDRE et SERES, 1996).

Mais avant de procéder à la réhabilitation d'un terrain, il est important de bénéficier de données spécifiques. Ces données permettront de saisir l'ampleur de la contamination et ainsi déterminer la solution de traitement adaptée à la situation. Plusieurs propriétaires s'embarquent dans des projets de réhabilitation environnementale sans connaître l'ampleur de la contamination présente sur leurs terrains, et cela peut engendrer beaucoup de frais et parfois même d'abandon du projet par le propriétaire en question. Une réhabilitation, qu'elle soit biologique, thermique ou chimique, n'est optimale que lorsque des données précises de caractérisation sont connues et maîtrisées par des experts dans le domaine. En effet, les caractéristiques du terrain et de la contamination influent sur l'efficacité des procédés disponibles. Par exemple, la nature du polluant permettra de préciser si ce dernier se volatilise facilement ou s'il se dissout facilement dans l'eau. Également, si le sol du terrain contaminé est principalement constitué d'argile, la technique de décontamination privilégiée sera différente que s'il s'agit plutôt d'un sable grossier.

D'autres contraintes, telle la superficie du site, l'emplacement des installations ou encore le temps disponible pour les travaux, devront être considérées dans le choix de la technologie (Dufresne, 2013)

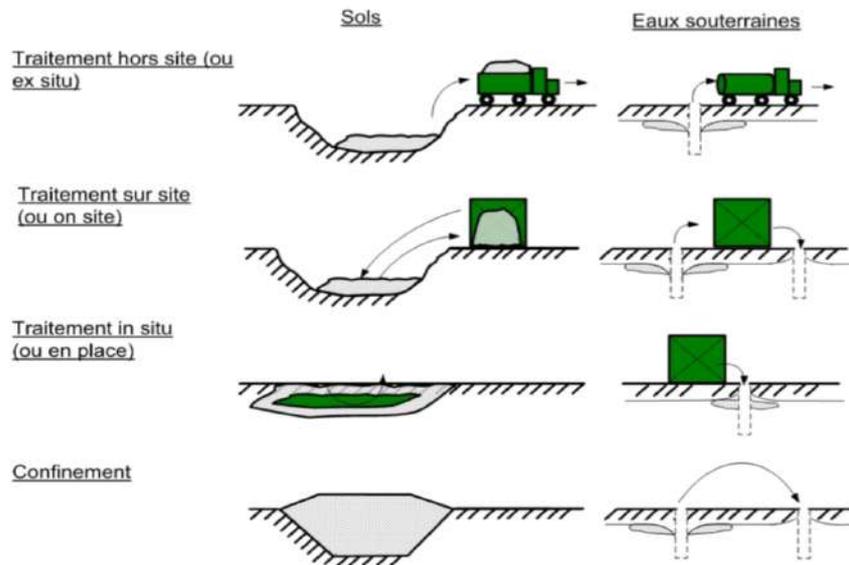


Figure 4:Famille de techniques de dépollution des sols par lieu de traitement (Brgm, 2010)

1. La bioremediation

Par bioremediation, on entend le nettoyage biotechnologique (par les microbes) des polluants de l'environnement. Les micro-organismes, dans leur ensemble, ont des métabolismes très variés de sorte qu'en théorie n'importe lequel des nombreux polluants organiques peut être dégradé, si le ou les micro-organismes sont bien choisis.

Les différents genres bactériens fréquemment décrits pour leur capacité à dégrader les hydrocarbures dans les environnements de sol sont mentionnés dans le tableau ci-dessous.

Étant donné que de nombreux microbes vivant dans le sol sont capables de décomposer les diverses fractions d'hydrocarbures et survivent dans des conditions différentes, chaque site peut nécessiter un traitement de biorestauration spécifique. Les différentes méthodes et stratégies génériques des technologies de bioremédiation actuellement appliquées sont l'**atténuation** naturelle, la **bioaugmentation** et la **biostimulation** (koshlaf et Ball, 2017).

Les techniques sont résumées dans le tableau 5 et discutées plus en détail ci-dessous :

Tableau 4: Les différents genres bactériens ayant la capacité de dégrader les hydrocarbures dans l'environnement (GAUDU, 2014)

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

Tableau 5: les principales caractéristiques des technologies de bioremediation pour les sols pollués par le pétrole (Koshlaf et Ball., 2017)

Méthode de bioremediation	Caractéristiques principales	Limites	
1. Atténuation naturelle	Utilisation de la flore indigène Populations sous conditions naturelles	Rentable. Pas toujours efficace.	Nécessite une observation étendue à longue distance.
2. Bioaugmentation <ul style="list-style-type: none"> • Souches isolées • Consortium microbien 	Addition de microbes efficaces dégradant les hydrocarbures Catalyse la dégradation de molécules simples ou de mélanges simples Catalyser la dégradation de Mélanges de polluants complexes.	Utilisation d'une forte biomasse de microbes dégradant les hydrocarbures plus efficace que l'atténuation naturelle	Nécessite une surveillance à long terme. pas toujours efficace Mauvaise adaptation des microorganismes hydrocarbonoclastes au site contaminé les souches introduites peuvent être inhibées par des co-polluants ou des microorganismes natifs
3. Biostimulation <ul style="list-style-type: none"> • Engrais • Biosurfactants 	Gestion des facteurs environnementaux (ajout d'éléments nutritifs). Restauration du bilan en éléments nutritifs, optimisation du rapport C / N / P. Stimulation de la biodisponibilité des contaminants.	plus efficace que l'atténuation naturelle	Pas toujours efficace. Le rapport optimal C / N / P et la biodisponibilité des polluants doivent être déterminés.

1.1 Atténuation naturelle

Par définition, l'atténuation naturelle est le processus de bioremédiation le plus simple par lequel la population microbienne autochtone (bactéries et champignons) élimine ou détoxifie le pétrole et les autres polluants hydrocarbonés dangereux pour la santé humaine et / ou l'environnement sous des formes moins toxiques, afin d'atténuer le site pollué. Au cours de ce processus, les microbes indigènes utilisent les hydrocarbures comme seule source de carbone, en fonction de leurs voies métaboliques naturelles. Cette technologie nécessite simplement de surveiller le processus. En cas de pollution des sites, les microorganismes indigènes dégradant les hydrocarbures augmenteront rapidement et s'adapteront aux polluants nouvellement ajoutés, ce qui entraînera la dégradation des contaminants ; Cependant, la diversité microbienne peut être réduite (McKew *et al.*, 2007).

1.2 Bioaugmentation

La capacité de la communauté microbienne du sol à métaboliser les polluants pétroliers est déterminée par sa structure et sa diversité (Rodríguez *et al.*, 2010). Dans les sols où le nombre de micro-organismes indigènes dégradant les polluants est insuffisant ou non détectable, l'atténuation naturelle ne convient peut-être pas comme méthode de dépollution. Par conséquent, une autre technologie de bioremédiation devrait être appliquée.

La bioaugmentation est l'une des méthodes alternatives de bioremédiation in situ. Cette application implique l'ajout de souches individuelles ou de consortiums de microbes dégradant les hydrocarbures (bactéries ou, dans une moindre mesure, de champignons), dotés de capacités catalytiques d'assainissement des sites contaminés afin d'accélérer la biodégradation de composés organiques indésirables. Les utilisateurs d'hydrocarbures bioaugmentés sont normalement isolés d'environnements pollués par des hydrocarbures pétroliers (Sarkar *et al.*, 2005). La bioaugmentation est justifiée par le fait que l'introduction de microorganismes dégradant les hydrocarbures dans les sols pollués améliore la capacité de biodégradation de la population autochtone. Des recherches ont montré que l'application de la bioaugmentation aux environnements marins et terrestres contaminés présentait une efficacité de traitement supérieure (Tang *et al.*, 2010 ; Kadali *et al.*, 2012)

2. Dégradation microbiologique des polluants hydrocarbonés

La biodégradation correspond à la décomposition de polluants organiques par des micro-organismes (bactéries, champignons ou algues). Les polluants sont alors convertis en dioxyde de carbone (lorsque la biodégradation est totale), en eau et en énergie pour constituer de la biomasse.

Les hydrocarbures pétroliers sont des polluants organiques qui sont soumis à la biodégradation dès que les micro-organismes capables de les utiliser se sont développés.

Un sol qui contient des hydrocarbures va modifier l'activité des microorganismes. La pollution exerce une pression sélective sur la capacité des bactéries à dégrader les hydrocarbures : elles doivent adapter leur activité enzymatique afin de pouvoir s'y attaquer. Cela engendre des modifications des capacités métaboliques. Une augmentation de la population des organismes capables de transformer les composants présents est aussi observée (Leahy et Colwell, 1990).

Pour produire de l'énergie (ATP), les micro-organismes utilisent les polluants pendant la biodégradation. Les polluants sont catabolisés : il y a une oxydation d'un donneur d'électrons (les hydrocarbures) et une réduction d'un oxydant ou accepteur d'électrons (composés oxydants tels que l'oxygène, les nitrates, les sulfates). En général, la quantité d'accepteurs d'électrons est le facteur limitant pour la biodégradation.

Un autre facteur limitant de la biodégradation des hydrocarbures est la disponibilité de l'azote (N) et du phosphore (P). La fuite d'hydrocarbures dans un milieu qui contient de faibles concentrations en nutriments inorganiques peut engendrer de forts rapports C/N ou C/P, qui ne sont pas favorables à la croissance bactérienne. Les nutriments peuvent être ajoutés sous forme de fertilisants (NH_4NO_3 , KH_2PO_4 ...) pour stimuler la biodégradation (Leahy and Colwell, 1990).

Trois voies permettent aux bactéries de capter les polluants:

- La solubilisation: possible pour les hydrocarbures de faible poids moléculaire.
- Formation de microgouttelettes.
- Formation de macro gouttelettes (Gaudu, 2014).

La première phase de dégradation des hydrocarbures par des bactéries ou des champignons implique l'oxydation des molécules par des oxygénases, ce qui nécessite que l'oxygène soit l'accepteur d'électrons (Leahy *et al.*, 1990). Par exemple, la ring dioxygénase, la méthyl monooxygénase ou la ring monooxygénase responsables du clivage du toluène chez différentes bactéries (Morasch *et al.*, 2002). Des conditions aérobies sont donc indispensables à l'oxydation des hydrocarbures dans l'environnement.

L'oxydation produit de l'acétyl-CoA (Sabirova *et al.*, 2006). Ce dernier est alors transformé en énergie et en carbone dans le cycle de Krebs (cycle permettant la transformation de l'acétyl-CoA en carbone et ATP).

La biodégradation complète d'un hydrocarbure en CO₂ et H₂O est possible, mais souvent une souche bactérienne possède les enzymes nécessaires à quelques étapes de dégradation du composé, mais pas toutes les enzymes requises. Il peut donc y avoir accumulation de métabolites. En revanche, au sein d'une communauté microbienne, il peut y avoir une succession de microorganismes qui vont intervenir pour dégrader la molécule de départ jusqu'en CO₂ et H₂O.

3. Bactéries dégradant les hydrocarbures

La capacité de dégrader les hydrocarbures est distribuée parmi de nombreux genres bactériens appartenant aux Protéobactéries et aux bactéries Gram positif. Les souches isolées sont généralement mésophiles et sont le plus souvent isolées à partir du sol. La gamme de substrats utilisée par une souche peut être restreinte à un ou deux hydrocarbures ou s'étendre à cinq et plus. Elle peut être liée à la présence chez la même souche d'une ou de plusieurs voies cataboliques mais ne peut pas être clairement assignée à des genres bactériens particuliers (Vandecasteele, 2005).

Les études de la microflore des sols pollués par les hydrocarbures ont mis en évidence plusieurs points relatifs à l'activité des bactéries aérobie. Ces études ont notamment souligné l'intérêt physiologique et écologique de la croissance microbienne, la grande diversité de la microflore et leur adaptation aux conditions du milieu. La prédominance des souches à croissance rapide du genre telles *Pseudomonas* et *Bacillus* a fréquemment été observée.

Des microorganismes ont été isolés dans des sédiments marins, des océans, des eaux côtières, des étangs arctiques, des lacs et des estuaires. Cependant, ces microorganismes se

retrouvent en proportions variables dans la communauté microbienne totale. (Smit *et al.*, 2001) ont montré que la composition de la microflore des sols est modifiée par la venue d'une pollution par des carburants, avec un enrichissement en Beta-protéobactéries et/ou Gamma-protéobactéries.

Les bactéries appartenant aux sous- divisions Gamma-proteobacteria et Beta-proteobacteria sont toutefois importantes tout au long de la décontamination. Par ailleurs, la plupart des souches bactériennes, caractérisées au cours du travail de (Smit *et al.*, 2001) avaient déjà été identifiées au niveau de sols contaminés par des hydrocarbures (Eriksson *et al.*, 2003). Les Pseudomonales, et surtout le genre *Pseudomonas*, sont très souvent dominants dans les sites contaminés aux hydrocarbures (Evans *et al.*, 2004). Ils semblent, en effet, être impliqués dans les premières phases des procédés de bioremédiation lorsque les polluants sont biodisponibles (Kaplan et Kitts, 2004).

Des bactéries du genre *Pseudomonas*, appartenant à la classe des Gammaprotéobactéries, ont servi de modèles pour étudier le métabolisme du naphthalène et du phénanthrène. Les opérons cataboliques de *P. putida* G7 et *P. stutzeri* AN10 ont été caractérisés après isolement sur naphthalène (Bosch *et al.*, 1999). De même, *Pseudomonas aeruginosa* a été isolée pour ses capacités à dégrader le phénanthrène. *Pseudomonas putida*, et *Pseudomonas aeruginosa* sont aussi connues pour leur faculté de chimiotactisme vis à vis des HAPs (Grimm et Harwood, 1999). D'autres *Pseudomonas* ont été détectées dans des sols contaminés par une pollution diffuse (Johnsen *et al.*, 2002). Une autre Gammaprotéobactérie, *Stenotrophomonas*, est capable de dégrader le phénanthrène ainsi que des HAP de haut poids moléculaire comme le benz[a]anthracène, le benzo[a]pyrène, le fluoranthène et le pyrène (Juhasz et Naidu, 2000).

Serratia marcescens est aussi une espèce appartenant aux Gammaproteobacteries, elle est connue pour son pouvoir de dégradation du pétrole brut et Co (Montero-Rodriguez *et al.*, 2015), grâce à la production de biosurfactants qui sont des composés tensioactifs produit par des micro-organismes, principalement aérobies, telles que les bactéries, les levures et champignons filamenteux (Muthusamy *et al.*, 2008 ; Kapadia et Yagnik, 2013). Ces produits microbiensont reçus une attention particulière sur les terrains d'assainissement de l'environnement parce qu'ils influent sur ces procédures à cause de leurs efficacité en tant qu'agent de remédiation. En outre leur respect de l'environnement qui se manifeste par une faible toxicité et haute biodégradabilité les rendent aptes à l'application dans l'environnement (Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2011;Lawniczak *et al.*, 2013).

MATERIEL

ET

METHODES

MATERIEL ET METHODES

1. Echantillonnage du sol *in situ*

Le but du prélèvement d'échantillons du sol est de fournir un petit volume de sol à des fins d'analyse qui est représentatif du volume entier du sol. La présente section décrit, à titre d'information, les exigences minimales d'échantillonnage.

Pour qu'un échantillon soit bien représentatif, il doit être prélevé de plusieurs endroits différents à partir cinq centimètres de profondeur. Cette dernière est appropriée car elle écarte la partie du sol ou la flore microbienne est perturbée.

Le prélèvement de cette étude a été réalisé sur deux types de sol dans trois sites différents :

- Le premier : un sol forestier prélevé au niveau du foret Chaabat Rsass a l'université des Frères Mentouri 1. (Figure 5)
- Le second : Du sable prélevé dans la région d'Annaba plus précisément la plage d'Ain Achire. (Figure 6).

Et ceci en choisissant des conditions climatiques de prélèvement optimales afin de faciliter le conditionnement et le tamisage de l'échantillon où les communautés microbiennes doivent être bien représentatives.



Figure 5: Zone de prélèvement du sol dans forêt de Chaabat Rsas (université Mentouri 1)

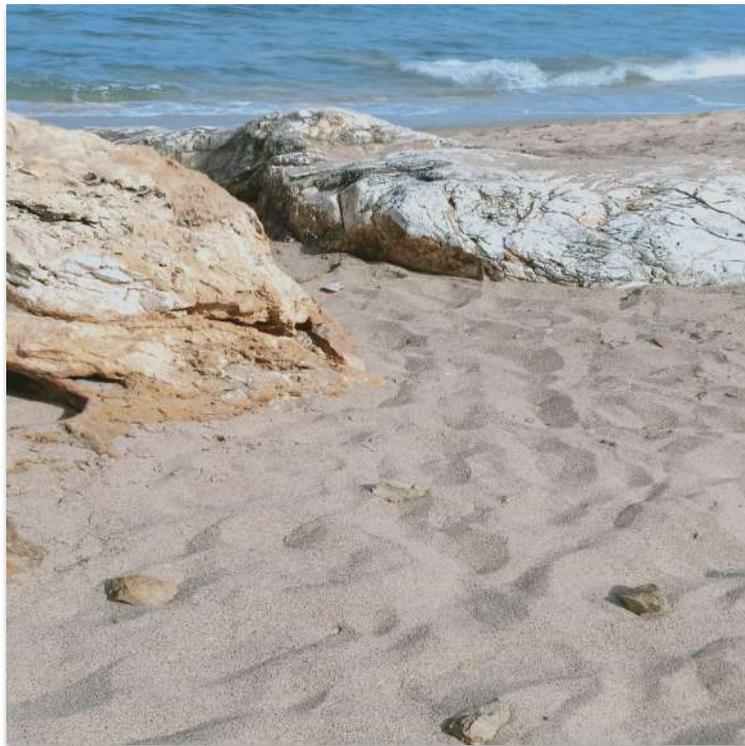


Figure 6: Zone de prélèvement du sable dans la plage de Ain Achire (Annaba)

Ces exigences correspondent à un prélèvement dans un sol ni trop sec ni trop humide : en période de pluie, attendre une semaine que le sol ressuie un peu et éviter les périodes de trop forte dessiccation aussi.

Les prélèvements doivent être réalisés de manière à :

- Utiliser du matériel propre, lavé à l'eau au préalable et désinfecté à l'éthanol.
- Enlever au maximum la terre restant sur la pioche ainsi que la pelle et les re-désinfecter afin d'éviter la contamination d'un endroit par autre

2. Préparation du sol

Les sols prélevés sont séchés dans la serre de l'université pendant 24h ensuite purifiés de tout débris et tamisés à l'aide d'un tamis d'un diamètre de 0,2 mm. Le refus est broyé (pilon+ mortier) puis tamisé à nouveau.

Les échantillons sont pesés et conditionnés dans des sacs en plastiques (1kg par sachet) puis placés dans des bacs à raison de 2kg par bac, mélangeant sable et sol en quantité égale (Guergouri, 2015, non publiée).



Figure 7:Préparation du sol

3. Préparation du polluant

Les échantillons du sol sont pollués par des hydrocarbures pétroliers (pétrole brute et gasoil) préalablement stérilisés par **filtration**. Le pétrole brut provient du service d'exploitation Sonatrach et le gasoil d'une station d'essence Naftal.



Figure 8:Filtration des polluants

4. Les souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées proviennent d'une étude antérieure de madame Guergouri (2015, non publiée). Ce sont des bactéries qui ont prouvé leur pouvoir de dégradation des hydrocarbures à travers un ensemble de tests réalisés. Elles sont aussi identifiées sur un plan moléculaire.

Tableau 6: Souches bactérienne utilisées

Code de la Souche	Espèce	Source
I2, H9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Sol</i>
M6	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Sol</i>

Ces souches bactériennes sont repiquées sur gélose nutritive (GN) préalablement autoclavée coulée dans des boîtes de Petri (GN), etensemencées par des stries serrés ensuite incubées pendant 24heures à 30°C.

Une observation macroscopique et microscopique après coloration de Gram est réalisée dans le but de vérifier la pureté et les caractères morphologiques de ces bactéries.

4.1 Aspect macroscopique

L'examen macroscopique des cultures est l'étude de l'aspect des colonies, effectué à partir de l'isolement après incubation. L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé, de la durée et de la température de l'incubation ainsi que les caractères cultureux de la bactérie.

L'étude de l'aspect des colonies nécessite l'observation à l'œil nu, en lumière naturelle et artificielle, par éclairage direct et par transparence des colonies. Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir de colonies bien isolées.

Les caractères principaux à étudier sont :

La forme

Le premier caractère important dans la description des colonies est sa forme générale... De nombreuses espèces bactériennes forment des colonies rondes. Cependant d'autres donnent des colonies aux formes plus ou moins variées...

Les quatre types de colonies rencontrées en général sont : Circulaire, irrégulière, Filamenteuse et punctiforme.

L'élévation

Après la forme générale, il est important de regarder le relief de la colonie. Il existe plusieurs types d'élévation chez les colonies bactériennes : Plane, élevée, convexe, bombée et bossue.

Le bord

C'est le contour d'une colonie, il en existe plusieurs mais les plus fréquemment observées sont des colonies à bords réguliers et d'autres à bords irréguliers.

L'aspect

L'aspect d'une colonie bactérienne peut être lisse, muqueux ou bien sec.

L'opacité

Les colonies sont décrites comme :

- Opaques (ne laissent pas passer la lumière).
- Translucides (laissent passer la lumière mais on ne voit pas les formes au travers, comme le verre dépoli).
- Transparentes (laissent passer la lumière et voir les formes au travers, comme le verre, on parle de gouttes de rosée).

La consistance

Au moment du prélèvement il est possible d'apprécier si les colonies sont crémeuses (on obtient facilement des suspensions homogènes), incrustée ou encore visqueuse (on obtient difficilement des suspensions homogènes)

La couleur

Plusieurs colonies n'ont pas une couleur bien définie (blanc, gris). Par contre, certaines bactéries produisent un pigment insoluble qui donne un aspect bien caractéristique à la colonie (rose, jaune, rouge, etc.), tandis que d'autres produisent un pigment soluble qui diffuse et colore le milieu.

4.2 Aspect microscopique (Annexe 1)

Etudier la morphologie microbienne, au microscope photonique, c'est rechercher la forme des bactéries et leur mode de groupement. Ce travail traite uniquement l'examen après coloration (coloration différentielle type Gram) qui permet d'observer des bactéries tuées fixées sur une lame et ayant subi l'action d'un ou plusieurs colorants.

La coloration de Gram est la base de l'identification d'une souche bactérienne. Elle doit être parfaitement maîtrisée car c'est le point de départ du choix des examens complémentaires à effectuer, des milieux àensemencer etc...

Au terme du processus de coloration, les bactéries dites « Gram Négatives » apparaissent roses tandis que les bactéries dites « Gram Positives » sont colorées en bleu foncé/violet.

5. Préparation de la suspension bactérienne (l'inoculum)

Un inoculum est un échantillonnage de micro-organismes ensemencé dans un milieu de culture.

A partir de cultures des 3 souches pures (I2, H9, M6) quelques colonies bien isolées sont raclées puis ensemencées en bouillon nutritif ordinaire dans 3 tubes différents. Ces tubes sont incubés pendant 24h à 30°C.

Après 24h d'incubation un volume équivalent de chaque souche est transvasé dans un flacon de 250 ml de bouillon nutritif préalablement autoclavé.

Après homogénéisation de la suspension bactérienne, sa densité optique est mesurée puis standardisée à 0,1 lue à 650nm (équivalent à environ 10^7 UFC /ml) (Hawrot et Nowak., 2005).

6. Inoculation

Un mélange de 3 souches bactériennes est testé : I2, H9 et M6 à raison de 40 ml dans chaque bac de traitement (Hawrot et Nowak, 2005).

Un ensemble de micro-organismes en consortium sont testées pour leur capacité de biodégradation des polluants pétroliers.



Figure 9:Préparation de l'inoculum bactérien

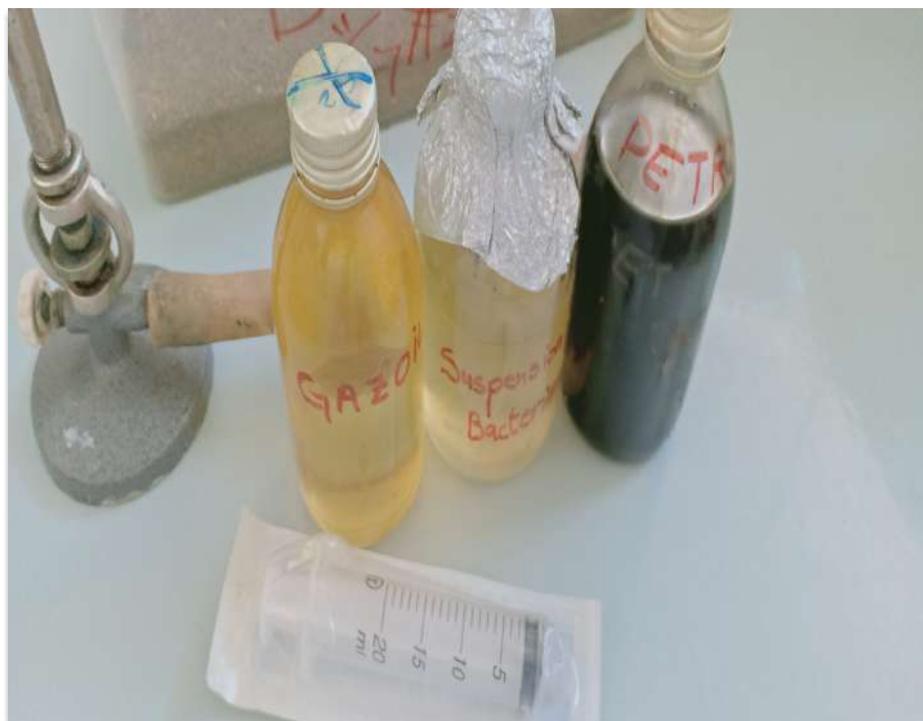


Figure 10: Gasoil, pétrole brut et suspension bactérienne

7. Technique de bioremédiation

Le teste de bioremédiation est structuré comme suit (Hawrot et Nowal, 2005):

Cinq bacs en plastique de dimension (32cm x21cm x13.5 cm), recevant chacun 2 kg de sol (1Kg de sol+1Kg de sable). (Tableau 7).

Tableau 7:Dispositif expérimentale de la bioremediation

Bacs	Abréviation	Contenu
Témoin	/	2kg de sol
Atténuation naturelle du pétrole brute	AT Pétrole	2kg de sol + 100ml de pétrole brute
Bio-augmentation du pétrole brute	BG Pétrole	2kg de sol + 100 ml de pétrole brut + 40 ml de suspension bactérienne
Atténuation naturelle du Gasoil	AT Gasoil	2kg de sol + 100ml de Gasoil
Bio-augmentation du Gasoil	BG Gasoil	2kg de sol + 100 ml de Gasoil + 40 ml de suspension bactérienne

8Suivi de l' experimentation

Trois paramètres sont suivis durant 45 jours d' expérimentation :

8.1 Irrigation et retournement

Chaque semaine (T₀, T₇, T₁₅, T₂₂, T₂₉, T₃₆, T₄₃), tous les bacs sont irrigués avec 20 ml d'eau distillée stérile puis retournés pour des raisons d'aération à l'aide d'une spatule désinfectée et flambée à l'éthanol.



Figure 1: l'irrigation et le retournement des sols pollués

1.1 Dénombrement

Un dénombrement de la flore bactérienne aérobie mésophile est réalisé sur gélose nutritive à intervalles de temps, à savoir : T₀- T₁₅- T₃₀- T₄₅, afin de suivre l'évolution du nombre aussi bien des bactéries indigènes que celles qui sont apportées par l'inoculum en présence des polluants. La suspension mère (1g de sol dans 9ml d'eau physiologique) est diluée successivement en transférant une prise d'essai de 1ml de suspension à diluer dans un tube contenant 9ml d'eau physiologique stérile.

- Le nombre de dilutions nécessaire est de 10⁻¹ à 10⁻⁷.
- Un étalement de chaque dilution est réalisé sur une boîte de milieu, en déposant 0,1 ml de la suspension à dénombrer de façon uniforme à l'aide d'un râteau stérile jusqu'à ce qu'il ne reste plus de liquide visible à la surface du milieu.



Figure 12: Denombrement

- Après incubation 24h à 30°C, Les boîtes de pétri retenues pour le calcul sont sélectionnées. Ces boites contiennent un nombre de colonies (d'unité formant colonie) compris entre 15 et 300.
- Le nombre C d'UFC bactérien est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$N = \sum c / d \cdot v$$

N : nombre des microorganismes en UFC /ml.

$\sum c$: nombre d'unité formant colonie sur toutes les boites retenues.

v : Volumeensemencé (0,1ml).

d : Taux de dilution le plus faible retenu.

8.3 Evaluation de l'effet de bioremédiation

Les tests écotoxicologiques sont utilisés comme un outil pour surveiller la bioremédiation des hydrocarbures pétroliers. Ces tests ont été développés dans le but d'estimer l'impact toxicologique des produits chimiques sur les récepteurs écologiques tels que les vers de terre, les plantes et les bactéries (Saterbak *et al*, 1999; D'Annibale *et al*, 2006). Dans le but d'évaluer les effets écotoxicologiques de la contamination des sols par les hydrocarbures, on a utilisé le test de germination des graines.

8.3.1 Test de germination

Le but de ce test est d'évaluer l'impact et l'effet de la concentration des hydrocarbures contenus dans le sol sur la germination des graines d'orges et d'évaluer le degré de remédiation dans les différents échantillons de sol.

Il consiste à établir un pourcentage de germination dans chaque lot en démembrant les graines germées dans les sols contaminés et traités par bioaugmentation. (Berkouche et Hadjadj, 2015)

L'orge (*Hordium vulgare L.da.*) appartenant à la famille des Poaceae, est une espèce sensible à la pollution par les hydrocarbures, résistante à la sécheresse et vigoureuse, l'orge peut être cultivé sur des terres peu propices aux céréales. (Simon, 1972 in Fezani et Khider., 2007).

Les graines choisies doivent être saines, sélectionnées selon leur taille, leur forme et leur couleur. Elles sont ensuite désinfectées par l'eau de javel à 2 % pendant 5 min puis rincées trois fois avec de l'eau distillée (Beddiar et Ben Kechrouda., 2013).

L'expérience est réalisée chaque 15 jours (T₀- T₁₅- T₃₀- T₄₅), celle-ci est décrite dans la figure 13.

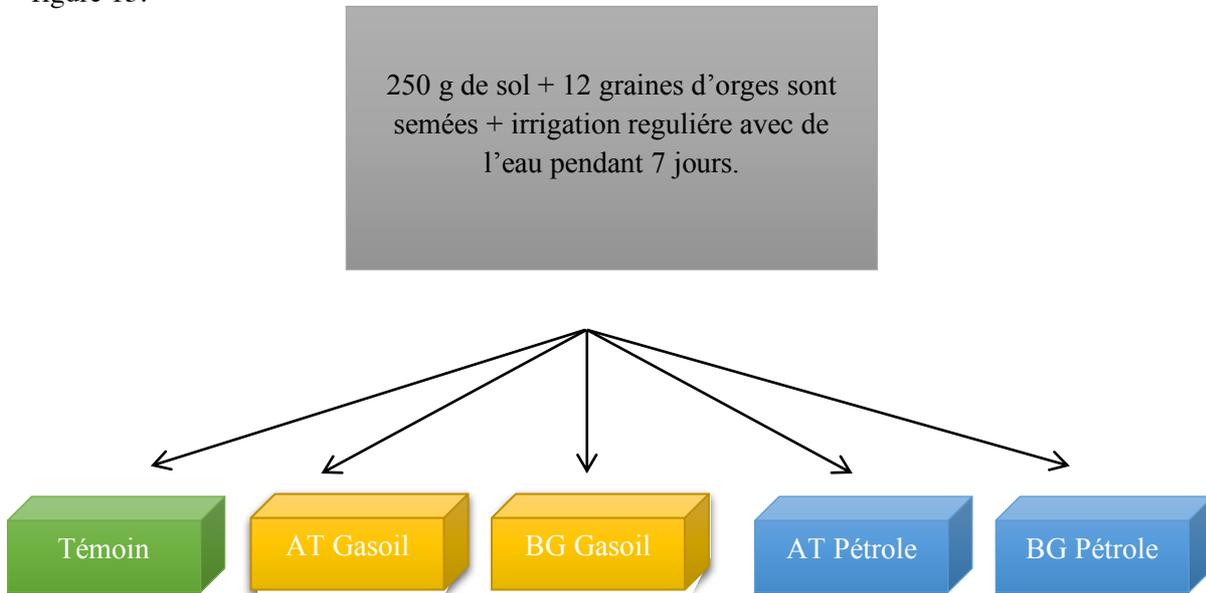


Figure 1:Dispositif expérimental du test de germination



Figure 2:Test de germination

8.3.2 La longueur racinaire

Les racines sont extraites en les plaçant dans de l'eau et les longueurs de racines sont mesurées. L'orge produit de multiples racines, et seuls les plus longues sont mesurées (Saterbak *et al.*, 1999; Rahman *et al.*, 2002).

8.3.3 L'indice de germination (Ig):

L'indice de germination est un pourcentage compris entre 0 et 100, indique la capacité de l'orge à germer dans un milieu donné. Le taux de germination des graines et la longueur des racines sont combinés en un indice de germination (Ig) selon l'équation suivante (D'Annibale *et al.*, 2006 ; Graj *et al.*, 2013) :

$$\text{Indice de germination (Ig)} = (\text{Ge} \times \text{Le} / \text{Gt} \times \text{Lt}) \times 100$$

Où :

Ge : Est le nombre de graines germées dans l'échantillon.

Gt : Est le nombre de graines germées dans le témoin.

Le : Est la longueur des racines dans l'échantillon.

Lt : Est la longueur des racines dans le témoin.

RESULTATS

RESULTATS

1. Caractérisation des isolats dégradant les hydrocarbures

1.1 Aspect macroscopique

L'observation macroscopique des colonies développées des trois souches après repiquage sur la gélose nutritive montre les résultats regroupés dans le tableau 7.

Tableau 8:Aspect macroscopique des colonies isolées sur gélose nutritive

Souche	Forme	Élévation	Opacité	Bord	Aspect	Consistance	Pigment
I2	Irrégulière	Élevée	Translucide	Ondulé	Lisse	Crémeuse	Vert
H9	Irrégulière	Élevée	Translucide	Ondule	Lisse	Crémeuse	Vert
M6	Circulaire	Bombée	Opaque	Régulier	Lisse	Crémeuse	Rouge

1.2 Aspect microscopique

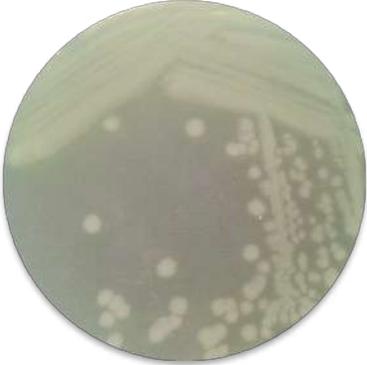
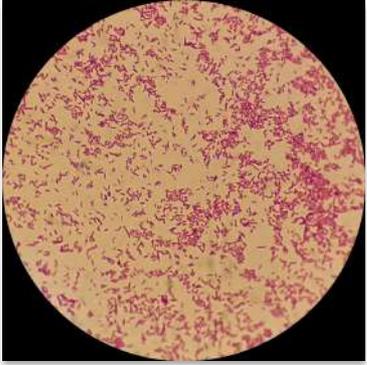
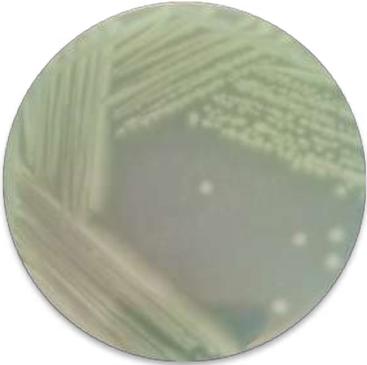
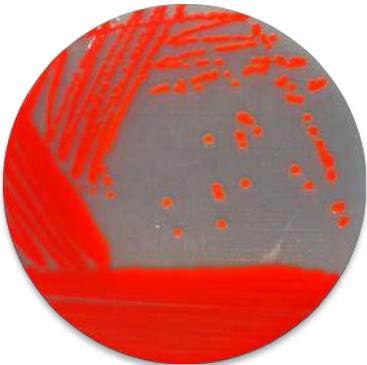
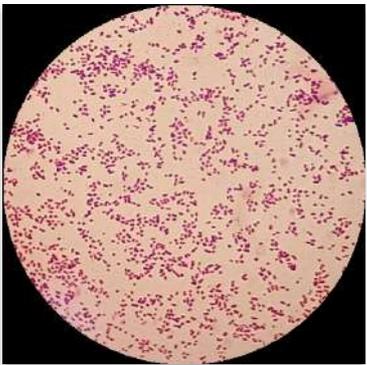
Après observation microscopique de la coloration de Gram, les résultats obtenus sont les suivants :

Tableau 9:les différents aspects microscopiques des souches

Souche	Gram	Forme	Mode de regroupement
I2	-	Bacilles	Isolées
H9	-	Bacilles	Isolées
M6	-	Coccobacilles	Isolées

Les résultats obtenus dans les deux tableaux précédents confirment la pureté des souches.

Tableau 10: Aspect macroscopique et microscopique des isolats

	
<p>I2 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)</p>	
	
<p>H9 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)</p>	
	
<p>M6 : <i>Serratia marcescens</i></p>	

1. Suivre de la bioremediation des sols pollués

1.1 Suivre de l'évolution de la charge microbienne dans le sol pollué

Tableau 11 : Nombre de microorganismes de chaque dilution du sol.

dilution	Témoin				AT Pétrole				BG Pétrole				AT Gasoil				BG Gasoil					
	T0	T15	T30	T45	T0	T15	T30	T45	T0	T15	T30	T45	T0	T15	T30	T45	T0	T15	T30	T45		
10^{-1}	>300	185	>300	>300	>300	10	>300	36	La charge initiale du sol +	223 pigment rouge	>300	>300 pigment rouge et vert	>300	118	>300	73	La charge initiale du sol +	223 pigment rouge et vert	>300	>300		
10^{-2}	112	13	>300	50	112	0	43	20		30 Pigment rouge	44 pigment Vert	50 Pigment vert	112	66	6	15		30	71	73		
10^{-3}	12	4	7	24	12	0	6	10	La taille d'inoculum	0	20 Colonies vertes	25 colonies vertes	12	1	1	0	La taille d'inoculum	0	14	15		
10^{-4}	0	0	0	0	0	0	1	0		1	6	0	0	2	0	0		0	0	2	0	
10^{-5}	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0
10^{-6}	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0
10^{-7}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Tableau 1: Charge microbienne (UFC/g) aux temps T₀, T₁₅, T₃₀, T₄₅

T (jours)	T ₀					T ₁₅				
Bac	Témoin	AT Gasoil	BG Gasoil	AT Pétrole	BG Pétrole	Témoin	AT Gasoil	BG Gasoil	AT Pétrole	BG Pétrole
N (UFC/g)	$1,12 \times 10^7$	$1,12 \times 10^7$	$2,12 \times 10^7$	$1,12 \times 10^7$	$2,12 \times 10^7$	$1,85 \times 10^6$	$1,18 \times 10^6$	$1,3 \times 10^8$	/	$2,23 \times 10^5$
T (jours)	T ₃₀					T ₄₅				
Bac	Témoin	AT Gasoil	BG Gasoil	AT Pétrole	BG Pétrole	Témoin	AT Gasoil	BG Gasoil	AT Pétrole	BG Pétrole
N (UFC/g)	/	/	$7,1 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	2×10^7	$2,4 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$	2×10^6	$2,5 \times 10^7$

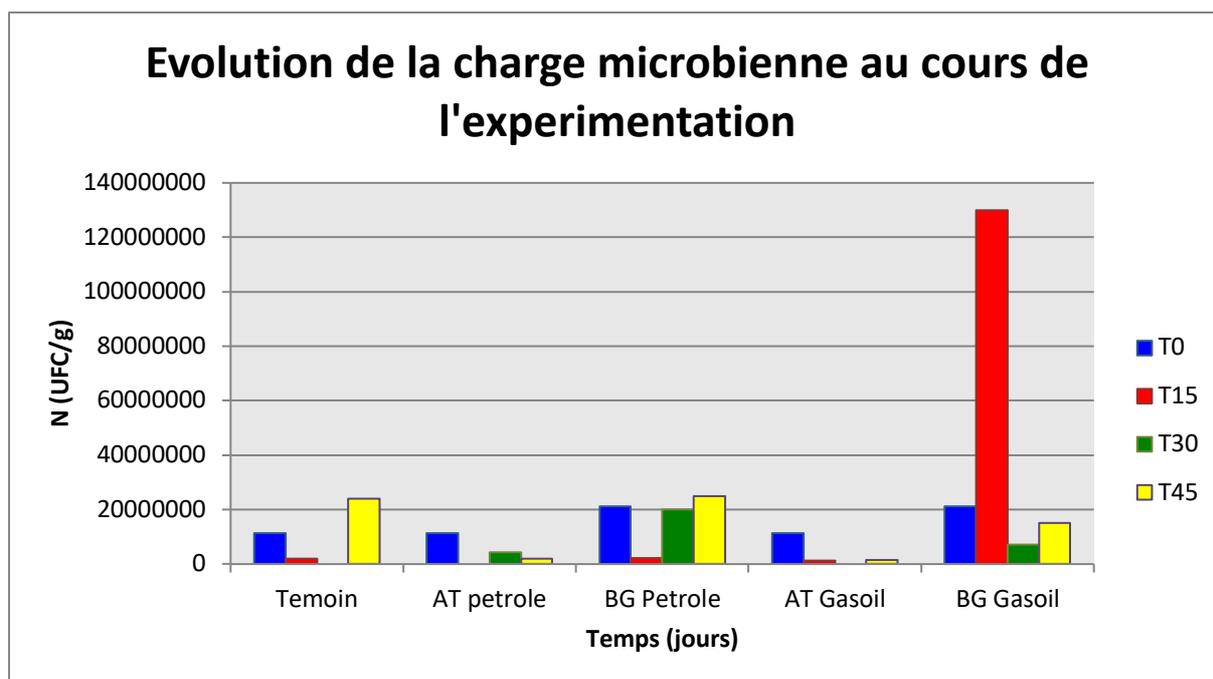


Figure 15: Diagramme en bâtonnet représentant le nombre des microorganismes (UFC/g) pendant la durée de traitement

À T_0 : La charge initiale du sol est la même pour le bac témoin et les autres bacs d'atténuation (AT Pétrole + AT Gasoil). Par contre dans les bacs de bioaugmentation (BG Pétrole + BG Gasoil), la charge initiale est composée de microorganismes issus du mélange de deux sols + l'inoculum bactérien.

Pétrole brut

T_{15} et T_{30} : Nous avons constaté, une diminution de la charge microbienne dans les deux bacs AT pétrole + BG pétrole, cependant elle est plus forte pour le bac AT pétrole que le bac BG pétrole. Cette baisse de charge dans le bac AT pétrole par rapport à T_0 est logique car c'est l'adaptation de la flore microbienne à la source de carbone et aux conditions environnantes.

La forte diminution de la biomasse microbienne dans le bac AT pétrole par rapport au bac BG Pétrole peut s'expliquer par l'adaptation rapide des souches inoculées dans le bac BG Pétrole. On peut consolider cela par l'augmentation importante du nombre microbien à T_{30} (2×10^6 UFC/g) dans le BG par rapport au bac AT pétrole.

En ce qui concerne le bac BG Pétrole, on constate qu'au contraire à **T₄₅**, la charge est plus importante qu'à **T₁₅**, nous admettons que les bactéries inoculées continuent à dégrader le polluant quel que soit sa complexité.

Gasoil

Concernant le **gasoil**, on constate à **T₁₅** une diminution de la charge microbienne dans le bac atténuation naturelle gasoil (AT Gasoil) ce qui est similaire aux résultats obtenus dans le bac Témoin. En revanche, il y'a une forte augmentation de la biomasse microbienne dans le bac bioaugmentation gasoil (BG Gasoil), ceci peut s'expliquer par le fait que les bactéries sont habituées à la présence du polluant ou ses dérivés comparativement à des bactéries non stressées par ces derniers. Celles-ci peuvent présenter une croissance accrue lorsque celui-ci est dans le sol. Au même temps aucune croissance des graines d'orges n'est constatée dans les deux bacs AT et BG Gasoil.

L'absence de croissance dans le bac BG Gasoil peut être dû à la libération de sous composées toxiques issus de la biodégradation du polluant.

À **T₃₀** : Nous observons une chute importante de la biomasse microbienne (de $1,3 \times 10^5$ à $7,1 \times 10^5$ UFC/g), cela peut être dû à l'appauvrissement du sol du bac BG Gasoil en composées facilement fermentescibles et le passage vers des substances plus complexes.

À **T₄₅** : Nous remarquons une rehausse de la charge des microorganismes présents dans le sol dans les 2 bacs AT et BG Gasoil, cependant elle était supérieure dans le bac BG Gasoi

2.2 Suivi de l'indice de germination

Tableau 13 : Indice de germination de chaque bac de traitement au cours de l'expérimentation.

Indice de germination (%)				
	T0	T15	T30	T45
Témoin	100	100	100	100
AT Gasoil	0	0	0	0
BG Gasoil	0	0	0,57	8,55
AT Pétrole	0	28	55	67,19
BG Pétrole	0	49	42	74,05

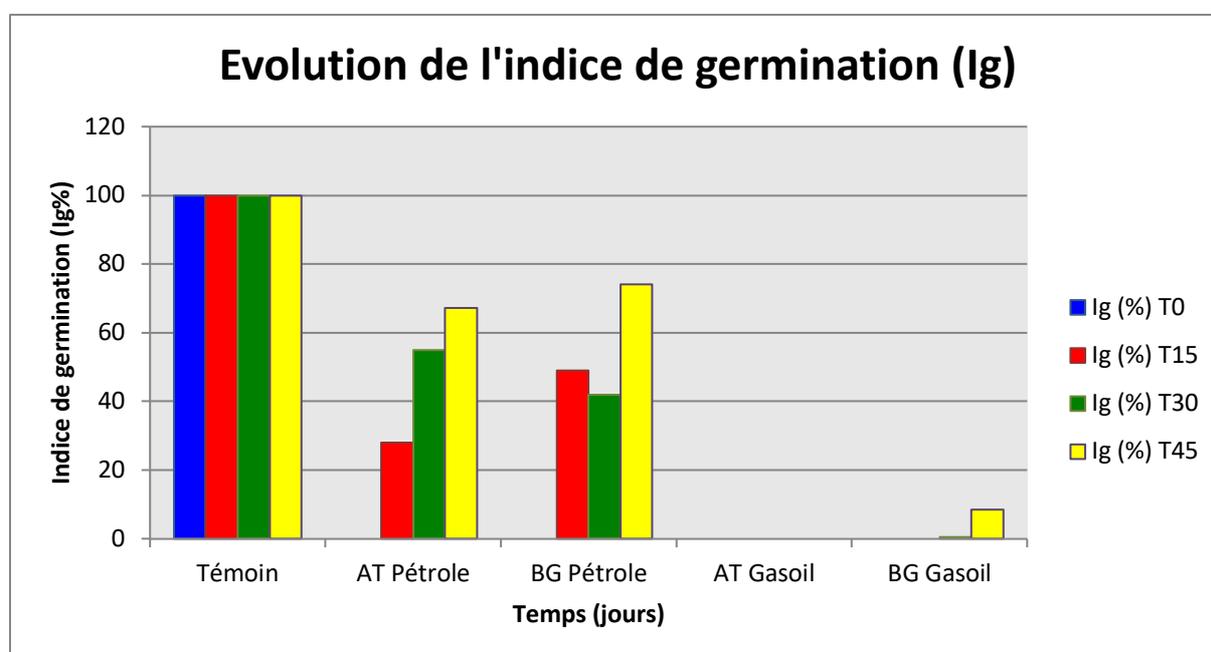


Figure 16: Diagramme en bâtonnets représentant l'évolution de l'indice de germination au cours du temps d'expérimentation



Figure 17 : Germination des grains d'orges

À T_0 : une croissance des graines d'orge est observée uniquement dans le bac témoin tandis que dans les autres bacs, aucune graine n'a germé. Ceci est dû à l'effet toxique des deux polluants (le polluant empêche la germination).

Pétrole brut

T_{15} et T_{30} : Une germination est constatée dans les 2 bacs AT et BG pétrole sauf que la croissance de l'orge été nettement meilleure dans le bac BG que dans le bac AT en présence du pétrole. Nous supposons ici qu'une fraction du polluant seulement a été éliminée. Et en parallèle ceci peut être dû à la stimulation de la croissance des plantes par les hydrocarbures aromatiques. En effet, les travaux de Graf en 1965 ont montré un effet stimulateur des hydrocarbures sur le rendement de la croissance de certains végétaux.

En parallèle nous avons observés une croissance très faible des plantes à T_{45} dans le bac AT Pétrole, ceci peut s'expliquer par l'épuisement des substances facilement fermentescibles (ex : hydrocarbures linéaires non ramifiés) et le passage vers des substances plus complexes (ex : hydrocarbures aromatiques ou ramifiés).

Un indice de germination (I_g) important est perçu à T_{30} dans le bac AT pétrole par rapport au bac BG ce qui nous parait illogique car le nombre microbien du bac BG (2×10^6 UFC/g) dépasse de loin celui du bac AT ($4,3 \times 10^5$ UFC/g).

À T_{45} : L'indice est redevenu plus important dans le bac BG à T_{45} par rapport au bac AT et ceci est en corrélation normale et logique avec l'augmentation du nombre microbien dans le bac BG a T_{45} dû à la dégradation du pétrole et la diminution de son effet toxique.

Gasoil :

A T₁₅ : L'absence de croissance dans le bac BG Gasoil peut être dû à la libération de sous composées toxiques issus de la biodégradation du polluant.

A T₃₀ : une germination d'une seule graine d'orge était aperçue dans le bac BG Gasoil qui prouve le début de la dépollution du sol par le mélange de bactéries.

À T₄₅ : une pousse de sept graines d'orges dans le bac BG Gasoil comparativement au bac AT Gasoil où aucune graine n'a poussé. Ces observations peuvent confirmer l'efficacité de la bioremediation du sol par le Gasoil.

DISCUSSION

DISCUSSION

Deux bactéries caractérisées et identifiées, dont le pouvoir de dégradation a été testé et confirmées au préalable sont utilisées :

L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* appartient à la famille des Pseudomonaceae, à l'ordre des pseudomonadales et la classe des Gammaproteobacteria.

Serratia marcescens est une espèce de la famille des enterobacteriaceae, de l'ordre des Enterobacterales et de la classe des Gammaproteobacteria.

Dans cet essai deux approches sont appliquées :

1. Atténuation naturelle : le principe de cette approche s'appuie sur le pouvoir des microorganismes endogènes à s'attaquer au polluant en tant que source de carbone, ces derniers sont issus d'un sol forestier et d'un sable de plage. Cela ne constitue pas un réel traitement puisque aucun apport bactérien n'a été fait.
2. Bioaugmentation : Ce traitement fait appel à des bactéries compétentes adaptées au préalable à plusieurs polluants et issues d'un sol pollué au pétrole brut.

3. Comparaison entre Gasoil et Pétrole

Les deux bactéries utilisées synthétisent des pigments :

- *La prodigiosine*, pigment rouge orangé produit par *Serratia marcescens*.
- *La pyocyanine*, pigment bleu vert produit par *Pseudomonas aeruginosa*.

Ces deux pigments sont mis en évidence sur gélose de dénombrement, les résultats de ce dernier ont démontré que :

Sur les cultures du sol BG Pétrole, il y a une dominance du pigment vert par rapport au rouge à l'inverse des cultures du sol BG Gasoil où le pigment rouge est en excès, ce qui indique que

P.aeruginosa a une préférence pour le pétrole brut alors que *S.marcescens* favorise le gasoil. Nous pouvons interpréter cela par la spécificité (affinité) des bactéries par rapport au polluant.

Cette affinité peut être dû la production de molécules à activités de surface appelées biosurfactants permettant aux bactéries de s'attaquer aux polluants différemment.

On observe également au niveau de ces deux bacs BG pétrole et BG Gasoil une meilleure croissance pour bac BG pétrole par rapport à celle du gasoil. Ceci peut être dû à l'isolement des bactéries à partir de sols contaminés par pétrole brut ce qui rend l'adaptation meilleure pour le bac BG pétrole.

L'évolution des populations bactériennes, suite à une pollution peut mettre en évidence les capacités épuratrices de certains microorganismes. En effet, l'augmentation de groupes bactériens au niveau d'un environnement pollué pourrait dénoter une capacité à dégrader le polluant (Milton, 2007).

Les faibles biomasses bactériennes observées lors des premières semaines de contamination sont expliquées selon Vogel et al., (2001) par l'action toxique du polluant qui provoque un ralentissement de l'activité de la microflore du sol.

Cependant, d'autres auteurs supposent que cette période est une période d'adaptation des microorganismes endogènes en générale et des bactéries additionnées pour la bioaugmentation avec la pollution délibérée et le nouveau milieu (Spain, 1990).

Étant donné que tous les microorganismes de la présente étude ont été isolées à partir d'un échantillon de sol contaminé par le pétrole, elles ont survécu et ont adopté très facilement le sol artificiellement contaminé par le pétrole ou le diesel, comme l'ont également indiqué d'autres auteurs (Sugiura *et al*, 1997 ; Rahman *et al*, 2003). Ceci était évident à partir de l'augmentation des populations de *P.aeruginosa* et *S.marcescens* dans les 2 bacs BG pétrole et BG Gasoil.

Le potentiel de biodégradation de pétrole et de gasoil par la méthode de bioaugmentation indique que les trois souches ont la capacité d'utiliser le pétrole et le gasoil comme source nutritive. Le pourcentage de dégradation était plus élevé pour le pétrole que le gasoil. Sachant que la croissance de *P.aeruginosa* était plus forte dans le bac BG Pétrole que *S.marcescens* , on en déduit que cette dernière est plus efficace en présence du pétrole brut ce

qui est le cas pour les travaux de John *et al.*, (2011) qui a obtenu une meilleure efficacité avec *P.aeruginosa* pour la biodegradation du pétrole brut.

D'autres travaux réalisés par Chithra et Hema Shenpagam., (2014) utilisant *Pseudomonas* sp qui dégrade le pétrole mieux que d'autres espèces isolées avec le pourcentage le plus élevé de dégradation de 92.3%, après 25 jours d'incubation. Contrairement à Montero-Rodriguez *et al.*, (2015) qui ont obtenu une remediation de 88,27% avec *S.marcescens*. Tandis que Bordoloi and Konwar, 2008) ont atteint une bioremediation de 49-54% avec *P.aeruginosa*.

Le présent travail nous a permis de déduire que la présence de pétrole et de gasoil dans les sols artificiellement contaminés inhibe la germination des graines de blé dur (*Triticum durum Desf.*) et réduit leur croissance au niveau de la longueur racinaire. La germination et le développement des plantes cultivées sont liés à la structure chimique des carburants testés, leur concentration dans le sol et l'espèce elle-même (Chaîneau *et al.*, 1996).

Le pétrole et le diesel semblent être toxiques pour le blé. L'effet inhibiteur de diesel sur l'émergence de blé dur a été spectaculaire, il s'est manifesté essentiellement par un retard de germination et la pourriture de quelques des graines. L'explication la plus probable est sa propriété physique hydrophobe ; le film de carburant diesel qui se forme autour des graines peut agir comme une barrière physique, réduisant à la fois le transfert de l'eau et de l'oxygène assimilés par les graines. Cela inhibe la réponse de la germination et explique le retard de levée, de croissance et de développement des plantules (Adam et Duncan., 2002).

En vue des résultats obtenus, la bioaugmentation est plus efficace que l'atténuation naturelle ce qui concorde avec les travaux de Howrot et Nowak, 2005 qui rapportent que la bioaugmentation augmente le pourcentage de dégradation jusqu'à 89% en comparaison avec l'atténuation naturelle qui elle a un pourcentage de dégradation de 58%.

CONCLUSION

CONCLUSION

En conclusion l'objectif principal de ce travail était de dépolluer des sols contaminés de pétrole brut et gasoil par des bactéries préalablement isolées et identifiées pour leur capacité épuratrice.

Des échantillons de sol sont bioaugmentés par l'apport de flore exogène et comparés à une atténuation naturelle qui ne compte que sur sa flore indigène. D'autre part, l'efficacité du traitement a été évaluée par le suivi de la biomasse bactérienne et d'un test de germination chaque 15 jours et ceci pendant 45 jours.

La mise en œuvre de l'expérience sur des sols volontairement pollués par des hydrocarbures pétroliers a montré que le traitement de ces sols été possible par le procédé biologique adopté. La présence des bactéries exogènes semble activer la biotransformation et l'élimination des contaminants organiques comparée à l'atténuation naturelle. L'ensemble des résultats que nous avons obtenus se résume ainsi :

La bioaugmentation par le consortium (I2 + H9 + M6) a donné une meilleure dégradation du pétrole (15 jours) par rapport au gasoil (30 jours). Ceci affirme une meilleure performance des deux souches de *Pseudomonas aeruginosa* qui étaient en dominance dans le bac BG Pétrole par comparaison à celui du gasoil où *Serratia marcescens* dominait.

Pour les sites contaminés, beaucoup de progrès ont eu lieu au cours des dernières années se traduisant par l'amélioration de l'assainissement des polluants présents. La bioaugmentation est une technique de plus en plus utilisée, mais d'autres méthodes comme le

recours à des micro-organismes immobilisés ou l'enrichissement direct pourraient augmenter le taux de succès de cette approche. En outre, plusieurs autres approches de bioaugmentation, y compris la bioaugmentation par transfert de gène (plasmide), la bioaugmentation rhizosphérique, et la phytoaugmentation, sont actuellement au stade de développement, et pourraient élargir considérablement l'éventail d'applications de cette technique. L'avantage des techniques biologiques de traitement dont la bioaugmentation reste le maintien des propriétés physicochimiques, voire biologiques des sols. Ces techniques se sont largement développées ces dernières années, car elles sont efficaces, peu coûteuses, et s'adressent à un grand nombre de polluants organiques ou non, même si le traitement est souvent plus long

que par les techniques conventionnelles, et ne peut s'appliquer qu'à des concentrations modérées en polluants.

En perspective, on propose :

- Prolonger la durée d'expérimentation.
- Augmenter le nombre de répétitions.
- Expérimenter plusieurs concentrations du polluant.
- Procéder à un dosage du polluant a différents temps.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADAM Gillian., DUNCAN Harry., 2002. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environ Pollut.* Vol. 120 N 2, p 363-70.
- BEDDIAR, Soumia ., BEN KACHROUDA, Rekaia,2013. *Etude des caractères d'adaptation morpho-physiologique et biochimique des plantules du blé dur à la salinité. Mémoire de master académique.* Biotechnologie végétale.Ouargla : Université kasdi Merbah Ouargla, 64p.
- BENCHOUK, Amina., 2017. *Bioremediation des sols pollués de pétrole par les microorganismes indigènes et amélioration génétique de leur pouvoir.* Thèse de doctorat : Microbiologie appliquée. Mostaganem : Université d' Ibn Bais Mostaganem, 199 p.
- BERKOUCHE, Houria., HADJADJ, Hacina, 2015.*Essai de phytoremédiation d'un sol pollué aux hydrocarbures en utilisant la fève, les pois et l'orge.* Mémoire de fin d'étude. Protection de l'environnement.Tizi-Ouzou : Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, 77p.
- BOCARD, Christian, 2006. *Marées noires et sols pollués par des hydrocarbures : enjeux environnementaux et traitement des pollutions.* Paris : Editions Technip-Paris. 150 p.
- BONNEAU, M., SOUCHIER, B, 1994. *Méthodes d'analyses des sols.*1ère édition .Paris : Masson. Pédologie : 2.Constituants et propriétés des sols. p.619-654.
- BORDOLOI, N.K., KONWAR, K. Bolin., 2008. Microbial surfactant-enhanced mineral oil recovery under laboratory conditions. *Colloids and Surfaces B.* Vol. 63 N°1, p 73-82.
- BOSCH, Rafael., GARCIA-VALDES, Elena., MOORE, R. Edward., 1999. Genetic characterization and evolutionary implications of a chromosomally encoded naphthalene-degradation upper pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Gene.* Vol 236 N°1, p 149-57.
- BOUAFIANE, Mabrouka ,2015.*Recherche de la performance de quelques souches bactériennes dans la réhabilitation de deux types de sols pollués par les hydrocarbures.* Mémoire de Magister .Eco-pédologie et environnement.Ouargla : Université Kasdi Merbah Ouargla, 83p.
- BOULAINÉ, Jean, 1983. V.V.Dokouchaev et les débuts de la pédologie. *Revue d'histoire des sciences* .Vol. 36 N° 3-4, p. 285-306. DOI : https://www.persee.fr/docAsPDF/rhs_0151-4105_1983_num_36_3_1942.pdf
- BRGM, *Quelles techniques pour quel traitement-analyse coûts-bénéfices*, 2010. Disponible sur : <http://infoterre.brgm.fr/rapports/RP-58609-FR.pdf> (Consulté le 01/06/2019).
- Calvet, Raoul, 2003. *Le sol : propriétés et fonctions. Tome 1: Constitution et structure, phénomènes aux interfaces.* Paris: Editions France Agricole, Dunod.456 p.
- Caroline SOUCY ,2016. 16- *Mesure de la porosité du sol* [en ligne] Disponible sur :

<https://docplayer.fr/20319253-16-mesure-de-la-porosite-du-sol.html> [consulté le 16/05/2019]

- CEDRE, SERES, 1996. *Sols contaminés, sols à décontaminer*. Bruxelles : Presses de l'Université Saint-Louis. 445p
- CHAINEAU Claude-Henri., MOREL Jean-Louis., OUDOT J., 1996. Land treatment of oil-based drill cutting in an agricultural soil. *J. environ. Quality*. Vol. 25 N°4, p 858-867.
- CHITHRA S., HEMA ShENPAGAM N., 2014. Isolation and identification of oil degrading bacteria from oil contaminated soil and comparison of their bioremediation potential. *Gjra-Global Journal for Research Analysis*, Vol 3 N°8, p 181-184.
- D'ANNIBALE, A., ROSETTO, F., LEONARDI, V. et al., 2006. Role of autochthonous filamentous fungi in bioremediation of a soil historically contaminated with aromatic hydrocarbons *Applied and Environmental Microbiology*. *Appl Environ Microbiol*. Vol. 72 N°1, p.28–36. DOI:[10.1128/AEM.72.1.28-36.2006](https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.28-36.2006)
- DAVET, Pierre, 1996. *Vie microbienne du sol et production végétale*. 1ère édition. Paris : Editions INRA. 384p.
- DOMMERGUES, Yvon, 2019. *Sols – Microbiologie*. In : Encyclopædia Universalis [En ligne] 11p. Disponible sur : <http://www.universalis.fr/encyclopedie/sols-microbiologie>
[Consulté le 16/05/2019]
- DUCHAUFOR, Philippe, 1984. *Abrégé de pédologie*. Paris : Masson. 220p.
- DUFRESNE, Myriam, 2013. *Les technologies de traitement des sols contaminés : lesquelles sont durables ?*. Maîtrise : Environnement. Sherbrook : Université de Sherbrook, 61p.
- *ENERFY4ME, Pétrole et gaz naturel* [en ligne]. (Page consultée le 10/05/2019). https://www.google.com/search?ei=otcSXYvyD6q8gwennL7wBw&q=p%C3%A9trole+et+gaz+naturel+pdf&oq=p%C3%A9trole+et+gaz+naturel+pdf&gs_l=psy-ab..3..0j0i22i30i7.13631.15179..15397...0.0..0.132.499.0j4.....0....1.gws-wiz.....0i71j0i67.9_TVSC5rHRg
- *Environnementales, applications industrielles*. Paris : Publications de l'institut français du pétrole. 412 p.
- ERIKSON, Mikeal., SODERSTEN, Eric., YU, Zhongtang. et al., 2003. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons at Low Temperature under Aerobic and Nitrate-Reducing Conditions in Enrichment Cultures from Northern Soils. *Appl. Environ. Microbio*. Vol. 69 N°1, p 275-284.
- EVANS, F.Flavia., ROSADO, Alexandre.Soaes., SEBASTIAN, Gina.Vasquez. et al, 2004. Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 49 N°2, p 295-305.
- FAO. *Perméabilité du sol* [en ligne] Disponible sur :

http://www.fao.org/tempref/FI/CDrom/FAO_Training/FAO_Training/General/x6706f/x6706f09.htm [consulté le 16/05/2019]

- FAUGIER, Aurélie, 2010. *Diversité bactérienne des sols : accès aux populations à effectifs monitaires « the rare biosphere »*. Thèse de doctorat. Sciences du Vivant [q-bio]. Lyon : Ecole centrale de lyon, 175p.
- FEZANI, S., KHIDER , F, 2007. *Toxicité des hydrocarbures vis-à-vis des plantes, leurs caractérisations et leurs effets sur la microflore du sol. Mémoire d'Ingénieur d'Etat en biologie*. Protection de l'environnement .Tizi-Ouzou : Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, 73p.
- FOUJIL, Fatma-ZOHRA, 2018 .Bioremédiation, la solution de l'heure. *Journal El Watan* [en ligne].Disponible :
<https://www.elwatan.com/pages-hebdo/etudiant/bioremediation-la-solution-de-lheure-21-02-2018>
- FOUKOU MBOGNE, Pascal Martial, 2017. *Bioremédiation augmentée de sols contaminés aux hydrocarbures lourds par ajout de substrats organiques*. Mémoire de maitrise .Génie de l'environnement. Ecole de technologie Supérieure de Montréal : Université du Québec, 109 p.
- GAUDU, Florian., 2014. *Bioremediation des sols pollués aux les hydrocarbures les hydrocarbures aromatiques et les alcanes*. Mémoire de Master : Biologie gestion Marketing. Rennes : Université de Rennes 1, 25p
- GAUTIER, Celine, 2007. *Biodégradation Des Hydrocarbures En Milieu Poreux Insaturé*. Thèse de Doctorat : Physique chimie. Pau :université de Pau Et Des Pays De L'ADOUR Institut FrançaisDu Pétrole. 248 p.
- GELIN, Sandrine ., Stengel,Pierre ,1998. *Sol : interface fragile*. 1ère édition. Paris : Editions Quae - c/o INRA RD 10 .222p.
- GOEURY, C. (2012). <<Modélisation du transport des nappes d'hydrocarbures en zones continentales et estuariennes>> [En ligne]. Thèse de doctorat : Mécanique des fluides. Paris. Université Paris-Est. 250 p. Disponible sur : https://pastel.archives-ouvertes.fr/file/index/docid/778087/filename/TH2012PEST1131_complete.pdf
- GRAF VON, W, 1965. On the natural occurrence and importance of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Median. Klin*. Vol 60, 561p.
- GRAJ, W., PIOTR, L., ALICJA, S. *et al.*, 2013. Bioaugmentation with petroleum-degrading consortia has a selective growth-promoting impact on crop plants germinated in diesel oil-contaminated soil .*Water Air Soil Pollut*,Vol.224 N°9, 1676p.DOI:[10.1007/s11270-013-1676-0](https://doi.org/10.1007/s11270-013-1676-0)

- GRIMM, C. Ann., HARWOOD, S. Caroline., 1999. NahY, a catabolic plasmid-encoded receptor required for chemotaxis of *Pseudomonas putida* to the aromatic hydrocarbon naphthalene. *Journal of Bacteriology*, Vol 181 N°10, p 3310-3316.
- GUERMOUCHE M'RASSI, Amel., 2014. *Caractérisation moléculaire des bactéries impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures*. [En ligne]. Thèse de doctorat : Microbiologie. Oran : Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, 166 p. Disponible sur : <https://theses.univ-oran1.dz/document/14201408t.pdf>
- HAWROT, Malgorzata., NOWAK, A., 2005. Effects of different soil treatments on Diesel fuel Biodegradation. *Polish J. of Environ. Stud.* Vol. 15 N 4, p 643-646.
- IAWNICZAK, Lukasz., MARECIK, Roman., CHRZANOWSK, Lukasz., 2013. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol 97 N°6, p 2327-2339.
- JOHN, C. Richard., ITAH Alfred. Yang., ESSIEN, P. Joseph. *et al.*, 2011. Fate of Nitrogen-Fixing Bacteria in Crude Oil Contaminated Wetland Ultisol, *Bull Environ Contam Toxicol.* Vol. 87 N°3, p 343–353.
- JOHNSEN, R. Anders., BENDIXEN, Karen., KARLSON, Ulrich., 2002. Detection of microbial growth on polycyclic aromatic hydrocarbons in microtiter plates by using the respiration indicator WST. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol 68 N°6, p 2683-2689.
- JUHASZ, L. Albert., NAIDU, Ravi., 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration and Biodegradation*, Vol 45 N°1-2, p 57-88.
- KADALI, Krishna., SIMONS, Keryn., SHEPPARD, Petra., *et al.*, 2012. Mineralisation of weathered crude oil by a hydrocarbonoclastic consortia in marine mesocosms. *Water Air Soil Poll.* Vol. 223 N°7, p 4283–4295.
- KAPADIA, S.G., YAGNIK, B.N., 2013. Current trend and potential for microbial biosurfactants. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences.* Vol. 4, p 1-8.
- KAPLAN, W. Christopher., KITTS, L Christopher., 2004. Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Appl Environ Microbiol.* Vol. 70 N°3, p 1777-1786.
- KOLAR, L., LEDVINA, R., TICHA, J. *et al.*, 1975. Contamination of soil, agricultural crops, and vegetables by 3,4-benzopyrene in the vicinity of Ceske Budejovice. *Cesk. Hyg.* Vol 20 N°3, p 139.
- KOSHLAF, Eman., BALL, Andrew, 2017. Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. *AIMS Microbiology*, Vol. 3 N°1, p 25-49.
- LALAOUI, Sonia, 2015. *Caractérisation physico-chimiques des carburants des véhicules cas : essence super et gazole*. Mémoire de fin d'études. Analyse chimique. Bejaia : Université Abderrahmane MIRA – Bejaia, 74p.
- IAWNICZAK, Lukasz., MARECIK, Roman., CHRZANOWSK, Lukasz., 2013. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol 97 N°6, p 2327-2339.
- LEAHY, Joseph, COLWELL, Rita, 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews.* Vol. 54 N°3, p 305-315.
- Lisan, 20-06-2019. *Texture et structure* [en ligne] Disponible sur :

<https://www.docdeveloppementdurable.org/file/paysagisme/sol/structuretexture.pdf>

[consulté le 15/05/2019]

- MASSENET Jean -Yves, Janvier 2010. *Chapitre III les constituants solides du sol* [en ligne] Disponible sur : <http://jymassenet-foret.fr/cours/pedologie/PEDO3.pdf> [consulté le 15/05/2019]
- MCKEW, Boyd., COULON, Frederic., OSBORN, Marc *et al.*, 2007. Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary. *UK. Environ Microbiol.* Vol. 9, p 165–176.
- MILITON, Cécile, 2007. *Caractérisation des communautés procaryotiques impliquées dans la bioremédiation d'un sol pollué par des hydrocarbures et développement d'outils d'analyse à haut débit: les biopuces ADN*. Thèse de doctorat. Génomique et écologie microbienne. Clermont-Ferrand : Université Blaise Pascal, 441p.
- MONTERO-RODRIGUEZ, Dayana., FONTENELE, Rosileide., RAMOS, Dafne. *et al.*, 2014. *Ability of Serratia marcescens UCP/WFCC 1549 for biosurfactant production using industrial wastes and fuels biodegradation : Industrial, medical and environmental applications of microorganisms: Current status and trends*. Madrid :Badajoz. p 211-216.
- MONTERO-RODRIGUEZ, Dayana., FONTENELE, Rosileide., RAMOS, Dafne. *et al.*, 2015. Bioremediation of Petroleum Derivative Using Biosurfactant Produced by *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549 in Low-Cost Medium. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* [en ligne]. Vol. 4 N°7, (page consultée le 18/06/2019) (<https://pdfs.semanticscholar.org/0af0/a0d0138c4ffb933e0f0d5ebf25c2e6178acf.pdf>)
- MOUGIN, Christain., BOUKCIM, Hassan., JOLIVALT, Claude, 2009. *Advances in applied bioremediation : Soil bioremediation strategies based on the use of fungal enzymes*. Berlin: Springer. 123-149.
- MOUGIN, Christian ; CHAPLAIN, Veronique ; GAILLARDAN, Paul *et al.*, 1996. Le traitement biologique des sols pollues par des composés organiques l'intérêt des champignons filamenteux. *Courrier de l'environnement de l'INRA* [en ligne], N°28 (consulté le 25/04/2019) (<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01205470/file/C28Asther.pdf>)
- MORASCH, Barbara., RICHNOW, Hans., SCHINK, Bernahrd. *et al.*, 2002. Carbon and hydrogen stable isotope fractionation during aerobic bacterial degradation of aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 68 N°10, p 5191-5194.

- MUTHUSAMY, Krishnaswamy., GOPALAKRISHNAN, Subbuchettiar., Ravi, Thiengungal Kochupappy. *Et al.*, 2008. Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Current science association*. Vol. 94 N°6, p 736-747.
- NORTCLIFF, Stephen , 2002. Standardisation of soil quality attributes .*Agriculture.Ecosystems and Environment*. Vol. 88 N°2, p.161-168.
- PACWA-P OCINICZAK, Magdalena., PLAZA, Grazyna Anna., PIOTROWSKA-SEGET, Zofia. *Et al.*, 2011. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Int. J. Mol. Sci*. Vol. 12 N°1, p 633-654.
- PANSU, Marc., GAUTHEYROU, Jacques, 2003.*L'analyse du sol, minéralogique, organique et minérale*. 1ère édition. Montpellier: Springer ,996p.
- PENG,F., WANG, Y., SUN, F. et al., 2008. A novel lipopeptide produced by a Pacific Ocean deep-sea bacterium, *Rhodococcus* sp. *TW53*. *Journal of Applied Microbiology*. Vol .105N°3, p.625-929.
- PIEMONTE Vincenzo, 2017. *Bioremediation of Hydrocarbon Contaminated Soil Using Selected Organic Wastes* [en ligne] Disponible sur : <http://www.oil-gasportal.com/bioremediation-of-hydrocarbon-contaminated-soil-using-selected-organic-wastes/> [consulté le 8/04/2019]
- RABODONIRINA, Rondro Suzanah, 2015. *Contaminants organiques (HAP, Me-HAP, PCB) en environnement: Etude de milieu naturel et de faisabilité de bioremédiation* .[en ligne]. These de doctorat : Optique, Lasers, Physico-chimie, Atmosphère. Lille: Université de Lille 1, 204 p. Disponible sur : <https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-01581420/document>
- RAHMAN K.S.M Pattanathu., RAHMAN Thahira., KOURKOUTAS Yiannis. *et al.*, 2003. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology*. Vol. 90 N°2, p.159–168.
- RAVEN, P.H., BERG, L.R ., HASSENZAHN,D.M ,2009. *Environnement*. 6ème édition. Bruxelles : De Boeck Supérieur, 700 p.
- REBUFFAT,Sylvie ., ZIRAH,Séverin, 21/09/ 2018. *Biodiversité et rôles des bactéries du sol* [en ligne] Disponible sur <http://edu.mnhn.fr/mod/page/view.php?id=1269> [consulté le 16/05/2019]
- République de Côte d'Ivoire Union-Discipline-Travail. Exposé de chimie [en ligne]. (Page consultée le 16/05/2019) <https://fr-static.z-dn.net/files/df6/b08f2492eda58626288851b86b42e85e.pdf>
- ROBERT, Michel, 1996. *Le sol : Interface Dans L'environnement*. Paris : Masson. 244p.
- RODRIGUEZ-BLANCO, Arturo., ANTOINE, Virginie., PELLETIER, Emilien. *et al.*, 2010. Effects of temperature and fertilization on total vs. active bacterial communities exposed to crude and diesel oil pollution in NW Mediterranean Sea. *Environ Pollut*. Vol. 158 N°3, p 663–673.

- SABIROVA, Julia., FERRER, Manuel., REGENHARDT, Daniela. *et al.*, 2006. Proteomic insights into metabolic adaptations in *Alcanivorax borku-mensis* induced by alkane utilization. *J. Bacteriol.* Vol. 188 N°11, p 3763–3773.
- SARKAR, Dibyendou., FERGUSON, Michael., DATTA, Rupali. *et al.*, 2005. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. *Environ Pollut.* Vol. 136 N°1, p 187-195.
- SATERBAK Ann, TOY Robin , WONG Diana., *et al.*, 1999. Ecotoxicological and analytical assessment of hydrocarbon-contaminated soils and application to ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry.* Vol. 18 N°7, p1591–1607.
- SCIENCES ADVENTURE, L'industrie chimique et le pétrole [en ligne]. (Page consultée le 11/05/2019)
www.sciencesadventure.be/sciencesadventure/documents/Petrole.pdf
- SEMPLE, K.T., REID, B.J., FERMOR, T.R., 2001. Impact of composting strategies on the treatments of soils contaminated with organic pollutants. *Environ. Pollut.* VI.112, p. 269-283.
- SMIT, Eric., LEEFLANG, Paula., GOMMANS, Suzanne. *et al.*, 2001. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol 67 N°5, p 2284-2291.
- SOUICI, Sabrina., ANNOU, Hadjer ,2015. *Evaluation de la phytotoxicité des hydrocarbures pétroliers sur la germination de quelque plante* .Mémoire de fin d'étude. Biotechnologie végétale. Ouargla : Université Kasdi Merbah Ouargla, 89p.
- SPAIN, J.C, 1990. *Enhanced biodegradation of pesticides in the environment: Microbial adaptation in aquatic ecosystems: Microbial adaptation in aquatic ecosystems.* The University of Michigan: Kenneth D. Racke, Joel R. Coats, American Chemical Society. Division of Agrochemicals. 302p.
- SPOSITO, Garisson, 2008. *The Chemistry of Soils.* 2ème édition .New york: Oxford University Press, 344p.
- STEVCEVSKA, V., JOVANOVIC-KOLAR, J, 1974. Influence of air pollution on the content of 3,4- benzopyrene in non-refined oil obtained from sunflower seeds grown in differently polluted areas. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, Vol 23 N°2, p 191-196.
- SUGIURA Keiji., ISHIHARA Masami., SHIMAUCHI Toshitsugu. *et al.*, 1997. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 31 N°1, p 45–51.
- TANG, Jingchun., WANG, Rugang., NIU, Xiaowei., *et al.*, 2010. Enhancement of soil petroleum remediation by using a combination of ryegrass (*Lolium perenne*) and different microorganisms. *Soil Tillage Research.* Vol. 110 N°1, p 87–93.

- TARAYRE, Cedric., 2012. *Bioremédiation de sols pollués aux hydrocarbures*. Editions Universitaires Européennes. 116 p.
- VANDECASTEELE, Jean-Paul., 2005. *Microbiologie pétrolière – concepts, implications*
- VOGEL, J., DRAPKIN, B., OOMEN, J. *et al.*, 2001. Phosphorylation of gamma-tubulin regulates microtubule organization in budding yeast. *Dev cell*. Vol. 1 N5, p 621-631.
- VAUVILLIER Nicolas, 01/07/2019. *Les sols : propriétés et formation. Fiches de Cours de SVT / Biologie destinée aux élèves de Lycée*[en ligne] Disponible sur :

<http://keepschool.com/fiches-de-cours/lycee/svt-biologie/sols-proprietes-formation.html> [consulté le 16/05/2019]

- WACKETT, Lawrens P., HERSHBERGER, C.Douglas., ELLIS, Lynda B.M, 2000. The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: Microorganisms genomics and prediction. *Nucleic Acids res*. Vol.28N°1, 377–379.DOI [10.1093/nar/28.1.377](https://doi.org/10.1093/nar/28.1.377)
- ZEGGANE, Yasmina., KASSA, Safia., 2015. *Études des performances De Gasoil Algerien*. Mémoire de Master : Génie chimique. Université Abderrahmane MIRA-Bejaia. 82p.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : composition des milieux de culture utilisés

1. Le bouillon nutritif (BN)

Extrait de levure : 1g

Extrait de viande : 2g

Peptone 5g NaCl : 5g

Eau distillée : 1000ml

pH=7.4

2. La gélose nutritive (GN)

Gélose nutritif déshydratée : 23,5g

L'eau distillée : 1000ml

3. L'eau physiologie

NaCl : 8,5g

L'eau distillée: 1000ml

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

2. Coloration de Gram Le protocole de cette coloration est composé de plusieurs étapes :

- Préparer et fixer un frottis bactérien à la chaleur du bec bunsen.
- Recouvrir au violet de gentiane. Laisser agir 1 minute.
- Verser du lugol. Laisser agir 1 minute.

- Décolorer à l'alcool pendant 5 à 10 secondes. Puis rincer à l'eau.
- Recolorer à la fuchsine. Laisser agir de 30 seconde à 1min. rinçage à l'eau puis s'écher.
- L'observation se fait en ajoutant l'huile à immersion, (grossissement x 100). Les bactéries à Gram positif se colorent en violet alors que les bactéries à Gram négatif se colorant en rose.

Annexe 2 : Les longueur racinaires et les parties aériennes des plantes obtenues Durant l'expérimentation.

Tableau 1: les longueurs racinaires et les parties aériennes du bac témoin aux temps T₀, T₁₅, T₃₀, T₄₅

Témoin (T₀)												
Partie aérienne (cm)	11	11,7	7,2	12	/	11,4	12,3	11,7	11,8	10,2	12	10,4
Nombre de racines	5	3	4	3	/	5	4	5	5	4	4	4
Longueur de la plus longue racine (cm)	16,5	15,8	11,1	16	/	14,5	16,8	18	15	13,3	13,5	14
Témoin (T₁₅)												
Partie aérienne (cm)	10,7	11,2	11	10,6	8,2	10,4	10,9	9,6	10,6	9,9	11,4	312
Nombre de racines	3	4	5	3	4	4	4	3	6	4	4	4
Longueur de la plus longue racine (cm)	11,2	13,6	16,3	14,1	10,5	10,5	11	12,2	14,1	13	16,2	14
Témoin (T₃₀)												
Partie aérienne (cm)	11,9	11,5	13,1	13	14,1	12,7	12,7	14,3	14,5	12,1	13,7	14,4
Nombre de racines	4	5	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4
Longueur de la plus longue racine (cm)	14,5	8,9	6	17,2	18,5	19	18	19,2	19,2	14,2	17,5	19,4
Témoin (T₄₅)												
Partie aérienne (cm)	12,7	12	12,1	11,6	10,7	14,7	15,1	12,1	12,5	13	12,7	12,9
Nombre de racines	3	4	4	4	4	5	4	4	4	4	5	5
Longueur de la plus longue racine (cm)	14,2	13,5	16,2	13,2	11	11,4	9,7	14,5	11,5	12,2	14,5	11,6

Tableau 2 : les longueurs racinaires et les parties aériennes du bac atténuation naturelle pétrole brut aux temps T₁₅, T₃₀, T₄₅

Atténuation naturelle Pétrole brut (T₁₅)												
Partie aérienne (cm)	0,9	4,8	7,5	5,3	5	1	3	3,5	1,7	1,9	/	3
Nombre de racines	2	4	4	4	5	5	5	3	4	4	/	4
Longueur de la plus longue racine (cm)	3,4	2,6	4,5	4	3,9	5	4,5	4,8	4,7	3,2	/	3
Atténuation naturelle pétrole brut (T₃₀)												
Partie aérienne (cm)	10,6	12,2	9,7	8,1	3,2	8,1	10,9	4	8,1	15,4	9,2	8,6
Nombre de racines	5	4	4	4	4	5	4	4	4	6	3	4
Longueur de la plus longue racine (cm)	9,2	10,7	7	11	6,3	8,4	10,4	9	7,3	9,2	9	7,4
Atténuation naturelle pétrole brut (T₄₅)												
Partie aérienne (cm)	8,4	7,1	6,9	10	8,2	11	4,9	8,5	10	10,2	9,5	7,5
Nombre de racines	4	4	5	5	4	3	3	4	5	7	5	4
Longueur de la plus longue racine (cm)	6,7	7,5	6,8	8,5	8,1	9	7	9,8	9,5	10,5	7,4	11

Tableau 3 : les longueurs racinaires et les parties aériennes du bac bioaugmentation pétrole brut aux temps T_{15} , T_{30} , T_{45}

Bioaugmentation pétrole brut (T_{15})												
Partie aérienne (cm)	4,4	4,1	6,2	2	3,9	7	1,2	2,8	6,3	5,4	1,8	6,4
Nombre de racines	4	4	4	4	5	5	4	4	4	5	4	5
Longueur de la plus longue racine (cm)	6,5	7,2	8,2	4,6	6,3	8,4	5,5	5,9	7,2	5,9	3,8	6,9
Atténuation naturelle pétrole brut (T_{30})												
Partie aérienne (cm)	6,5	3,4	7	9	/	9,6	1,9	6,7	10,2	9,6	6,6	9
Nombre de racines	4	5	4	4	/	4	4	4	4	4	4	4
Longueur de la plus longue racine (cm)	6	6	9,7	5,6	/	3,4	7,2	9,4	10,5	7	6,7	10,9
Atténuation naturelle pétrole brut (T_{45})												
Partie aérienne (cm)	8,5	9	8	8	11	9,5	10	11,5	8,7	9,5	8	11
Nombre de racines	4	4	5	4	4	4	4	5	3	3	4	5
Longueur de la plus longue racine (cm)	7,2	10,1	9,7	11,6	11,5	10,2	10,6	13,2	11,5	11,4	10,5	12

Tableau 4 : les longueurs racinaires et les parties aériennes du bac bioaugmentation gasoil aux temps T₃₀, T₄₅

Bioaugmentation gasoil (T ₃₀)												
Partie aérienne (cm)	/	/	/	/	/	0	/	/	/	/	/	/
Nombre de racines	/	/	/	/	/	1	/	/	/	/	/	/
Longueur de la plus longue racine (cm)	/	/	/	/	/	1,1	/	/	/	/	/	/
Bioaugmentation gasoil (T ₄₅)												
Partie aérienne (cm)	1,9	3,8	0	0	/	/	/	/	0	4,3	3	/
Nombre de racines	4	4	2	2	/	/	/	/	1	4	4	/
Longueur de la plus longue racine (cm)	5,8	9,2	2,2	2,5	/	/	/	/	2	7,9	7	/

Annexes 3 : Moyennes des longueurs racinaires et des parties aériennes.

Tableau 13: Moyennes des longueurs aériennes et racinaires des différents bacs de traitement au cours de l'expérimentation

Type de traitement	Moyennes des longueurs de la partie aérienne				Moyenne des longueurs racinaires			
	T0	T15	T30	T45	T0	T15	T30	T45
Témoin	11,06	10,54	13,17	12,68	13,71	13,06	15,97	12,79
AT Gasoil	/	/	/	/	/	/	/	/
BG Gasoil	/	/	0	1,86	/	/	1,1	5,23
AT Pétrole	/	3,42	9,01	8,52	3,96	3,96	8,72	8,48
BG Pétrole	/	4,29	7,23	9,39	/	6,37	7,27	10,79

Contribution à l'étude du pouvoir dégradant de *Pseudomonas aeruginosa* et *Serratia marcescens* vis-à-vis du pétrole brut et du gasoil

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie Moléculaire des Microorganismes

Résumé

Le présent travail a été mené en vue de mettre en œuvre la capacité de deux souches bactériennes à dégrader le pétrole brut et le gasoil et épurer un sol artificiellement pollué en conditions du laboratoire.

Ces bactéries proviennent de sols contaminés par le pétrole brut. I2 et H9 sont deux *Pseudomonas aeruginosa* et M6 est une *Serratia marcescens*. Elles ont fait l'objet d'étude morphologique macroscopique et microscopique pour s'assurer de leur pureté.

Cinq bacs de traitement contenant chacun un mélange de sol et de sable contaminés de l'un des polluants sont utilisés. Deux servent pour la bioaugmentation par les bactéries hydrocarbonoclastes et deux pour l'atténuation naturelle grâce aux microorganismes indigènes, un dernier étant un témoin non contaminé.

L'efficacité du traitement avec le consortium bactérien (I2+H9+M6) a été évaluée d'une part par la mesure de la biomasse microbienne et d'une autre part par un test de germination et le calcul de son indice, durant 45 jours d'expérimentation.

D'après les résultats, l'épuration du sol contenant le pétrole brut par les bactéries indigènes ou le consortium inoculé a donné un meilleur rendement (74,05%) en peu de temps par comparaison à celle du gasoil (8,55%) avec une dominance de *Serratia marcescens* pour le gasoil et *Pseudomonas aeruginosa* pour le pétrole brut.

Mots clés : Pétrole brut, gasoil, bioaugmentation, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme Sakhri Nadjoua (Maitre de conférence <<A>> UFM Constantine),

Rapporteur : Mme Guergouri Ibtissem (Maitre-assistant <<A>> - UFM Constantine).

Examineur : Mr Chabbi Rabeh (Maitre-assistant <<A>> - UFM Constantine).

Date de soutenance : 03/07/2019