



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET
POPULAIRE



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

N°d'ordre :

N° de Série :

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

جامعة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة
قسم الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Intitulé :

*Caractérisation microbiologique des bactéries isolées à
partir d'un site pollué par les hydrocarbures*

Présenté et soutenu par : BOUDRA Malak, MERDJANA Ferial & BOUDRAA
Malak

Le : 13/06/2024

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : ALMI hiba (MCB-UFM, constantine)
Rapporteur : AMOKRANE serine (MRB, CRBt, Constantine)
Co-encadrant : ABDELAZIZ Ouided (MCB-UFM, constantine)
Examinatrice : MEGHNOUS Ouissem (MCB, constantine)

Année : 2023/2024

Remerciement

Tout d'abord nous remercions Dieu de nous avoir donné les efforts pour arriver à ce stade de succès et de nous orienter vers la lumière de la science et du savoir.

*Nous remercions très chaleureusement notre encadrante Mme **AMOKRANE SERINE** Maitre de recherche au centre de recherche de biotechnologie de Constantine nous lui exprimons notre gratitude de nous avoir dirigé, encouragé et sur tout aidé afin de réaliser ce travail.*

Nous remercions les membres du jury, Mme ALMI HIBA et Mme Meghnous ouissem d'avoir accepté l'évaluation de ce mémoire.

Nous remercions tous les enseignants de notre département qui ont contribué à notre formation. Nous remercions tous les travailleurs de laboratoire de bactériologie du centre de recherche de biotechnologie CRBT.

Enfin, il nous serait de remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.



Dédicace

Du plus fond du cœur et avec l'intensité de mes émotions je dédie ce travail :

*À mon plus doux amour ma très chère mère **Wided**,*

Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide; Votre présence et votre soutien moral ont illuminé chaque étape de ce parcours, Merci pour votre amour infini et votre inspiration perpétuelle.

*À mon point de force dans la vie, mon cher père **Driss**, Aucune dédicace ne serait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Ce travail est le fruit de tes sacrifices et tes encouragements constants.*

*À ma sœur adorée **Razane** et mon petit frère **TedjEddine**, Vous êtes les témoins de mes joies et de mes peines, les gardiens de mes souvenirs les plus précieux. Chaque instant partagé avec vous a enrichi ma vie et coloré mes expériences.*

Merci pour votre amour et votre soutien inconditionnel,

*À mes chères collègues : **Ferial, Malak**, mes copines d'enfance **Nesrine et Zineb** Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des sœurs sur qui je peux compter. Votre amitié est un trésor précieux, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur*

*À tous les membres de la famille **BOUDRAA** et **RAHMOUNI**,*

*À tous ceux qui m'ont soutenu et qui me soutient encore mon oncle **HALIM** et ma tante **DOUNIA***

À toute la promotion de microbiologie 2019/2020.

BOUDRAA MALAK

Dédicace

Louange à Dieu tout puissant, qui m'a permis de voir ce jour tant attendu.

Je dédie ce travail

*A mes chers parents **Toufik** et **Fatiha***

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez. Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que vous avez déployés pour mon éducation et ma formation. J'implore le tout-puissant pour qu'il vous protège et vous garde.

*A mes chères sœurs **Nadjoua**, **Yousra**, **Malak** ainsi que mon frère **Wassim**
Merci de m'avoir toujours supporté dans mes décisions. Merci pour tout votre amour et votre confiance, pour m'avoir aidé à ranger mon éternel désordre. Que Dieu vous paye pour tous vos bienfaits.*

*A mon âme sœur et ma meilleure amie **Abir***

Merci d'être toujours à mes côtés, votre amitié est précieuse et indispensable à mon bonheur. Je te souhaite une vie pleine de santé et de réussite.

*A mes copines et mes collègues **Malak** et **Malak***

Merci pour tous les beaux moments et situations que nous avons vécus ensemble, je suis chanceuse de vous connaître. Je vous souhaite une vie longue et heureuse.

*A mes neveux **Taim** et **Koussai***

*A tous les membres de la famille **Merdjana** et **Beloulou***

A toute la promotion de microbiologie appliquée 2019

MERDJANA FERJAL

Dédicace

Toutes les lettres ne sauront trouver les mots qu'il faut... Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance. Aussi,

*C'est tout simplement que :
je dédie ce travail :*

*Au plus chers de mon cœur, ma mère **FARIDA** et mon père **SAID**, qu'ils trouvent en moi la source de leurs fiertés. Sans votre affection, vos conseils, vos sacrifices, vos encouragements, et vos prières, je ne serais jamais arrivé où je suis.*

« Que dieu vous protège »

*A mon âme sœur, ma jolie princesse **AMIRA** et mon frère **IBRAHIM** qui ont toujours été présents pour moi.*

*A ma meilleure amie et mon soutien de toujours **SERINE**.*

*A mes cousins et cousines et surtout : **SOUROUR** et **AMINA** merci d'être à mes cotés*

*A mes chères tantes et oncles et toutes les membres de la famille **BOUDRA** et **SERARMA** qui m'ont soutenu de près et de loin.*

*Ce travail est aussi dédié à mes belles copines : mes collègues **MALAK** et **FERJAL** et à mes très chères amies : **MALAK**, **CHAIMA**, **ZAHRA**, **HADIL**, **MARWA**, **CHAIMA** pour votre sincère et profonde amitié et les moments agréables passés ensemble .*

A toute la promo de microbiologie APP 2024.

BOUDRA MALAK

TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLEAUX	
LISTE DES FIGURES	
LISTE DES ABREVIATIONS	
Introduction	01
Première partie : Revue bibliographique	
Chapitre 01 : les bactéries hydrocarbonoclastes	03
I. Généralités	03
II. Classification	03
II.1. les bactéries aérobies hydrocarbonoclastes	03
II.2. Les bactéries anaérobies hydrocarbonoclastes	04
II.2.1. Les bactéries dénitrifiantes	04
II.2.2. Les bactéries sulfato-réductrices	05
III. Autres métabolismes	05
VI. Les caractéristiques des bactéries hydrocarbonoclastes	05
Chapitre 02 : La biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes	07
I. Les hydrocarbures	07
I.1. Définition d'un hydrocarbure	07
I.2. Les différents types des hydrocarbures dans l'environnement	07
I.3. Toxicité des hydrocarbures	07
II. La biodégradation des hydrocarbures	08
II.1. Définition de la biodégradation	08
II.2. Les microorganismes dégradants les hydrocarbures	08

II.3 Les facteurs influençant la biodégradation	08
II.4 La biodégradation des hydrocarbures en anaérobie	09
II.5 La biodégradation des hydrocarbures en aérobiose	10
Chapitre 3 : les biosurfactants et leur production par les bactéries hydrocarbonoclastes.	12
I. Définition	12
II.3 Les facteurs influençant la biodégradation	08
II. Types et classification	12
III. Microorganismes producteurs de biosurfactant	14
IV. Propriétés de biosurfactant	15
IV.1 Activité à l'interface (et à la surface)	15
IV.2 Concentration micellaire critique (CMC)	15
IV.3 Biodégradabilité	15
IV.4 Toxicité	15

Deuxième partie Matériels et méthodes

I. Objectifs de l'étude	18
II. Origine des souches	18
III. Etude microbiologique	18
III.1 Revivification des souches	19
I. Objectifs de l'étude	18
III.2. Préparation du milieu de revivification en anoxie (pre-reduced anaerobically medium)	19

III.3Caractéristiques macroscopiques	21
III.4Caractéristiques microscopiques	22
III.5Presence/ Absence de l'endospore	23
III.6Détermination de la mobilité	25
III.7Détermination du type respiratoire	26
IV.Etude physico-chimique	28
IV.1Test de production des biosurfactants	28
IV.2Suivie de la croissance bactérienne par mesure de la DO	31
IV.3Suivie de la production du biogaz	31
Troisième partie Résultats et discussion	
I.Etude microbiologique	34
I.1Caractéristiques macroscopique	34
I.2Aspect microscopique	35
I.3Détermination de la mobilité	37
I.4Détermination du type respiratoire	39
II.Etude physico-chimique	42
II.1Test de production des biosurfactants	42
II.2Suivie de la production de la biomasse	45
II.3Suivie de la production du biogaz	47
Conclusion et perspective	69
Résumés	
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des Tableaux

N° Tab	Titre	Page
Tab n° 01 :	Quelque genre bactérien dégradant les hydrocarbures (Tarayre, 2012).	5
Tab n° 02 :	Exemples de microorganismes dépollueurs (Bouderhem, 2010).	8
Tab n° 03 :	Classification des biosurfactants et microorganismes producteurs (Klosowska <i>et al.</i> , 2011).	14
Tab n° 04 :	résultat des caractéristiques morphologiques des 15 isolats	34
Tab n° 05 :	Résultats de l'observation microscopique après coloration de gram et de vert de malachite chez les souches étudiées.	36
Tab n° 06 :	Résultats de la mobilité, fermentation de mannitol et production de biogaz chez les souches étudiées	38
Tab n° 07 :	Type respiratoire des souches étudiées.	40
Tab n° 08 :	Screening des souches pour la production de biosurfactant (Oilspreading test)	44

Liste des figures

N° Fig	Titre	Page
Fig n° 01 :	Arbre phylogénétique illustrant la diversité des bactéries aérobies ayant la capacité de dégrader les hydrocarbures (Head <i>et al.</i> , 2006).	4
Fig n° 02 :	Représentation d'une molécule de biosurfactant (Ferhat, 2012).	12
Fig n° 03 :	Photographie représentant le système de Heated Copper Catalyst	20
Fig n° 04 :	Enceinte d'anaérobiose (Bactron)	21
Fig n° 05 :	Trinoculaire pour l'observation macroscopique (Leika)	21
Fig n° 06 :	Schéma descriptif de la coloration de Gram	22
Fig n° 07 :	Schéma descriptif du protocole de la coloration des endospores	24
Fig n° 08 :	Schéma descriptif du test de la mobilité	25
Fig n° 09 :	Schéma descriptif du protocole de la détermination du type respiratoire	26
Fig n° 10 :	Schéma descriptif du test de la detection de catalase	27
Fig n° 11 :	Schéma descriptif du test de la detection de l'oxydase.	28
Fig n° 12 :	Schéma descriptif de la préparation et la préculture et de l'inoculation	29
Fig n° 13 :	Etape de preparation de la preculture et inobulation	29
Fig n° 14 :	Les étapes de réalisation du test E24	31
Fig n° 15 :	Méthode de suivi de la production de la biomasse	31
Fig n° 16 :	Système de déplacement de l'eau pour la mesure du biogaz produit par les différentes souches	32
Fig n° 17 :	L'aspect macroscopique des souches étudiées	35
Fig n° 18 :	Observation microscopique (G×100) après coloration avec vert de malachite (Résultats négatif)	37
Fig n° 19 :	Aspect microscopique après coloration de Gram de quelques isolats étudiés (G×100)	37
Fig n° 20 :	Résultats du test de mobilité. (A : souche mannitol- mobilité- gaz+, B:souche mannitol+ mobilité+ gaz+, D: souche mannitol+ mobilité- gaz+)	39
Fig n° 21 :	Test du type respiratoire. (A: milieu thioglycolate stérile, B:souche microaérophile, C:souche AAF)	41

Fig n° 22 :	Résultats du test de catalase (1) et du test oxydase (2)	41
Fig n°23:	Culture bactérienne après centrifugation.	43
Fig n° 24 :	Diamètres de déplacement de l'huile des biosurfactants produits par les 15 souches (Oilspreading test)	44
Fig n° 25 :	Résultats du test de déplacement de l'huile.	45
Fig n° 26:	Résultats du test E24	46
Fig n° 27 :	Indice d'émulsification des biosurfactants produits par les 15 souches (E24)	46
Fig n° 28 :	Suivie de la production de la biomasse bactérienne par DO à 600nm	47
Fig n° 29 :	Quantité du biogaz produite au bout de 5 jours par les différentes souches	48

Liste des abréviations

AAF	Aérobic anaérobic facultatifs
AAT	Anaérobic aérotoleurant
AS	Aérobic stricte
CMC	Concentration micellaire critique
CuO	L'oxyde de cuivre
DO	Densité optique
E24	L'index d'emulsification
Fe	Le fer
H₂O₂	peroxyde d'hydrogène
MEOR	Microbial Enhanced Oil Recovery
MSM	Milieu minimal salé
MMN	Milieu Mannitol-Mobilité-Nitrate
ml	Millilitre
N₂	Azote
Na₂S 9H₂O	Sulfure de sodium nonahydraté
NO₃	Le nitrate
NO	L'oxyde nitrique
N₂O	L'oxyde nitreux
OST	<u>O</u> il <u>S</u> prea <u>d</u> ing <u>T</u> est
pH	Potentiel hydrogène
TS	La tension de surface
TI	La tension interfaciale
µl	Microlitre

Introduction générale

Introduction :

Les bactéries hydrocarbonoclastes sont des microorganismes capables de dégrader les hydrocarbures, c'est-à-dire les composés chimiques constitués uniquement d'atomes de carbone et d'hydrogène. Elles sont souvent présentes dans les environnements naturels, comme les sols et les sédiments. Ces bactéries jouent un rôle crucial dans le processus de dépollution tel que la bioremédiation des zones contaminées où ils sont introduits dans les zones contaminées pour accélérer le processus de dégradation des hydrocarbures, comme les marées noires ou les sites industriels pollués.

Ces bactéries ont un pouvoir de synthétiser des biomolécules appelées biosurfactants, qui ont des propriétés fonctionnelles, leur permettant d'utiliser ces hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie. Ces biosurfactants servent à plusieurs applications comme la remédiation biologique, l'extraction du pétrole, les applications cosmétiques, détergentes ou émulsifiantes pour l'industrie alimentaire ainsi que dans beaucoup d'applications industrielles et environnementales grâce à leur biodégradation et l'absence de toxicité, il est aussi indispensable de citer que les biosurfactants ont une activité antimicrobienne vis-à-vis des algues, des champignons et des bactéries, de nombreux genres bactériens ont été recensés à être sensible à certains type de biosurfactants (Zeinali *et al.*, 2007).

Ce travail a pour but d'étudier la capacité des souches hydrocarbonoclastes isolées d'un site pétrolier à produire des biosurfactants dans des conditions favorables à leur croissance.

La réalisation de ce mémoire est structurée en trois parties : la première présente un rappel bibliographique où nous exposons les données relatives à la description des bactéries hydrocarbonoclastes, la biodégradation des hydrocarbures par ces mêmes microorganismes, et enfin notre attention se portera sur la production des biosurfactants par ces bactéries. Dans le second chapitre, nous définissons la méthodologie adoptée pour la réalisation de différentes expérimentations, et une troisième partie consacrée aux résultats et discussion qui sera suivie d'une conclusion et des perspectives

Première partie

Revue bibliographique

Chapitre 1 : les bactéries hydrocarbonoclastes

I. Généralités

De nombreux genres bactériens tels que les hydrocarbonoclastes jouent un rôle crucial dans la biodégradation des hydrocarbures. Plusieurs études montrent qu'elles étaient ubiquistes et présentes en faible quantité même dans les environnements dépourvus de contamination. Naturellement, leurs efficacités apparaissent dans les zones chroniquement polluées par les hydrocarbures et augmentent après un apport de pétrole. Mais chacun de ces genres bactériens n'est capable de dégrader qu'un nombre restreint d'hydrocarbures alors que le pétrole est composé de centaines voire de milliers de molécules différentes (Sauret, 2011).

Certaines espèces isolées peuvent dégrader plusieurs types d'hydrocarbures en condition oxygène. Par exemple, les souches *Pseudomonas sp.* B17 et B18 dégradent à la fois les alcanes et les aromatiques (Whyte *et al.*, 1997). La biodégradation du pétrole dans les milieux naturels n'implique pas seulement les microorganismes qui attaquent directement les composés du pétrole mais également d'autres composants biologiques et abiotiques, avec lesquelles les agents primaires de dégradation du pétrole interagissent ; les interactions coopératives entre les microorganismes jouent un rôle majeur dans l'élimination des composés du pétrole, tels que la consommation des métabolites, la production de biosurfactants, l'apport d'oxygène et de nutriments.

II. Classification

II.1 Les bactéries aérobies hydrocarbonoclastes

Les souches aérobies hydrocarbonoclastes, connues pour dégrader les hydrocarbures aromatiques, les plus fréquemment décrites appartiennent aux différentes classes des Protéobactéries. Elles appartiennent aux genres *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* (Juhasz *et al.*, 1997 ; Mueller *et al.*, 1997 ; Johnsen *et al.*, 2002). Parmi les bactéries à Gram positif, on trouve les genres *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium* et *Bacillus* (Kästner *et al.*, 1994 ; Moody *et al.*, 2001 ; Zeinali *et al.*, 2007). Le genre *Cycloclasticus* compte également des souches hydrocarbonoclastes.

Les souches aérobies dégradant les alcanes appartiennent à divers genres de bactéries à Gram positif, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* (Radwan *et al.*, 1996 ; Churchill *et al.*, 1999 ; Sharma and Pant, 2000) et à Gram négatif, *Pseudomonas*,

Alcaligenes, *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Burkholderia* et *Paracoccus* (Yuste et al., 2000 ; van Beilen *et al.*, 2002 ; Wentzel *et al.*, 2007).

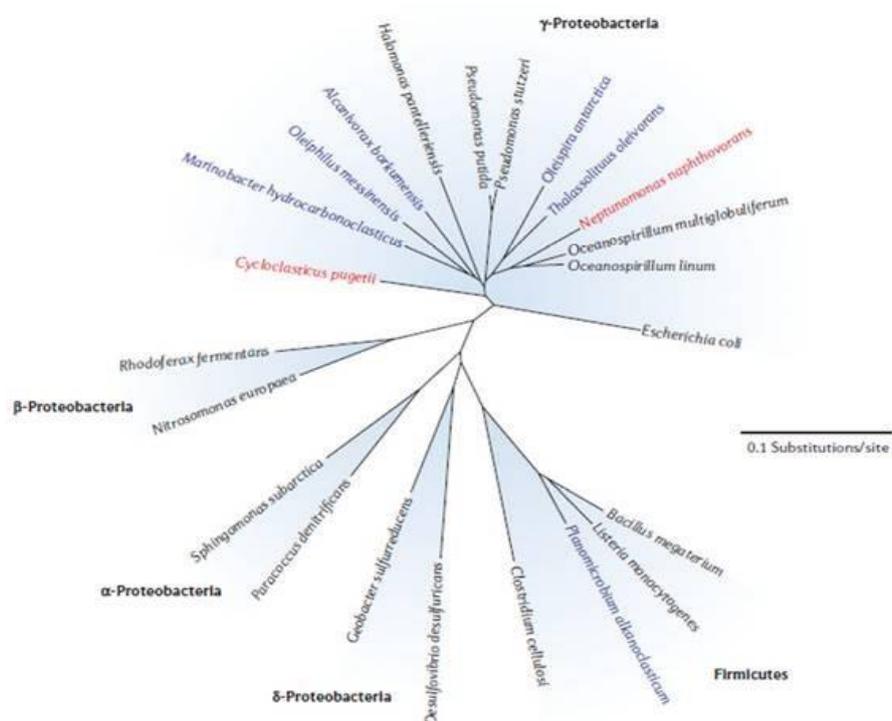


Figure 01 : Arbre phylogénétique illustrant la diversité des bactéries aérobies ayant la capacité de dégrader les hydrocarbures (Head *et al.*, 2006).

II.2 Les bactéries anaérobies hydrocarbonoclastes

L'utilisation d'hydrocarbures par des bactéries anaérobies a été réellement démontrée au début des années 1990 avec l'isolement d'une souche pure sulfato-réductrice utilisant l'hexadécane comme seule source de carbone et d'énergie (Aeckersberg *et al.*, 1991). Depuis, de nombreuses souches pures dégradant les hydrocarbures ont été isolées et décrites comme appartenant à un large panel de types respiratoires. (Boudrhem, 2018).

II.2.1 Les bactéries dénitrifiantes

A cause de la rapidité de croissance, les bactéries dénitrifiantes ont été préférentiellement utilisées comme modèles pour les études génétiques et biochimiques liées à la dégradation des hydrocarbures.

Les genres impliqués dans la dégradation des alcanes connus actuellement sont *Azoarcus*, *Dechloromonas* et *Pseudomonas* et ceux impliqués dans la dégradation des molécules aromatiques sont *Thauera*, *Azoarcus* et *Dechloromonas* (Widdel and Rabus, 2001 ; Bonin *et al.*, 2004).

II.2.2 Les bactéries sulfato-réductrices

L'intérêt porté aux sulfato-réducteurs est double. D'une part, il a été démontré que les bactéries sulfato-réductrices marines sont capables d'utiliser les composés aliphatiques et aromatiques directement à partir d'un pétrole brut, D'autre part, ces bactéries jouent un rôle majeur dans le cycle du carbone en milieu marin (Rabus *et al.*, 2006). De manière générale, les principaux genres bactériens impliqués et connus à ce jour, sont *Desulfobacula*, *Desulfobacterium*, *Desulfotomaculum*, *Desulfatibacillum*, *Desulosarcina*, *Desulfococcus*, *Desulfatiferula* (Bouderhem, 2018).

III. Autres métabolismes

D'autres souches pures anaérobies ont été isolées et caractérisées comme utilisant les hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie. C'est le cas des bactéries ferri-réductrices appartenant au genre *Geobacter*, utilisant le Fe(III) comme accepteur d'électrons. Une souche phototrophe, *Blastochloris sulfoviridis*, est également capable de dégrader le toluène ainsi qu'une souche fermentative, *Pelobacter acetylenicus*, dégradant l'acétylène (Bouderhem, 2018).

Tableau 01 : Quelques genres bactériens dégradant les hydrocarbures (Tarayre, 2012).

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

VI. Les caractéristiques des bactéries hydrocarbonoclastes

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

- Apte à se reproduire rapidement suite à un entreposage de longue durée
- Génétiquement stable
- La biodégradation d'une large gamme de polluants pétroliers
- Physiologie bactérienne optimale dans des conditions environnementales
- Aucun effet secondaire néfaste et produits finaux non toxiques
- La majorité des souches bâtonnets à Gram négatif
- 32% des bactéries motiles ou mobiles
- 20% des bactéries à Gram positif, filamenteux.

Chapitre 02 : La biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes

I. Les hydrocarbures

I.1 Définition d'un hydrocarbure

Un hydrocarbure est un composé contenant des atomes de carbone et d'hydrogène.. On peut le trouver sous forme d'énergie fossile, ce qui fait de lui une ressource énergétique assez importante pour l'économie des pays, notamment pour alimenter certaines industries et certains secteurs professionnels. Cette énergie est souvent associée au pétrole et au gaz naturel. Comme c'est une énergie fossile, l'hydrocarbure est non renouvelable et ses gisements commencent à se raréfier depuis ces dernières années. Son utilisation est donc de plus en plus coûteuse et son exploitation de plus en plus difficile. Les derniers gisements se trouvent en majeure partie dans les fonds marins, ce qui rend leur extraction complexe (Slimani et Hamidi, 2019).

I.2 Les différents types des hydrocarbures dans l'environnement

Le carbone et l'hydrogène peuvent former des molécules saturées ou insaturées, linéaires ou cycliques, et parmi les molécules cycliques, certains d'entre elles, grâce à un type particulier d'insaturation ont des propriétés particulières qui les font classer à part (Manahan, 2007). On distinguera donc trois types d'hydrocarbures :

- Les hydrocarbures saturés à chaîne ouverte ou cycliques.
- Les hydrocarbures insaturés à doubles ou triples liaisons et qui peuvent aussi être cycliques ou acycliques.
- Les hydrocarbures aromatiques mono ou polycyclique (Lefebvre, 1986).

I.3 Toxicité des hydrocarbures

La toxicité des hydrocarbures pétroliers dépend de leur solubilité et biodisponibilité, on suppose que la fraction soluble dans l'eau est la plus nocive pour l'environnement car elle est directement disponible pour l'absorption par les organismes. La toxicité des hydrocarbures varie d'une famille à une autre, ainsi qu'au sein de la même famille la toxicité varie d'un composé à un autre (Nielsen *et al.*, 1996). Les hydrocarbures aliphatiques sont moins toxiques par rapport aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (Abdellah, 2015). L'élimination des

hydrocarbures se fait par plusieurs méthodes biotiques parmi ces derniers, la plus utilisée est la biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes.

II. La biodégradation des hydrocarbures

II.1 Définition de la biodégradation

La biodégradation des hydrocarbures est un processus naturel par lequel des micro-organismes appelés hydrocarbonoclastes décomposent les hydrocarbures présents dans l'environnement. La biodégradation de ces composés est essentielle pour atténuer la pollution causée par les déversements de pétrole et autres contaminations par les hydrocarbures.

II.2 Les microorganismes dégradants les hydrocarbures

Les micro-organismes capables de décontaminer le site d'un déversement de pétrole sont essentiellement des bactéries et des champignons. Les bactéries peuvent décomposer le pétrole en dioxyde de carbone et en eau.

II.3 Les facteurs influençant la biodégradation

Les micro-organismes dégradent le pétrole grâce à la production des enzymes capables de le décomposer, beaucoup plus rapidement dans des conditions environnementales optimales. Certains facteurs influençant cette activité enzymatique parmi lesquels : Structure et nature du sol ; composition chimique des hydrocarbures ; l'humidité ; température ; salinité ; Potentiel d'hydrogène (pH) ; taux d'oxygène et contenu en nutriments (Bliefert et Perraud., 2004 ; Belmenai et Benhafed., 2015) .

Tableau 02 : Exemples de microorganismes dépollueurs (Bouderhem, 2010).

Bactérie	
Gram -	Gram +
<i>Pseudomonas</i>	<i>Micrococcus</i>
<i>Xanthomonas</i>	<i>Arthrobacter</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Rhodococcus</i>
<i>Flavobacterium</i>	
<i>Agrobacter</i>	

II.4 La biodégradation des hydrocarbures en anaérobie

C'est un processus complexe par lequel des micro-organismes décomposent des composés organiques, tels que les hydrocarbures, en l'absence d'oxygène. Ce processus est crucial pour la dépollution des environnements contaminés.

II.4.1 Mécanismes de la biodégradation anaérobie

II.4.1.1 Étapes de la biodégradation

Elle se fait comme suit

- **Activation des hydrocarbures** : Souvent, les hydrocarbures sont activés par une addition de fumarate, formant des produits intermédiaires.
- **Dégradation des intermédiaires** : Les produits intermédiaires sont ensuite transformés en composés plus simples, comme les acides gras, les alcools, ou les acides carboxyliques.
- **Minéralisation** : Les composés simples sont minéralisés en méthane, dioxyde de carbone, sulfure d'hydrogène, etc.

II.4.1.2 Conditions environnementales requise

Elles se résument comme suit

- **Absence d'oxygène** : Essentielle pour les processus anaérobies.
- **Présence d'accepteurs d'électrons alternatifs** : Comme les nitrates, sulfates, fer (III), et dioxyde de carbone.
- **pH et température** : Les conditions optimales varient selon les micro-organismes, mais en général, un pH neutre et une température modérée sont favorables.

II.4.1.3 Applications

Elle a un grand intérêt en :

- **Bioremédiation des sites contaminés** : La biodégradation anaérobie est utilisée pour nettoyer les sols et eaux contaminés par les hydrocarbures.
- **Gestion des déchets** : Les processus anaérobies sont utilisés dans les digesteurs anaérobies pour traiter les déchets organiques et produire du biogaz.

- **Production de bioénergie** : La méthanogénèse anaérobie peut être exploitée pour produire du méthane, une source d'énergie renouvelable.

II.5 La biodégradation des hydrocarbures en aérobiose

Est un processus où des micro-organismes utilisent l'oxygène comme accepteur d'électrons pour décomposer les hydrocarbures en composés plus simples et moins toxiques.

II.5.1 Mécanismes de la biodégradation aérobie

II.5.1.1 Étapes de la biodégradation

Elle se fait comme suit :

- **Activation initiale** : Les hydrocarbures sont initialement oxydés par des enzymes telles que les monooxygénases et les dioxygénases, formant des alcools, des aldéhydes, puis des acides carboxyliques.
- **Oxydation complète** : Les acides carboxyliques sont ensuite dégradés via le cycle de Krebs, conduisant à la production de dioxyde de carbone, d'eau et de biomasse microbienne.

II.5.1.2 Conditions environnementales

Elles se résument comme suit :

- **Présence d'oxygène** : Essentielle pour les processus aérobie.
- **Présence des nutriments** : La présence de nutriments comme l'azote, le phosphore et certains oligo-éléments est cruciale pour la croissance et l'activité des micro-organismes.
- **PH et température** : Des conditions de pH neutre (environ 6-8) et des températures modérées (20-30°C) sont généralement optimales pour la biodégradation.

II.5.1.3 Applications

- **Traitement des eaux usées** : Les procédés aérobie sont utilisés dans les stations d'épuration pour dégrader les contaminants organiques.
- **Compostage** : La dégradation des hydrocarbures peut être intégrée dans les processus de compostage pour traiter les déchets organiques contaminés.
- **Toxicité des hydrocarbures** : Certains hydrocarbures peuvent être toxiques pour les micro-organismes, inhibant ainsi leur activité.

- **Temps de traitement** : Bien que généralement plus rapide que les processus anaérobies, la biodégradation aérobie peut encore nécessiter des semaines à des mois pour dégrader complètement les hydrocarbures.

Chapitre 3 : les biosurfactants et leur production par les bactéries hydrocarbonoclastes.

I- Définition

Les biosurfactants (surfactant étant la contraction de « surface-active agent ») sont des molécules synthétisées par divers microorganismes. Les biosurfactants ont la particularité d'être amphiphile, comportant une « tête » hydrophile (sucre ou peptide) et une « queue » hydrophobe (une chaîne d'acides gras de 8 à 18 atomes de carbone) au sein de la même molécule (Neu, 1996 ; Maier, 2003) (figure 02). Cette propriété leur permet de s'adsorber aux interfaces et de diminuer la tension interfaciale entre deux composés immiscibles, solide-liquide, liquide-liquide ou gaz-liquide. De plus, le caractère amphiphile leur permet également d'augmenter la solubilité apparente des composés organiques, et de rendre la surface bactérienne plus hydrophobe pour favoriser son interaction avec des molécules hydrophobes.

La grande diversité des structures chimiques et des propriétés de surfaces des biosurfactants suggèrent qu'ils ont des rôles très diversifiés pour la croissance des bactéries et qui dépendent de la niche écologique dans laquelle elles se trouvent (Ron and Rosenberg, 2001). Certains fixent les métaux, d'autres sont utilisés par la bactérie comme des antibiotiques ou des antifongiques selon les cas (Neu, 1996 ; Ron and Rosenberg, 2001).

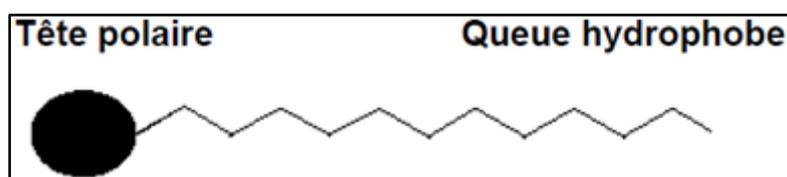


Figure 02 : Représentation d'une molécule de biosurfactant (Ferhat, 2012).

II- Types et classification

Contrairement aux tensioactifs chimiques, qui sont classés selon leur structure de dissociation dans l'eau (cationique, anionique, non-ionique et amphotères), les biosurfactants sont éventuellement classés selon leur composition chimique, poids moléculaire, propriétés physico-chimiques, mode d'action et l'origine microbienne.

De point de vue structure, on distingue cinq types de biosurfactants qui sont les suivants :

➤ **Glycolipides**

Les glycolipides représentent le groupe le plus important et le plus étudié parmi les biosurfactants produits. Les glycolipides résultent de la combinaison d'un mono, di, tri ou tétra saccharide (glucose, mannose, galactose, rhamnose) avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acide hydroxy-aliphatique (Ferradji, 2014).

➤ **Lipopeptides et lipoprotéines**

C'est une association de peptides liés à différentes chaînes d'acides gras (Banat *et al.*, 2000 ; Mukherjee *et al.*, 2010). Les biosurfactants de nature lipopetidique sont divisés en quatre familles : les surfactines, les iturines, les fengycines et les plipastatines et les lichenysines. Les surfactines sont la famille la plus importante dans cette classe. Ce sont des lipopeptides cycliques produites par *Bacillus Substilis* avec une puissante activité de surface.

➤ **Phospholipides et Acides gras**

Les phospholipides sont formés de groupement alcool et phosphore et de chaîne lipidique. Ils sont classés en deux groupes : glycérophospholipides et glycopospholipides. Tandis que les biosurfactants d'acides gras sont composés de chaînes hydrocarbonées d'acides gras saturés entre C12 et C14 et acides gras complexes qui contiennent des groupements hydroxyles et des alkyles ramifiées. (Thavasi *et al.*, 2007).

➤ **Les biosurfactants polymères**

Les biosurfactants polymériques sont des hétéro-polysaccharides poly-anioniques contenant à la fois des polysaccharides et des protéines. Ce sont des biopolymères de poids moléculaire élevé. À titre d'exemples : Emulsan, Biodispersan, Alasan, Liposan et Manno-protéine. L'emulsan est le biopolymère le plus étudié. (Banat *et al.*, 2010).

➤ **Les biosurfactants particuliers**

Quelques exemples de biosurfactants particuliers sont les vésicules membranaires extracellulaires des cellules microbiennes. Ils améliorent la biodisponibilité des hydrocarbures par formation de microémulsions. (Banat *et al.*, 2000)

III- Microorganismes producteurs de biosurfactant

Tableau 03 : Classification des biosurfactants et microorganismes producteurs (Klosowska *et al.*, 2011).

Biosurfactants		Microorganismes
Glycolipides	Rhamnolipids	<i>Nocardioides</i> sp. (Vasileva-Tonkova and Geshevaa, 2005)
	Sophorolipids	<i>Candida</i> sp. (Hirata <i>et al.</i> , 2009)
	Trehaloselipids	<i>Rhodococcus</i> sp. (Lang and Philip, 1998)
Lipopeptides et lipoproteins	Fengycin	<i>Bacillus</i> sp. (Vanittanakom <i>et al.</i> , 1986)
	Arthrofactin	<i>Arthrobacter</i> sp. (Morikawa <i>et al.</i> , 1993)
Phospholipides et Acides gras	Sels de bile	<i>Myroides</i> sp. (Maneerat <i>et al.</i> , 2005)
	Acides gras	<i>Mycobacterium</i> sp., <i>Nocardia</i> sp., <i>Candida</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp. (Rehm and Reiff, 1981)
	Phosphatidylethanolamine	<i>Rhodococcus</i> sp. (Kretschmer <i>et al.</i> , 1982)
Les biosurfactants polymers	Alasan	<i>Acinetobacter</i> sp. (Navon-Venezia <i>et al.</i> , 1995)
	Bioemulsan BS29	<i>Gordonia</i> sp. (Franzetta <i>et al.</i> , 2009)
Les biosurfactants particuliers	Cellules entières	<i>Yarrowia</i> sp. (Zinjarde and Pant, 2002)
	Vésicules	<i>Serratia</i> sp. (Matsuyama <i>et al.</i> , 1986)

IV- Propriétés de biosurfactant

Les biosurfactants ont de meilleures propriétés moussantes et une plus grande sélectivité. Ils sont moins sensibles aux environnements extrêmes de température, de pH et de la salinité. Ils sont biodégradables et non ou peu toxiques, ce qui rend leurs applications environnementales intéressantes.

IV.1 Activité à l'interface (et à la surface)

L'efficacité d'un biosurfactant est déterminée par sa capacité à réduire la tension de surface, un bon biosurfactant peut diminuer la tension de surface (TS). Par exemple le biosurfactant rhamnolipide de *P. aeruginosa* réduit la TS et les TI à 26 mN.m^{-1} et au-dessous de 1 mN.m^{-1} respectivement (Eddouaouda, 2012).

IV.2 Concentration micellaire critique (CMC)

La CMC est par définition la concentration en solution d'un agent de surface au-dessus de laquelle une partie des molécules dispersées au sein de la solution se rassemblent pour former des micelles. Les micelles se forment lorsque les portions hydrophobes, incapables de former des liaisons hydrogène en phase aqueuse, créent une forte augmentation de l'énergie libre du système (Poré, 1992).

IV.3 Biodégradabilité

Contrairement aux tensioactifs synthétiques, les biosurfactants sont des composés facilement biodégradables et particulièrement adapté pour les applications environnementales telles que la bioremédiation des sites contaminés.

IV.4 Toxicité

Bien que peu de données sont disponibles dans la littérature concernant la toxicité des surfactants microbiens, ils sont généralement considérés comme des produits peu ou non-toxiques et par conséquent, ils sont appropriés pour des usages pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires et environnementaux.

Il est à noter que la toxicité dépend de la structure des surfactants et non pas de leur origine. En général, la toxicité est corrélée avec la chaîne grasse hydrophobe de surfactant ; plus

la chaîne grasse est longue, plus l'hydrophobicité est élevée et par suite le tensioactif est plus toxique (Ferradji, 2014).

Deuxième partie

Matériels et méthodes

I. Objectifs de l'étude

Notre travail avait comme objectifs :

- Caractérisation microbiologique (morphologique et biochimique) des 15 isolats préalablement isolés à partir d'un site pollué par les hydrocarbures ;
- L'étude de leur aspect physico-chimique consistant au screening des souches vis-à-vis leur aptitude de production de biogaz et des biosurfactants.

II. Origine des souches

Les souches testées proviennent d'un sol pollué par les hydrocarbures pétroliers prélevé au niveau de la zone industrielle de la raffinerie de Skikda au nord-est de l'Algérie. En fait, la contamination du sol dans ce cas-là est accidentelle résultant des accidents du transport, ainsi par les fuites des bacs et des pipelines.

L'échantillonnage est fait au cours de l'année 2022, le prélèvement est fait aux alentours des bacs de stockage du brut. Les échantillons sont prélevés à partir d'une profondeur de 20cm dans des bocaux en verre dans des conditions rigoureuses d'asepsie.

III. Etude microbiologique

L'étude microbiologique est portée sur l'étude des caractéristiques des isolats en se référant au Bergey's manual of systematic bacteriology (Bergey *et al.*, 2012). Ce dernier préconise une identification basée sur l'examen de sept caractéristiques, étant:

- ✓ **Caractéristiques macroscopiques** déterminés par la morphologie des colonies (forme, taille, surface, opacité, pigmentation, élévation et contour);
- ✓ **Caractéristiques microscopiques** déterminés par la morphologie de la cellule bactérienne (forme, taille et arrangement cellulaire) ;
- ✓ **Type de Gram** (coloration de Gram);
- ✓ **Présence/Absence** des endospores
- ✓ **Mobilité** ;
- ✓ **Type respiratoire** ;

- ✓ **Tests biochimiques** (catalase, oxydase)

III.1 Revivification des souches

La revivification des souches a pour objectif l'obtention d'une culture jeune et pure. Les cryotubes contenant les suspensions bactériennes des 15 souches étant conservées à -20°C en présence de 30% de glycérol ont été ressorties du congélateur pour qu'elles s'adaptent à la température ambiante (période d'adaptation de 3heures), par la suite, nous procédons à ensemencer en stries 0,1ml de chaque isolats à la surface de la gélose MS préalablement préparé , coulée et solidifié dans la chambre d'anaérobiose. Les boîtes de pétri renfermant chacune une souche bactérienne, sont incubées dans l'incubateur de la chambre à 39C° pendant 48-72 heures.

III.2 Préparation du milieu de revivification en anoxie (pre-reduced anaerobically medium)

Le milieu MS est utilisé pour l'isolement et par ainsi pour la revivification des isolats, la préparation d'un milieu de culture réduit en anoxie requière d'autres étape supplémentaires comparativement à sa préparation en aérobiose. La création de l'anaérobiose par élimination de l'oxygène se fait par trois étapes cruciales, elles sont résumées comme suit (Levett *et al.*, 1991) :

- ✓ Ebullition du milieu jusqu'à virage de la couleur de l'indicateur de l'anaérobiose (résazurine) du rose à l'incolore (2-3 min), en fait, l'ébullition réduit la solubilité des gaz et expulser l'oxygène du milieu ;
- ✓ Barbotage du milieu avec un gaz exempt d'oxygène (N₂) pendant 20 min ;
- ✓ L'ajout de l'agent réducteur, dans notre cas présenté par une solution de cystéine et de Na₂S 9H₂O.

Le gaz du barbotage est préalablement purifié par piégeage d'éventuelles traces d'oxygène par passage dans un four de copeaux de cuivre chauffé à 250C° (*Heated Copper Catalyst*, figure 03). L'oxygène résiduel réagit alors avec le cuivre pour former du CuO. Le système sert globalement à fournir une source de gaz exempt d'oxygène au cours des différentes étapes de travail.

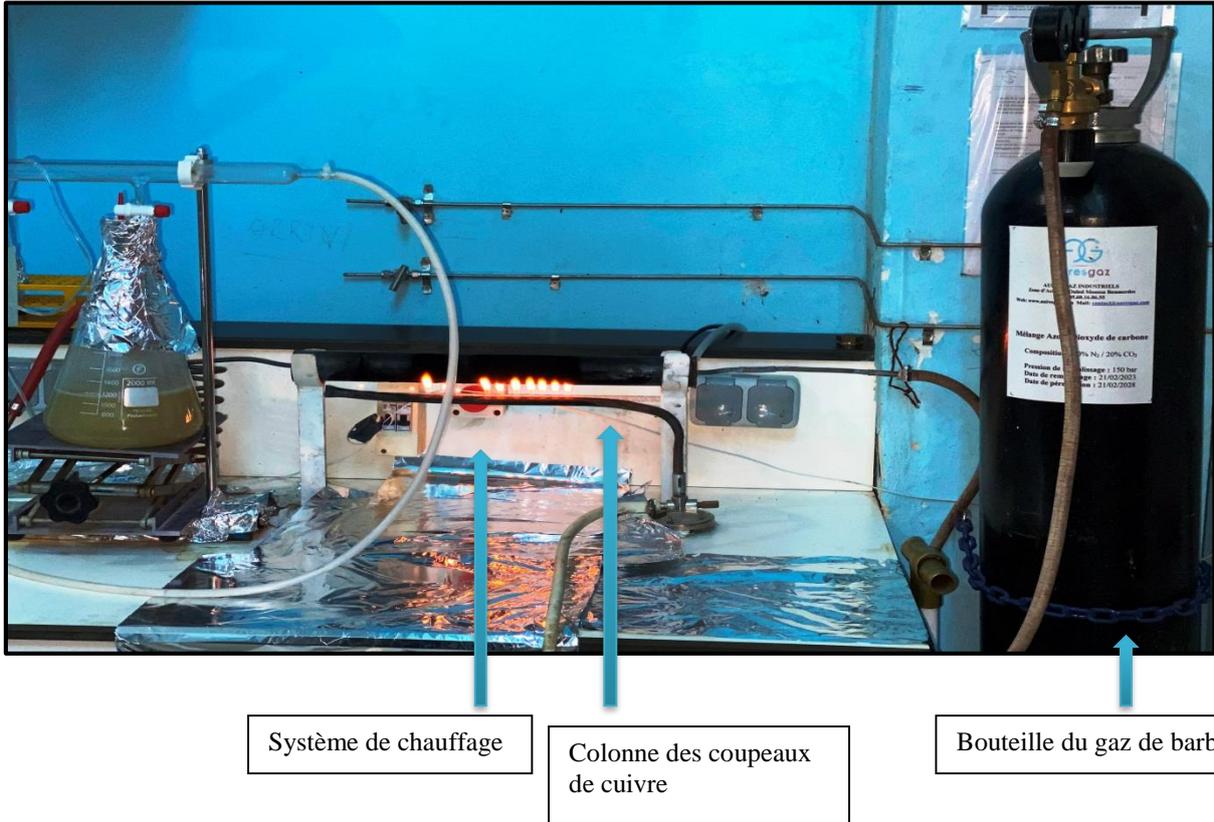


Figure 03 : Photographie représentant le système de Heated Copper Catalyst
(Barbotage du milieu)

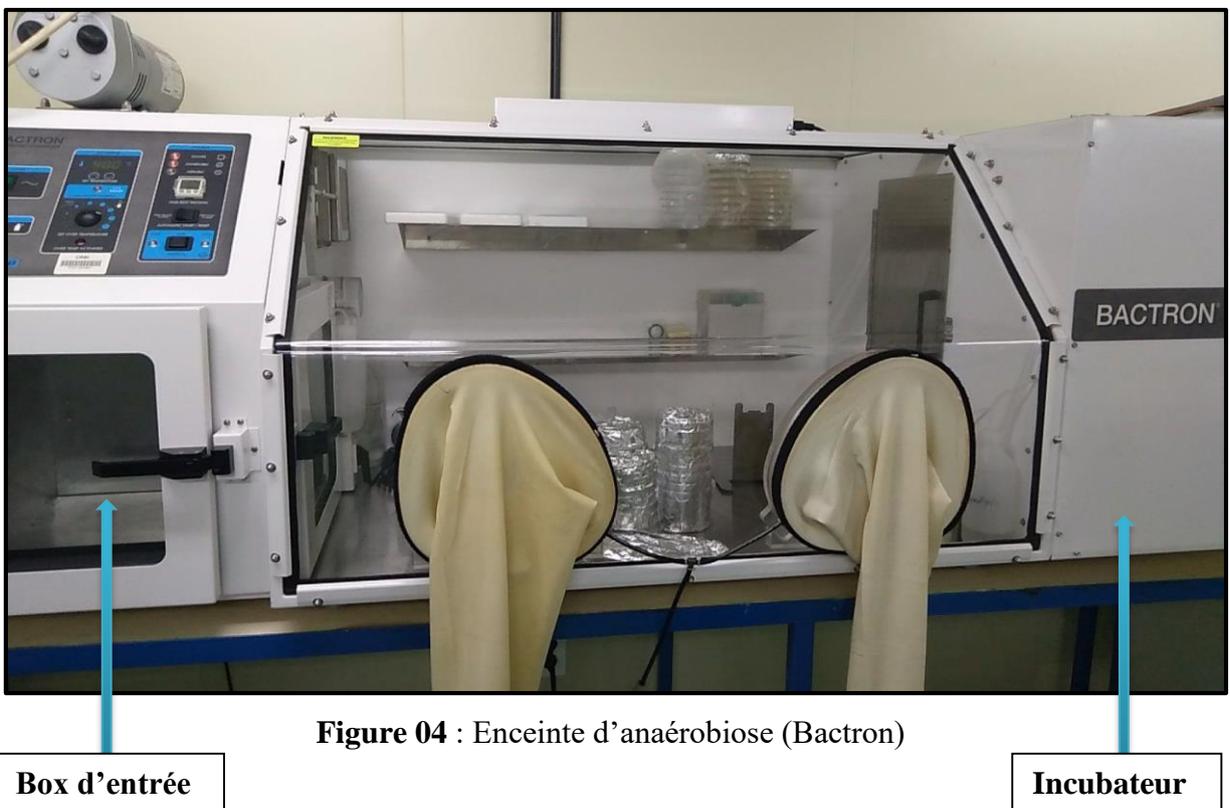


Figure 04 : Enceinte d'anaérobiose (Bactron)

Box d'entrée

Incubateur

III.3 Caractéristiques macroscopiques

La caractérisation préliminaire des isolats est basée sur la détermination de l'aspect des colonies issues de la croissance de la souche sur un milieu gélosé approprié, elle englobe leur forme, taille, surface, couleur ou pigmentation, opacité, élévation et contour. Elle a été réalisée sous un microscope trinoculaire muni d'une caméra (Leika).



Figure 05 : Trinoculaire pour l'observation macroscopique (Leika)

III.4 Caractéristiques microscopiques

Dans notre étude, la morphologie de la cellule bactérienne est déterminée après une coloration de Gram en définissant sa forme et arrangement cellulaire (figure 06)

✓ Principe de la coloration de Gram

La coloration de Gram est une technique différentielle et distinctive entre deux grands groupes bactériens sur la base de la composition chimique de leurs parois. En trois étapes, coloration, décoloration et contre coloration, les bactéries à Gram positive (se révèlent en violet) dotée d'une couche épaisse de peptidoglycane avec un degré de réticulation élevé piège le complexe colorant-décolorant plus efficacement, ce qui rend la paroi moins sensible à la décoloration.

Celles à Gram négative, munies d'une couche fine de peptidoglycane et un taux élevé en lipide deviennent poreuses et incapables de retenir le complexe colorant-décolorant provoquant par ainsi une décoloration des bactéries (se révèlent en rose).

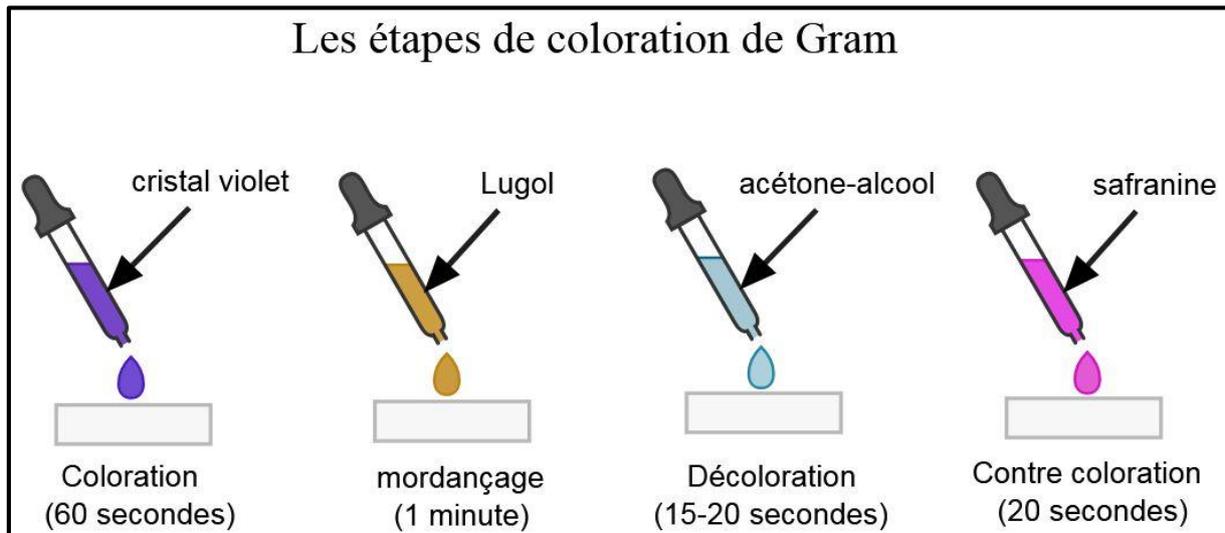
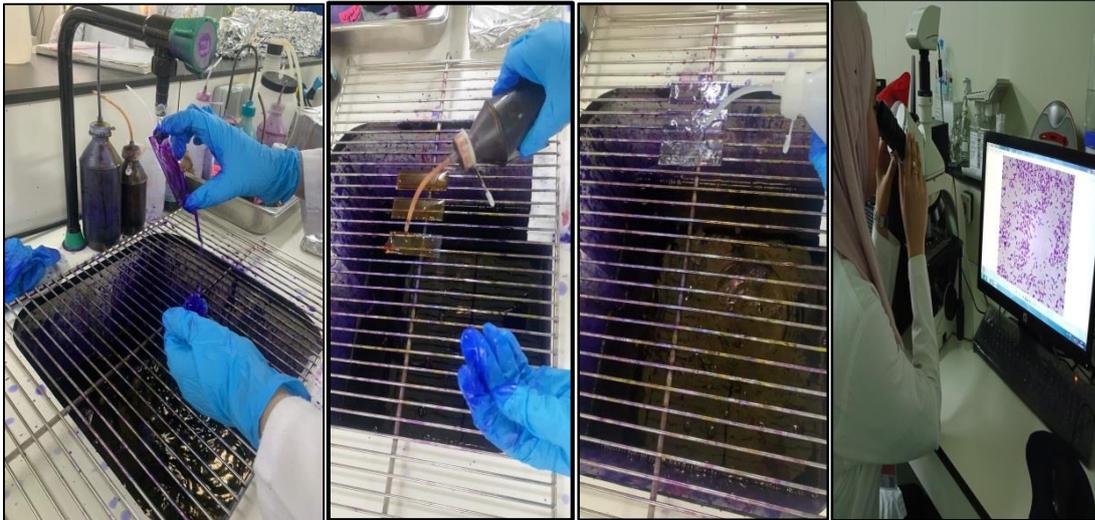


Figure 06 : Schéma descriptif de la coloration de Gram

✓ **Mode opératoire**

La préparation des frottis est faite dans la chambre d'anaérobiose, la différence entre la coloration de Gram des aérobies et des anaérobies réside dans l'utilisation du cristal violet au lieu du violet de gentiane et la safranine au lieu de fushine (Johnson *et al.*, 1995), les étapes sont résumées comme suit :

- **Colorer** le frottis séché à l'air et fixé à la chaleur avec le cristal violet pendant 1 minute ;
- Faire agir le frottis avec la solution du mordant (Lugol) pendant 1 minute,
- Rincer à l'eau de robinet (jet réduit) pendant 2-3 secondes et éponger l'excès d'eau avec un papier buvard propre ;
- **Décolorer** au maximum par le mélange acétone-alcool éthylique pendant 15-20 secondes et rincer à l'eau et éponger l'eau en excès ;
- **Contre colorer** avec la safranine pendant 20 secondes.
- Rincer à l'eau, sécher et procéder à l'observation microscopique sous immersion (x100).



III.5 Presence/ Absence de l'endospore

✓ Principe de la coloration

La méthode de coloration au vert de malachite « méthode Schaeffer-Fulton » repose sur la différence de perméabilité entre les endospores et les cellules bactériennes. Les endospores ne se colorent pas facilement avec les méthodes classiques, mais elles sont colorées avec le vert de malachite, une fois colorées, elles résistent fortement à la décoloration. La chaleur est employée pour assurer la pénétration du colorant. Les cellules bactériennes, néanmoins absorbent le vert de malachite et sont décolorées lors du rinçage. Ainsi, après l'application du contre colorant (safranine), les cellules bactériennes sont colorées en rose tandis que les endospores restent vertes permettant ainsi leur visualisation sous le microscope (Hussey and Zayaitz, 2007)

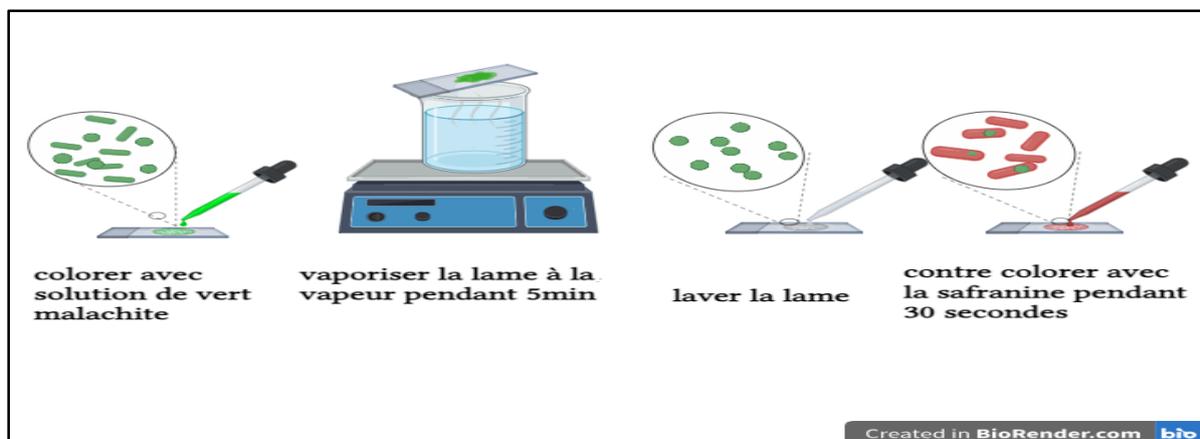


Figure 07 : Schéma descriptif du protocole de la coloration des endospores (created by biorender.com)

✓ **Mode opératoire**

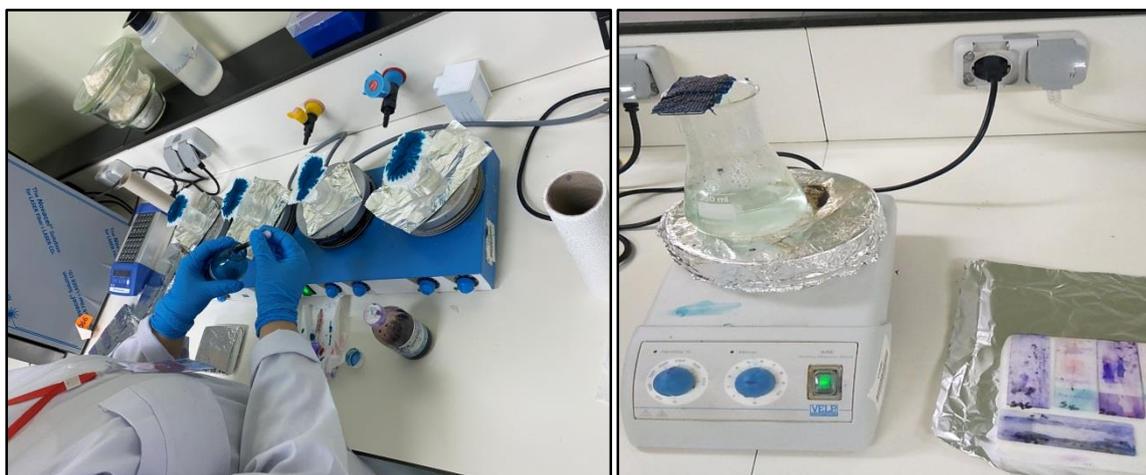
- Sur un récipient d'eau bouillante, déposer le frottis fixé et le couvrir d'un carré de papier buvard ou d'essuie-tout coupé pour s'adapter à la lame ;

- Saturer le papier absorbant avec la solution de vert de malachite en présence de la vapeur pendant 5 minutes, en gardant le papier humide et en ajoutant plus de colorant au besoin ;

- Laver la lame avec un jet réduit d'eau de robinet ;

- Inonder la lame avec la solution de safranine pendant 1 minute, puis. Jeter l'excès et rincer à l'eau de robinet ;

- Rincer à l'eau, sécher et procéder à l'observation microscopique sous immersion (x100).

**III.6 Détermination de la mobilité**✓ **Principe**

Le milieu Mannitol-Mobilité-Nitrate (MMN) permet de tester trois différents tests ; la mobilité, fermentation de mannitol et la recherche de la nitrate réductase. Le MMN est une gélose semi-molle qui rend possible le déplacement des bactéries mobiles autour de la pique centrale. La lecture de l'utilisation du mannitol est possible grâce à la présence d'un indicateur de pH, le rouge de phénol. L'utilisation du mannitol acidifie le milieu qui peut ainsi être révélé par le virage de l'indicateur de pH à sa teinte acide (jaune).

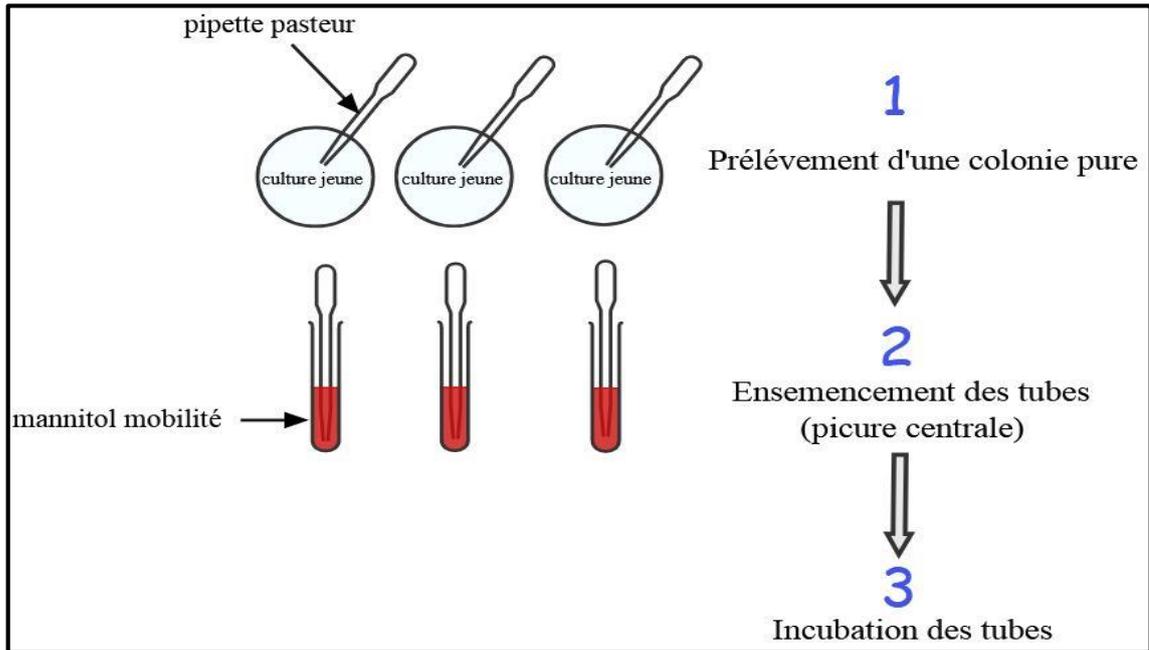


Figure 08 : Schéma descriptif du test de la mobilité

✓ Mode opératoire

- Le milieu est préparé en suivant les étapes citées dans la section (3-2), dans la chambre d'anaérobiose, le milieu est, par la suite distribué dans des tubes hungate à raison de 5ml par tube.

- A l'aide d'une pipette pasteur stérile, un ensemencement de chaque tube par piqûre central jusqu'à à fond du tube est effectué, les tubes sont par la suite incubé à 39 °C pendant 24-48h.

NB: Vu la non disponibilité des réactifs de GRIESS (acide sulfanilique et α -naphtylamine), le suivi de la réduction des nitrates en nitrites n'a pu être suivi.

III.7 Détermination du type respiratoire

✓ Principe

La détermination du type respiratoire (ou type énergétique) d'une bactérie est de tester la tolérance des bactéries à la présence du dioxygène dans l'air et/ou dans l'eau.

Le thioglycolate est un milieu polyvalent, outre les nutriments, il contient le thioglycolate comme un agent réducteur, il se combine à l'oxygène pour produire de l'eau. Le thioglycolate contient également une petite quantité d'agar réduisant, par ainsi la diffusion de l'oxygène à l'intérieur. Selon l'emplacement de croissance des bactéries dans ce milieu, les bactéries sont

classées comme suit : Les bactéries aérobies strictes se cultivent en haut du tube ; Les bactéries micro-aérophiles se cultivent en haut du tube, légèrement sous la surface ; les bactéries anaérobies strictes se cultivent en bas du tube et les bactéries aéro-anaérobies facultative et /ou anaérobie aérotoleurant se cultivent dans tous le tube (Hartline, 2023).

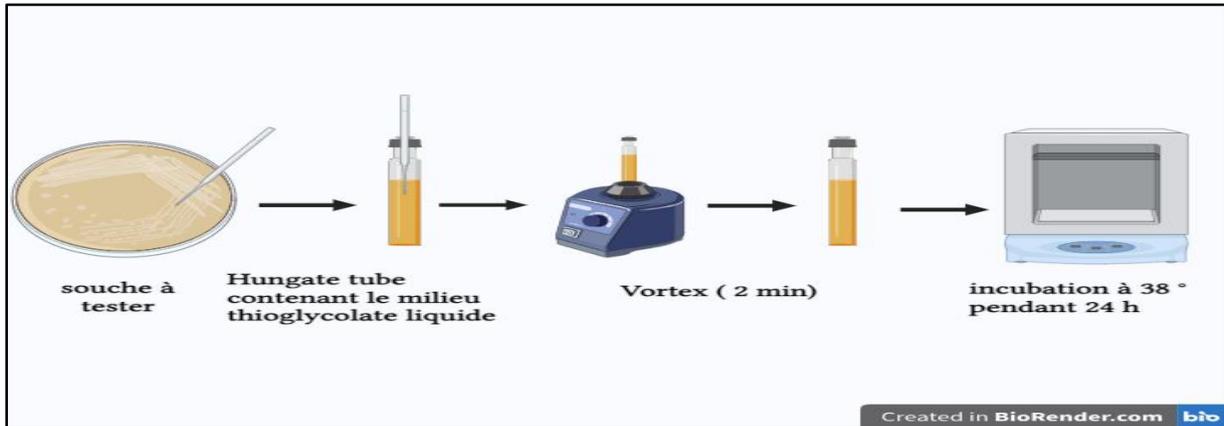


Figure 09 : Schéma descriptif du protocole de la détermination du type respiratoire (created by biorender.com).

✓ Mode opératoire

-Le milieu est préparé en suivant les étapes citées dans la section (3-2), dans la chambre d'anaérobiose, le milieu est, par la suite distribué dans des tubes hungate à raison de 5ml par tube.

-Toujours à l'intérieur du Bactron, on inocule une colonie avec une pipette Pasteur stérile puis on vortex les tubes pendant 2min. Les tubes sont par la suite incubés à 39 °C pendant 24-48h. La croissance est mise en évidence par l'apparition d'une turbidité comparativement au milieu de contrôle non inoculé.

En plus de la détermination du type respiratoire proprement dite par le milieu de thioglycolate, les enzymes respiratoires oxydase et catalase ont été ainsi déterminés.

III.7.1 Test de production du catalase

➤ Principe

Le peroxyde d'hydrogène(H_2O_2) produit à l'issu de certains réactions métaboliques doit être éliminé vu sa toxicité pour la cellule. La catalase est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire (AS et AAF) qui peuvent détruire les peroxydes selon la réaction suivante : $2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$.

La présence de catalase est déterminée à l'œil nu par un dégagement d'oxygène traduit par une effervescence lorsque la culture bactérienne est ajoutée au peroxyde d'hydrogène. Aucune bulle n'est produite dans les organismes à catalase négative (Reiner, 2010).

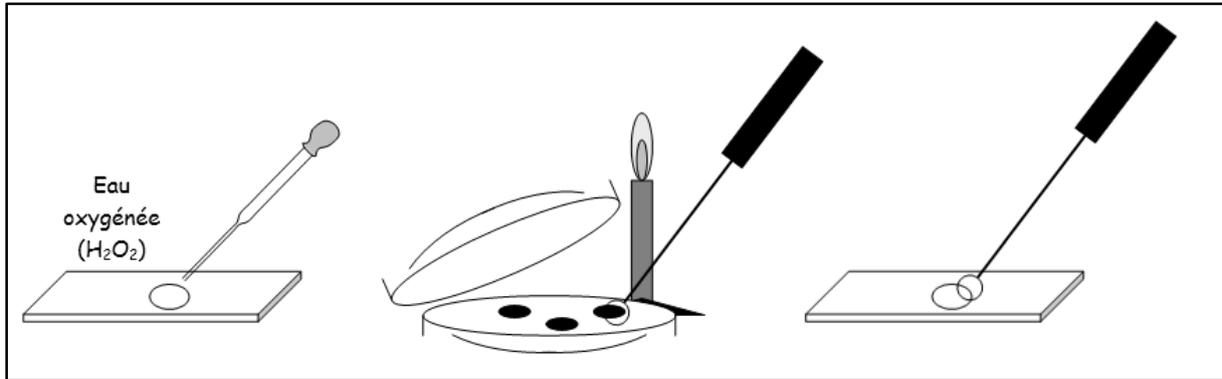


Figure 10 : Schéma descriptif du test de la détection de catalase

➤ **Mode opératoire**

- Dans la chambre d'anaérobiose, une goutte d'eau oxygénée à 15% est déposée au contact avec une colonie bien définie.

III. Test de production d'oxydase

➤ **Principe**

Le test d'oxydase est une réaction biochimique qui teste la présence de cytochrome oxydase, une enzyme parfois appelée phénylène diamine oxydase. En présence d'un organisme qui contient l'enzyme cytochrome oxydase, le réactif incolore réduit devient un produit coloré oxydé comme suit (Shields and Cathcart, 2010)

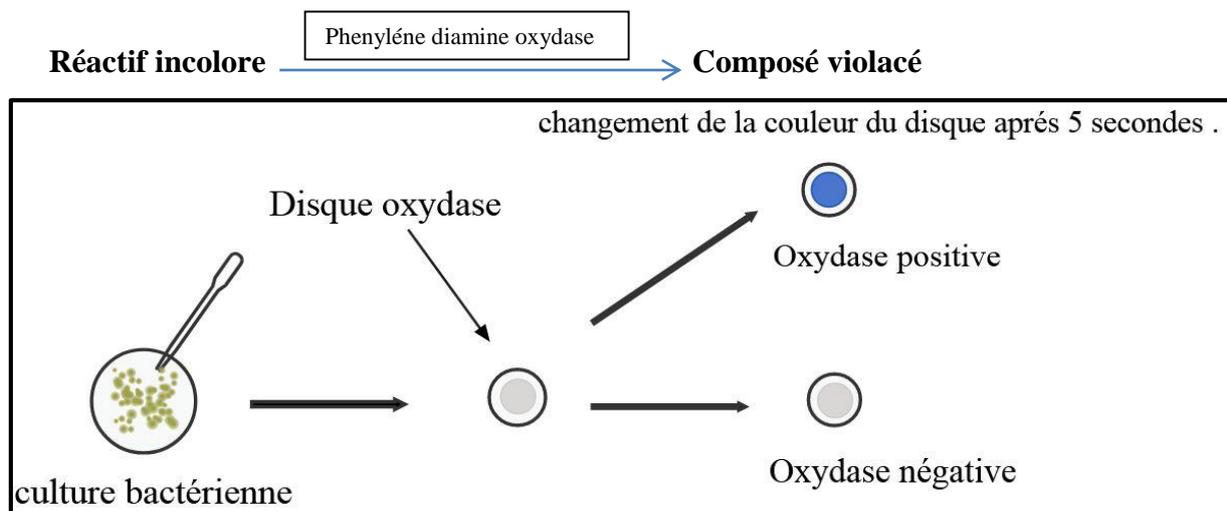


Figure 11 : Schéma descriptif du test de la détection de l'oxydase.

➤ Mode opératoire

- A l'aide d'une pince, on place un disque d'oxydase sur une lame porte objet ;
- Prélever une colonie bien isolée à l'aide d'une pipette pasteur ;
- Frotter doucement la colonie sur le disque. Si une coloration violette dans un délai de 30 secondes est apparue, la réaction est oxydase + ; pas de coloration : oxydase –.

IV. Etude physico-chimique

Cette étude est basée sur l'étude de l'aptitude des isolats à utiliser l'huile brute (crue oil) comme seul source de carbone pour satisfaire à leur besoins énergétiques et assurer par ainsi leur croissance. Ce test est suivie par trois paramètres : La production des biosurfactants (après 5 jours) le suivie de la production du biogaz et de la biomasse microbienne.

IV.1 Test de production des biosurfactants

Dans cette méthode 5% du volume de la pré-culture de chaque souche est inoculé dans des flacons Scott (100ml) contenant 30 ml du milieu MSM (mineral salt medium) supplémenté de 2% du crude oil stérile comme seul source de carbone. La préculture est préparée dans des tubes hungate contenant 5ml du même milieu inoculés avec des colonies prélevées à partir d'une culture jeune jusqu'à obtention d'une DO approximativement entre 0,8 et 1.

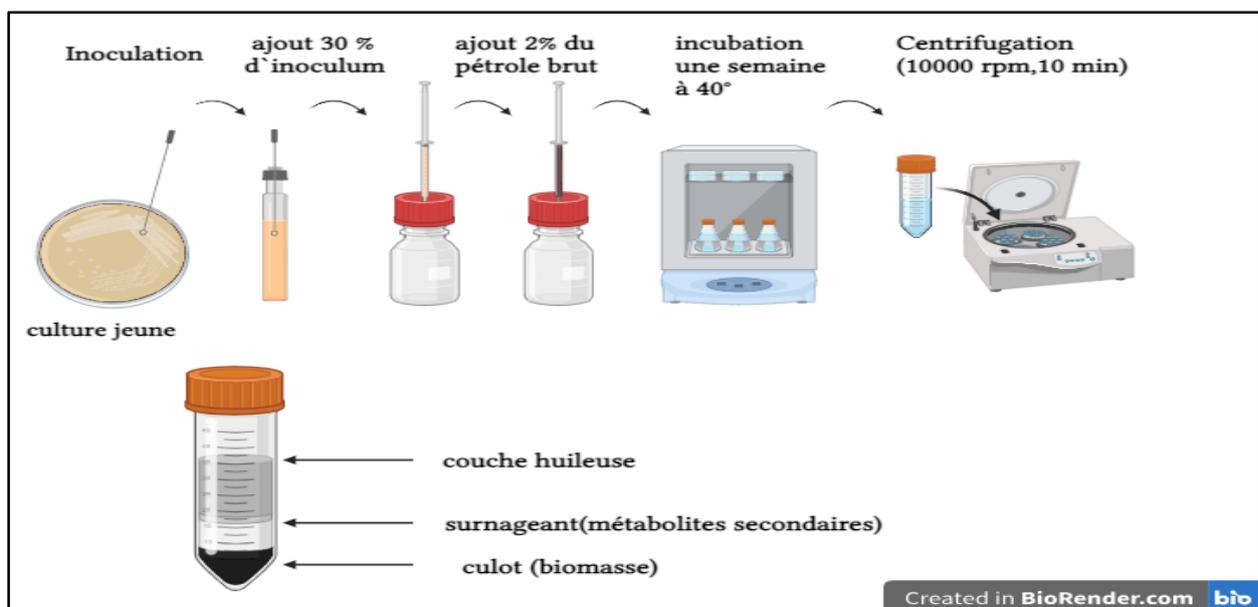


Figure 12 : Schéma descriptif de la préparation et la préculture et de l'inoculation (*created by biorender.com*).

Les flacons Scott et les tubes Hungate sont scellés avec un bouchon en butyle et une capsule en aluminium, l'ajout de la préculture et de l'huile brute est réalisé par une seringue luer-lock stérile. L'incubation est faite à 39°C pendant 5 jours sous agitation 160rpm (ORBITAL INCUBATOR S1500). Après 5 jours, la culture est récupérée dans des tubes Falcon (50ml) stérile ; puis centrifugée à 8000 pendant 15min (Figure 13). Le surnageant est utilisé pour déterminer la présence des biosurfactants à travers 2 tests, test de déplacement de l'huile et E24.

IV.1.1 Test de déplacement d'huile (OST, Oil Spreading Test)

➤ Principe

Le test de déplacement du pétrole (Oil spreading test) est l'un des tests qualitatifs de screening les plus simple et le plus utilisé pour la détection de la production des biosurfactants par une souche ou par un consortium bactérien, il consiste à mettre en évidence la présence de telles biomolécules par déplacement de l'huile et l'apparition d'une zone claire. Une corrélation positive entre le diamètre de la zone claire formée sur la surface de l'huile et de l'activité de dispersion de pétrole est indicatrice de la production des biosurfactant dans le mout de fermentation.

➤ Mode opératoire

Dans une boîte de Pétri de 90cm, un volume de 100µl du pétrole brut est rajouté à la surface d'un volume de 40 ml d'eau distillée, ensuite, un volume de 10 µl du surnageant est déposé délicatement sur le centre de la couche du pétrole. La présence d'une concentration très élevée de biosurfactant augmente considérablement le diamètre formé de la dispersion de l'huile. Le test est fait contre un témoin positif (tween 80) et un témoin négatif (milieu MSM stérile) (Piorkowski and McClements, 2014).

IV.1.2 L'index d'emulsification (E24)

➤ Principe

Les biosurfactants présumés produits par une souche/consortium peuvent être extracellulaire et par ainsi libéré directement dans le milieu (extracellulaire), ou intracellulaire attachés à la souche productrices. Le test « E24 » est effectué pour déterminer la localisation

des biosurfactants présumés produits. L'indice d'émulsification calculé est le rapport de la hauteur de la couche d'émulsion et la hauteur totale du mélange (huile + surnageant)

➤ **Mode opératoire**

Il consiste à ajouter un volume de l'huile à un volume du surnageant récupéré. Le mélange est homogénéisé manuellement puis vortexé à une grande vitesse à l'aide d'un vortex (IKA VORTEX GENIUS 3) pendant 5 minutes (Cooper and Goldenberg, 1987). Après 24 heures, l'indice d'émulsification est calculé comme suit :

$$E24 = \frac{H_{\text{émulsion}}}{H_{\text{total}}} \times 100$$

Un control positif et négatif est fait dans les mêmes conditions en remplaçant le surnageant par le milieu MSM stérile (négatif) et par Tween80 ans le cas tu témoin positif.



Figure 14 : Les étapes de réalisation du test E24

IV.2 Suivre de la croissance bactérienne par mesure de la DO

Dans notre étude, nous avons suivi la croissance des souches étudiées par turbidimétrie via la mesure de la densité optique (DO) à l'aide d'un spectrophotomètre. Trois lectures à différents temps d'incubation sont effectuées, elles s'agissent du T0, T24, T48 et T120h. Dans une microplaque de 96 puits, on dépose 200 µl de chaque batch (2 puits pour chaque souche) puis on mesure la densité optique par le spectrophotomètre de type « MULTIMODE PLATE READER (figure 15)



Figure 15 : Méthode de suivi de la production de la biomasse

IV.3 Suivi de la production du biogaz

Le biogaz (mélange de biogaz) produits dans le headspace des 15 batch sont directement connectés au système de mesure via une aiguille (figure 16). Le système est basé sur le principe de déplacement de l'eau (Pham *et al.*, 2013). La quantité de biogaz est mesurée en observant la hauteur de l'eau déplacée dans la colonne. Cette hauteur est directement proportionnelle au volume de biogaz collecté (ml)



Figure 16 : Système de déplacement de l'eau pour la mesure du biogaz produit par les différentes souches

Troisième partie

Résultats et discussion

I. Etude microbiologique

I.1 Caractéristiques macroscopique

L'aspect macroscopique des 15 isolats sur le milieu MS est illustré dans la figure 17 et leurs caractéristiques morphologiques sont répertoriées dans le tableau 04. D'une manière générale, les isolats présentent un aspect macroscopique pratiquement différencié, visuellement, la majorité des souches se développe en masse (les colonies s'agrippent les unes des autres) avec une surface tantôt ridée tantôt rugueuse. La pigmentation des isolats variant du jaunâtre à crèmeuse. La majorité des isolats se manifestent incrustés dans la gélose, translucide à opaque, bombé avec un contour régulier ou ondulé à lobé.

Tableau 04 : résultat des caractéristiques morphologiques des 15 isolats

Souche	Forme	Taille	Surface	Pigmentation	Élévation	Opacité	Contour
S1	Circulaire	Moyenne	Rugueuse	Crèmeuse	Bombée	Translucide	Régulier
S2	Irrégulière	Grosse	Ridée	Jaune	Plate	Opaque	Ondulé/lobé
S3	Circulaire	Petite	Rugueuse	Crèmeuse jaunâtre	Bombée	Translucide	Régulier
S4	Irrégulière	Grosse	Ridée brillante	Jaune	Bombée	Translucide	Ondulé/lobé
S5	Circulaire	Petite	Rugueuse	Crèmeuse jaunâtre	Bombée	Opaque	Régulier
S6	Irrégulière	Grosse	Ridée	Crèmeuse jaunâtre	Bombé	Translucide	Ondulé/lobé
S7	Circulaire	Moyenne	Rugueuse	Jaune	Bombée	Opaque	Régulier
S8	Irrégulière	Grosse	Ridée	Jaune	Bombé	Opaque	Ondulé/lobé
S9	Irrégulière	Moyenne	Rugueuse	Crèmeuse jaunâtre	Bombée	Translucide	Ondulé/lobé
S10	Circulaire	Moyenne	Rugueuse	Crèmeuse jaunâtre	Bombée	Opaque	Régulier
S11	Circulaire	Moyenne	Rugueuse	Crèmeuse jaunâtre	Bombée	Translucide	Régulier
S12	Circulaire	Moyenne	Rugueuse	Crèmeuse	Bombée	Translucide	Régulier
S13	Irrégulière	Moyenne	Lisse	Crèmeuse	Bombée	Translucide	Ondulé/lobé
S14	Circulaire	Petite	Rugueuse	Crèmeuse jaunâtre	Bombée	Opaque	Régulier
S15	Irrégulière	Moyenne	Rugueuse	Jaune	Bombée	Opaque	Ondulé/lobé

I.2 Aspect microscopique

L'observation microscopique a été réalisée suivant deux étapes, une de coloration de Gram et autre de vert de malachite. Les résultats obtenus se résument dans le tableau 05. Conventionnellement, deux groupes de bactéries existent ; celles Gram+ et Gram-avec des formes et des arrangements cellulaires différents (Figure 19).

Gram positif (S3, S4, S6, S7, S10) ou Gram négatif (S1, S2, S5, S8, S9, S11, S12, S13, S14, S15), les bactéries isolées présentent différentes formes : bacilles, coccobacille ou cocci ; elles sont soit isolées soit assemblées en paire ou en chaînette. Cette différence fondamentale révèle une diversité bactérienne au niveau du site d'échantillonnage. La prédominance des bactéries à Gram – (67%) comparativement à celle Gram + (33%) dans les sites pollués par les hydrocarbures a été déjà rapporté (Técher, 2011 ; Dwivediet *al.*, 2017).

Tableau 05 : Résultats de l'observation microscopique après coloration de gram et de vert de malachite chez les souches étudiées.

Souche	Gram	La Forme des cellules	Le mode de regroupement	Présence d'endospore
S1	-	Coccobacilles	Isolés / en diplo / en chainettes	-
S2	-	Bacilles	Isolés / en diplo /	-
S3	+	Bacilles	Isolés / en diplo	-
S4	+	Coccobacilles	Isolés / en diplo	-
S5	-	Coccobacilles	Isolés / en diplo	-
S6	+	Bacilles	Isolés / en diplocoques	-
S7	+	Bacilles	Isolés / en diplo / en chainettes	-
S8	-	Coccobacilles	Isolés / en diplo	-
S9	-	Coccobacilles	Isolés / en diplo	-
S10	+	bacilles	Isolés	-
S11	-	Coccobacilles	Isolés	-
S12	-	Cocci	Isolés / en diplo	-

S13	-	coccobacilles	Isolés / en diplo	-
S14	-	Bacilles	Isolés/en diplo	-
S15	-	Coccobacilles		-

Toutes les souches étudiées sont asporulées. Bien que le genre sporulant *Bacillus* et l'un des genres renommés par leur aspect hydrocarbonoclaste et producteurs des biosurfactants (Zhou *et al.*, 2015 ; Bezzaet *al.*, 2019 ; Daset *al.*,2023). Les bacilles Gram+ rencontrés dans notre étude, en absence des spores, n'appartiennent pas au genre *Bacillus* ou même *Clostridium*, *Sporosarcina* ou *Sporolactobacillus*.

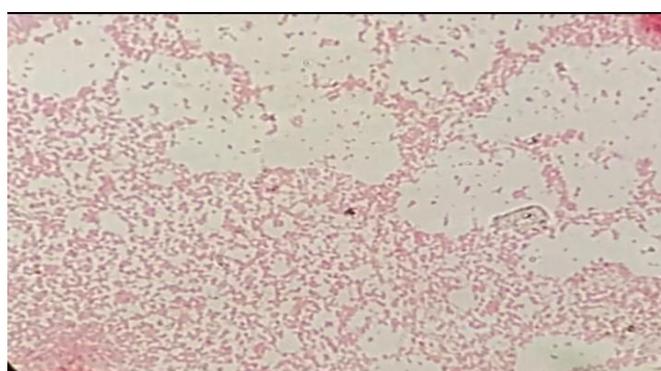


Figure 18 : Observation microscopique (G×100) après coloration avec vert de malachite (Résultats négatif)

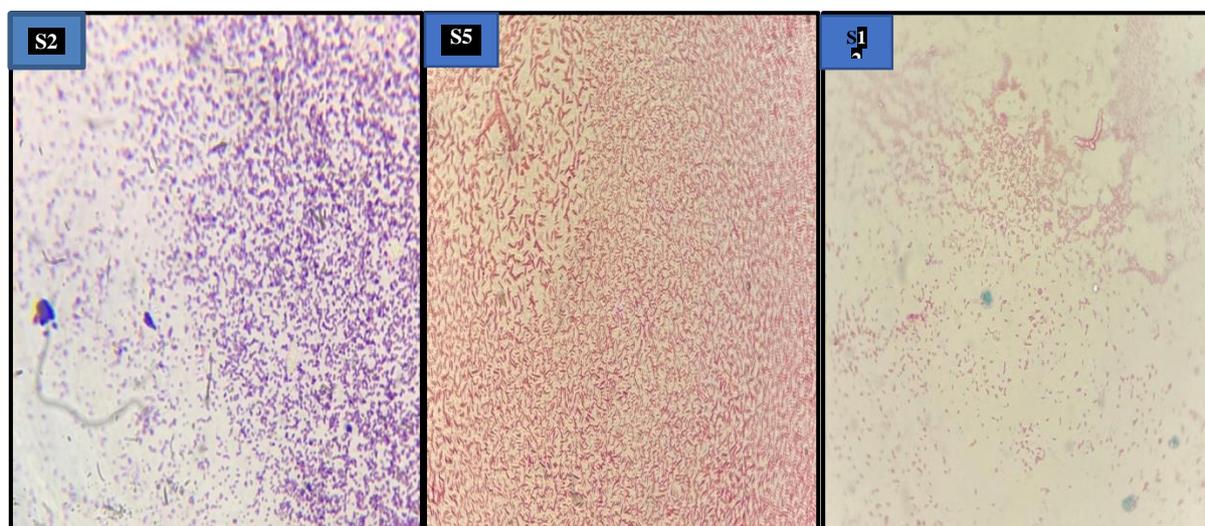


Figure 19 : Aspect microscopique après coloration de Gram de quelques isolats étudiés (G×100)

I.3 Détermination de la mobilité

Le milieu mannitol mobilité nitraté est utilisé dans notre étude pour la détermination de la mobilité ainsi que l'aptitude des souches à utiliser le mannitol comme source de carbone et

d'énergie. D'après les résultats figurés dans le tableau 06, il paraît clairement que 10 souches/15 sont mobiles. Palma *et al.*, 2022 ; rapportent que la détermination de la mobilité des souches pourrait être faite macroscopiquement via des milieux spécifiques, les bactéries mobiles se propagent à partir de la ligne d'ensemencement, créant par ainsi un trouble dans le milieu, tandis que les bactéries immobiles poussent uniquement le long du fil d'ensemencement.

La fermentation du mannitol a été observée chez 11 souches/15, en fait, la dégradation en anaérobie du mannitol conduit à la formation de fructose dont l'attaque conduit elle-même à la formation d'acides à chaînes courtes indiquée par un virage de l'indicateur du rouge au jaune. Un autre constat a été soulevé durant ce test noté par un dégagement des bulles de gaz dans tous les tubes. Cela pourrait être expliqué par la réduction du nitrate en nitrite puis en N_2 par la respiration anaérobie (respiration nitrate). Dans la respiration anaérobie, la dénitrification utilise le nitrate (NO_3^-) comme accepteur d'électrons terminal, de nombreux organismes aéro-anaérobie facultative utilisent la dénitrification car les nitrates, comme l'oxygène, ont un potentiel de réduction élevé (Moreno-Vivián *et al.*, 1999 ; Kraft *et al.*, 2011).

Tableau 06 : Résultats de la mobilité, fermentation de mannitol et production de biogaz chez les souches étudiées

Souches	Mobilité	Production de Biogaz	Mannitol
S1	+	+	+
S2	-	+	+
S3	+	+	+
S4	+	+	+
S5	+	+	+
S6	-	+	+
S7	+	+	+
S8	-	+	-
S9	+	+	-
S10	+	+	+
S11	+	+	+
S12	-	+	-
S13	+	+	+
S14	-	+	-

S15	+	+	+
-----	---	---	---

De ce fait, le biogaz détecté chez tous les isolats pourrait être N_2 comme un produit finale de la dénitrification, l'oxyde nitrique (NO) ou oxyde nitreux (N_2O) comme des gaz intermédiaires de la dénitrification.

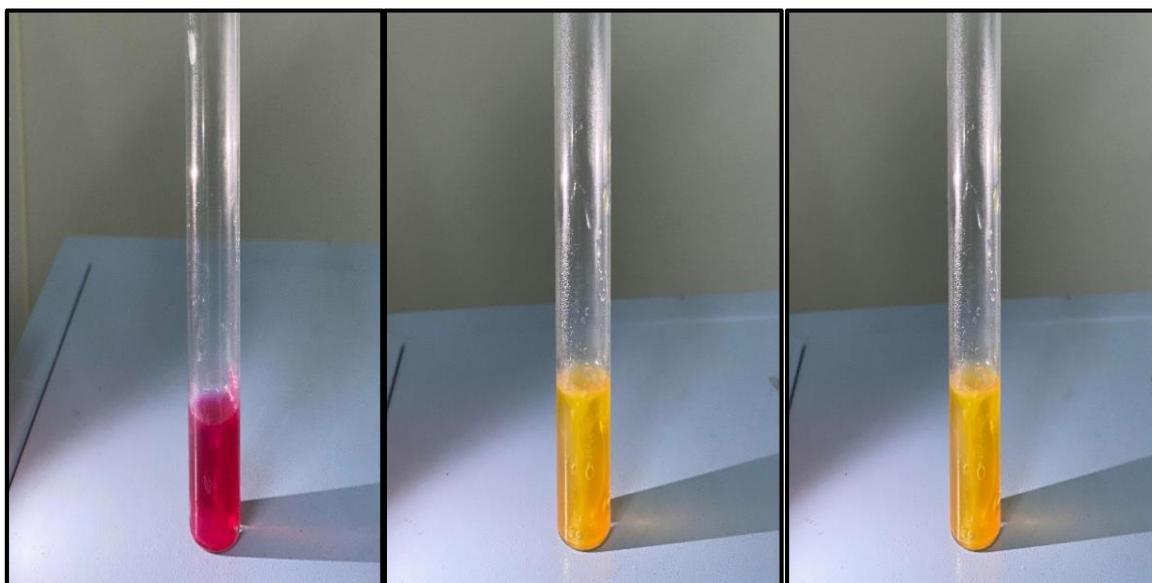


Figure 20 : Résultats du test de mobilité. (A : souche mannitol- mobilité- gaz+, B:souche mannitol+ mobilité+ gaz+, D: souche mannitol+ mobilité- gaz+)

I. Détermination du type respiratoire

Le type respiratoire des bactéries est déterminé par la culture sur milieu thioglycolate de sodium. A l'exception de la souche S10 étant microaérophile, toutes les souches sont des Aéro-Anaérobies facultatives. Les bactéries microaérophiles se cultivent en haut du tube, légèrement sous la surface. Elles nécessitent des concentrations faibles d'oxygène pour se développer, aux alentours de 2-10% (Stuart, 2005 ; Prescott *et al.*, 1996), cependant, ces concentration sont bien inférieures à celles trouvées dans l'atmosphère terrestre (Ludwig, 2004). Les bactéries aéro-anaérobies se cultivent dans tous le tube avec une présence concentrée sous la surface. Elles préfèrent exécuter une respiration aérobie pour générer plus d'ATP. En fait, la croissance tout au long du tube est ainsi une caractéristique des anaérobies aérotoleurant (AAT), cependant, la distinction entre ces deux types réside dans le fait que les AAF se concentrent dans la surface, tandis que la croissance des AAT est uniforme. Ainsi, les deux types se distinguent par la présence du catalase, Les AAF sont catalase+, et les AAT sont catalase-

Tableau 07:Type respiratoire des souches étudiées.

Souches	Métabolisme respiratoire		
	Catalase	Oxydase	Type respiratoire
S1	+	+	AAF
S2	+	+	AAF
S3	+	+	AAF
S4	+	+	AAF
S5	+	+	AAF
S6	+	+	AAF
S7	+	+	AAF
S8	+	+	AAF
S9	+	+	AAF
S10	+	+	Microaérophile
S11	+	+	AAF
S12	+	+	AAF
S13	+	+	AAF
S14	+	-	AAF
S15	+	+	AAF

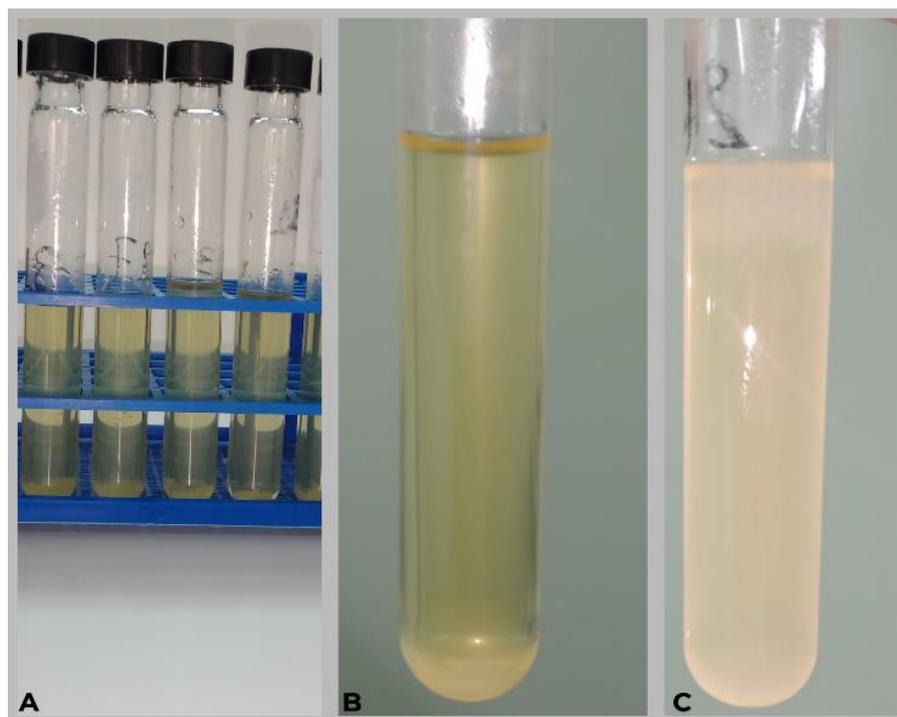


Figure 21 : Test du type respiratoire. (A: milieu thioglycolate stérile, B:souche microaérophile, C:souche AAF)

La recherche d'oxydase est un test fondamental pour l'orientation des bactéries gram-, permettant de différencier si elle est entérobactéries (oxydase négative) ou non entérobactérie (oxydase positive) (tortora *et al.*, 2003). Le résultat du test oxydase des souches bactériennes étudiées est un résultat positive ce qui nous a menés à exclure l'existence d'un genre /espèce de la famille des entérobactéries parmi les 15 isolats.



Figure 22 : Résultats du test de catalase (1) et du test oxydase (2)

Suivant les différents traits morphologiques et biochimiques, nous pouvons présomptivement identifier nos isolats. Les bacilles/coccobacilles gram négatifs, mobiles, oxydase et catalase positifs et présentant un métabolisme de type oxydatif. La croissance

anaérobie n'a lieu qu'en présence de nitrate. Cette description (S1, S5, S11, S13 et S15) répond à la définition des familles *pseudomonaceae* et/ou *vibrionaceae*. La fermentation du mannitol ainsi fait la distinction entre les espèces, le S1, S5, S11, S13 et S15 (mannitol + et dénitrifiantes) pourront être soit *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas fluorescent* ou *aeromonashydrophila*. Cependant, S8, S9 et S14 (mannitol – et dénitrifiantes) peuvent être *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas mondocena* ou *Alcaligenes denitrificans*. (Pichionyet *al.*, 1978 ; Garcia *et al.*, 1981). La coque Gram négative (S12) pouvait être *Microcoques denitrificans*.

Les bacilles Gram positifs (S3, S6, S7 et S10) présentent des caractéristiques distinctives de celles cités dans la bibliographie indiquant qu'elles pourront être des nouvelles espèces, une étude plus approfondie est requise en réalisant plus de tests, néanmoins, l'étude moléculaire est la méthode la plus crédible pour les identifier.

II. Etude physico-chimique

L'étude de l'aptitude des souches sélectionnées à utiliser l'huile brute (Crudeoil) comme une seule source de carbone et d'énergie a été étudié à travers trois paramètres, étant ; la production des biosurfactants, le suivie de la production du biogaz et de la biomasse bactérienne.

II.1 Test de production des biosurfactants

Dans notre étude, la recherche de la production des biosurfactants par les 15 souches testées s'est fait par deux tests qualitatifs, le test d'émulsification (E24) et le test de déplacement de l'huile (Oilspreading test). En fait, les cultures bactériennes de différentes souches sont récupérées après 5 jours de fermentation, elles sont par la suite subies une centrifugation pour récupérer 3 couches distinctes : la couche d'huile trouvée au sommet du tube de centrifugation, le surnageant contenant les biosurfactants dissous dans le milieu de culture et enfin le culot des cellules bactériennes (Figure 23).

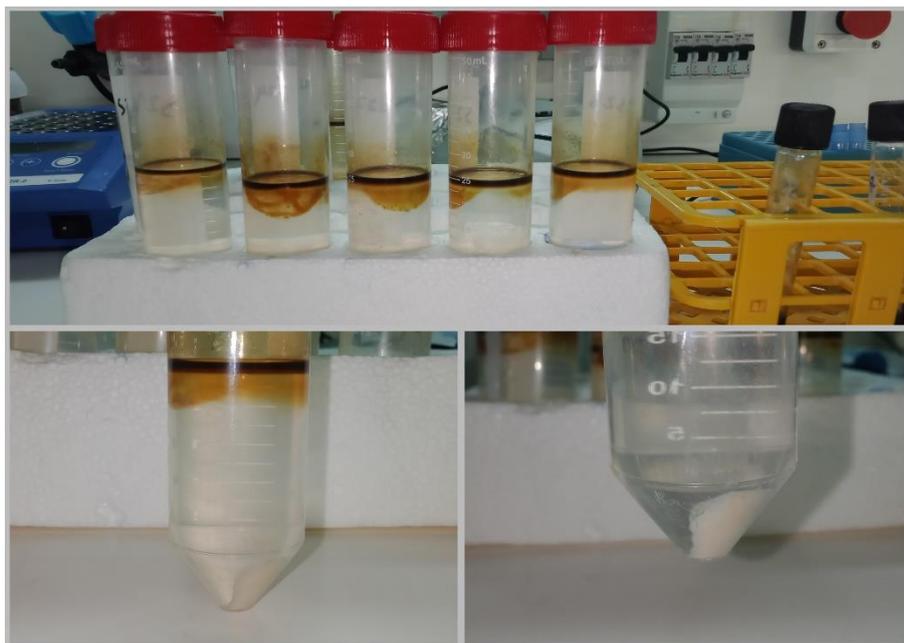


Figure23: Culture bactérienne après centrifugation.

II.1.1 Test de déplacement de l'huile (OST)

Dans ce test, l'apparition d'une zone claire au centre de la goutte d'huile est considérée comme un indicateur de production des biosurfactants. En fait, cette zone est formée suite à la fusion de la partie hydrophobe de l'huile est la partie hydrophile du biosurfactant induisant par ainsi, une diminution de la surface d'interface et interruption de la couche d'huile par formation de la zone claire. Le diamètre de la zone est proportionnel à la quantité des biosurfactants produites dans le milieu réactionnel, une grande zone claire indique une forte production de biosurfactants, et vice versa (Nayarissieriet *al.*, 2021). Le test est réalisé contre un témoin positif (Tween 80) et un témoin négatif (milieu de culture stérile). Les résultats obtenus sont récapitulés dans la figure 24, il en ressort que les diamètres variant du 0,4 à 5,3mm, la souche S13 suivie par la souche S1 et S12 présentent les diamètres les plus grands (5,3, 3,9 et 3,6mm) suggérant qu'elles sont les plus productrices de biosurfactants comparativement aux control et aux autres souches.

Des travaux antérieurs sur la production des biosurfactant à partir de trois souches ont stipulé que *E. coli* a donné un test négatif, alors que *Staphylococcus* et *Bacillus* ont donné un résultat positif avec une zone de déplacement de 1,8 mm et 2,5 mm respectivement (Nayarissieriet *al.*, 2021). En étudiant 59 souches isolées à partir du sol, 86% des souches sont producteurs de biosurfactants avec un diamètre de déplacement entre 2-21mm (Anaukwuet *al.*, 2015)

Tableau 08 : Screening des souches pour la production de biosurfactant (Oilspreading test)

Souche	Diamètre de déplacement
S1	++++
S2	+++
S3	+++
S4	++
S5	++
S6	+
S7	+
S8	-
S9	+++
S10	+
S11	++
S12	++++
S13	++++
S14	++
S15	+

Diamètre entre 0.5-1.5 mm (+); diamètre entre 1.6 to 2.5 mm (++), diamètre entre 2.6 to 3.5 mm (+++); diamètre \leq 3,5 mm (++++).

Branch *et al.*(2012) ont étudié la production du biosurfactant par *Bacillus sp* isolée à partir des sols contaminés par les hydrocarbures, La bactérie a révélé une forte production des molécules tensio-actif, en particulier pour la récupération microbienne améliorée du pétrole (MEOR) et la bioremédiation de la contamination par le pétrole.

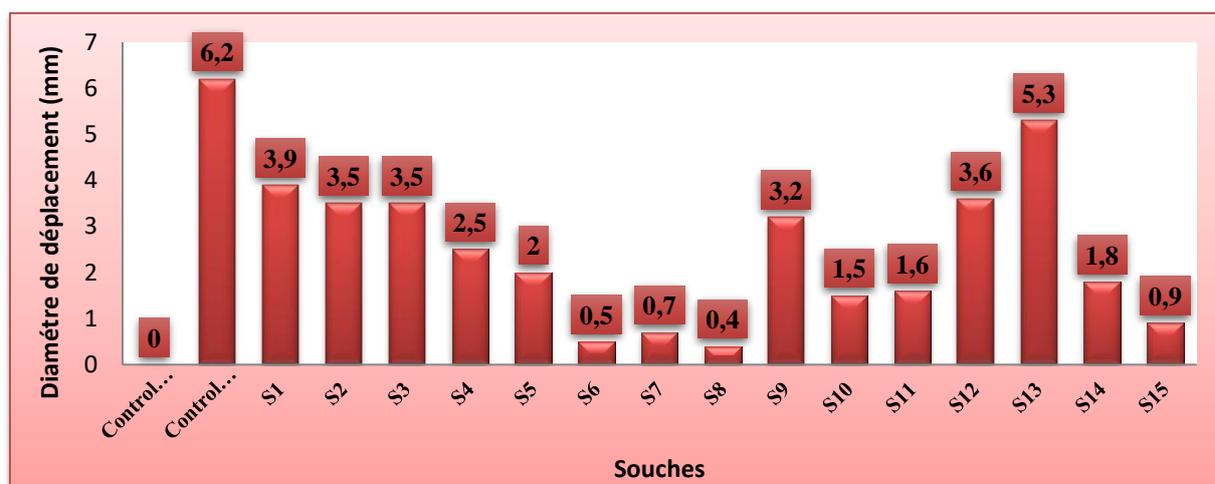


Figure 24 : Diamètres de déplacement de l'huile des biosurfactants produits par les 15 souches (Oilspreading test)

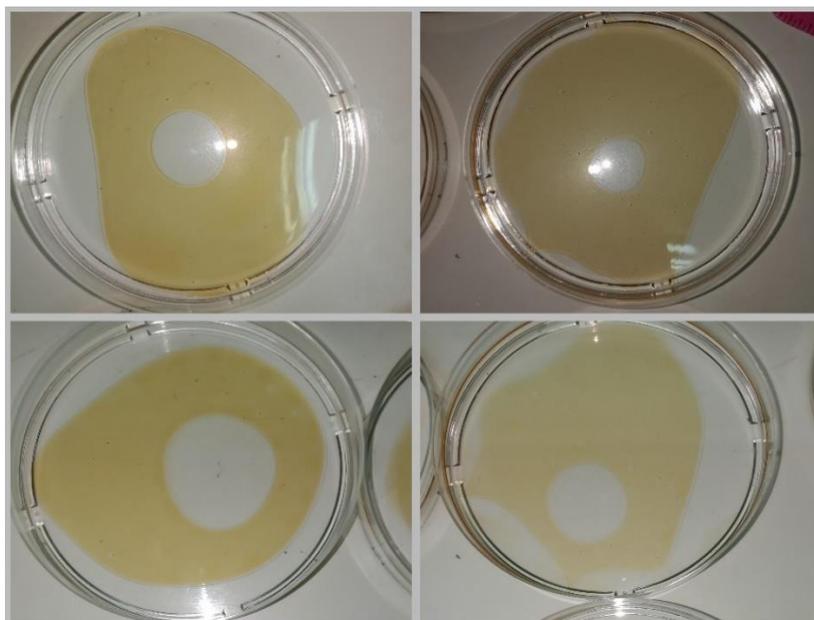


Figure 25 : Résultats du test de déplacement de l'huile.

II.1.2 Test d'émulsification (E24)

En mélangeant vigoureusement la phase aqueuse représentée par le surnageant de la culture bactérienne, contenant les biosurfactants et la phase huileuse, les biosurfactants présents facilitent la dispersion des gouttelettes d'huile dans l'eau, formant ainsi une émulsion à l'interface entre la phase aqueuse et la phase huileuse. Une haute valeur de l'indice d'émulsification indique une forte production de biosurfactants par le micro-organisme et vice versa.

Les résultats de l'indice d'émulsification des 15 souches sont mentionnés dans la figure 26, toutes les souches présentent un indice d'émulsification de l'huile significativement moins que le control positif. Similairement aux OST, les souches S1, S10 et S13 sont des fortes productrices de biosurfactants comparativement au control et aux autres souches. Jayanthi and Revathi, (2016) ont rapportés des index d'émulsification largement supérieurs aux nôtres, variant entre 20 et 57% pour des souches isolées à partir des sites pollués par les hydrocarbures et identifiées comme *Pseudomonas putida*.

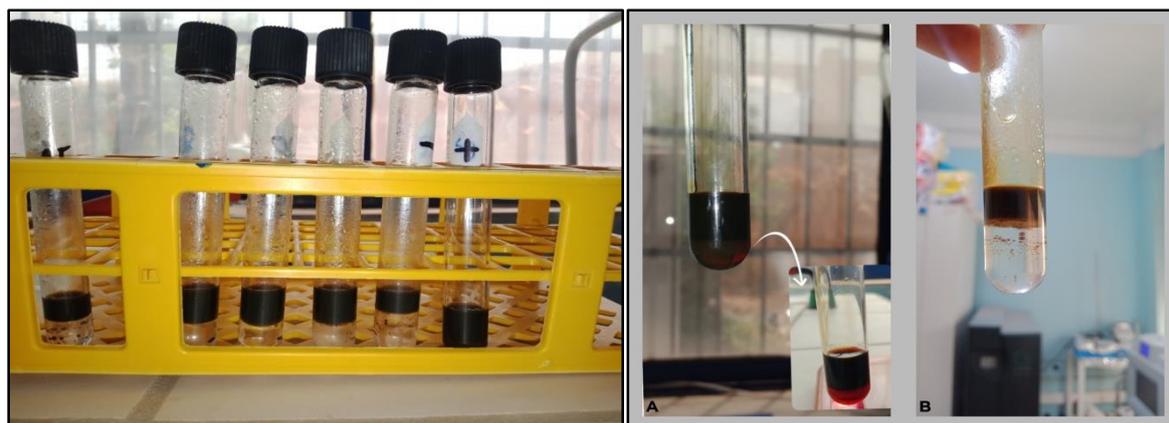


Figure 26: Résultats du test E24

Les souches les plus performantes vis-à-vis l'aptitude à produire les biosurfactant sont des Gram négative (S1 et S13), plusieurs rapports ont stipulés que les bactéries Gram négatives présentent une capacité d'émulsification plus grande comparativement aux bactéries Gram positives (Hassanshahian, 2014 ; Susanti et *al.*, 2021).

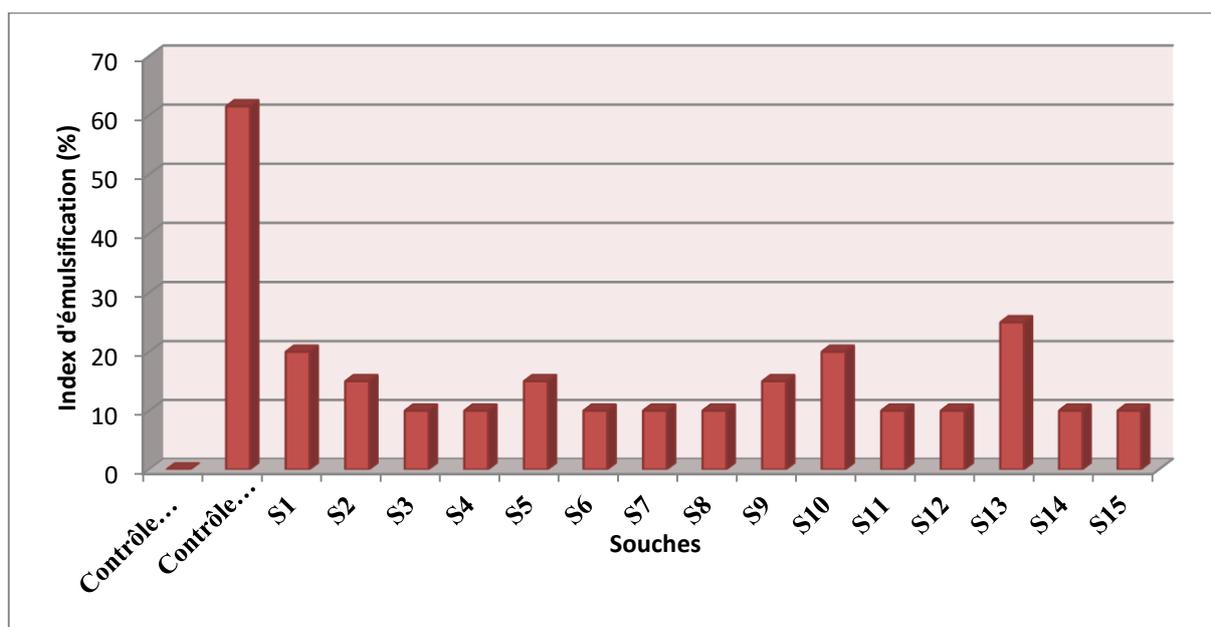


Figure 27 : Indice d'émulsification des biosurfactants produits par les 15 souches (E24)

II.2 Suivre de la production de la biomasse

Les résultats du suivie de la DO sont indiqués dans la figure 28. Il en ressort qu'à 48h la biomasse bactérienne des souches est augmenté avec des taux d'augmentation variant du 18 jusqu'à 94% dépendamment des souches. Cette augmentation de la biomasse comme indiquée par la DO à 600nm reflète une croissance accrue en présence de l'huile brute comme seule source de carbone et d'énergie (phase exponentielle). Cela signifie que les bactéries ont utilisé

les hydrocarbures faciles à dégrader pour se développer et se multiplier, confirmant par ainsi leur caractère hydrocarbonoclaste. Cependant, à 96h de fermentation, la biomasse de la majorité des souches est abaissée avec des taux allant de -5 Jusqu'à -26% indiquant que les bactéries ont rentré en phase de déclin (mort des cellules bactériennes). Des travaux similaires de Sharma et *al.*,(2019) ont stipulé que la phase log a duré 72h durant laquelle une augmentation constante de la production des biosurfactants, indiquée par le test E24, est enregistrée.

Il a été rapporté que la production des biosurfactant durant la phase exponentielle de croissance augmente la biodisponibilité de l'huile par émulsification, la rendant par ainsi, facile à être utiliser comme source de carbone et d'énergie (Hassanshahian, 2014).Le type de biosurfactant produit (ramnolipides, glycolipides...etc.) est ainsi un critère discriminant.

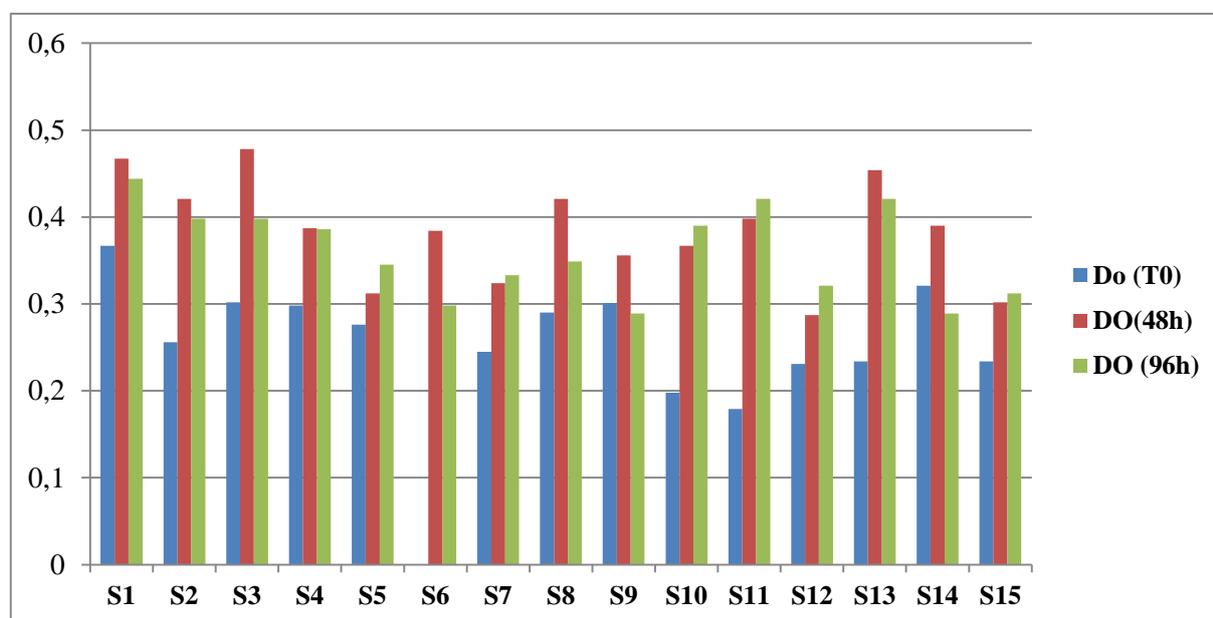


Figure 28 : Suivie de la production de la biomasse bactérienne par DO à 600nm

II.3 Suivie de la production du biogaz

Un autre indicateur de la croissance des souches étudiées en présence de l'huile comme la seule source de carbone et d'énergie est la production du biogaz. Ce suivi est fait par un montage basé sur le déplacement de l'eau. Les résultats de a production du biogaz au bout de 5 jours pour les 15 souches sont illustrés dans la figure 29.

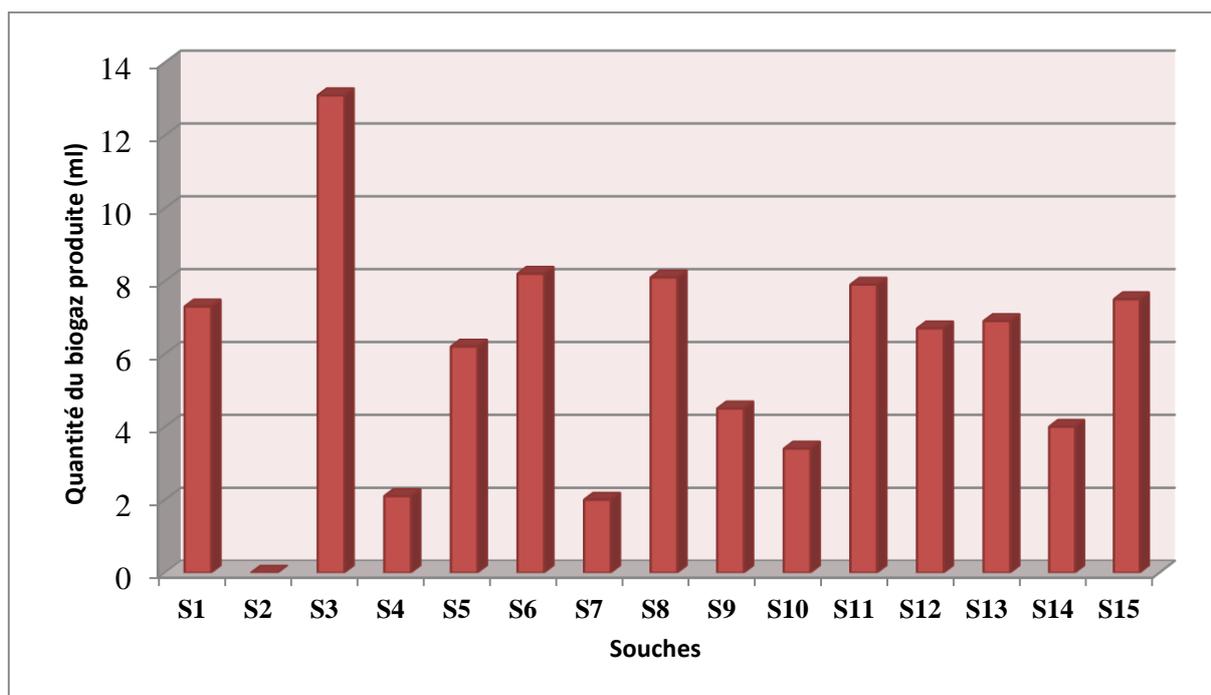


Figure 29 : Quantité du biogaz produite au bout de 5 jours par les différentes souches

A l'exception de la souche S2, tous les autres isolats sont apparus productrices de biogaz. En fait, la qualité ou la composition de ces biogaz demeure inconnue et nécessite une analyse par des équipements chimiques avancés comme la GC-MS. Jusqu'à l'instant, peu d'études ont rapporté que certains hydrocarbonoclastes sont dotés d'une propriété de production de biogaz. L'un des bactéries capables de dégrader les hydrocarbures exploités pour la production du biogaz est *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas stutzeri* (Gopinath *et al.*, 2015).

L'importance de la production du biogaz est reconnue comme une source d'énergie renouvelable (chaleur, électricité), des souches génératrices de biogaz pourront avoir un intérêt industriel incontournable. De plus leur intérêt gigantesque dans le processus de récupération assistée du pétrole (MEOR) du fait que le biogaz produit augmente la pression dans les puits facilitant par ainsi la récupération du pétrole emprisonné dans la roche mère.

*Conclusion
et perspective*

Conclusion et perspective

Les sols contaminés par les hydrocarbures abritent des milliers de microorganismes susceptibles d'avoir un effet bioremediateur via la dégradation partielle ou complète des hydrocarbures contaminants. Ces bactéries dites « hydrocarbonoclastes » peuvent accélérer la biodégradation (en aérobiose et/en anaérobiose) par la production de substances émulsifiantes nommées les « biosurfactants ». Les microorganismes hydrocarbonoclastes présentent un intérêt majeur dans la bioremédiation des sites pollués par les hydrocarbures via la production des biosurfactants, ainsi elles offrent un intérêt crucial dans le processus de récupération assistée du pétrole (MEOR) via la production du biogaz.

Dans notre étude nous avons étudié 15 souches préalablement isolées en anaérobiose à partir des échantillons de sols pollués par les hydrocarbures pétroliers, leurs caractéristiques microbiologiques (phénotypiques et biochimiques) ainsi physico-chimiques (production de biosurfactant et de biogaz) ont été évaluées. Une différenciation dans l'aspect macro et microscopique a révélé une prédominance des bactéries Gram- au détriment des bactéries Gram+, ainsi une dominance des formes bacilles comparativement aux formes cocci. Biochimiquement, tous les isolats sont oxydase et catalase positifs, à l'exception de la souche S10, toutes les souches sont des AAF. L'étude de la mobilité et de la fermentation du mannitol dans le milieu thioglycolate a aussi fait la distinction entre les souches, de plus, ce test a dévoilé la capacité des souches à produire le biogaz. Suivant les aspects morphologiques et biochimiques, nous avons pu présomptivement identifier quelques isolats comme des différentes espèces du genre *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Aeromonas* et *Micrococcus*. Quatre isolats paraissent des nouvelles souches, vu l'absence des caractéristiques communes avec la bibliographie.

L'étude de l'aspect hydrocarbonoclaste des 5 isolats a été prouvé à travers leurs aptitudes à produire les biosurfactants (test E24 et test OST) en présence de l'huile comme seule source de carbone et d'énergie. Toutes les souches sont des productrices de biosurfactant, cependant, la souche S13 suivie par les souches S1 et S12 (presomptivement identifiées comme *Pseudomonas*, *Aeromonas* et *Micrococcus*) sont les plus performantes comparativement aux control et aux autres souches. L'augmentation de la biomasse bactérienne durant les premières heures de fermentation sur milieu MSM a ainsi fait preuve de l'utilisation du crude oil comme source de carbone unique. Ce résultat révèle que nos souches présentent un intérêt majeur et crucial dans le processus de bioremédiation (décontamination) des sites pollués par les

hydrocarbures (sol, mer.etc.), ainsi, leurs profils respiratoires augmentent leur performance en les utilisant soit en aérobiose et/ou en anaérobiose. A l'exception de la souche S2, toutes les souches sont des productrices de biogaz, ce qui leur confère un avantage crucial dans le processus MEOR à grand intérêt économique.

En plus de l'utilisation des souches en bioremédiation et en MEOR, nos souches peuvent être exploitées en industrie (cosmétique, alimentaire...etc.) pour la production des biosurfactants qui représentent des substances intéressantes avec différentes applications.

Comme perspective, une analyse moléculaire des 15 souches est requise pour savoir leur identification réelle, et pour augmenter la chance d'explorer de nouvelles souches à intérêts biotechnologiques divers.

Références

Bibiloghraphie

Références bibliographiques :

A

- Abdellah, N. (2015). Bioremédiation d'un site pollue par les hydrocarbures : essais d'application d'un biosurfactant. Mémoire de Master en Génie des procédés. Faculté de Technologie, Université de BLIDA, Algérie.
- Anaukwu, C. G., Ekwealor, I. A., Ezemba, C. C., Anakwenze, V. N., Okafor, U. C., & Archibong, E. J. (2015). *Pseudomonas monteili* and *Citrobacter murlinae*, biosurfactant-producing bacteria isolated from Nigerian soil. *British Microbiology Research Journal*.

B

- Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., ... & Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 87, 427-444.
- Banat, I. M., Makkar, R. S., & Cameotra, S. S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, 53, 495-508.
- Belmenai, M., & Benhafed, N. E. (2015). Isolement et caractérisation des bactéries hydrocarbonoclastes. Mémoire de master. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri, Constantine, Algérie.
- Bezza, F. A., & Chirwa, E. M. N. (2015). Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN2. *Biochemical engineering journal*, 101, 168-178.
- Bliefert, C., & Perraud, R. (2004). Chimie de l'Environnement : Air, eau, sols ; déchets 1 ère édition. *De Boeck Université*, 234-251.
- Boudershem, a. (2010). Utilisation des souches bactériennes telluriques autochtones dans la biodetection et la bioremediation des sols pollues par les hydrocarbures (Doctoral dissertation)
- BOUDERHEM, A. Utilisation des souches bactériennes telluriques sahariennes dans la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures pétroliers (Doctoral dissertation).

- Cooper, D., & Goldenberg, B. (1987). Surface-active agents from 2 *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol.*, 53(2), 224–229.

D

- Das, S., Das, N., Choure, K., & Pandey, P. (2023). Biodegradation of asphaltene by lipopeptide-biosurfactant producing hydrocarbonoclastic, crude oil degrading *Bacillus* spp. *Bioresource Technology*, 382, 129198.

E

- Eddouaouda, K. (2012). Etude du potentiel biodegradatif de souches isolées du sol de hassi messaoud contaminate par du pétrole (Doctoral dissertation, Blida).

F

- Ferhat, S. (2012). Production de biosurfactants par des souches de *Brevibacterium* et *Ochrobactrum* isolées du sol de Hassi-Messaoud contaminées par le pétrole brut (Doctoral dissertation, Blida).
- Ferradji, F.Z. (2014). Etude des voies métaboliques de la biodégradabilité des hydrocarbures en vue d'une application d'un procédé de biodepollution des eaux de mer (Doctoral dissertation, Blida).

G

- Garcia, J. L., Roussos, S., & Besoussan, M. (1981). Étude taxonomique de bactéries dénitrifiantes isolées sur benzoate dans des sols de rizières du Sénégal. *Cahiers ORSTOM*, 12, 13-27.
- Gopinath, L. R., Divya, D., Gehitha, T. R., Bhuvaneshwari, R., Archaya, S., & Merlin Christy, P. (2015). Hydrocarbon degradation and biogas production efficiency of bacteria isolated from petrol polluted soil. *Research Journal of Recent Sciences*. ISSN, 2277, 2502.

H

- Hassanshahian, M. (2014). Isolation and characterization of biosurfactant producing bacteria from Persian Gulf (Bushehr provenance). *Marine pollution bulletin*, 86(1-2), 361-366.
- Head, I. M., Jones, D. M., & Röling, W. F. (2006). Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, 4(3), 173-182.
- Hussey, M., & Zayaitz, A. (2007, September 29). Endospore Stain Protocol. American Society For Microbiology.

J

- Jayanthi, C., & Revathi, K. (2016). Optimization of biosurfactant production from hydrocarbonoclastic bacteria *Pseudomonas putida*. *Int. J. Curr. Res. Biol. Med*, 1, 22-27
- Johnsen, A. R., Wick, L. Y., & Harms, H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental pollution*, 133(1), 71-84.
- Juhasz, A. L., Britz, M. L., & Stanley, G. A. (1997). Degradation of fluoranthene, pyrene, benz [a] anthracene and dibenz [a, h] anthracene by *Burkholderia cepacia*. *Journal of Applied Microbiology*, 83(2), 189-198.

K

- Kästner, M., Breuer-Jammali, M., & Mahro, B. (1994). Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41, 267-273.
- Klosowska-Chomiczewska, I., Medrzycka, K., & Karpenko, E. (2011). Biosurfactants—biodegradability, toxicity, efficiency in comparison with synthetic surfactants. *Adv. Chem. Mech. Eng*, 2, 1-9.

L

- Lefobore G. (1986). *Notion de chimie-pétrole*, E-d. TECHNIP, Paris.

M

- Maier, R. M. (2003). Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. *Advances in applied microbiology*, 52, 101-122.

- Manhan S.E. (2007). Environnemental science and technology, Ed. Taylor and Francis, New York.
- Moody, J. D., Freeman, J. P., & Cerniglia, C. E. (2005). Degradation of benz [a] anthracene by *Mycobacterium vanbaalenii* strain PYR-1. *Biodegradation*, 16, 513-526.
- Mueller, L. A., Hinz, U., Uzé, M., Sautter, C., & Zryd, J. P. (1997). Biochemical complementation of the betalain biosynthetic pathway in *Portulaca grandiflora* by a fungal 3, 4-dihydroxyphenylalanine dioxygenase. *Planta*, 203, 260-263.
- Mukherjee, A. K., & Das, K. (2010). Microbial surfactants and their potential applications: an overview. *Biosurfactants*, 54-64.

N

- Nayarisseri, A., Singh, P., & Singh, S. K. (2018). Screening, isolation and characterization of biosurfactant producing *Bacillus subtilis* strain ANSKLAB03. *Bioinformation*, 14(6), 304.
- Neu, T. R. (1996). Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiological reviews*, 60(1), 151-166
- Nielsen, T., Jørgensen, H. E., Larsen, J. C., & Poulsen, M. (1996). City air pollution of polycyclic aromatic hydrocarbons and other mutagens: occurrence, sources and health effects. *Science of the Total Environment*, 189, 41-49.

P

- Pelmont, J. (1995). Bactéries et environnement-adaptation biologique.
- Perfumo, A., Smyth, T., Marchant, R., & Banat, I. (2010). Production and roles of biosurfactants and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates. In *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology* (pp. 1501-1512). Springer.
- Pichinoty, F., Veron, M., Mandel, M., Durand, M., Job, C., & Garcia, J. L. (1978). Etude physiologique et taxonomique du genre *Alcaligenes*: *A. denitrificans*, *A. odorans* et *A. faecalis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 24(6), 743-753.
- Piorkowski, D., & McClements, D. J. (2014). Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. (Vol. 422). Récupéré sur <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.009>.

- Poré, J. (1992). Émulsions, micro-émulsions, émulsions multiples : Les agents de surface. 2, Balance hydrophile. Éd. Techniques des industries des corps gras.

R

- Rabus, R., Boll, M., Heider, J., Meckenstock, R. U., Buckel, W., Einsle, O., ... & Wilkes, H. (2016). Anaerobic microbial degradation of hydrocarbons: from enzymatic reactions to the environment. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 26(1-3), 5-28.
- Radwan, S. S., Al-Awadhi, H., Sorkhoh, N. A., & El-Nemr, I. M. (1998). Rhizospheric hydrocarbon-utilizing microorganisms as potential contributors to phytoremediation for the oil Kuwaiti desert. *Microbiological Research*, 153(3), 247-251.
- Reiner, K. (2010, November 11). Catalase Test Protocol. American Society For Microbiology.
- Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2001). Natural roles of biosurfactants: Minireview. *Environmental microbiology*, 3(4), 229-236.

S

- Sauret, C. (2011). Ecologie des communautés bactériennes marines soumises à une pollution pétrolière : influence des facteurs environnementaux, de la prédation et de la récurrence des pollutions (Doctoral dissertation, Paris 6).
- Sharma, S. L., & Pant, A. (2000). Biodegradation and conversion of alkanes and crude oil by a marine *Rhodococcus*. *Biodegradation*, 11, 289-294.
- Shields, P., & Cathcart, L. (2010, November 11). Oxidase Test Protocol. American Society For Microbiology.
- Slimani, Y., & Hamidi, M. (2019). Récupération assistée du pétrole par injection de Surfactants. Mémoire de master. Faculté des sciences chimie organique, Université Mohamed Boudiaf, M'sila, Algérie.
- Smith, A., & Hussey, M. (2005, September 30). Gram Stain Protocols. American Society For Microbiology.
- Susanti, M. E., Maftuch, M., & Prihanto, A. A. (2021). Screening of Potential Biosurfactant Producing Bacteria from Tanjung Perak Port, Surabaya. *The Journal of Experimental Life Science*, 11(3).

T

- Tarayre, C. (2012). Bioremédiation de sols pollués aux hydrocarbures. Amélioration de la bio-augmentation et biostimulation. Allemagne : Edition universitaires européennes.
- Thavasi, R., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T., & Banat, I. M. (2007). Biosurfactant production by *Corynebacterium kutscheri* from waste motor lubricant oil and peanut oil cake. Letters in applied microbiology, 45(6), 686-691.

V

- van Beilen, J. B., Panke, S., Lucchini, S., Franchini, A. G., Röthlisberger, M., & Witholt, B. (2001). Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk genes. Microbiology, 147(6), 1621-1630.
- Vandecasteele, J. P. (2005). Les hydrocarbures naturels dans l'environnement. Microbiologie pétrolière. Technip (ed). Paris : IFP publications, 44-73.

W

- Wentzel, A., Ellingsen, T. E., Kotlar, H. K., Zotchev, S. B., & Throne-Holst, M. (2007). Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. Applied microbiology and biotechnology, 76, 1209-1221.
- Whyte, L. G., Schultz, A., Van Beilen, J. B., Luz, A. P., Pellizari, V., Labbé, D., & Greer, C. W. (2002). Prevalence of alkane monooxygenase genes in Arctic and Antarctic hydrocarbon-contaminated and pristine soils. FEMS Microbiology Ecology, 41(2), 141-150.
- Widdel, F., & Musat, F. (2010). Diversity and common principles in enzymatic activation of hydrocarbons. In Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology.

Y

- Yuste, L., Corbella, M. E., Turiégano, M. J., Karlson, U., Puyet, A., & Rojo, F. (2000). Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. FEMS microbiology ecology, 32(1), 69-75.

Z

- Zeinali, M., Vossoughi, M., & Ardestani, S. K. (2007). Characterization of a moderate thermophilic *Nocardia* species able to grow on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Letters in applied microbiology*, 45(6), 622-628.
- Zhou, H., Chen, J., Yang, Z., Qin, B., Li, Y., & Kong, X. (2015). Biosurfactant production and characterization of *Bacillus* sp. ZG0427 isolated from oil-contaminated soil. *Annals of microbiology*, 65, 2255-2264.

Annexes

Annexe 1 : composition des milieux de culture utilisés

1. Milieu de culture MS

KH ₂ PO ₄	0.80g
NH ₄ Cl	1.2g
MgCl ₂ ×6 H ₂ O	4.60g
CaCl ₂ ×2 H ₂ O	1.20g
NaCl	15g
Extrait de levure	1.00g
Tryptone	1.00g
Agar	20g/l
PH	7-7.2

2. Milieu minimal salé (MSM)

Eau de gisement	250ml
NaNO ₃	2g
KCl	0.5g
K ₂ HPO ₄ H ₂ O	1g
KH ₂ PO ₄	1g
CaCl ₂	0.025g
MgSO ₄	0.1g
FeSO ₄ .7.H ₂ O	0.001g
Solution d'éléments traces	2ml
pH	7

3.Mannitol mobilité nitraté

Hydrolysattrypsique de caséine	10,0 g
Mannitol	7,5 g
Rouge de phénol	0,04 g
Nitrate de potassium	1,0 g
Agar	3,5 g
pH	7,6

4. Milieu thioglycolate liquide

Eau de gisement	250ml
L-cystéine	0.50g
Extrait de levure	5g
Glucose	5.5g
Caséine	15g
Thioglycolate de sodium	0.5g
pH	7

Annexe 2 : composition des solutions colorées

1. Lugol (double concentration)

Iode	2g
Iodure de potassium	4g
Eau distillée	300ml

2. Violet de gentiane

Violet de gentiane	1g
Ethanol à 90°	10ml
Phénol	2g
Eau distillée	100ml

3. Vert de malachite

Vert malachite	0,5 g
Eau distillée	100 ml

4. Safranine

Solution stock

Safranin	2.5g
Ethanol 95 %	100 ml

Résumé

L'objectif de notre travail est la caractérisation microbiologique (morphologique et biochimique) des 15 isolats isolés en anaérobiose provenant d'un sol pollué par les hydrocarbures, et l'étude de leur aspect physico-chimique consistant à la détermination de leur aptitude à utiliser l'huile brute comme seule source de carbone et d'énergie par la production des biosurfactants et du biogaz. L'étude microbiologique a révélé une diversité discernable entre les isolats avec une identification présomptive de *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Micrococcus* et *Alcaligenes*. L'aspect physico-chimique des isolats suivi par une fermentation sur milieu MS, préparé dans des conditions d'anaérobiose, a dévoilé que toutes les souches ont utilisé l'huile brute comme seule source de carbone avec production de biosurfactants et du biogaz comme produits finaux. Telles productions étaient avec une performance divergente et distinguable. En effet, les souches étudiées dans ce travail présentent le double avantage d'être utilisées comme des agents bioremediateurs ainsi des agents impliqués dans le processus MEOR pour la récupération du pétrole. Leur implication dans les différentes industries pour la production des biosurfactants est ainsi envisageable.

Mots clés : biosurfactant, anaérobiose, hydrocarbonoclaste, biogaz, hydrocarbure.

ملخص

الهدف من عملنا هو الخصائص الميكروبيولوجية (المورفولوجية والكيميائية الحيوية) لـ 15 من العزلات المعزولة في شروط لاهوائية من الأرض الملوثة بالمحروقات، والبحث عن الجوانب الفيزيائية الكيميائية التي تتمثل في تحديد القدرة على استخدام النفط الخام كمصدر وحيد للبتروول والطاقة من خلال إنتاج المواد البيولوجية السطحية والغاز الحيوي. أظهرت الدراسة الميكروبيولوجية تنوعًا متميزًا بين الفصائل مع تحديد محتمل لـ *Pseudomonas* ، *Aeromonas* و *Micrococcus* و *Alcaligenes*. وقد أظهرت الجوانب الفيزيائية الكيميائية للعزلات، متبوعة بالتخمير في وسط MS ، التي تم إعدادها في ظروف لاهوائية ، أن جميع السلالات استخدمت النفط الخام كمصدر الكربون الوحيدة مع إنتاج المواد البيولوجية والغاز البيولوجي كمنتج نهائي. مثل هذه المنتجات كانت مع أداء متزايد ومختلف .في الواقع، تتمتع السلالات التي تمت دراستها في هذا العمل بميزة مزدوجة تتمثل في استخدامها كعوامل معالجة بيولوجية بالإضافة إلى عوامل تشارك في عملية MEOR لاستخلاص النفط .وبالتالي فإن مشاركتهم في الصناعات المختلفة لإنتاج العوامل السطحية الحيوية أمر ممكن.

الكلمات المفتاحية: العوامل السطحية الحيوية، اللاهوائية، الهيدروكربونوكلاست، الغاز الحيوي، الهيدروكربون.

Abstract

The objective of our work is the microbiological characterization (morphological and biochemical) of the 15 anaerobically isolated isolates from a soil polluted by hydrocarbons and the study of their physico-chemical aspect, consisting of the determination of their ability to use crude oil as the only source of carbon and energy through the production of biosurfactants and biogas. The microbiological study revealed discernible diversity between the isolates, with a presumptive identification of *Pseudomonas*, *Aeromona*, *Micrococcus*, and *Alcaligenes*. The physico-chemical aspect of the isolates, followed by MS fermentation, prepared in anaerobic conditions, revealed that all strains used crude oil as the only source of carbon, with the production of biosurfactants and biogas as the final products. Such productions had divergent and distinguishable performances. Indeed, the strains studied in this work have the double advantage of being used as bioremediators as well as agents involved in the MEOR process for oil recovery. Their involvement in the various industries for the production of biosurfactants is thus possible.

Key words : biosurfactants, anaerobiosis, hydrocarbonoclast, biogaz, hydrocarbons

Année universitaire : 2023-2024	Présenté par : BOUDRA Malak MERDJANA Ferial BOUDRAA Malak
Titre : Caractérisation microbiologique des bactéries isolées à partir d'un site pollué par les hydrocarbures	
Mémoire de fin de cycle pour l'obtention de diplôme de Master en Microbiologie Appliquée	
<p>Résumé</p> <p>L'objectif de notre travail est la caractérisation microbiologique (morphologique et biochimique) des 15 isolats isolés en anaérobiose provenant d'un sol pollué par les hydrocarbures, et l'étude de leur aspect physico-chimique consistant à la détermination de leur aptitude à utiliser l'huile brute comme seule source de carbone et d'énergie par la production des biosurfactants et du biogaz. L'étude microbiologique a révélé une diversité discernable entre les isolats avec une identification présomptive de <i>Pseudomonas</i>, <i>Aeromonas</i>, <i>Micrococcus</i> et <i>Alcaligenes</i>. L'aspect physico-chimique des isolats suivi par une fermentation sur milieu MS, préparé dans des conditions d'anaérobiose, a dévoilé que toutes les souches ont utilisé l'huile brute comme seule source de carbone avec production de biosurfactants et du biogaz comme produits finaux. Telles productions étaient avec une performance divergente et distinguable.</p> <p>En effet, les souches étudiées dans ce travail présentent le double avantage d'être utilisées comme des agents bioremediateurs ainsi des agents impliqués dans le processus MEOR pour la récupération du pétrole. Leur implication dans les différentes industries pour la production des biosurfactants est ainsi envisageable.</p> <p>Mots clés : biosurfactants, anaérobiose, hydrocarbonoclaste, biogaz, hydrocarbure.</p>	
Laboratoire de recherche : Centre de Recherche en Biotechnologie (C.R.Bt) , Constantine	
<p>Jury d'évaluation :</p> <p>Président du jury : ALMI HIBA (MCB-UFM, constantine)</p> <p>Rapporteur : AMOKRAN SERINE (MRB, CRBt, Constantine)</p> <p>Co-encadrant ; ABEDELAZIZ Ouided (MCB-UFM, constantine)</p> <p>Examineur : Mme MAGHNOUS OUISSEM (MCB-UFM, constantine)</p>	