

Université Ibn Khaldoun, Tiaret
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de

Master académique

en

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie.
Filière : Sciences Biologiques.
Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Présenté par :

KESSE Tanoa Sephora

Intitulé

Caractérisation microbiologique d'un sol pollué par du pétrole

Soutenu publiquement le

Devant les membres de jury :

Président	Dr. MEZOUAR D.	MCB
Examineur	Dr. MEDJEBER N.	MCB
Encadrant	Dr. AIT ABDERRAHIM L.	MCA
Co-encadrant	Mlle MEKNASSI Khadidja	

Année universitaire 2019-2020

Résumé

Le pétrole et ses dérivés sont en cause dans plusieurs cas de pollution suite à des accidents lors de leur acheminement ou en raison de fuites des réservoirs de stockage. Ces accidents représentent une préoccupation environnementale majeure aussi bien pour la faune et la flore locale que pour la santé humaine.

De nombreuses espèces de micro-organismes sont naturellement présentes dans les sols à l'exception des environnements extrêmes. Dans les sites ayant été régulièrement contaminés par des hydrocarbures la densité microbienne tend à diminuer drastiquement ayant des conséquences directes sur le fonctionnement du sol et ses caractéristiques, et des conséquences indirectes sur la biosphère et l'atmosphère.

A cet effet, nous avons tenté une caractérisation microbiologique de trois échantillons de sols pollués par du pétrole afin de déterminer l'impact de ce polluant sur la microflore du sol. Trois échantillons de sols ont été prélevés du même site à différentes profondeurs (10, 50 et 80 cm) à proximité d'un bac de stockage du pétrole situé à Ain Salah (Wilaya de Tamanrasset).

A l'issue de cette étude, nous avons pu constater une composition et diversité microbienne réduites dans les échantillons de sols analysés reflétant la toxicité du pétrole sur la microflore du sol. En outre, 35 colonies ont pu être isolées à partir de ces échantillons, dont majoritairement des bactéries avec prédominance des cocci à Gram positif. Nous avons également identifié de façon distincte le genre *Alternaria* parmi les moisissures isolées.

Il est important de noter que l'échantillon prélevé en profondeur (80 cm) présentait un nombre et une diversité microbienne élevés par rapport aux échantillons prélevés en surface (10 et 50 cm).

Mots clés : Pollution, pétrole, hydrocarbures, sol, microflore, caractérisation microbiologique

Abstract

Petroleum and its derivatives are involved in several cases of pollution following accidents during their transportation or during frequent leaks from storage tanks. These accidents represent a major environmental concern both for local flora and fauna as well for human health. Many microbial species are naturally present in soils with the exception of extreme environments. However, in soils that have been regularly contaminated with hydrocarbons, the microbial density tends to decrease drastically with direct consequences on soil functioning and its characteristics, and indirect consequences on the biosphere and the atmosphere.

To this end, we attempted a microbiological characterization of three samples of oil-polluted soils in order to determine the impact of this pollutant on soil microflora. Three soil samples were taken from the same site at different depths (10, 50 and 80 cm) near an oil storage tank located in Ain Salah (Province of Tamanrasset).

At the end of this study, we noticed a reduced microbial composition and diversity in the analysed soil samples reflecting the toxicity of petroleum on soil microflora. In addition, 35 colonies were isolated from the samples which were bacteria in their majority with predominance of Gram-positive cocci. We have also identified the genus *Alternaria* among the isolated molds.

It is important to note that the deepest soil sample (taken at 80 cm) had higher microbial number and diversity compared to the other samples taken from the surface (10 and 50 cm).

Key words: Pollution, Petroleum, hydrocarbons, soil, microflora, microbial characterization

Remerciements

La rédaction de ce mémoire n'a pas été le long fleuve tranquille que je m'imaginai qu'il serait, avant d'en avoir entamé le périple.

Mais à chacune des épreuves affrontées et étapes surmontées, la présence de Madame Leïla AÏT ABDERRAHIM fut d'un immense réconfort, de par son soutien moral indéfectible. J'ai appris à ses côtés et de sa personne, le sérieux, la rigueur et la patience exigés dans la pratique des sciences expérimentales, et c'est la raison pour laquelle je tiens à lui exprimer vivement toute ma gratitude au travers de ces quelques mots.

Toute ma reconnaissance est adressée à l'endroit de Mademoiselle MEKNASSI Khadidja, aux côtés de qui j'ai énormément appris durant toute la phase expérimentale de ce travail, et qui est restée attentive et disposée à m'aider dans la résolution de mes préoccupations.

J'aimerais remercier Monsieur Khaled TAÏBI, dont la gentillesse et la disponibilité m'ont profondément marqué durant les trois dernières années de mon cursus, passées en sa présence. Lui qui s'est toujours montré extrêmement serviable, est en grande partie l'une des raisons pour lesquelles ces années en Biologie Moléculaire et Cellulaire, sont aussi et surtout riches en valeurs humaines à mes yeux.

Je remercie les membres du jury Mme MEDJEBER Nacira et Mme MEZOUAR Djamila, qui ont bien voulu accorder du temps, à l'évaluation de ce modeste travail. Je vous saurai gré de bien vouloir le traiter avec indulgence.

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance à l'endroit de Monsieur BOUSSAID Mohamed, ainsi qu'à toute l'équipe de Biologie Moléculaire et Cellulaire pour les efforts considérables et le soin consentis à nous transmettre un savoir de qualité. Participer à chacun de vos cours a été pour moi un réel plaisir et grandement enrichissant intellectuellement.

J'exprime mes sincères remerciements également à l'endroit de Monsieur BENAICHATA, Doyen de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, qui a particulièrement été à l'écoute de mes préoccupations, et qui sans hésitation, a résolu les problèmes que je lui ai posés dans la mesure du possible.

Enfin, je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à vous, mes amis de classe de la promotion 2020 de Biologie Moléculaire et Cellulaire. Je pense en particulier à vous SARA et YOUCEF, les moments de fous rires partagés tous ensemble resteront indéfiniment gravés dans ma mémoire. Puisse le Seigneur vous bénir d'avoir été aussi bon envers moi, je ne doute pas que la vie permettra que de nouveau, nos chemins se croisent.

A vous, les étudiants subsahariens avec qui j'ai construit ma vie sociale en Algérie, à toi JOYCE en particulier, je dis merci du fond du cœur, pour l'amour, la disponibilité, et la solidarité qui ont régnés entre nous durant ces cinq années. Loin de ma famille biologique, vous avez été mon unique réconfort, et je prie que les liens que nous avons tissés ne se défassent jamais.

A mes amis à Abidjan, MARIAM, MALICKA, BARBARA, REGINA, JESSICA MARTHE..., merci de m'avoir constamment soutenu, et encouragé. Votre amitié est inestimable à mes yeux.

Je vous dédie à vous, enfin, la famille KESSE (PAPA, MAMAN, EVE, JUDITH, DANIEL), ce travail. Merci d'avoir continué de me soutenir malgré la distance, par vos appels, vos messages, et surtout vos prières. Chaque jour passé loin de vous n'a été qu'un perpétuel rappel de combien je vous chérie.

A mon fiancé,

Au bon DIEU,

Je vous aime.

Table des matières

Résumé

Abstract

Remerciements

Dédicaces

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Synthèse bibliographique

I. Hydrocarbures 2

1. Définitions 2

2. Propriétés physico-chimiques et utilisations. 3

3. Classification 4

II. Pollution et polluants 4

1. Généralités 4

2. Catégories de polluants 5

2.1. Polluants primaires 5

2.2. Polluants secondaires 5

3. Conséquences de la pollution par les hydrocarbures 5

III. Biodégradation des hydrocarbures 6

1. Généralités 6

2. Mécanismes d'adaptation des micro-organismes 7

3. Transformation 7

a. Minéralisation 8

b. Co-métabolisme 8

c. Polymérisation 8

d. Accumulation cellulaire 8

e. Biodégradation non-enzymatique 8

4. Consortium microbien et biofilms.....	8
IV. Bioremédiation	9
1. Définition et généralités	9
2. Facteurs influençant la bioremédiation	9
3. Avantages et inconvénients de la bioremédiation	10
a. Avantages	10
b. Inconvénients	10
4. Bioremédiateurs	10
4.1. Mécanismes utilisés par les bioremédiateurs	11
a. Biosurfactants	11
b. Enzymes	11
4.2. Amendements organiques	11
4.3. Génie génétique et bioremédiation.....	12

Méthodologie

1. Objectif.....	13
2. Matériels et méthodes.....	13
2.1. Matériel	13
2.1.1. Echantillons de sols étudiés.....	13
2.2. Méthodes	14
2.2.1. Préparation des échantillons et ensemencement	14
2.2.2. Isolement et purification des souches microbiennes	14
a. Observation macroscopique	14
b. Observation microscopique.....	15

Résultats

1. Microorganismes isolés	16
2. Observations microscopiques des microorganismes isolés.....	17

Discussion	19
-------------------------	-----------

Conclusion et perspectives.....	22
--	-----------

Références bibliographiques	23
--	-----------

Liste des figures

Figure 1. Produits issus de la distillation du pétrole en fonction de la température et de la densité.....	3
Figure 2. Echantillons de sols étudiés	13
Figure 3. Types et pourcentages des microorganismes obtenus à partir des 3 échantillons de sols pollués par le pétrole.	16
Figure 4. Types et pourcentages de microorganismes obtenus dans chaque échantillon de sol pollué par le pétrole.....	17

Liste des tableaux

Tableau 1. Récapitulatif du nombre de colonies obtenues par échantillon.	16
Tableau 2. Observations microscopiques des microorganismes isolés à partir des échantillons de sols pollués par le pétrole.....	18

Introduction

Introduction

A de nombreuses reprises au cours de l'histoire, ont été enregistrés des épisodes de pollution à diverses échelles causés par l'exploitation des hydrocarbures pétroliers, aussi bien sur des sites terrestres qu'au niveau d'infrastructures off-shore (Albinet 1963).

Les dérivés intermédiaires de la distillation de ces hydrocarbures sont en cause notamment dans plusieurs cas de pollution suite à des accidents lors de leur acheminement vers des points de vente, ou plus fréquemment des fuites des réservoirs de stockage (Fuentes 2014). Ces accidents représentent une préoccupation environnementale majeure aussi bien pour la faune et la flore locale, que pour la santé humaine.

La pollution du sol par les hydrocarbures modifie la composition, la richesse et la diversité des populations animales, végétales et microbiennes du sol et plus généralement le fonctionnement de l'écosystème. Il a été démontré que la diversité microbienne du sol régresse fortement après un épisode de contamination aux hydrocarbures au profit de la colonisation du milieu par des populations dominantes qui ont réussi à s'adapter en améliorant leur outil enzymatique (Chikere et al. 2011).

De plus, allant en croissant, l'utilisation des hydrocarbures continuera d'élever les risques par leur exploitation sur le plan écologique, économique, politique et sanitaire (Stern 1978). Cette situation concentre grandement l'attention de nombreux scientifiques dans le monde entier qui sont à pied d'œuvre afin de dépolluer efficacement les sites contaminés.

Des techniques physicochimiques sont utilisées afin de remédier à ce problème cependant, elles ne sont pas toujours efficaces. De plus, la toxicité générée surtout par l'utilisation des produits chimiques à mener les chercheurs à se tourner vers d'autres solutions plus efficaces comportant moins d'effets secondaires (Abatenh et al. 2017). De ce fait, la bioremédiation qui est une alternative explorée par ces derniers, consiste à utiliser les organismes vivants pour dépolluer les sols et les eaux contaminés. Elle englobe de nombreuses techniques selon qu'on utilise ou non les plantes, qu'on stimule la croissance des microorganismes en jouant sur leurs facteurs limitants, ou qu'on enrichisse les milieux contaminés par amendements (Mansur et al. 2014).

Dans ce sens, ce travail consiste en une caractérisation microbiologique d'un sol pollué par du pétrole afin de déterminer l'effet de ce polluant sur la microflore du sol. De plus, cette étude constituera une base pour la bioremédiation microbienne des sols pollués par les hydrocarbures pétroliers.

Synthèse bibliographique

Synthèse bibliographique

Vue d'ensemble

En 2008, le volume de la demande mondiale de pétrole était de 85,62 millions de barils par jour (Macaulay et Rees 2014). Cette surconsommation de ce qu'on a appelé l'or noir, entraîne de lourdes conséquences écologiques pour la faune et la flore ainsi qu'un impact sanitaire colossal pour l'homme. A titre d'exemples, dans plusieurs villes d'Allemagne, des puits d'eau potable ont été contaminés par le déversement d'hydrocarbures au cours d'exploitation d'usines ou de plateformes pétrolières pendant la première guerre mondiale ainsi que les bombardements de 1945 (Albinet 1963).

La Lybie, qui possède les plus grands réservoirs de pétrole en Afrique, a connu également des heures sombres lorsque 59 millions de litre de pétrole ont accidentellement été déversés dans le sud-est du pays à Tripolis, contaminant de ce fait 800 km² de terre (Koshlaf 2016).

Plus récemment, The International Tanker Owners Pollution Federation Limited (ITOPF), l'une des bases de données les plus fournies traitants des déversements d'hydrocarbures par les navires pétroliers, dans son rapport de 2019, révèle que l'incident le plus important de l'année a été observé au mois de Mai, en Amérique du Nord. En effet, l'accident résultait d'une collision entre navires, et a causé la contamination d'environ 3 000 km de côtes dans onze États du Brésil par plus de 700 tonnes d'hydrocarbures.

De façon plus générale en 2019, un volume total d'environ 1000 tonnes d'hydrocarbures a été déversé dans l'environnement (ITOPF 2019).

I. Hydrocarbures

1. Définition

On appelle hydrocarbure un composé formé d'hydrogène et de carbone. Généralement, un hydrocarbure est un composé organique hydrocarboné extrait à partir de gisement d'énergies fossiles ou de gaz naturels (c'est le cas notamment du pétrole brut, de l'essence, du kérosène...). Ils peuvent être saturés (contenant des chaînes linéaires, des liaisons covalentes simples et constitués d'atomes de carbones et d'hydrogènes exclusivement), ou insaturés au contraire (présentant des ramifications, des doubles ou triples liaisons, ainsi que pour certains composés, des chaînes cycliques) (GEO 2018).

2. Propriétés physico-chimiques et utilisations

Les hydrocarbures regroupent plusieurs familles de composés dérivés issues des différentes étapes de raffinage du pétrole brut, et sont généralement repartis en hydrocarbures aliphatiques (à chaîne carbonée ouverte ex. les alcanes), en hydrocarbures aliphatiques cycliques (alicycliques) ou cyclanes, ainsi qu'en hydrocarbures aromatiques monocycliques et polycycliques (formée d'au moins un cycle d'atomes de carbone du type de celui du benzène) (Lemière et al. 2001). Si la molécule d'hydrocarbure contient un atome autre que du carbone et de l'hydrogène, on parle d'hydrocarbures substitués et, dans le cas d'un cycle, on parle d'hétérocycle (Cicolella 2008).

Les combustibles et carburants, obtenus à partir de la transformation du pétrole, sont utilisés pour le transport, le chauffage et la production d'énergie. On parle de combustibles liquides tels que les fiouls domestiques et lourds, ainsi que des carburants regroupant les essences et les distillats (gazole et kérosène). Ils sont de différents types de par les constituants de leur mélange, leur chaîne carbonée et leurs caractéristiques physico-chimiques. Mais on peut regrouper ces derniers sous deux grands labels : les carburants lourds, de densité supérieure à 1 (ex. fuels lourds), et les carburants légers, de densité inférieure à 1 (ex. essences et gazoles) (Fig. 1) (Saada et al. 2005 ; Boust et Lebreton 2019).

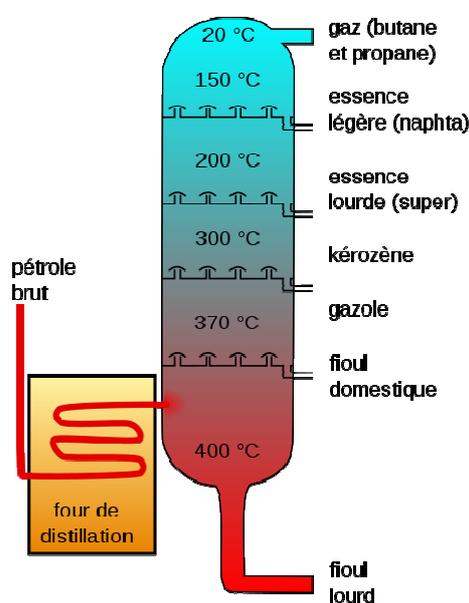


Figure 1. Produits issus de la distillation du pétrole en fonction de la température et de la densité.

3. Classification

Il existe de nombreuses classifications des hydrocarbures selon divers critères considérés, mais également, selon qu'ils résultent de procédés de fabrication propre à une structure particulière ou une autre. Cependant, une classification intéressante des types d'hydrocarbures selon un regroupement analytique (méthodologie d'analyse identique pour tous les produits du groupe considéré), et/ou hydro-chimique (des produits qui se comportent de façon similaire dans les nappes) a été établie par Lemière et son équipe (2001). Il en ressort les différents groupes suivants :

- Les DNALP (Dense Non-Aqueous Phase Liquids) : englobent les produits qui généralement, forment une phase distincte de la phase aqueuse, parce qu'ils sont non miscibles à celle-ci. Selon que la densité est inférieure ou supérieure alors à 1, la phase lipidique peut être au-dessus ou au-dessous de la phase aqueuse.
- Les COV/VOC (Non-Halogenated Volatil Organic Compounds) : désignent les hydrocarbures principalement caractérisés par leur forte volatilité.
- Les SVOC (Semi-Volatil Organic Compounds) : regroupent les composés à volatilité moindre que les COV mais présentent en général les mêmes caractéristiques que ces derniers.
- Les CAV (composés aromatiques volatils) : sont également très voisins des COV de par leurs propriétés physiques, mais diffèrent au plan toxicologique et chimique.
- Les BTEX (Benzène, Toluène, Ethylbenzène, Xylène) : sont des composés CAV usuels tels que le benzène, le toluène, l'éthylbenzène et le xylène.
- Les CFC (Chlorofluorocarbones) : quant à eux regroupent de nombreux composés halogénés dont certains hydrocarbures aliphatiques. Ce sont d'excellents solvants et caloporteurs.

II. Pollution et polluants

1. Généralités

Qu'ils soient émis par l'homme (d'origine anthropique), ou non (d'origine naturelle), les polluants sont en générale, soit de nature physique (les produits de la radioactivité par exemple), chimiques (gaz, aérosols...) ou biologiques (pollen, moisissures toxiques...) (Charpin et al. 2016).

Dadrastia et Agamuthu (2013), dans leur travail sur la biorestauration des sols contaminés par le diesel, ont indiqué que chaque année dans le monde, une estimation de la quantité d'hydrocarbures déversés dans les eaux et les sols, faisait état de chiffres alarmants, à hauteur de 1,7 à 8,8 millions de tonnes.

2. Catégories de polluants

On peut classer les types de polluants en deux principaux groupes : les polluants primaires, et les polluants secondaires (XPair 2020).

2.1. Polluants primaires

Les polluants primaires sont avant tout, des toxiques existants dans l'environnement sous la forme dans laquelle ils ont été émis. Ils comprennent principalement le dioxyde de soufre (SO₂), le dioxyde d'azote (NO₂), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), et les composés organiques volatils (COV) dont ceux labélisés BTEX. Ceux-ci contribuent activement à la formation de pluies acides, au réchauffement de la couche d'ozone, à la recrudescence des cas de cancers ... (Xpair 2020).

La présence dans l'environnement de ces polluants est le résultat des activités humaines avec l'exploitation de combustibles fossiles, de la biomasse, procédés de transformation des COV et de l'agriculture (Chaouki 2016 ; Charpin et al. 2016). Les polluants primaires générés par les HAP, sont la plupart du temps naturels. Ils sont libérés particulièrement en abondance dans l'atmosphère pendant les feux de forêt, qui chaque année, entraînent la pollution de l'air à raison de 2000 tonnes de composés (Chaouki 2016).

Les métaux lourds tels que le Plomb, l'Arsenic, le Cadmium, le nickel ou encore le mercure, sont contenus dans l'essence et donc relâchés dans la fumée des pots d'échappements des véhicules, ou encore par l'activité de l'industrie métallurgiques (Charpin et al. 2016).

2.2. Polluants secondaires

L'existence de polluants secondaires dans l'environnement est due, à l'opposé, à la transformation des polluants primaires en de nouveaux composés (tout aussi dangereux voir plus que leurs prédécesseurs dans certains cas), du fait des interactions avec d'autres molécules du milieu, ou au contraire, dans des processus de déstructurations naturels de ces derniers. Et c'est le cas principalement du gaz ozone (O₃), qui résulte de l'interaction entre le monoxyde de carbone, certains oxydes d'azote et composés organiques volatils, dans des conditions atmosphériques bien précises (Chaouki 2016).

3. Conséquences de la pollution par les hydrocarbures

La pollution des sols par les hydrocarbures pétroliers peut constituer des menaces d'explosions et d'incendies, la perturbation des processus édaphiques et l'infiltration de ces polluants dans les nappes phréatiques (Saada et al. 2005).

A court et à long termes le déversement des hydrocarbures dans les écosystèmes terrestres peut avoir un impact direct ou indirect sur la vie dans ces milieux. De façon directe chez les organismes vivants, on peut assister à des suffocations/asphyxies, une réduction de la mobilité,

des retards de croissance, des déformations reproductives et morphologiques, une réduction importante des interactions sociales et d'importants troubles dermatologiques dans le cas de contact cutané.

Indirectement, on assiste à des intoxications d'espèces de zones non polluées, par ingestion de proies contaminées ultérieurement sur d'autres sites (Macaulay et Rees 2014). L'exposition régulière à ces polluants, pourrait accroître le risque de développer un cancer chez l'homme ainsi que provoquer des altérations graves de son système rénal, cardiaque, dermatologique et gastro-intestinal (Alvim et Pontes 2018).

Au-delà des conséquences qui découlent de la contamination des sols ou fonds marins par le déversement des hydrocarbures dans leur écosystèmes respectifs, l'exploitation des ressources pétrolifères par l'industrie, ainsi que la consommation quotidienne de carburants par les véhicules et autres dispositifs qui en dépendent étroitement, génèrent une grande quantité de pollution par gaz d'échappements contenant de nombreux toxiques (radioéléments, métaux lourds, CO, NOx, COV,...) qui posent d'importants problèmes respiratoires, le réchauffement de la planète, la disparition de certains habitats naturels à équilibre sensible... etc. En outre, on enregistre une explosion d'années en années, des cas d'asthme, de maladies allergiques respiratoires ou cutanées, des pathologies cardio-vasculaires et cardio-pulmonaires. Le taux de mortalité lié aux maladies cardio-pulmonaire a été d'ailleurs en hausse de 9 % en 2016 (Charpin et al. 2016).

III. Biodégradation des hydrocarbures

1. Généralités

Suite à une contamination par les hydrocarbures, les sols et la vie qui y règne seront le théâtre d'une série de réactions qui vont favoriser la dégradation de ces polluants.

La biodégradation des hydrocarbures est régie à plusieurs niveaux, par différents types d'interactions d'une part, entre les polluants et les microorganismes et d'autre part, du fait de la nature du sol, des mouvements physiques ainsi que de la dynamique entre ces microorganismes et leur environnement immédiat.

Dans des conditions normales, c'est-à-dire en l'absence de pollution, les microorganismes du sol sont les principaux acteurs de la métabolisation des composés organiques d'origines végétales ou animales contenus dans celui-ci. En cas de pollution, ces microorganismes sont sollicités pour leurs facultés naturelles, mais très vite, étant donnée la quantité importante de polluants déversée et la vitesse à laquelle la contamination a lieu, ils peuvent se révéler

incapables de travailler dans les conditions nouvelles imposées par cet environnement, et ont donc besoin d'un temps d'adaptation au cours duquel les organismes mutants qui présentent les enzymes nécessaires à leur survie sont sélectionnés (Bidaud 1998 ; Chikere et al. 2011).

2. Mécanismes d'adaptation des micro-organismes

Trois modèles d'adaptation sont couramment admis, et ils sont étroitement liés à la présence ou l'absence chez ces micro-organismes des enzymes adéquates pour faire face au polluant. La présence de ces enzymes est due à deux causes majeures : la sélection environnementale et les mutations spontanées (Bidaud 1998).

- Dans le premier cas, si certains des microorganismes possèdent déjà l'outil enzymatique nécessaire au moment du contact avec le polluant, ils seront sélectionnés de façon naturelle et on assistera à une augmentation du nombre d'individus de leur communauté par consommation de la nouvelle source de carbone.

- Si, au contraire, ils sont dépourvus des enzymes nécessaires mais possèdent quand même la capacité (génétique) de les synthétiser, il leur faudra plus de temps, avant de commencer effectivement à consommer cette nouvelle source de nutriment.

- Dans le dernier cas, par recombinaison génétique, les plasmides qui possèdent le gène qui code pour cette enzyme, seront transmis à leurs congénères. Le gène codant pour cette, fonction peut être porté aussi bien par le chromosome bactérien, plasmide, que les transposons et l'ADN phagique (Bidaud 1998).

De nombreux paramètres qui caractérisent le milieu ainsi que les conditions générales du processus de sélection, vont favoriser ou au contraire, inhiber l'adaptation des micro-organismes (Stauffert et al. 2010). En d'autres termes, si pour une concentration de polluants trop importante, la toxicité due à celle-ci peut empêcher les microorganismes mutants de croître en induisant leur mort, au contraire, à faible concentration, la quantité de nutriment à métaboliser est bien trop insuffisante pour qu'ils puissent se développer ou établir l'adaptation attendue. Aussi, lorsque l'adaptation est due à une concentration importante de polluants, très rapidement cette nouvelle faculté peut être perdue à mesure que la pression exercée sur ces derniers s'amenuise (Bidaud 1998).

3. Transformation

Dans la thèse de Bidaud (1998), cinq facteurs prépondérants ont été identifiés comme étant à la base de la transformation des toxiques. De façon succincte, ce sont : la minéralisation, le co-métabolisme, la polymérisation, l'accumulation et les effets secondaires de l'activité microbienne.

a. Minéralisation

La minéralisation consiste en une consommation du polluant en tant que source de carbone et de nutriments principale, par les microorganismes pour leur croissance. Au cours de leur métabolisme aérobie, ils convertissent les polluants organiques primaires, en d'autres composants inorganiques (dont le dioxyde de carbone principalement), débouchant sur une disparition totale du polluant dans son état initial.

b. Co-métabolisme

De façon aléatoire, les enzymes de faible spécificité des microorganismes, destinées à métaboliser un substrat donné, modifient également d'autres molécules non cibles. Ces composés sont ainsi co-métabolisés et ne sont pas nécessairement utilisés pour la croissance microbienne. Ils n'ont donc en général aucune influence sur elle.

c. Polymérisation

Elle consiste en une association des molécules du polluant aux particules du sol, formant ainsi des complexes qui seront probablement métabolisés ultérieurement par les micro-organismes. Ce type de réactions diminue largement la toxicité des polluants en cause.

d. Accumulation cellulaire

Considérée comme passive ; les cellules microbiennes mortes, possédant des capacités adsorbantes équivalentes ou supérieures à celles des cellules vivantes, se gorgent de polluants sans nécessairement impliquer de biodégradation, et ce parfois de façon irréversible.

e. Biodégradation non-enzymatique

De façon indirecte en causant une alcalinisation ou une acidification du pH de leur milieu, les micro-organismes peuvent entraîner l'hydrolyse des liaisons des hydrocarbures.

4. Consortium microbien et biofilms

Plusieurs études ont prouvé l'efficacité de l'utilisation du consortium pour contrer les limites de l'adaptation des bactéries aux conditions biotiques et abiotiques auxquelles elles étaient soumises, après avoir été transférés d'un milieu *ex-situ* vers un milieu *in-situ*. Et celui-ci, présente l'avantage d'une meilleure adaptabilité vis-à-vis du stress environnemental. De plus, transféré sous forme de biofilm, ce consortium peut survivre plus longtemps et ce, même en situation de carence en nutriments, tout en améliorant la biodégradation par augmentation de la densité microbienne. Il offre également de meilleures chances de survie à des températures élevées, puisque le biofilm est entouré d'une matrice contenant des polymères extracellulaires qui le protège efficacement (Farber et al. 2019).

Dans le même temps, les bactéries elles-mêmes également, développent de nouvelles aptitudes par synthèse d'enzymes de dégradation et de profondes modification physiologiques qui permettent d'assurer leur survie même après agression par usage de détergents (Mariani 2007).

IV. Bioremédiation

1. Définition et généralités

La bioremédiation est une technique qui consiste en l'utilisation de microorganismes et/ou plantes qui vont décontaminer le sol en transformant les produits toxiques de celui-ci en produits non toxiques (Alvim et Pontes 2018).

Abatenh et al. (2017) quant à eux, décrivent la bioremédiation comme un mécanisme de recyclage biologique des déchets réalisé par les microorganismes vivants. Ces derniers transforment les déchets en matières réutilisables et mettent ainsi à disposition des autres organismes, cette nouvelle source de nutriments. Dans ce processus, les enzymes servent de catalyseurs de réactions chimiques au cours desquelles les polluants sont transformés en biomasse de production, ainsi qu'en énergie. La plupart du temps, les organismes vivants utilisés lors de ce processus sont les bactéries, les champignons, les archées ainsi que les plantes. Ils sont communément appelés bioremédiateurs (Abatenh et al. 2017).

2. Facteurs influençant la bioremédiation

L'efficacité du processus de bioremédiation est déterminée par de nombreux facteurs biotiques et abiotiques dont la nature chimique et la concentration du polluant, l'uniformité de la répartition du polluant dans le sol, les caractéristiques physico-chimiques du milieu, et leur disponibilité pour les organismes. Les facteurs biologiques sont grandement déterminants pour l'optimisation des réactions également, à travers les mutations, les interactions intraspécifiques (compétition, prédation, succession), la composition et la taille de la population ainsi que le seuil critique de sa croissance (Abatenh et al. 2017).

Parmi les facteurs abiotiques, certains paramètres environnementaux (température, taux d'oxygène, humidité, pH, ions métalliques, ...) peuvent par une optimisation très précise donner des résultats convaincants. Les nutriments dont principalement le phosphore et l'azote disponibles naturellement en faible quantité, doivent être ajoutés au milieu pour optimiser le rapport bactérien ; améliorant de ce fait l'efficacité de la biodégradation. On note aussi que le salicylate ajouté au milieu peut aider à améliorer les résultats. De plus, les meilleurs résultats de bioremédiations ont été observés en aérobiose (Al-Sayegh et al. 2016).

3. Avantages et inconvénients de la bioremédiation

La bioremédiation présente de nombreux avantages et inconvénients qu'il convient d'énumérer.

a. Avantages

Parmi les avantages de son usage, on peut citer le caractère naturel de ce procédé, dont les produits de traitements (CO₂ et biomasse cellulaire) sont relativement inoffensifs. Il peut se faire *in situ* car n'entraîne pas de perturbations majeures de l'activité normale. Cela permet d'éviter le risque de contamination pendant le transport de la matière à dépolluer d'un endroit à un autre. La rentabilité des coûts est bonne et la technique est simple et non intrusive. De plus, elle est durable et respectueuse de l'environnement et peut être adaptée selon le milieu concerné (Abatenh et al. 2017).

b. Inconvénients

Le fait par contre, que seuls les composés biodégradables soient transformables, est un des inconvénients de la technique. Il est aussi possible que les produits de dégradation dans certains cas soient plus toxiques que les polluants de base. De plus l'ajustement des conditions environnementales et des différents autres facteurs doit être réalisée de façon très précise, au risque d'obtenir des résultats faiblement satisfaisants. L'adaptation de l'échelle de laboratoire à une échelle plus grande est difficilement réalisable. Mais également, c'est un processus lent, nécessitant une expertise rigoureuse (Abatenh et al. 2017).

4. Bioremédiateurs

Il existe au moins 79 genres bactériens qui peuvent utiliser les hydrocarbures comme seule source de carbone et d'énergie, ainsi que 9 genres de cyanobactéries, 103 genres fongiques et 14 genres algaux connus pour dégrader les hydrocarbures. Il a été répertorié dans la bibliographie plus de 175 genres de bactéries capables de se développer en utilisant des hydrocarbures comme seule ou principale source de carbone. De plus, les bactéries sont plus polyvalentes que les champignons ; elles prennent donc une plus grande part lors de la biotransformation des hydrocarbures. Cependant, il n'y a pas d'espèce unique qui dégradera complètement une classe complexe d'hydrocarbures (Al-Sayegh et al. 2016).

Les genres les plus fréquemment décrits dans la littérature comme ayant la capacité de dégrader un large éventail de composés pétroliers sont : *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Alcanivorax*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Actinobacter*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Ralstonia* sp. et *Microbacterium* sp. (Montagnolli et al. 2014 ; Abatenh et al. 2017). Le genre *Aspergillus* (*A. niger*, *A. fumigatus*) ainsi que *Fusarium solani* et *Penicillium funiculosum* sont également des bioremédiateurs de dégradation des hydrocarbures (Abatenh et al. 2017).

4.1. Mécanismes utilisés par les bioremédiateurs

a. Biosurfactants

Les biosurfactants sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile (acides aminés et polysaccharides), et d'une autre hydrophobe (acides gras saturé ou insaturé). Selon la nature biochimique, il existe cinq familles principales de biosurfactants : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les liposaccharides et les lipides neutres (Belmenai et Benhafed 2015).

Présentant les avantages d'être biodégradables (contrairement à leurs homologues synthétiques) et la possibilité d'être utilisés en conditions extrêmes, les biosurfactants sont employés de diverses manières et en particulier dans la biorestauration, pour réduire le rapport volumique de la phase huileuse afin d'en faciliter la dispersion. Ils en accélèrent de ce fait le processus de biodégradation et favorisent une meilleure performance des communautés microbiennes. Une étude a démontré que les biosurfactants extraits à partir de *B. subtilis* améliorent effectivement la biodégradation d'une large variété d'hydrocarbures pétroliers (Montagnolli et al. 2014).

b. Enzymes

Sans aucun doute, les enzymes principales au cœur de la dégradation des hydrocarbures sont majoritairement les oxygénases, puisqu'elles catalysent l'ajout d'oxygène moléculaire au substrat (Fuentes 2014). Elles comprennent les monooxygénases et les dioxygénases, et généralement, sont spécifiques aux milieux aérobies (Martin 2011). En anaérobie par contre l'équivalent des oxygénases sont les hydroxylases, très peu spécifiques. Cependant, d'autres enzymes sont impliquées dans les réactions en jeu lors de la dépollution (Poulicek 1970).

En outre, les microorganismes ne possèdent pas toutes les enzymes et outils nécessaires pour dégrader totalement le pétrole de façon isolée, ils doivent donc la plupart du temps, travailler en consortium.

4.2. Amendements organiques

L'utilisation comme source d'amendement des boues activées et du compost, pourrait avoir un effet inhibiteur sur l'activité enzymatique du sol car ces nouvelles sources de carbone contiennent également de nombreux métaux lourds (Namkoong et al. 2002).

Le type d'amendement organique utilisé peut influencer le taux de biodégradation. En effet, il a été rapporté que lors d'une étude, 85 % du carburant diesel a été dégradé sous compostage thermophile généré par des biodéchets frais mais seulement 35 % de réduction a été enregistré lorsque du compost mature a été utilisé (Macaulay et Rees 2014).

Une étude comparative de l'efficacité des techniques *in-situ* et *ex-situ* révèle un écart vis-à-vis de l'adaptation sur terrain des données obtenues en laboratoire. Ces échecs résulteraient d'une

incapacité à prendre en compte et à comprendre les variables dépendant de l'échelle comme le transport de masse limites, l'hétérogénéité spatiale et les concurrences entre microorganismes. Elle met aussi en lumière l'impact direct de l'apport en oxygène sur la qualité de la dégradation et son rendement (Zytner et al. 2001).

4.3. Génie génétique et bioremédiation

Il a été rapporté le succès de l'utilisation des microbes génétiquement modifiés MGM ; utilisant *Pseudomonas fluorescens* notamment, dans le domaine mais avec l'inconvénient de leur inaptitude à la compétition en raison de la demande énergétique que leur impose leur nouveau matériel génétique recombiné, en plus du danger de la prolifération. Pour remédier à ce problème, certains scientifiques ont alors suggérés d'intégrer à la construction génique un gène suicide afin de maîtriser la croissance des MGM. Cette proposition est controversée car elle entrainerait des conséquences bien plus lourdes encore pour l'environnement dans l'éventualité où ce gène suicide serait diffusé aux populations indigènes non cibles. Avec le cout élevé des travaux et les nombreuses restrictions imposées par les lois, il n'est pas aisé d'utiliser les MGM pour la bioremédiation (Macaulay et Rees [2014](#)).

Méthodologie

Méthodologie

1. Objectif

Cette étude consiste en une caractérisation microbiologique de différents échantillons de sols pollués par du pétrole.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel

2.1.1. Echantillons de sols étudiés

Trois échantillons de sols ont été prélevés de différentes profondeurs (10, 50 et 80 cm) à proximité d'un bac de stockage du pétrole situé dans la région de Ain Salah (wilaya de Tamanrasset) (Fig. 2).



Figure 2. Echantillons de sols étudiés.

Les échantillons de sols, quoique prélevés à partir du même site, présentent des textures et des couleurs relativement différentes en fonction de la profondeur au niveau de laquelle ils ont été prélevés. L'échantillon E1 a été prélevé à une profondeur de 10 cm, il présente une texture composite, en agrégats de taille moyenne et de couleur cuivrée. L'échantillon E2, prélevé à 50 cm de profondeur présente une texture et une couleur semblable à celui-ci. Alors que l'échantillon E3 qui a été prélevé à 80 cm de profondeur présente une texture plus sableuse, homogène et une couleur plus foncée.

2.2. Méthodes

2.2.1. Préparation des échantillons et ensemencement

Des suspensions ont été préparées à partir des échantillons de sols dans de l'eau distillée stérile. Par la suite, des volumes allant de 0.1 à 0.5 ml ont été ensemencés à partir de ces suspensions sur plusieurs milieux de culture à savoir :

- la gélose nutritive : milieu largement utilisé pour la culture des micro-organismes peu exigeants).
- les géloses King A et King B : utilisée pour la caractérisation des *Pseudomonas* par la mise en évidence de la production de pigments spécifiques (fluorescéine (pyoverdine), pyocyanine).
- la gélose Chapman : milieu sélectif pour l'isolement des staphylocoques. Il permet aussi de différencier les espèces fermentant le mannitol de celles qui ne le fermentent pas.
- la gélose MacConkey : milieu d'isolement ordinaire, lactosé et sélectif des bacilles à Gram négatif et entériques non exigeants.
- le milieu Bushnell Haas : utilisé pour son rôle dans l'identification de bactéries hydrocarbonoclastes. Comme il contient tous les éléments nécessaires à la croissance excepté une source de carbone, celui-ci permet le développement des microorganismes en fonction de l'hydrocarbure ajouté à étudier (Obi et al. 2016).

* Une fois les géloses ensemencées, celles-ci sont incubées à 25° C pendant 24 h à 1 semaine en fonction de la croissance microbienne.

2.2.2. Isolement et purification des souches microbiennes

Après l'apparition des colonies sur les géloses, celles-ci sont repiquées sur des milieux de culture neufs cette opération est répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention de cultures microbiennes pures. Après chaque repiquage une observation macroscopique des colonies formées ainsi qu'une observation microscopique des cellules sont effectuées pour vérifier la pureté des cultures microbiennes obtenues.

a. Observation macroscopique

Sur le plan macroscopique, nous nous sommes basés sur les critères suivants pour apprécier les colonies formées :

- La couleur
- La taille (diamètre)
- La forme (ronde, filamenteuse...)
- Les bordures
- L'aspect de la surface (lisse, rugueuse ...)

- L'élévation (colonie bombée, plate, ...)

b. Observation microscopique

L'observation de l'aspect macroscopique des différentes colonies nous permet de distinguer dans un premier temps les bactéries des champignons. Dès lors, cette distinction nous indique la marche à suivre quant au type de coloration adéquat pour une bonne observation microscopique.

Ainsi, pour observer au microscope les champignons, nous avons eu recours à la technique de Drapeau qui permet une observation à l'état frais de chacune de ses composantes.

Pour l'observation des bactéries, nous avons préparé des frottis sur lesquels on a procédé à une coloration simple et une coloration de Gram.

Résultats

Résultats

1. Microorganismes isolés

Le nombre de colonies microbiennes obtenues à partir des trois échantillons de sols étudiés est représenté dans le tableau 1.

Tableau 1. Récapitulatif du nombre de colonies obtenues par échantillon.

Echantillons	Milieux de culture						Total de colonies observées
	Gélose Nutritive	Mac Conkey	Bushnell Haas	MSM	King A	King B	
E1 (10 cm)	6	0	1	0	2	1	10
E2 (50 cm)	2	0	2	0	2	0	6
E3 (80 cm)	9	0	2	3	5	1	19

Les figures 3 et 4 représentent les pourcentages de chaque type de microorganisme obtenu à partir des trois échantillons de sols pollués par le pétrole.

On remarque que les cocci à Gram positif prédominent dans tous les échantillons de sols analysés.

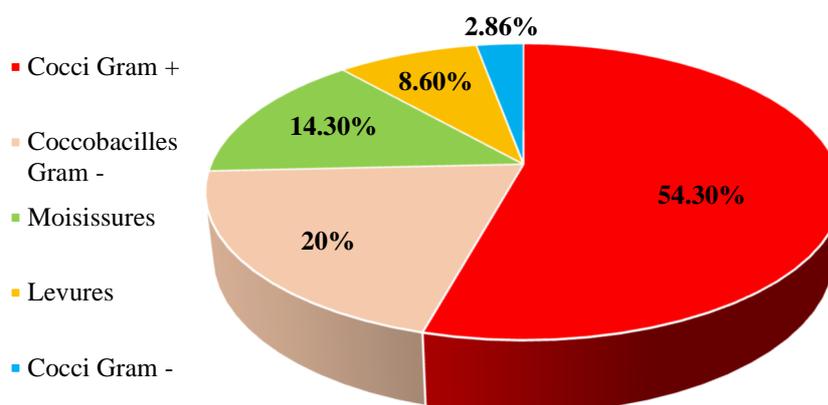


Figure 3. Types et pourcentages des microorganismes obtenus à partir des 3 échantillons de sols pollués par le pétrole.

L'analyse microbiologique de l'échantillon E1 révèle la présence de cocci à Gram positif, de coccobacilles à Gram négatif ainsi que des moisissures. L'échantillon E2 est semblable à E1 excepté l'absence des coccobacilles. Cependant, l'échantillon E3 qui a été prélevé en profondeur (80 cm) par rapport aux autres échantillons a révélé une diversité microbienne plus importante; on note la présence de cocci à Gram positif et négatif, des coccobacilles à Gram négatif ainsi que de moisissures et levures.

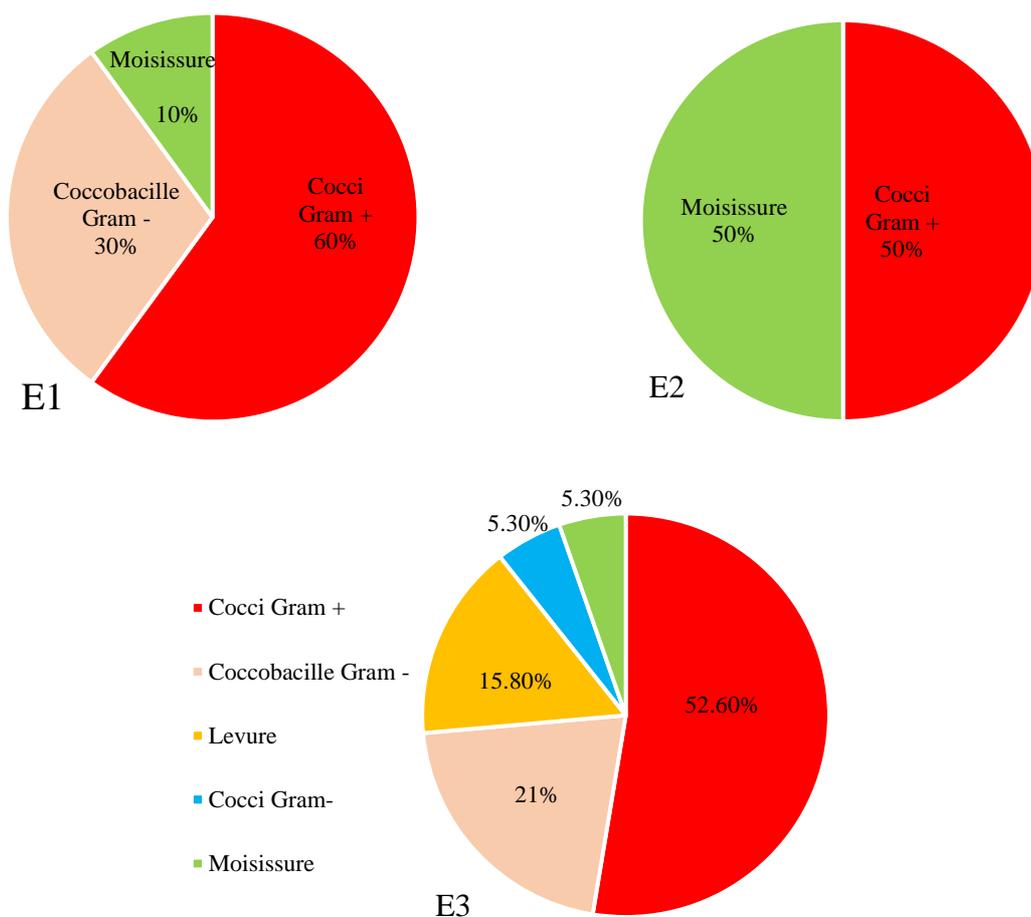


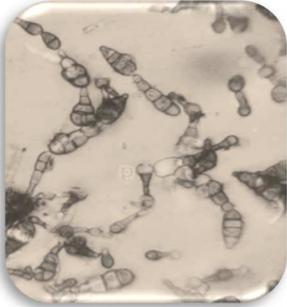
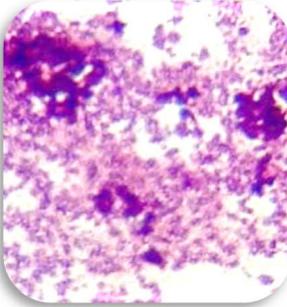
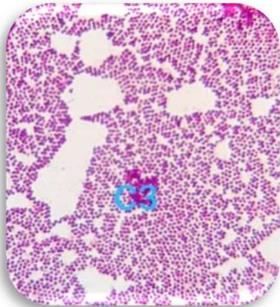
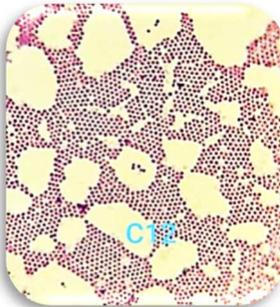
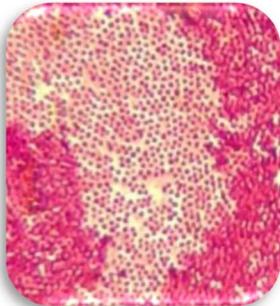
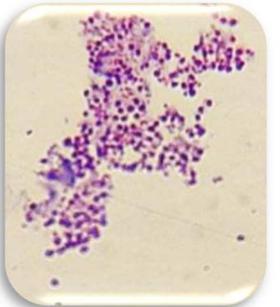
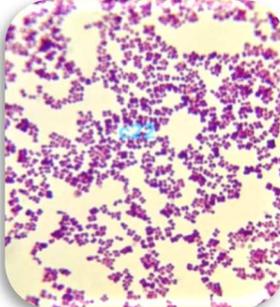
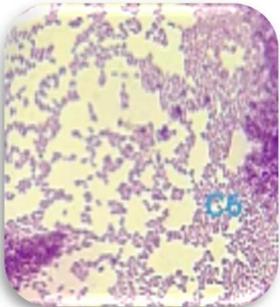
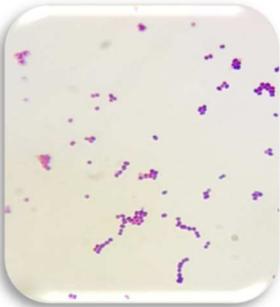
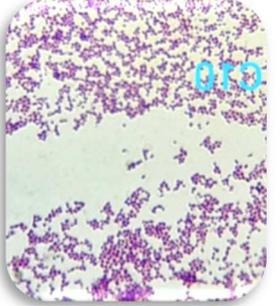
Figure 4. Types et pourcentages de microorganismes obtenus dans chaque échantillon de sol pollué par le pétrole.

2. Observations microscopiques des microorganismes isolés

Le tableau 2 représente les observations microscopiques de quelques microorganismes isolés à partir des échantillons de sols.

On remarque la présence de moisissures du genre *Alternaria* ainsi que de levure dans les échantillons E2 et E3. Cependant, les cocci à Gram positif disposés en amas et en tétrades prédominent dans les trois échantillons.

Tableau 2. Observations microscopiques des microorganismes isolés à partir des échantillons de sols pollués par le pétrole.

<p>Champignons</p>	 <p>Moisissure du genre <i>Alternaria</i> (E2, E3)</p>	 <p>Levure (E2)</p>	
<p>Bactéries</p>	<p>E1</p>  <p>Cocci à Gram + en amas</p>  <p>Cocci à Gram + en amas</p>  <p>Cocci à Gram – en amas</p>	<p>E2</p>  <p>Cocci à Gram + en amas</p>  <p>Cocci à Gram + en tétrades</p>  <p>Cocci à Gram + en amas</p>	<p>E3</p>  <p>Cocci à Gram+</p>  <p>Cocci à Gram + en chaîne</p>  <p>Cocci à Gram + en chaîne</p>

Discussion

Discussion

Grâce à la riche documentation qui a déjà abordé la question sous de nombreux angles, on sait maintenant qu'il existe deux types de pollution : ponctuelle et diffuse. Lorsque le premier type fait référence à des accidents isolés ou à la contamination des périphéries de zones industrielles. Le second désigne plutôt l'accumulation de polluants sur le long terme au niveau de vastes écosystèmes (Roger et Jacq 2000). Qu'il s'agisse du premier ou du second contexte, la pollution par les hydrocarbures reste une préoccupation sanitaire qui nécessite une attention scientifique particulière.

L'émission du pétrole et ses dérivés dans l'environnement conduit à une pollution de l'air, du sol, de la nappe phréatique et surtout à une contamination de la chaîne alimentaire. De plus, les hydrocarbures pétroliers sont des polluants toxiques dont la majorité de leurs composés sont considérés comme cancérigènes et mutagènes pour l'homme (Kaboré-Ouédrago et al. 2010).

L'impact de la pollution par le pétrole et ses dérivés sur l'environnement et les organismes vivants dépend de leurs compositions et de leurs concentrations (Sakineh et al. 2012).

Cette étude a consisté en une analyse microbiologique de trois échantillons de sols pollués prélevés à différentes profondeurs (10, 50 et 80 cm) à proximité d'un bac de stockage du pétrole.

Les résultats obtenus ont révélé la présence des microorganismes avec prédominance des bactéries par rapport aux champignons. Ce résultat peut être expliqué par le fait que les bactéries sont des organismes bien plus polyvalents et ont un champ d'action plus large et restent ainsi qualitativement et quantitativement prépondérantes pour métaboliser divers substrats, même si les champignons grâce à leurs hyphes, arrivent à fixer efficacement des quantités importantes de polluants (Chikere et al. 2011).

En outre, le sol, constitué d'une fraction organique et d'une fraction minérale, est le milieu naturel de nombreux microorganismes tels que bactéries, champignons, microalgues, protozoaires... Cette diversité microbienne est un important indicateur de fertilité et de qualité des sols. Ainsi en général, les champignons dans le sol sont responsables de la décomposition des matières organiques contenant notamment de la lignine (Bidaud 1998). C'est le cas des basidiomycètes saprophytes, auxquels appartient le genre *Alternaria* isolé à partir de nos échantillons.

Aussi, de nombreuses bactéries qui appartiennent à la microflore naturelle du sol, occupent une fonction essentielle. Les bactéries hétérotrophes contribuent par leur métabolisme à la dégradation de la matière organique du sol (Bouderhem 2011). Elles utilisent une grande variété de substrats (acides aminés, huiles, acides humiques...), les métabolites sont ensuite libérés sous des formes aisément utilisables par les végétaux. Elles peuvent également, en présence des substrats libérés par les plantes, améliorer leurs performances de biodégradation. En raison de leur métabolisme plus diversifié, les bactéries sont donc naturellement, le genre qui prédomine en milieu édaphique (Martin 2011).

De plus, la présence et l'abondance des microorganismes dans les milieux pollués peuvent s'expliquer par les ressemblances structurales qui prévalent entre les xénobiotiques et les molécules complexes existants dans le vivant, dont spécifiquement la lignine (Poulicek 1970). Chez les bactéries, lors d'un premier contact avec les xénobiotiques, celles-ci ont besoin d'un temps d'adaptation (se traduisant par une phase de latence) afin d'utiliser ces nouvelles molécules comme source de nutriment. La phase de latence est généralement variable en fonction de la complexité de la molécule, l'efficacité enzymatique et la distribution de la molécule au sein de la communauté microbienne concernée et la biodisponibilité du polluant ainsi que sa concentration dans le milieu (Ckikere et al. 2011). La biodégradation des hydrocarbures pétroliers est assurée par un système enzymatique spécifique, l'attaque intracellulaire initiale est un processus oxydatif dont l'activation et l'incorporation de l'oxygène est la réaction enzymatique clé catalysée par les oxygénases et les peroxydases (Das et Chandran 2010).

La biodégradation des hydrocarbures par les bactéries est induite par contact entre la cellule et le polluant. Cette accessibilité est favorisée par chimiotactisme et signalisation moléculaire (Martin 2011). Cette dégradation suit deux voies principales ; centrale (avec production d'un intermédiaire pris en charge dans le cycle de Krebs), et périphérique (induit la dégradation totale du composé en oxygène et dioxyde de carbone).

En outre, si on admet que l'échantillon de sol prélevé à 80 cm de profondeur a été exposé à de faibles quantités de pétrole, cela justifierait la diversité microbienne que nous y avons mis en évidence. En effet, la concentration des polluants en faible quantité en profondeur (qui résulte d'une infiltration très lente des polluants dans le sol) peut expliquer la diversité microbienne n'étant probablement pas exposée à une forte toxicité (Saada et al. 2005). D'autre part, les microorganismes vivant en anaérobiose ne dégradent jamais totalement seuls un composé, ils nécessitent toujours l'action de plusieurs autres souches (Martin 2011) d'où probablement, l'importance du nombre et diversité de microorganismes isolés au niveau de la

couche la plus profonde (E3). De même, La faible biodisponibilité du polluant à ces profondeurs ainsi que le manque d'oxygène ont pu avoir pour effet de rendre bien plus lente la biodégradation de ce dernier et nécessiter l'action conjuguée de plusieurs communautés différentes comme le suggère l'étude de Martin (2011).

Dans la plupart des études menées par Chikere et al. (2011), il est démontré que la diversité microbienne du sol régresse fortement après un épisode de contamination par des hydrocarbures, au profit de la colonisation du milieu par des populations dominantes ; qui ont réussi à s'adapter en améliorant leur outil enzymatique. De nombreux travaux, dont celui de Margesin et al. (2007) ont montrés une prédominance de certaines populations microbiennes utilisant les hydrocarbures comme substrat après un contact prolongé avec eux. Ceci peut expliquer la prédominance des cocci à Gram positif dans les échantillons prélevés en surface (E1 et E2). La présence des moisissures peut soit indiquer qu'elles ont la capacité d'utiliser le polluant, soit être due au fait que ces dernières forment des spores qui peuvent être facilement véhiculées par l'air et être déposées sur le sol.

Les résultats obtenus dans notre étude concordent avec ceux de Ghanem et al. (2016) qui ont également isolés des champignons, dont le genre *Alternaria*, dont ils ont démontré les capacités effectives de biodégradation des hydrocarbures. Chez les champignons lignolytiques dont le genre *Alternaria*, lors de la dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques, par exemple ; on assiste à l'excrétion de 3 types d'enzymes : les lignines-, manganèse-, et phénol-oxydases. En plus de ces dernières, une enzyme produisant de la peroxydase est synthétisée. Ces enzymes ont une action sur la lignine, mais peuvent hydrolyser aussi les hydrocarbures puisqu'elles ont une faible spécificité ; par le phénomène de cométabolisme. A l'issue de la réaction, des quinones (métabolites intermédiaires) sont produits et mis à disposition des bactéries aérobies.

Enfin, dans la plupart des travaux antérieurs sur le sujet, de nombreuses bactéries à Gram négatif et positif et de formes diverses ont été mises en évidence dans des sols pollués par les hydrocarbures, on cite les genres ; *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Corynebacterium*, *Arhrobacter*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Rhodococcus*, *Bacillus* et *Sphingomonas* (Montagnolli et al. 2014). De même, plusieurs genres et espèces fongiques ont été caractérisés par leur capacité à se propager dans les sols, grâce à leur mycélium, et à produire des enzymes extracellulaires permettant l'utilisation des hydrocarbures, on cite ; *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Rhizopus* sp., *Alternaria* et *Penicillium* sp. (Kurnaz et Büyükgüngör 2016).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Si l'intensification des activités humaines et le consumérisme de notre civilisation moderne, sans cesse croissants, ont grandement contribué à l'essor de l'industrie pétrolière, il s'avère que la surconsommation d'hydrocarbures qu'ils ont engendrée a été une catastrophe aussi bien pour l'homme que pour l'écosystème dont il fait partie.

C'est d'ailleurs dû par le désir d'atténuer les conséquences néfastes de la pollution causée par les hydrocarbures que nous nous sommes intéressés à la problématique des sols contaminés aux hydrocarbures.

Au cours de notre étude, nous avons tenté d'observer l'impact du déversement du pétrole ou de ses dérivés sur la microflore du sol. Ceci à travers une analyse microbiologique de trois échantillons prélevés, à proximité de bacs de stockage du pétrole, à différentes profondeurs du même site (Ain Salah, wilaya de Tamanrasset).

Nous avons au total pu isoler 35 colonies à partir des 3 échantillons de sols dont majoritairement des bactéries, avec prédominance des cocci à Gram positif. Nous avons également identifié de façon distincte le genre *Alternaria* parmi les moisissures isolées.

A travers ce travail, nous avons pu constater une composition et diversité microbienne réduites dans les sols analysés reflétant l'effet toxique du pétrole sur la microflore du sol.

Même si écourté par le temps (dans le contexte de crise sanitaire mondiale, COVID-19, qui a prévalu durant l'étude), nous n'avons pas totalement été en mesure d'achever ce travail, il n'en demeure pas moins intéressant d'y envisager à l'avenir de nombreuses applications notamment en bioremédiation.

Ce travail peut être amélioré sous divers aspects :

- Une purification suivie d'une batterie de tests microbiologiques (pour l'évaluation de la production de biosurfactants par exemple),
- Une étude approfondie portant sur la synthèse des enzymes induite en fonction du type d'hydrocarbure.
- Une approche métagénomique par séquençage direct de l'ADN des différentes souches, en vue d'une caractérisation moléculaire.
- Une évaluation du potentiel de dégradation d'hydrocarbure de chaque souche isolée, puis en synergie.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Abatenh, E., Birhanu, G., Zerihun, T., Misganaw, W., 2017. Application of microorganisms in bioremediation-review. *Journal of Environmental Microbiology*, 1, 2–9.
2. Albinet, 1963. La pollution des eaux souterraines. Etude documentaire (No. DS.63.A127). Bureau de recherches géologiques et minières, Paris, France.
3. Al-Sayegh, A., Al-Wahaibi, Y., Joshi, S., Al-Bahry, S., Elshafie, A., Al-Bemani, A., Al-Wahaibi, Y., 2016. Bioremediation of heavy crude oil contamination: An overview. *The Open Biotechnology Journal*, 10, 301–311.
4. Alvim, G.M, Pontes, P.P., 2018. Aeration and sawdust application effects as structural material in the bioremediation of clayey acid soils contaminated with diesel oil. *International Soil and Water Conservation Research*, 6(3), 253-260.
5. 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.
6. Bidaud, C., 1998. Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Approche microbiologique et application au traitement d'un sol pollué. Thèse de Doctorat. Institut National polytechnique des mines de Saint-Etienne de Grenoble, France.
7. Boudherhem, A., 2011. Utilisation des souches bactériennes telluriques autochtones dans la biodétection et la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures. Mémoire de Magister. Département des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Kasdi Merbah-Ouragla, Algérie.
8. Boust, C., Lebreton, R., 2019. Combustibles et carburants pétroliers. Aide-mémoire technique. 2^{ème} édition. Edition Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) ED 989. Paris, France.
9. Chaouki, M., 2016. Cours sur la pollution (Air, Eau, Sol). Génie des procédés. 3^{ème} année licence. Faculté des sciences appliquées. Université Kasdi Merbah. Ouargla. Algérie.
10. Charpin, D., Pairon, J.C., Annesi-Maesano, I., Caillaud, D., de Blay, F., Dixsaut, G.,

- Housset, B., Meurice, J.C., Roussel, I., Zmirou, D., Delaval, P., Dalphin, J.C., 2016. La pollution atmosphérique et ses effets sur la santé respiratoire. Document d'experts du groupe pathologies pulmonaires professionnelles environnementales et iatrogéniques (PAPPEI) de la Société de pneumologie de langue française (SPLF). *Revue des maladies respiratoires*, 33, 484—508.
11. Chikere, C.B., Okpokwasili, G.C., Chikere, B.O., 2011. Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. *3 Biotech*, 1(3), 117–138.
 12. Cicolella, A., 2008. Les composés organiques volatils (COV) : définition, classification et propriétés. *Revue des Maladies Respiratoires*, 25(2), 155-163.
 13. Dadrasnia, A., Agamuthu, P. 2013. Bioavailability and bioremediation of diesel fuel-contaminated soil using organic wastes as supplement. *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience*, 19(10), 2935-2938.
 14. Das, N., Chandran P. 2010. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnology Research International*, 2011, <https://doi.org/10.4061/2011/941810>.
 15. Farber, R., Rosenberg, A., Rozenfeld, S., Benet, G., Cahan, R., 2019. Bioremediation of Artificial Diesel-Contaminated Soil Using Bacterial Consortium Immobilized to Plasma-Pretreated Wood Waste. *Microorganisms*, 7(11), 497.
 16. Fuentes, S., Méndez, V., Aguila, P., Seeger, M., 2014. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 4781–4794.
 17. GEO, 2018. Hydrocarbure : définition, classification et utilisation. <https://www.geo.fr/environnement/hydrocarbure-definition-classification-et-utilisation-193625>. Accédé en Juin 2020.
 18. Ghanem, K.M., Al-Garni, S.M., Al-Zahrani, M.A., 2016. Bioremediation of diesel fuel by fungal consortium using statistical experimental designs. *Polish Journal of Environmental Studies*, 25(1). DOI: 10.15244/pjoes/42493.
 19. ITOPF, 2019. Oil Tanker Spill Statistics 2019. <https://www.itopf.org/knowledge-resources/data-statistics/statistics/>. Accessed on June 2020.
 20. Kaboré-Ouédraogo, P.W., Savadogo, P.W., Ouattara, C.A.T., Savadogo, A., Traoré J, A.S., 2010. Etude de la bio-depollution de soles contaminé s par les hydrocarbures au Burkina

- Faso. Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie 30, 19-28.
21. Koshlaf, E., Shahsavari, E., Aburto-Medina, A., Taha, M., Haleyr, N., Makadia, T.H., Morrison, P.D., Ball, A.S., 2016. Bioremediation potential of diesel-contaminated Libyan soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 133:297-305.
 22. Kurnaz, S.Ü., Büyükgüngör, H., 2016. Bioremediation of total petroleum hydrocarbons in crude oil contaminated soils obtained from southeast Anatoli. *Acta Biologica Turcica*, 29, 57–60.
 23. Lemièrre, B., Seguin, J.J., Le Guern, C., Guyonnet, D., Baranger, P., Darmendrail, D., Conil, P., 2001. Guide sur le comportement des polluants dans les sols et les nappes. Applications dans un contexte d'évaluation détaillée des risques pour les ressources en eau. BRGM, France.
 24. Macaulay, B.M., Rees, D., 2014. Bioremediation of oil spills: a review of challenges for research advancement. *Annals of Environmental Science*, 8, 9–37.
 25. Mansur, A.A., Adetutu, E.M., Kadali, K.K., Morrison, P.D., Nurulita Y., Ball, A.S., 2014. Assessing the hydrocarbon degrading potential of indigenous bacteria isolated from crude oil tank bottom sludge and hydrocarbon-contaminated soil of Azzawiya oil refinery, Libya. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 10725–10735.
 26. Margesin, R., Hämmerle, M., Tschërko, D., 2007. Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time. *Microbial Ecology*, 53, 259–269.
 27. Mariani, C., 2007. Ecologie microbienne des biofilms présents à la surface des planches d'affinage en bois de l'AOC "Reblochon de Savoie" et effet inhibiteur vis à vis de *Listeria monocytogenes*. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires, Paris, France.
 28. Martin, F., 2011. Exploration de la biodiversité bactérienne dans un sol pollué par les hydrocarbures : analyse par marquage isotopique du potentiel métabolique et de la dynamique des communautés impliquées dans la dégradation. Thèse de Doctorat. Université de Grenoble, France.
 29. Montagnolli, R.N., Lopes, P.R.M., Bidoia, E.D., 2014. Assessing *Bacillus subtilis* biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187, 4116.

30. Namkoong, W., Hwang, E.Y., Park, J.S., Choic, J.Y., 2002. Bioremediation of diesel contaminated soil with composting. *Environmental Pollution*, 119(1),23–31.
31. Obi, L.U., Atagana, H.I., Adeleke R.A. 2016. Isolation and characterisation of crude oil sludge degrading bacteria. *Springer Plus* 5, 1946.
32. Poulicek, M., 1970. Biodegradation des molecules organiques naturelles et artificielles en milieu marin. Notes de Cours. Université de Liege, Belgique.
33. Roger, P., Jacq, V., 2000. Introduction à la bioremédiation des sols, des eaux et de l'air. Laboratoire de microbiologie IRD. Université de Provence Aix-Marseille 1, France.
34. Saada, A., Nowak, C., Coquereau, N., 2005. Etat de connaissances de l'atténuation naturelle des hydrocarbures. BRGM\RP-53739-FR. 107p.
35. Sakineh., L., Gunale, V.R., Rajurkar, N.S., 2012. Assessment of petroleum hydrocarbon degradation from soil and tarball by fungi. *Bioscience Discovery*, 2, 186–192.
36. Stauffert, M., Cravo-Laureau, C., Jézéquel, R., Goñi-Urriza, M., 2010. Dégradation d'hydrocarbures dans les vasières (DHYVA) : Rôle des mécanismes bactériens et effet de la bioturbation dans la biodisponibilité des polluants organiques. Université de Pau et des Pays de l'Adour.
37. Stern, B., 1978. A propos de l'accident d'Ekofisk Problèmes posés par la pollution provoquée par les installations de production pétrolière off-shore. *Annuaire français de droit international*, 24, 772–791.
38. XPair, 2020. La filtration de l'air. https://conseils.xpair.com/consulter_savoir_faire/filtrationair/differents_types_polluants.htm. Accédé en Juin 2020.
39. Zytner, R.G., Leunissen, M., Brook, T.R., 2011. Bioremediation of diesel fuel contaminated soil. *Canadian Journal of Civil Engineering*, 28(1), 131-140.