

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 :

BELAID Nour El Houda  
BELHADJ Rezika  
KHODJET KESBA Sara Hanane

Intitulé

### **Isolement et caractérisation des microorganismes contenus dans le pétrole**

Soutenu publiquement le

Devant les membres de jury :

Président	M. SASSI M.	Professeur
Examineur	Mme MEZOUAR D.	MCB
Encadrant	Mme AIT ABDERRAHIM L.	MCA
Co-encadrant	Mlle MEKNASSI Khadidja	

Année universitaire 2019-2020

## Remerciement

Nous remercions Dieu le tout puissant qui a permis la réalisation de ce modeste travail.

A l'issue de la rédaction de ce mémoire, nous sommes convaincues que le travail de mémoire universitaire est loin d'être un travail solitaire. C'est avec très grand plaisir qu'on souhaite remercier toutes les personnes qui ont participé à ce travail.

Nous tenons particulièrement à remercier vivement nos encadrantes ; Mme AÏT ABDERRAHIM L. et Mlle MEKNASSI K. pour leur gentillesse, patience, soutien et leur disponibilité qui nous ont permis d'apprendre et de découvrir énormément d'informations du point de vue scientifique ou technique ; nous les remercions aussi pour nous avoir transmis le goût pour la recherche.

Merci.

On tient à remercier infiniment M. TAIBI K, responsable du Master Biologie Moléculaire et Cellulaire

Nos vifs remerciements s'adressent aux membres du jury M. SASSI M. et Mme MEZOUAR D.. qui ont bien voulu accorder du temps à l'évaluation de ce modeste travail.

Nous tenons à remercier Dr. AIT ABDERRAHIM N. ainsi que Mme HAOULI D. travaillant à SONATRACH de la région d'Arzew (Oran), pour leur aide et pour avoir accepté de nous fournir les échantillons.

Nos remerciements sont adressés également à Tous les étudiants de la promotion Master 2 Biologie Moléculaire et Cellulaire 2019- 2020.

## Dédicaces

J'ai l'honneur de dédier ce travail ;

A mon papa quia toujours cru en moi, qui a veillé à ce que nous ne manquions de rien, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort, que Dieu le garde pour nous

A ma Maman qui a été présente quand j'en avais besoin, ses encouragements, sa patience, son attention et ses sacrifices juste pour que je consacre tout mon temps rien que pour mes études, que Dieu la protège.

A mes grands parents

A mes tantes

A mes cousins et cousines

A mes très chères amies Yasmine et Soumia avec qui je partage ma petite vie de tous les jours et qui m'ont soutenue moralement pendant toute cette période de préparation.

A mes camarades de promotion

Une mention particulière va à notre cher et regretté enseignant et doyen Dr. BENAICHATTA Lazrag qui nous a quitté prématurément, prions Dieu l'omnipotent qu'il l'accueille en son vaste paradis.

*Nour.*

## Dédicaces

Pour ma maman Amina et mon père Mouhamed qui ont toujours été à mes côtés.

Pour la famille Khodjet à sa tête ma grand-mère Leila.

Pour mes tantes et oncles en particulier Abdelkader qui est un ami plus qu'un  
oncle.

Pour ma famille universitaire, Dr Khaled Taibi, Mme Ait Abderrahim Leila, tous  
mes collègues

Mes deux sœurs Kenza et Khadidja

Notre chère amie Séphora.

*Sara.*

## Dédicaces

Avant tout je remercie ALLAH pour tout.

Je dédie ce modeste travail

A la personne la plus précieuse et la plus chère à mon cœur, ma chère maman,  
qui m'a toujours soutenu et encouragé tout au long de mon parcours depuis mon  
enfance.

Puisse dieu, le très haut, t'accorder santé, bonheur et longue vie.

A mes charmantes sœurs et mes adorables frères, je vous remercie d'être toujours  
à mes côtés, de me soutenir, aimer, protéger et pour tous ce que vous avez fait  
pour moi.

A toute la famille BELHADJ et BENHENNI.

A tous mes amis que j'ai connus jusqu'à maintenant.

A tous mes enseignants(e) et toute la promotion de Master 2 Biologie Moléculaire  
et Cellulaire 2019/2020.

A tous ceux qui me connaissent de près ou de loin.

*Rezika*

## Résumé

La pollution de l'environnement par les hydrocarbures pétroliers constitue une menace importante à cause de leurs propriétés toxiques et cancérigènes. Leur déversement dans l'environnement peut être d'origine naturelle ou anthropique, volontaire ou accidentel engendrant de graves dégâts sur les écosystèmes mais aussi sur la santé humaine.

Cependant, malgré leur toxicité, certains organismes vivants plus particulièrement les microorganismes ont pu développer des aptitudes à survivre sur certains polluants.

Dans cette étude, nous avons tenté une caractérisation microbiologique de trois échantillons d'hydrocarbures pétroliers à savoir le pétrole brut, le condensat et le slop afin de déterminer si des microorganismes pouvaient se développer sur ce genre de substances connues pour être toxiques. A l'issue de cette étude, 17 colonies microbiennes ont pu être isolées à partir des trois échantillons d'hydrocarbures pétroliers, dont majoritairement des bactéries sous formes de cocci à Gram positif mais aussi des moisissures.

On en conclut que malgré la toxicité rapportée des hydrocarbures pétroliers, divers microorganismes arrivent à survivre dans ce milieu hostile en l'utilisant comme source de nutriments ou simplement y demeurant sous une forme en dormance.

**Mots clés :** Pétrole, hydrocarbures pétroliers, pollution, biodégradation, microorganismes hydrocarbonoclastes

## Abstract

Environmental pollution by petroleum hydrocarbons is a major threat to all environmental ecosystems and human health because of their toxic and carcinogenic properties. Their release into the environment can be of a natural or an anthropogenic origin voluntary or accidental.

However, despite their toxicity, certain living organisms, particularly microorganisms, have been able to develop the ability to survive on certain pollutants.

In this study, we attempted a microbiological characterization of three petroleum hydrocarbon samples namely crude oil, condensate and slop to determine if microorganisms could grow on these kinds of substances known to be toxic.

At the end of this study, 17 microbial colonies could be isolated from the three samples, mostly bacteria in the form of Gram-positive cocci but also molds.

We conclude that despite the reported toxicity of petroleum hydrocarbons, various microorganisms manage to survive in this hostile environment by using it as a source of nutrients or simply remaining there in a dormant form.

**Keywords** : Petroleum, petroleum hydrocarbons, pollution, biodegradation, hydrocarbonoclastic microorganisms.

## ملخص

يشكل تلوث البيئة بالهيدروكربونات البترولية تهديداً كبيراً بسبب خصائصها السامة والمسرطنة. يمكن أن يكون إطلاقها في البيئة طبيعياً أو من صنع الإنسان، متعمداً أو عرضياً، مما يتسبب في أضرار جسيمة للنظم البيئية وكذلك لصحة الإنسان. ومع ذلك، على الرغم من سميتها، فقد تمكنت بعض الكائنات الحية، وخاصة الكائنات الحية الدقيقة، من تطوير القدرة على البقاء على قيد الحياة على ملوثات معينة.

في هذه الدراسة، حاولنا التوصيف الميكروبيولوجي لثلاث عينات من الهيدروكربونات البترولية المتمثلة في النفط الخام والمكثف والرواسب الموجودة في قاع صهاريج تخزين النفط، لتحديد ما إذا كانت الكائنات الحية الدقيقة يمكن أن تنمو على هذه الأنواع من المواد المعروفة بأنها سامة.

في نهاية هذه الدراسة تم عزل 17 مستعمرة ميكروبية من عينات الهيدروكربونات البترولية الثلاث، معظمها بكتريا على شكل مكورات موجبة الجرام وكذلك فطريات.

نستنتج، أنه على الرغم من سمية الهيدروكربونات البترولية، فإن العديد من الكائنات الحية الدقيقة تمكنت من البقاء على قيد الحياة في هذه البيئة المعادية من خلال استخدامها كمصدر للعناصر الغذائية أو ببساطة البقاء هناك في شكل نائم.

كلمات مفتاحية البترول ، الهيدروكربونات البترولية ، التلوث ، التحلل البيولوجي ، الكائنات الدقيقة الهيدروكربونية.

# Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Résumé

Abstract

ملخص

## Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

**Introduction.....1**

## Synthèse bibliographique

<b>I. Hydrocarbures pétroliers.....</b>	<b>2</b>
I. 1. Généralités.....	2
I. 1.1. Pétrole.....	2
I. 1.2. Hydrocarbures .....	2
I. 2. Classification des hydrocarbures pétroliers.....	2
I. 2.1. Hydrocarbures aliphatiques.....	3
a. Alcanes (hydrocarbures saturés).....	3
- Alcanes linéaires (n-alcanes).....	3
- Alcanes ramifiés (isoparaffines).....	3
- Cycloalcanes (naphtènes).....	3
b. Alcènes (oléfines).....	4
c. Alcynes (acétylènes).....	4
I. 2.2. Hydrocarbures aromatiques.....	4
I. 3. Utilisations .....	4
<b>II. Pollution par les hydrocarbures pétroliers (HCP).....</b>	<b>5</b>
II. 1. Généralités .....	5
II. 2. Sources de pollution par HCP.....	5
II. 3. Devenir naturel des HCP.....	5
II. 3.1. Transformation abiotique .....	6

a.	Evaporation.....	6
b.	Solubilisation .....	6
c.	Emulsification .....	6
d.	Sédimentation.....	7
e.	Photo-oxydation ou oxydation photochimique.....	7
f.	Sorption (adsorption).....	7
II.	3.2. Transformation biotique (Biodégradation) .....	7
II.	4. Effets écotoxicologiques des hydrocarbures.....	7
II.	4.1. Effets sur la santé.....	7
II.	4.2. Effets sur le végétal.....	8
II.	4.3. Effets sur le sol.....	8
	- Effets sur les propriétés physiques.....	8
	- Effets sur les propriétés chimiques.....	8
	- Effets sur les propriétés biologiques.....	8
<b>III.</b>	<b>Dépollution.....</b>	<b>9</b>
III.	1. Méthodes de dépollution.....	9
III.	1.1. Traitements physiques.....	9
III.	1.2. Traitements thermiques.....	9
III.	1.3. Traitements chimiques.....	9
III.	1.4. Techniques biologiques (bioremédiation).....	9
III.	1.4.1. Principe de la bioremédiation .....	9
III.	1.4.2. Bioremédiation par les microorganismes.....	10
III.	1.4.3. Les microorganismes aptes à dégrader HCP.....	10
III.	2. Facteurs influençant la biodégradation .....	11
III.	2.1. Composition chimique .....	11
III.	2.2. Température .....	12
III.	2.3. Oxygène .....	12
III.	2.4. pH .....	12
III.	2.5. Biodisponibilité .....	12
III.	2.6. Nutriments inorganiques .....	12
III.	2.7. Salinité.....	13
III.	2.8. Teneur en humidité.....	13
III.	2.9. Facteurs biologiques.....	13

## Méthodologie

<b>1. Objectif .....</b>	<b>14</b>
<b>2. Matériels et méthodes .....</b>	<b>14</b>
2.1. Matériels.....	14
2.1.1. Echantillons .....	14
2.2. Méthodes .....	15
2.2.1. Préparation des échantillons et ensemencement .....	15
2.2.2. Isolement et purification des souches microbiennes.....	15
A. Observation macroscopique.....	15
B. Observation microscopique.....	16

## **Résultats**

1. Microorganismes isolés .....	17
2. Observations microscopiques .....	19
<b>Discussion.....</b>	<b>21</b>
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>25</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>26</b>

## Listes des figures

<b>Figure 1.</b> Classement des hydrocarbures en fonction de leur structure.....	3
<b>Figure 2.</b> Devenir des hydrocarbures pétroliers à la suite d'un déversement en milieu aquatique	6
<b>Figure 3.</b> Echantillons d'hydrocarbures pétroliers analysés. (a) slop, (b) pétrole brut, (c) condensat.....	17
<b>Figure 4.</b> Microorganismes isolés à partir des 3 échantillons d'hydrocarbures pétroliers.....	17
<b>Figure 5.</b> Microorganismes isolés à partir de l'échantillon de condensat .....	18
<b>Figure 6.</b> Microorganismes isolés à partir de l'échantillon du pétrole brut .....	18
<b>Figure 7.</b> Microorganismes isolés à partir de l'échantillon Slop.....	19

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Composition élémentaire des composés pétroliers .....	2
<b>Tableau 2.</b> Nombre de colonies isolées à partir de chaque échantillon d'hydrocarbure pétrolier sur les différents milieux de culture.....	17
<b>Tableau 3.</b> Observations microscopiques des microorganismes isolées à partir des échantillons d'hydrocarbures pétroliers.....	19

# **Introduction**

## Introduction

L'exploitation humaine des gisements de pétrole n'a cessé d'augmenter depuis le début du 20<sup>e</sup> siècle ; celui-ci est considéré, non seulement comme la matière première pour l'industrie chimique, mais également comme la source d'énergie la plus demandée (Soultani 2004).

La croissance exponentielle de l'extraction, du transport, de la transformation et de l'utilisation de cette source d'énergie a multiplié les risques de contaminations accidentelles et chroniques des écosystèmes aquatiques et terrestres.

Certains composés pétroliers (ou hydrocarbures) peuvent présenter une grande toxicité du fait de leurs pouvoirs mutagènes et/ou cancérogènes. En 1976, ils ont été inscrits dans la liste des polluants prioritaires établie par l'agence pour la protection de l'environnement des États-Unis (Environmental Protection Agency) (Verdin et al. 2004).

L'élimination des hydrocarbures de l'environnement nécessite l'intervention de différents facteurs biotiques et abiotiques. Parmi ces facteurs, la biodégradation par les microorganismes appelés « hydrocarbonoclastes » est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement.

La biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes a été mise en évidence dès 1946 par ZoBell. Depuis cette date le nombre d'espèces bactériennes identifiées possédant cette propriété n'a cessé d'augmenter (Soultani 2004).

De ce fait, la bioremédiation consistant en l'exploitation des capacités métaboliques des microorganismes hydrocarbonoclastes apparaît comme une solution alternative écologique puisqu'elle est naturellement gérée par les microorganismes et nécessite aucun apport chimique, mais également la moins coûteuse. Seulement, elle est loin d'être parfaite puisqu'elle présente quelques limites.

Dans ce sens, ce travail a pour objectif d'isoler et de caractériser des microorganismes (bactéries et champignons) hydrocarbonoclastes à partir de 3 échantillons d'hydrocarbures pétroliers à savoir le pétrole brut, le condensat et le slop.

# **Synthèse bibliographique**

## Synthèse bibliographique

### I. Hydrocarbures pétroliers

#### I.1. Généralités

##### I.1.1. Pétrole

Le pétrole est une ressource précieuse, il est constitué d'un mélange de milliers de composés formés à partir de différents matériaux organiques. Sa formation s'effectue par conversion anaérobie de la biomasse sous haute pression et température (Feknous 2017). Les pétroles bruts sont des mélanges extrêmement complexes d'hydrocarbures et d'autres constituants mineurs, comme des métaux (dont le nickel, le vanadium, le cuivre...), des composés polaires qui contiennent de l'azote, du soufre ou de l'oxygène et des molécules polaires de faible masse moléculaire appelées résines ou plus lourdes étant regroupées sous l'appellation d'asphaltènes (tableau 1) (Selmoun et Benkhebcheche 2016).

##### I.1.2. Hydrocarbures

Les hydrocarbures sont des composés organiques, aux origines multiples, formés exclusivement d'atomes de carbone et d'hydrogène (Feknous 2017).

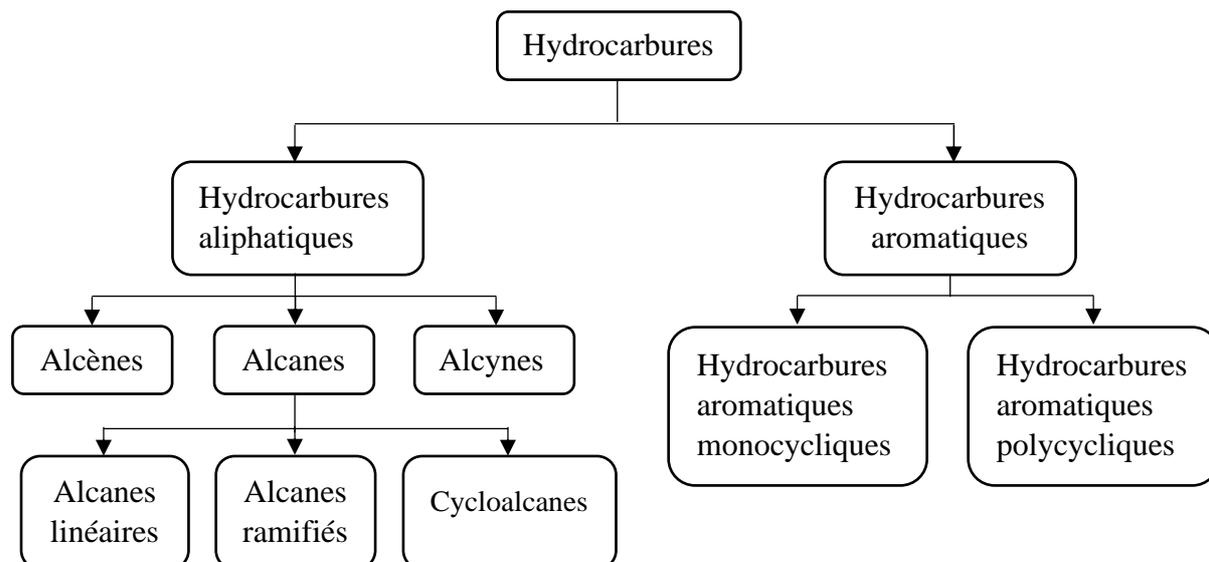
Les hydrocarbures constituent la fraction la plus importante d'un brut pétrolier, ils représentent entre 65 et 95 % de la plupart des pétroles bruts (Fokou Mbogne 2017).

**Tableau 1.** Composition élémentaire des hydrocarbures pétroliers (Fokou Mbogne 2017).

Éléments	Pourcentage (%)
Carbone	83 à 87
Hydrogène	10 à 14
Azote	0.1 à 2
Oxygène	0.05 à 6
Soufre	0.05 à 6
Métaux (Al, Ni, ...)	< 0.1

#### I.2. Classification des hydrocarbures pétroliers

Les hydrocarbures pétroliers peuvent être classés en deux grandes familles principales qui sont présentes dans le pétrole en proportions variables selon l'origine géographique et géologique : les hydrocarbures aliphatiques et les hydrocarbures aromatiques (Fig. 1) (Fokou Mbogne 2017).



**Figure 1.** Classement des hydrocarbures en fonction de leur structure.

### I.2.1. Hydrocarbures aliphatiques

Les aliphatiques sont divisé en familles : alcanes, alcènes et alcynes (Dilmi 2019).

#### a. Alcanes (hydrocarbures saturés)

La chaîne carbonée des saturés est constituée uniquement de liaisons simples (Bekenniche 2014), parmi les hydrocarbures saturés on distingue :

- **Alcanes linéaires (n-alcanes)**

Leur longueur varie de 7 à 40 atomes de carbones, ils constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier léger et peuvent atteindre dans certains cas 60 %) (Hassaine 2016).

- **Alcanes ramifiés (isoparaffines)**

Les alcanes ramifiés les plus abondants sont les iso-alcanes (groupement méthyle en position 2). Les autres composés ramifiés antéiso (groupement méthyle en position 3) ou polyramifiés tels que les isoprénoides sont beaucoup moins nombreux. Ces composés se trouvent dans le pétrole brut à des proportions sensiblement égales à celles des n-alcanes (Hassaine 2016).

- **Cycloalcanes (naphtènes)**

Les cycloalcanes renferment des composés cycliques (à 5 ou 6 atomes de carbone) saturés et le plus souvent substitués. Quelques dérivés polycycliques sont aussi présents et certains d'entre eux tels que les stéranes et les triterpanes sont caractéristiques d'un pétrole brut. Cette famille peut représenter entre 30 et 50 % des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut (Soultani 2004).

**b. Alcènes (oléfines)**

L'alcène est un composé chimique insaturé contenant au moins une double liaison (C=C) résultant du fait qu'ils contiennent deux atomes d'hydrogène en moins. L'alcène le plus simple est l'éthylène (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) (Dilmi 2019). Les alcènes sont associés aux produits pétroliers issus du raffinage (Boudreau et al. 2015).

**c. Alcynes (acétylènes)**

Les alcynes sont des hydrocarbures qui ont une triple liaison entre deux atomes de carbone (C≡C), et ont une formule de (C<sub>n</sub>H<sub>2n-2</sub>) (Dilmi 2019). Les alcynes sont rarement associés au pétrole et aux produits pétroliers (Boudreau et al. 2015).

**I.2.2. Hydrocarbures aromatiques**

Ces composés sont dominés par des composés mono-, di- et tri-aromatiques, ils sont moins abondants que les alcanes, et ne représentent que 10 à 30 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier (Soultani 2004). Ils sont répartis en deux familles :

- Les hydrocarbures aromatiques monocycliques (HAM) tels que les BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène, xylènes) (Fokou Mbogne 2017).
- Les hydrocarbures aromatiques polycycliques souvent abrégés en HAP. Leur arrangement en structure cyclique comporte au moins deux cycles aromatiques condensés de type benzène. Le fluorène et le benzo(a)pyrène sont des exemples d'HAP (Triffault-Bouchet et al. 2015).

**I.3. Utilisations**

Les dérivés obtenus à partir du raffinage du pétrole ont de multiples applications : ils alimentent les transports (voitures, camions, avions), ils servent comme combustible dans le chauffage domestique et comme source de chaleur dans l'industrie. Le pétrole est aussi à l'origine de très nombreux produits non énergétiques (lubrifiants, caoutchoucs synthétiques, matières plastiques, fibres synthétiques, solvants et détergents, etc.) (Fokou Mbogne 2017 ; Dilmi 2019).

## **II. Pollution par les hydrocarbures pétroliers (HCP)**

### **II.1. Généralités**

De nos jours, l'exploitation du pétrole et les dommages qu'elle engendre ont atteint leur paroxysme. Alors que le 19<sup>e</sup> siècle était celui du charbon, le 20<sup>e</sup> siècle est celui du pétrole, une substance pouvant fournir jusqu'à deux fois plus d'énergie pour la même quantité. La découverte de « l'or noir » a résolument bouleversé notre mode de vie à tel point que la quasi-totalité de nos activités dépendent aujourd'hui de son exploitation. Inévitablement, la pollution engendrée par l'exploitation massive du pétrole est à la hauteur de celui-ci (Benchouk 2017).

### **II.2. Sources de pollution par les HCP**

Les hydrocarbures trouvés dans l'environnement sont généralement issus du pétrole brut et d'autres dérivés du pétrole comme le diesel, l'essence, l'huile de graissage entre autres. Leur déversement dans l'environnement peut être d'origine naturelle ou anthropique (Van Epps 2006).

Diverses zones des mers côtières situées au niveau de bassins sédimentaires érodés ou au niveau de failles entre blocs de la croûte terrestre sont le siège de suintements naturels d'hydrocarbures fossiles. C'est le cas, en particulier, sur les côtes du golfe du Mexique et du Golfe de San Jorge en Argentine.

À ces rejets naturels, s'ajoutent les apports anthropiques de pétrole via l'exploitation des gisements, le transport des hydrocarbures par voie maritime ou terrestre et même leur simple utilisation comme carburants ou produits dérivés (gasoil, diesel, et kérosène). Ces apports sont logiquement accentués aux endroits où l'industrialisation et l'urbanisation sont le plus développées (Lemarchand et Desbiens 2015).

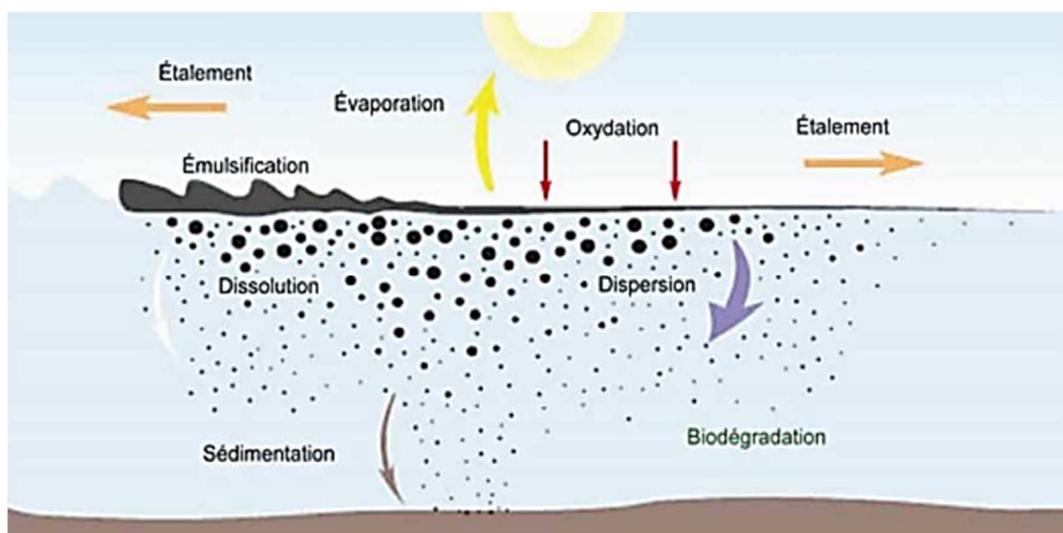
### **II.3. Devenir naturel des HCP**

C'est par des processus physiques, chimiques et biologiques qu'un hydrocarbure va pouvoir être déplacé, transformé ou éliminé après avoir été diffusé dans l'environnement (Fig. 2).

Le devenir est déterminé par les propriétés physicochimiques intrinsèques de la substance, la quantité et la vitesse d'émission dans l'écosystème et par les propriétés physiques, chimiques et biologiques de l'environnement (Forbes et Forbes 1997).

Les phénomènes biotiques sont ceux qui participent majoritairement à la dégradation des hydrocarbures lourds tandis que les phénomènes abiotiques agissent plutôt sur les plus légers (Zebich Et Semaani, 2015). La proportion relative des différents éléments constituant le pétrole brut déterminera les caractéristiques physiques du pétrole, sa toxicité, son devenir et son comportement dans l'environnement ainsi que sa biodégradabilité par les microorganismes indigènes. L'action combinée des différents mécanismes biotiques et abiotiques régule l'efficacité

de la décontamination et détermine la capacité de remédiation du milieu (Lemarchand et Desbiens 2015).



**Figure 2.** Devenir des hydrocarbures pétroliers à la suite d'un déversement en milieu aquatique (Lemarchand et Desbiens 2015).

### II.3.1. Transformation abiotique

Les transformations abiotiques des hydrocarbures sont uniquement dues à des phénomènes d'ordre physique et chimique. Ces transformations peuvent se traduire principalement par :

#### a. Évaporation

L'évaporation est un phénomène qui touche les fractions de faible poids moléculaire et dépend des conditions atmosphériques (vent, vagues, température, etc) (Soultani 2004). Elle correspond au transfert des composés volatils, comme les aliphatiques, les BTEX et les HAP de faible poids moléculaire, vers l'atmosphère pouvant conduire à sa pollution. Cette perte des composés volatils entraîne la modification de certaines propriétés physiques des hydrocarbures, telles que la densité et la viscosité (Triffault-Bouchet et al. 2015).

#### b. Solubilisation

Les hydrocarbures ont une solubilité très faible dans l'eau ; certains d'entre eux peuvent partiellement se dissoudre (hydrocarbures aromatiques et hydrocarbures à faible nombre de carbone). Il est important de noter que ces hydrocarbures solubles sont parmi les plus dangereux pour l'environnement, ils sont difficiles à éliminer et sont adsorbés par la faune et la flore (Zebich et Semaani 2015).

#### c. Émulsification

L'émulsification est un processus d'incorporation de gouttelettes d'eau dans les hydrocarbures pétroliers. Ceci augmente le volume du produit déversé et modifie certaines propriétés physiques

des hydrocarbures, telles que la densité et la viscosité. Cette émulsion stable eau-pétrole est nommée « mousse au chocolat » (Triffault-Bouchet et al. 2015).

#### **d. Sédimentation**

La sédimentation est le passage de la surface vers le fond. Les gouttelettes d'hydrocarbures dispersées peuvent interagir naturellement avec les matières en suspension (MES) présentes dans la colonne d'eau, tels que les minéraux argileux ou la matière organique, pour former des agrégats de haute densité difficilement dégradable par voie naturelle (Benchouk 2017).

#### **e. Photo-oxydation ou oxydation photochimique**

La photo-oxydation ou oxydation photochimique correspond à la transformation des hydrocarbures sous l'effet des rayonnements lumineux (essentiellement les rayons UV) (Benchouk 2017). Elle touche plus particulièrement les composés aromatiques qui sont plus photosensibles que les composés aliphatiques. Parmi ces derniers, les composés ramifiés sont plus facilement photo-oxydés que les n-alcanes (Soultani 2004).

#### **f. Sorption (adsorption)**

Dans les phases solides (sol et sous-sol) peuvent se produire des immobilisations permanentes ou temporaires des polluants. Certains corps solides ont la capacité de retenir les molécules d'autres corps (à l'état gazeux ou liquide) à leur surface par adsorption (en particulier sur les argiles et la matière organique humifiée) (Fokou Mbogne 2017).

### **II.3.2. Transformation biotique (biodégradation)**

La dégradation par voie microbienne est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement. Elle peut survenir en conditions aérobies ou en conditions anaérobies avec comme seuls rejets des produits simples tels que le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), l'eau ou encore de petits alcanes et des hydrocarbures cycliques (Benchouk 2017).

## **II.4. Effets écotoxicologiques des hydrocarbures**

Les déversements des hydrocarbures engendrent des effets très nocifs aussi bien pour l'Homme que pour l'environnement.

### **II.4.1. Effets sur la santé**

Les données expérimentales disponibles ont montré que certains hydrocarbures pouvaient induire spécifiquement chez les personnes qui leur sont exposés par inhalation, par ingestion ou par contact de nombreux effets sur la santé, des effets systémiques (hépatiques, hématologiques, immunologiques et développement d'athéroscléroses), et/ou des effets sur la reproduction ainsi que des effets génotoxiques et cancérigènes (Benchouk 2017).

#### **II.4.2. Effets sur le végétal**

L'effet phytotoxique des hydrocarbures se manifeste par une diminution voire une inhibition du taux de la germination, des retards de croissance et une diminution de l'activité photosynthétique et du rendement (Zebich et Semaani 2015).

#### **II.4.3. Effets sur le sol**

La présence des hydrocarbures au niveau d'un sol avec des concentrations plus ou moins élevées peut affecter ses propriétés physiques, chimiques et biologiques.

##### **- Effets sur les propriétés physiques**

La présence des hydrocarbures sur le sol modifie légèrement sa structure. Les hydrocarbures enrobent les particules minérales ce qui favorise leur dispersion (Zebich et Semaani 2015).

##### **- Effets sur les propriétés chimiques**

Les effets des hydrocarbures sur les propriétés chimiques du sol consistent généralement en (Zebich et Semaani 2015) :

- Une augmentation de la concentration en éléments traces tels que Mn, Zn, Fe, Pb.
- Une élévation du pH du sol et de la teneur en potassium (K) et en calcium (Ca).
- Une diminution de la teneur du sol en phosphore (P) et une augmentation en carbone organique total.
- Une augmentation de la conductivité électrique (CE) entraînant l'inhibition de certaines plantes très sensibles à la présence des sels.

##### **- Effets sur les propriétés biologiques**

Les effets des hydrocarbures sur l'activité biologique du sol dépendent de leur nature et de leur concentration dans le sol. Des concentrations toxiques du pétrole dans le sol inhibent le développement de différentes espèces de protozoaires, de rotifères, d'algues, de champignons, de bactéries et d'actinomycètes (Dilmi 2019).

Également, il a été rapporté que la pollution pétrolière provoque des changements dans la charge microbienne des populations du sol ; il a été indiqué que les populations de bactéries utilisant des hydrocarbures augmentent alors que les autres diminuent en raison de la pollution des sols par le pétrole brut (EZE 2010).

### **III. Dépollution**

La dépollution ou décontamination est un ensemble de procédés consistant à épurer ou, tout au moins, à isoler un milieu ayant été exposé à une pollution chronique ou récurrente. Le traitement concerne le sol, les eaux, et l'air (Zebich et Semaani 2015).

#### **III.1. Méthodes de dépollution**

##### **III.1.1. Traitements physiques**

Les méthodes physiques consistent à transférer et concentrer les polluants sans les modifier ou les détruire en se servant de fluides (eau ou gaz) pour le transport de la pollution vers des points de concentration et d'extraction (Benchouk 2017). Les techniques physiques affectent très souvent l'activité biologique des sols et dégradent leur structure en laissant un résidu pour tout ou partie stérile (Zebich et Semaani 2015).

##### **III.1.2. Traitements thermiques**

Les méthodes thermiques consistent à chauffer le matériel contaminé pour en extraire le polluant et le détruire, essentiellement employé ex situ pour la décontamination des sols pollués (Benchouk 2017). Cependant, cette technique est extrêmement coûteuse et les fumées toxiques qui se dégagent lors de la combustion nécessitent d'importants traitements qui engendrent des surcoûts (Zebich et Semaani 2015).

##### **III.1.3. Traitements chimiques**

Les méthodes chimiques, font appel à un principe réactionnel (action d'un solvant, oxydation, etc.) pour transformer le polluant en un composé moins toxique et inerte vis-à-vis de l'environnement (Benchouk 2017). La majorité des procédés de traitements chimiques exigent que les sols soient sous forme de boues ou que les contaminants soient mobilisés dans un milieu (Zebich et Semaani 2015).

##### **III.1.4. Techniques biologiques (bioremédiation)**

Les voies biologiques de décontamination appelées bioremédiation apparaissent comme une solution alternative écologique aux procédés physiques, chimiques ou thermiques actuellement utilisés, également elles sont moins coûteuses et plus efficaces permettant la minéralisation du xénobiotique et donc sa disparition (Verdin et al. 2004).

###### **III.1.4.1. Principe de la bioremédiation**

Le procédé de la bioremédiation consiste à activer la capacité naturelle que possèdent de nombreux organismes communément appelés bioremédiateurs ; à dégrader les polluants en composés inertes, comme l'eau et le gaz carbonique. Ces organismes peuvent être des microorganismes (bactéries, champignons, algues) ou organismes supérieurs (végétaux) ; ils peuvent être indigènes (déjà

présents dans la zone polluée), ou exogènes (ajoutés au milieu), ou encore être prélevés sur le site contaminé, cultivées au laboratoire puis réintroduits dans le milieu à restaurer (bioaugmentation) (Berkouche et Hadjadja 2015).

Dans la nature, se développent spontanément des processus de dégradation ou de transformation des polluants. Les organismes vivants, en transformant les déchets, jouent un rôle essentiel dans les cycles biochimiques vitaux. Mais ces réactions se produisent avec des cinétiques trop lentes pour avoir une application. Les procédés de bioremédiation visent donc, par intervention de l'Homme, à augmenter les capacités métaboliques de ces bioremédiateurs pour accélérer les phénomènes naturels de dégradation, à ramener les quantités de polluants extractibles en dessous des normes établies et à limiter les risques de dispersion ou de contamination plus larges (Verdin et al. 2004).

#### **III.1.4.2. Bioremédiation par les microorganismes**

Ces procédés exploitent la diversité génétique et le caractère versatile du métabolisme des micro-organismes (bactéries et champignons) pour la transformation des contaminants en produits moins dangereux. La biodégradation microbienne complète des hydrocarbures produit du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), de l'eau ainsi que de petits alcanes et des hydrocarbures cycliques. Ces biodégradations peuvent survenir en conditions aérobies ou en conditions anaérobies, par utilisation des sulfures ou du méthane. Toutefois, en conditions anaérobies, la biodégradation des hydrocarbures apparaît plus lente. Notons que les hydrocarbures complexes, tels que les alcanes ramifiés et les composés polycycliques (hydrocarbures aliphatiques et aromatiques polycycliques), ne sont biodégradables que par l'action combinée de l'ensemble des membres d'une communauté microbienne complexe (consortium) (Triffault-Bouchet et al. 2015 ; Benchouk 2017).

#### **III.1.4.3 Les microorganismes aptes à dégrader les HCP**

Une grande variété de micro-organismes indigènes du sol et des eaux présente la capacité d'utiliser les composés pétroliers comme sources de carbone et d'énergie. Les micro-organismes dégradants les hydrocarbures sont communément appelés hydrocarbonoclastes. Ils représentent moins de 0,1 % de la communauté microbienne indigène en milieu non pollué, mais peuvent représenter près de 100 % dans les milieux pollués par des déversements d'hydrocarbures (Hassaine 2016).

Les microorganismes d'un milieu dépourvu de contaminant ne possèdent pas forcément la capacité de les métaboliser. Cependant, lorsqu'ils sont exposés à de tels composés, ils sont souvent capables de s'adapter, c'est-à-dire d'acquérir le potentiel métabolique de dégradation de ces polluants par recrutement vertical ou horizontal de gènes spécifiques ou même par mutation (Benchouk 2017).

Le recrutement des voies métaboliques présentes dans le génome mais non exprimées, peut se faire par des événements de changement de régulation ou par réarrangement génétique. Les micro-

organismes peuvent aussi acquérir des clusters de gènes cataboliques via des éléments mobiles transférés d'un hôte donneur à un hôte receveur (transfert horizontal) (Goerge et Hay 2011).

Les bactéries et les champignons sont des médiateurs primaires dans la dégradation des hydrocarbures les plus étudiés et semblent les plus efficaces. 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 d'algues connus pour dégrader les hydrocarbures (Feknous 2017).

Les bactéries se sont avérées plus polyvalentes et actives que les champignons et peuvent donc jouer un rôle plus important au cours de la biodégradation des hydrocarbures (Benchouk 2017).

Les différents genres bactériens fréquemment décrits pour leur capacité à dégrader les hydrocarbures comprennent : *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Collimonas*, *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Flavobacterium*, *Gordonia*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Nocardioideis*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Variovorax* et d'autres clones bactériens (Benchouk 2017).

Parmi les champignons décrits pour leur capacité à dégrader les hydrocarbures : *Amorphoteca*, *Neosartorya*, *Talaromyces*, *Graphium*, *Candida*, *Yarrowia*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Pencillium*, *Cunninghamella*, *Fusarium*, *Mucor*, *Phanerochaete*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* et *Trichoderma* (Benchouk 2017).

Les avantages principaux des champignons par rapport aux bactéries sont leur capacité à se propager dans les sols grâce à leur mycélium et à produire des enzymes extracellulaires par exemple des oxydases à large spécificité de substrats qui permettent un meilleur contact avec les hydrocarbures (Benchouk 2017).

### **III.2. Facteurs influant sur la biodégradation**

La réussite de la biodégradation des hydrocarbures réside non seulement dans le choix de l'agent biologique mais également dans la maîtrise des conditions physicochimiques du milieu (Kumar et Gopal 2015). Les travaux de recherche menés sur la biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes ont montré que l'efficacité de ce processus dépend principalement de :

#### **III.2.1. Composition chimique**

La composition d'un pétrole détermine sa toxicité et son potentiel de dégradation. La vitesse de biodégradation est plus élevée pour les hydrocarbures saturés, viennent ensuite les hydrocarbures aromatiques légers, les hydrocarbures aromatiques à haut poids moléculaire ayant la vitesse de dégradation la plus faible (Feknous 2017).

### **III.2.2. Température**

La température joue un rôle essentiel dans la biodégradation des hydrocarbures en affectant non seulement la nature physico-chimique de ceux-ci, mais aussi en modifiant le taux métabolique et la diversité des microorganismes indigènes et par conséquent la vitesse de dégradation des hydrocarbures. À basse température, la viscosité du pétrole augmente et la volatilisation des composés toxiques (comme les alcanes courts) est réduite ce qui entraîne un ralentissement du métabolisme des microorganismes. Des températures plus élevées ont pour effet d'augmenter la vitesse de biodégradation. Si l'oxydation des hydrocarbures a été observée à des températures inférieures à 0 °C, ou élevées 70-80 °C, le maximum de l'activité métabolique des microorganismes est généralement observé à une température comprise entre 30 et 40 °C (Lemarchand et Desbiens 2015).

### **III.2.3. Oxygène**

En aérobie, la dégradation des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques par les bactéries et les champignons est initiée par une étape d'oxydation faisant intervenir des hydroxylases et des oxygénases à fortes dépendance en oxygène. Il est donc important de maintenir une aération adéquate des microorganismes (Lemarchand et Desbiens 2015).

### **III.2.4. pH**

Le pH optimal pour l'activité microbienne se situe autour de la neutralité bien qu'il y ait de nombreuses exceptions à ces tendances. Des valeurs de pH extrêmes (trop acide ou trop alcalin) pourraient inhiber l'activité microbienne en régulant le métabolisme microbien (Feknous 2017).

### **III.2.5. Biodisponibilité**

La biodisponibilité est la tendance des composants individuels à être absorbés par les microorganismes. En ce qui concerne les aspects microbiens, les difficultés de biodisponibilité résultent des obstacles au transfert des hydrocarbures dans les enzymes cellulaires et les limitations d'énergie pour maintenir la dégradation (Chekroud 2012).

### **III.2.6. Nutriments inorganiques**

Les taux de biodégradation peuvent être limités par les concentrations disponibles de divers nutriments. Comme les micro-organismes ont besoin d'azote et de phosphore pour s'incorporer dans la biomasse, la disponibilité de ces nutriments dans la même zone que les hydrocarbures est essentielle. Il a été généralement constaté que les engrais inorganiques azotés-phosphorés commerciaux et les mélanges inorganiques définis améliorent la dégradation des hydrocarbures déversés (Chekroud 2012).

### **III.2.7. Salinité**

Les variations de salinité modifient la structure et la diversité des communautés microbiennes indigènes en sélectionnant des espèces halophiles ou halotolérantes. Ceci peut affecter la biodégradation des hydrocarbures (Feknous 2017).

### **III.2.8. Teneur en humidité**

Les microorganismes ont besoin d'une quantité d'eau suffisante pour accomplir leur croissance. La teneur en humidité du sol a un effet négatif sur les agents de biodégradation (Abatenh et al. 2017).

### **III.2.9. Facteurs biologiques**

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).

# Méthodologie

## Méthodologie

### 1. Objectif

Ce travail a été réalisé dans la faculté SNV, Université IBN KHALDOUN à Tiaret, dans une période allant de Janvier à Mars, elle a eu pour but d'évaluer la présence et les caractéristiques microbiennes de différents échantillons d'hydrocarbures pétroliers.

### 2. Matériels et méthodes

#### 2.1. Matériels

##### 2.1.1. Echantillons

Trois échantillons de différentes consistances et origines ont été analysés dans cette étude (Fig. 3)

- Le pétrole brut, obtenu directement à partir des bacs de stockage des hydrocarbures du Terminal Arrivée Brut d'Arzew, wilaya d'Oran (région de transport Ouest, Algérie).
- Le condensat, qui est un mélange liquide d'hydrocarbures légers issus de la condensation de certains gaz naturels bruts, a été obtenu à partir du Terminal Arrivée Condensat d'Arzew.
- Le slop, de consistance boueuse issus des résidus de sédimentation du pétrole brut, a été prélevé à partir des fonds de bacs de stockage des hydrocarbures du Terminal Arrivée Brut d'Arzew.



**Figure 3.** Echantillons d'hydrocarbures pétroliers analysés.

(a) slop, (b) pétrole brut, (c) condensat

## 2.2. Méthodes

### 2.2.1. Préparation des échantillons et ensemencement

Une suspension diluée à  $10^{-1}$  a été préparée à partir du slop dans de l'eau distillée stérile alors que le condensat et le pétrole brut, étant de consistances liquides, ont été utilisés tels quels.

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 : utilisées pour la caractérisation des *Pseudomonas* par la mise en évidence de la production de pigments spécifiques (fluorescéine (pyoverdine) et pyocyanine).
- la gélose Mac Conkey : 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).
- Mineral Salt Medium (MSM) : milieu de culture composé uniquement de sels minéraux sans source de carbone. Il est utilisé pour l'enrichissement / l'isolement / la croissance de microorganismes ayant des types nutritionnels spécifiques.

\* 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, les critères suivants sont utilisés 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 leurs 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

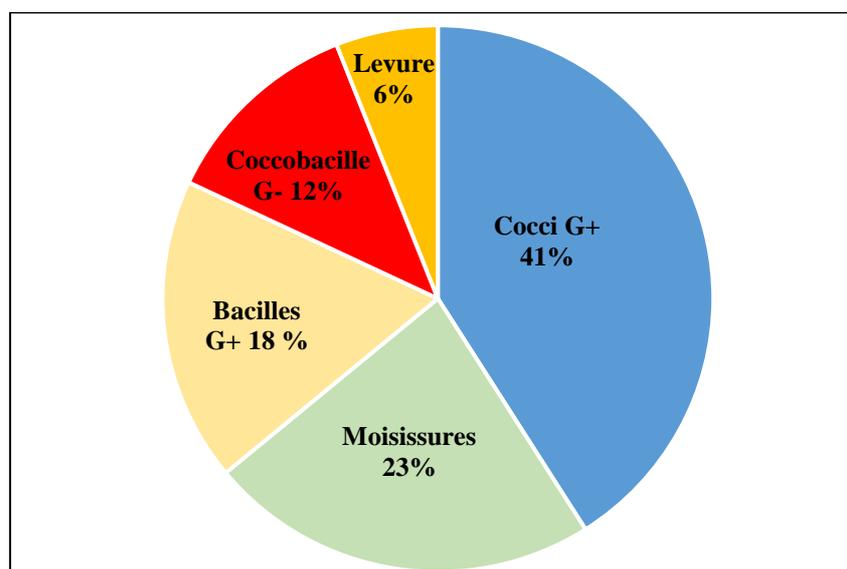
### 1. Microorganismes isolés

L'inoculation des différents milieux de culture par les trois échantillons d'hydrocarbures pétroliers en étude a permis d'isoler et de purifier différents types de colonies microbiennes. Ces résultats ont été aussi confirmés par les observations à l'œil nu et au microscope optique des isolats. On remarque que le nombre de colonies obtenues est relativement plus important dans le condensat en comparaison avec les autres échantillons. Le tableau 2 récapitule le nombre des colonies obtenues sur chaque milieu de culture.

**Tableau 2.** Nombre de colonies microbiennes isolées à partir de chaque échantillon d'hydrocarbure pétrolier sur les différents milieux de culture.

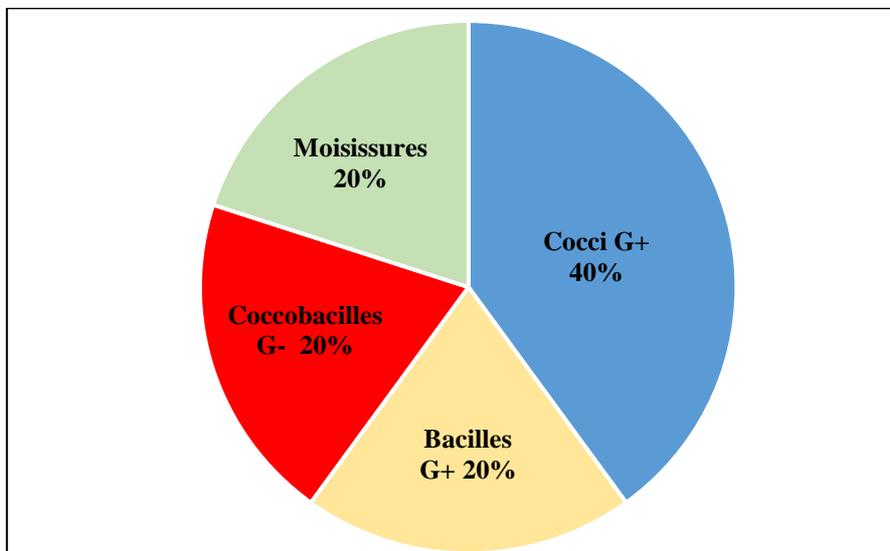
Echantillons	Milieux de culture						Total de colonies observées
	Gélose Nutritive	Mac Conkey	Bushnell Haas	MSM	King A	King B	
<b>Condensat</b>	0	3	0	1	2	4	10
<b>Pétrole brut</b>	1	0	1	0	1	1	4
<b>Slop</b>	2	0	0	0	1	0	3

D'une manière générale, les bactéries sous forme de cocci à Gram positif et les moisissures ont été distinguées après observation au microscope dans les trois échantillons analysés. Des bacilles à gram positif pour la plupart sporulés (*Bacillus*) ainsi que des coccobacilles à Gram négatif et des levures ont aussi été observés (Fig. 4).



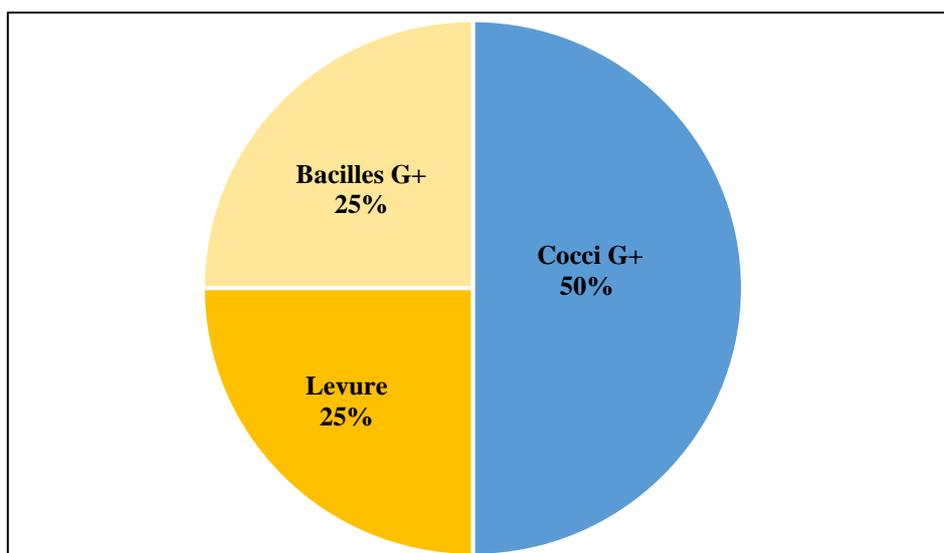
**Figure 4.** Microorganismes isolés à partir des 3 échantillons d'hydrocarbures pétroliers.

L'analyse microbiologique de l'échantillon de condensat révèle en plus de la présence des cocci à Gram positif et des moisissures, la présence de coccobacilles à Gram négatif ainsi que des bacilles à Gram positif sporulés (*Bacillus*) (Fig. 5). On note que les isolats microbiens obtenus à partir du condensat sont plus diversifiés par rapport aux autres échantillons.



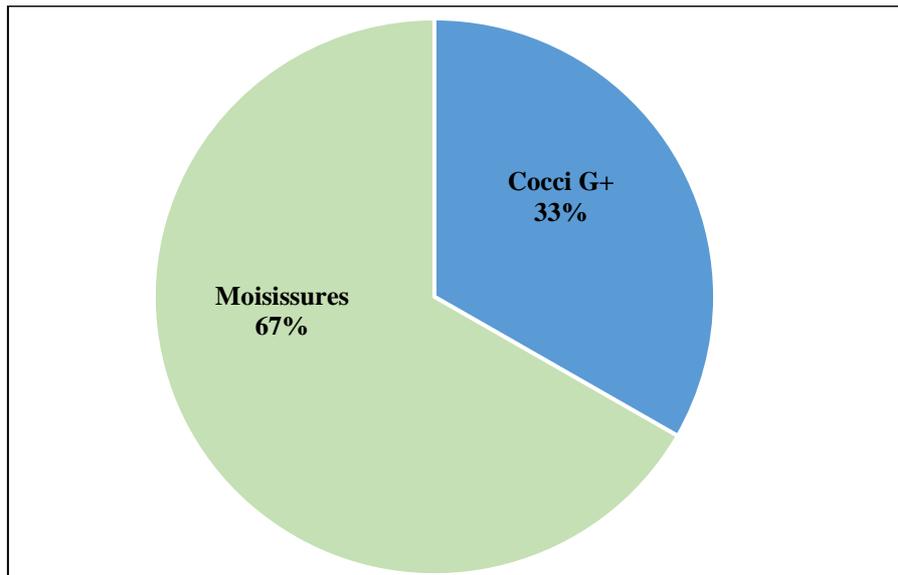
**Figure 5.** Microorganismes isolés à partir de l'échantillon de condensat.

Cependant, l'échantillon de pétrole brut a révélé la présence de cocci à Gram positif en prédominance en plus de levures et de bacilles à Gram positif (Fig. 6).



**Figure 6.** Microorganismes isolés à partir de l'échantillon de pétrole brut.

L'échantillon de slop, quant à lui, a révélé moins de diversité microbienne par rapport aux deux autres échantillons où seulement les cocci à Gram positif et les moisissures sont observés (Fig. 7).

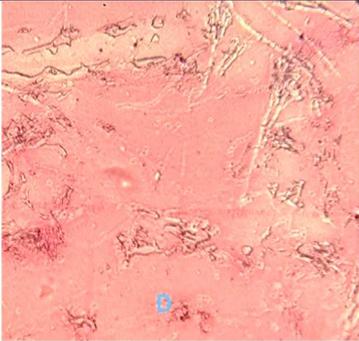
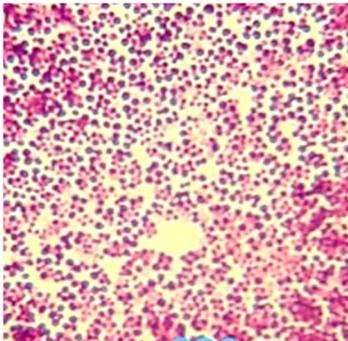


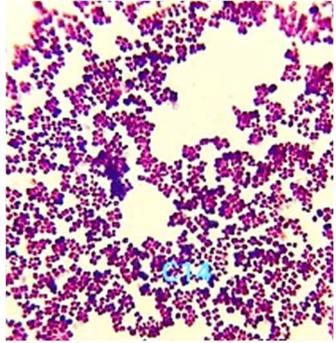
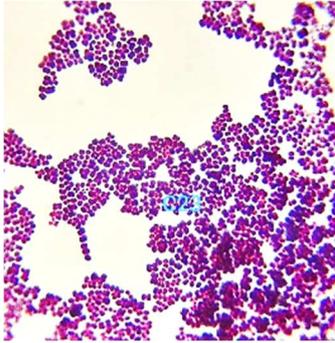
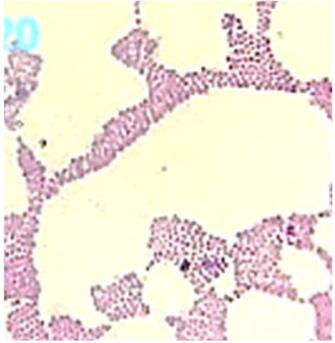
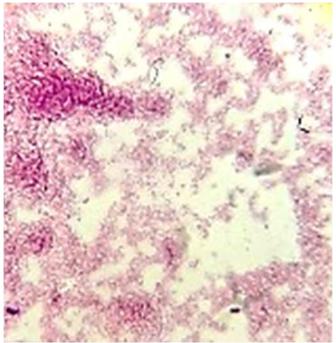
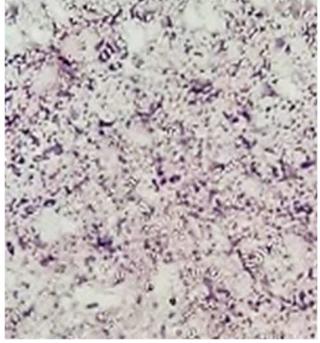
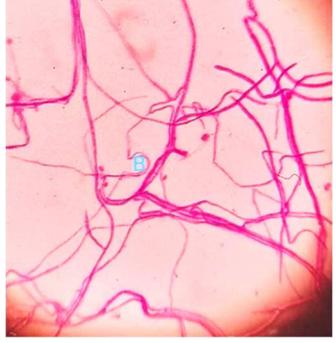
**Figure 7.** Microorganismes isolés à partir de l'échantillon du Slop.

## 2. Observation microscopique

L'observation microscopique, après coloration simple et de Gram, des microorganismes isolés à partir des trois échantillons d'hydrocarbures pétroliers a permis de distinguer les formes décrites dans le tableau 3.

**Tableau 3.** Observations microscopiques des microorganismes isolés à partir des trois échantillons d'hydrocarbures pétroliers.

Champignons	 <p>Moissure non identifiée</p>	 <p>Moissure de genre Penicillium</p>
	 <p>Levure non identifiée</p>	

	Condensat	Pétrole brut	Slop
Bactéries	 <p>Cocci Gram+ en tétrades</p>	 <p>Cocci Gram+ en amas</p>	 <p>Cocci Gram+ en amas</p>
	 <p>Coccobacilles G-</p>		
	 <p>Bacillus</p>		
	 <p>Actinobactéries</p>		

# Discussion

## Discussion

Avec l'accélération du développement économique, l'homme est de plus en plus responsable de la pollution de l'environnement. La diversité des produits d'origine industrielle conduit à une augmentation considérable du nombre de substances totalement étrangères au monde vivant, dites xénobiotiques. Parmi ces polluants, les hydrocarbures pétroliers qui contaminent tous les compartiments de l'environnement : eau, air, sol et biosphère. Ce sont des polluants toxiques dont la majorité de leurs composés sont considérés comme cancérigènes et mutagènes pour l'homme (Chekroud 2012 ; Kaboré-Ouédrago et al. 2010).

De plus, plusieurs, ont 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 (Chikere et al. 2011). 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. Certains microorganismes formant des spores résistantes peuvent être isolés à partir d'environnements pollués sans que ceux-ci aient la capacité d'utiliser le polluant.

La présente étude a consisté en une caractérisation microbiologique de trois échantillons d'hydrocarbures pétroliers à savoir le pétrole brut, le slop et enfin le condensat.

Les résultats obtenus ont révélé la présence de bactéries et de champignons dans tous les échantillons avec prédominance des bactéries. Ce résultat peut être expliqué par le fait que les bactéries sont plus polyvalentes 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. De plus, le transfert horizontal des gènes, répandu chez les bactéries, et a été signalés comme l'un des principaux mécanismes responsables pour l'évolution de la dégradation accrue des hydrocarbures (Chikere et al. 2011).

L'identification morphologique des isolats ainsi que la coloration de Gram des cellules bactériennes nous a permis de distinguer parmi les bactéries : des actinobactéries, des Bacillus et des cocci à Gram positif rappelant des Staphylococcus et Micrococcus entre autres. Cependant, parmi les champignons isolés, une moisissure du genre Penicillium a pu être identifiée parmi les autres moisissures et levures isolées.

La capacité à métaboliser les hydrocarbures se manifeste chez de nombreux types de microorganismes, de nombreuses études existent à sujet et il est maintenant généralement admis qu'aucune seule espèce ne dégradera complètement toute classe complexe d'hydrocarbures. Bien qu'il soit largement admis que les bactéries et les champignons sont les principaux médiateurs de dégradation des hydrocarbures (Chikere et al. 2011).

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*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Alcaligenes* et *Mycobacterium* (Vidali 2001 ; Montagnolli et al. 2014). De même, plusieurs genres et espèces fongiques ont été caractérisées 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). Parmi les levures hydrocarbonoclastes, les plus citées sont : *Rhodotorula*, *Candida*, *Torulopsis*, *Cryptococcus*, *Pichia* et *Hansenula* (Benyahia et Ayadi 2012).

En outre, la dégradation observée au niveau de la microflore du sol est quasi-totale dans la plupart des essais effectués. La synergie ou le commensalisme entre les différentes espèces de populations bactériennes sont susceptibles de jouer un rôle aussi important que le cométabolisme au cours de la biodégradation (Solano-Serena et al. 2001). L'exposition préalable aux hydrocarbures entraîne une adaptation de la communauté microbienne pour utiliser les hydrocarbures comme sources d'énergie. Les trois moyens interdépendants par lesquels l'adaptation peut se faire sont : (1) l'induction et/ou la répression des enzymes spécifiques, (2) des modifications génétiques qui entraînent les voies métaboliques et (3) l'enrichissement sélectif des microbes capables de transformer les hydrocarbures (Chikere et al. 2011).

Pour la dégradation, il est nécessaire que les bactéries et les contaminants soient en contact. Cela n'est pas facile à réaliser, car ni les microbes ni les contaminants ne sont répartis uniformément dans le sol. Certaines bactéries sont mobiles et présentent une réponse chimiotactique, détectant le contaminant et se déplaçant vers lui. D'autres microorganismes tels que les champignons se développent sous une forme filamenteuse vers le contaminant (Vidali 2001).

Des études ont montré que les actinobactéries jouent un rôle écologique important. Elles possèdent la capacité de dégrader des molécules complexes non dégradées par les champignons ou les autres bactéries, contribuant ainsi à la fertilisation des sols. Les enzymes sont, après les antibiotiques, les produits les plus importants sécrétés par les actinobactéries. Plusieurs études ont démontré qu'elles sont impliquées dans la dégradation des HAP. De plus les actinobactéries du genre *Arthrobacter*,

Nocardioides et Rhodococcus sont capables de dégrader les HAP de faible poids moléculaire (Martin 2011 ; Dali et Iddir 2018).

Beaucoup de bactéries du genre Bacillus sont d'origine tellurique et produisent des spores résistantes à de nombreux agents physiques et chimiques. Elles possèdent une forte potentialité catabolique et peuvent produire des biosurfactants et une gamme diversifiée d'exoenzymes capables de dégrader les macromolécules telles que les hydrocarbures (Willemse-Collinet et al. 1982).

Raveket et al. (2000) a démontré la capacité de certains Penicillium à utiliser des hydrocarbures comme seules sources de carbone et d'énergies. Les Penicillium produisent des cytochromes p450 monooxygénase qui leur permettent de transformer un certain nombre de molécules y compris les HAPs (Bekenniche 2014).

Les hydrocarbures sont des composés hydrophobes dont la solubilité diminue d'autant que la masse moléculaire est importante. De ce fait, les microorganismes ont développé des stratégies pour utiliser ce type de substrat. Quatre modes d'accès expliquant l'assimilation des hydrocarbures par les microorganismes ont été proposés à savoir ; l'assimilation en phase aqueuse où le substrat pénètre dans la cellule sous forme solubilisée, qui est surtout rapportée pour des alcanes légers et certains hydrocarbures aromatiques suffisamment solubles. L'accès interfacial est un autre mode où les microorganismes utilisant les alcanes peu solubles possèdent fréquemment une membrane externe hydrophobe. L'hydrophobicité élevée de la membrane cellulaire externe permet l'adhésion du microorganisme aux gouttelettes du substrat présentes dans le milieu aqueux ainsi le substrat pénètre directement dans la cellule par diffusion ou transport actif sans se dissoudre dans la phase aqueuse. L'accès interfacial facilité ou émulsification est aussi un autre moyen où les bactéries, les champignons et les levures synthétisent des biosurfactants qui sont soit des molécules intracellulaires, extracellulaires ou localisées à la surface de la cellule qui accélèrent le transfert de l'hydrocarbure dans la cellule après contact direct substrat-cellule. Ce transfert facilité est dû à une augmentation de l'aire interfaciale entre la phase hydrophobe et la phase hydrophile. Enfin, le transfert micellaire consistant dans la formation d'une microémulsion suite à une pseudo-solubilisation de l'hydrocarbure par des biosurfactants produits par le microorganisme. La micelle entre en contact avec la cellule. La surface externe de la micelle est majoritairement hydrophile et le transfert micellaire est privilégié chez les microorganismes dont l'hydrophobicité de l'enveloppe cellulaire est faible (Hentati 2018).

La dégradation la plus rapide et la plus complète de la majorité des polluants organiques se fait dans des conditions aérobies. La première étape dans la dégradation aérobie de ces composés est l'introduction dans le substrat d'un atome d'oxygène dérivé de l'oxygène moléculaire, cette étape critique est effectuée par les oxygénases et les peroxydases. Les voies de dégradation périphériques

convertissent les polluants organiques étape par étape en intermédiaires du métabolisme intermédiaire central, par exemple, le cycle de l'acide tricarboxylique.

La biosynthèse de la biomasse cellulaire se fait à partir des métabolites précurseurs centraux, par exemple, l'acétyl-CoA, succinate, pyruvate. Les sucres nécessaires aux diverses biosynthèses et à la croissance sont synthétisés par gluconéogenèse (Yuniati 2017 ; Haddad et Boudjada 2015).

# **Conclusion et perspectives**

## Conclusion et perspectives

De nos jours, les produits pétroliers sont considérés non seulement comme matière première pour l'industrie chimique mais également comme source d'énergie très demandée et moins couteuse. Du fait de leur utilisation massive, les produits pétroliers, constituent des polluants importants, leurs effets et leurs impacts ont été évalués sur l'environnement. Les conséquences de ces pollutions écologiques peuvent avoir un impact soit direct ou indirect sur la santé humaine mais aussi sur l'équilibre des écosystèmes.

A travers cette étude nous avons tenté d'évaluer la qualité microbiologique de trois échantillons d'hydrocarbures pétroliers à savoir le pétrole brut, le condensat et le slop.

17 colonies microbiennes ont pu être isolées à partir des trois échantillons analysés dont la majorité sont des bactéries ; principalement des cocci à Gram positif. Nous avons également identifié de façon distincte des actinobactéries et des bactéries du genre *Bacillus*. Concernant les champignons, plusieurs moisissures ont été isolées ainsi que quelques levures. De plus, des moisissures du genre *Penicillium* ont pu être identifiées.

Il est à noter que le condensat, qui est un liquide obtenu par la condensation de certains gaz naturels et considéré comme hydrocarbure léger, a présenté une diversité microbienne plus importante par rapport aux autres échantillons. Cependant, l'échantillon de slop qui est une boue qui se forme dans les fonds des citernes où est stocké le pétrole brut ou d'autres produits pétroliers, a présenté le moins de diversité microbienne reflétant sa toxicité vis-à-vis des microorganismes.

A travers ce travail, nous avons pu constater que malgré la toxicité rapportée des hydrocarbures pétroliers, divers microorganismes arrivent à survivre dans ce milieu hostile en l'utilisant comme source de nutriments ou simplement y demeurant sous une forme en dormance.

Malheureusement, ce travail n'a pas pu être achevé en raison de la pandémie du Corona virus (COVID 19) qui a touché le monde et qui nous a obligé à interrompre notre travail à son début.

A l'avenir et comme perspectives nous envisagerons :

- Une purification et identification poussées des isolats obtenus, suivie d'une batterie de tests microbiologiques et moléculaires pour confirmer la capacité des souches à dégrader les hydrocarbures.
- Une étude approfondie portant sur les voies métaboliques et la cinétique des enzymes impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures pétroliers.
- Une évaluation du potentiel de dégradation des hydrocarbures individuel de chaque souche isolée et en combinaison.

# **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. Bekenniche N. 2014. Caractérisation des activités de biodégradation des hydrocarbures par différents genre microbiens isolés de sites contaminés. Mémoire de Magister. Université Es-Sénia, Oran, Algérie.
3. Benchouk A. 2017. Bioremédiation des sols pollués de pétrole par les microorganismes indigènes et amélioration génétique de leur pouvoir. Thèse de Doctorat. Université d'Ibn Badis, Mostaganem, Algérie.
4. Benyahia D., Ayadi M. 2012. Caractérisation de la flore microbienne de boues résiduares des bacs de pétrole de la RTC-SONATRACH. Mémoire de Magister. Université Abderrahmane Mira, Bejaia, Algérie.
5. Berkouche H., Hadjadja H. 2015. Essai de phytoremédiation d'un sol pollué aux hydrocarbures en utilisant la fève, les pois et l'orge. Mémoire de Master. Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie.
6. Boudreau L., Sinotte M., Defo MA., 2019. Revue de littérature sur les critères de qualité d'eau de surface pour les hydrocarbures pétroliers. Réalisé dans le cadre de l'évaluation environnementale stratégique (Étude AENV14), ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, Direction générale du suivi de l'état de l'environnement, Québec, Canada.
7. Chekroud Z. 2012. Contribution à l'étude bactériologique de la biodégradation et de la bioremédiation des déchets et des produits industriels. Thèse de Doctorat. Université 8 Mai 1945, Guelma, Algérie.
8. Chikere CB., Okpokwasili GC., Chikere BO. 2011. Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. *3 Biotech*. 3: 117-138.
9. Dali M., Iddir O. 2018. Etude physico-chimique et microbiologique d'un sol pollué par les hydrocarbures avant et après traitement par phytoremédiation. Mémoire de Master. Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie.
10. Dilmi F. 2019. Isolement et caractérisation des microorganismes capable de dégrader le pétrole de la raffinerie d'Arzew. Thèse de Doctorat. Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, Algérie.

11. EZE CN. 2010. Ecological impact of petroleum hydrocarbon pollution and efficacy of some bioremediation techniques for contaminated arable lands. Thèse de Doctorat. University of Nigeria, Nigeria.
12. Feknous N. 2017. Essais d'isolement et d'identification des souches bactériennes à pouvoir auto-épurateur vis-à-vis des hydrocarbures. Thèse de Doctorat. Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.
13. Fokou Mbogne PM. 2017. Bioremédiation augmentée de sols contaminés aux hydrocarbures lourds par ajout de substrats organiques. Mémoire de Licence. Université du Québec, Canada.
14. Forbes VE., Forbes TL. 1997. Ecotoxicologie : théorie et applications. Editions Quae, 256 p.
15. Goerge KW., Hay AG. 2011. Bacterial strategies for growth on aromatic compounds. *Advances in Applied Microbiology*. 74: 1-33.
16. Haddad N., Boudjada YJ. 2015. Isolement et caractérisation des bactéries hydrocarbonoclastes à partir de sols pollués dans la région de Hassi Messaoud. Mémoire de Master. Université des Frères Mentouri, Constantine, Algérie.
17. Hassaine A. 2016. Biodégradation des Hydrocarbures (Pétrole brut et Kérosène) par la Microflore Microbienne des Eaux de la région de Skikda. Thèse de Doctorat. Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.
18. Hentati D. 2018. Isolement et caractérisation des bactéries marines hydrocarbonoclastes, production des biosurfactants et étude de la biodiversité microbienne au sein de trois ports de Sfax, Tunisie. Thèse de Doctorat. Université Montpellier, France ; Université de Sfax, Tunisie.
19. Kaboré-Ouédraogo PW., Savadogo PW., Ouattara CAT., Savadogo A., Traoré JAS. 2010. Etude de la bio-dépollution de sols contaminés par les hydrocarbures au Burkina Faso. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*. 30: 19-28.
20. Kurnaz SÜ., Büyükgüngör H. 2016. Bioremediation of total petroleum hydrocarbons in crude oil contaminated soils obtained from southeast Anatoli. *Acta Biologica Turcica*. 29: 57-60.
21. Lemarchand K., Desbiens I. 2015. Revue des connaissances sur les capacités potentielles de dégradation des hydrocarbures dans l'Estuaire maritime et le Golfe du Saint-Laurent par les communautés bactériennes indigènes." Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques du Québec, Rapport GENV32, Québec, 31.

22. Margesin R., Hämmerle M., Tscherko 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.
23. 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.
24. Montagnolli RN., Matos Lopes PR., Bidoia ED. 2015. Assessing *Bacillus subtilis* biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products. *Environmental Monitoring and Assessment*. 187(1): 4116.
25. Obi LU., Atagana HI., Adeleke RA. 2016. Isolation and characterization of crude oil sludge degrading bacteria. *Springer Plus* 5: 1946.
26. Raveket C., Krivobok S., Sage L., Steiman R. 2000. Biodegradation of pyrene by sediment fungi. *Chemosphere*. 40: 557-563.
27. Selmoun M., Benkhebeche DE. 2016. Contribution à l'étude de la biodégradation des hydrocarbures dans les boues de forage par des bactéries productrices de biosurfactants. Mémoire de Master. Université des Frères Mentouri, Constantine, Algérie.
28. Solano-Serena F., Marchal R., Vandecasteele JP. 2001. Biodégradabilité de l'essence dans l'environnement : de l'évaluation globale au cas des hydrocarbures récalcitrants. *Oil & Gas Science and Technology-Review*. 56 : 479-498.
29. Soultani M. 2004. Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse de Doctorat. Université Paris 6, France.
30. Triffault-Bouchet G., Gruyer N., Groleau P-E., Ouellet A., Dupont F. 2015. Hydrocarbures pétroliers : caractéristiques, devenir et criminalistique environnementale. Études GENV22 et GENV23. Évaluation environnementale stratégique globale sur les hydrocarbures. Centre d'expertise en analyse environnementale de Québec, Canada.
31. Van Epps A. 2006. Phytoremediation of petroleum hydrocarbons. Environmental Protection Agency, US. Environmental Protection Agency Office of Solid Waste and Emergency Response Office of Superfund. Remediation and Technology Innovation Washington, DC.
32. Verdin A., Lounès-Hadj Sahraoui A., Durand R. 2004. Les agents de la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures polycycliques aromatiques. *Déchets sciences et techniques*. 36: 30-37.

33. Vidali M. 2001. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*. 73: 1163-1172.
34. Willemse-Collinet MF., Carsin JL., Brodard E., L'Emeillat Y. 1982. Contribution du genre *Bacillus* à la dégradation bactérienne des hydrocarbures. *Publications du Centre National pour l'Exploitation des Océans (CNEXO). Actes de colloques*. 13 :111-117.
35. Yuniati MD. 2017. Bioremediation of petroleum-contaminated soil: A review. *Global Colloquium on GeoSciences and Engineering. Earth and Environmental Science*. 118: 012063.
36. Zebich B., Semaani L. 2015. Effet de la concentration du pétrole brut sur la croissance du pois (*Pisum sativum*) et de la luzerne (*Medicago sativa* L.), essai de phytoremédiation. *Mémoire de Master. Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie.*