

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Magistère en Sciences Agronomiques

Option : Sciences du sol

***ESSAI DE REHABILITATION D'UN SOL CONTAMINE PAR LES
HYDROCARBURES A L'AIDE DE TENSIOACTIFS OBTENUS PAR
VOIE BIOLOGIQUE***

Présentée par : **Melle ALI AHMED Samira**

Devant le jury composé par :

Président : **Pr. Y. DAOUD** Professeur à l'ENSA

Directeur de thèse : **Dr. S. CHERID-TILIOUINE** Maître de recherche -IAP

Examineurs : **Mme F. ZERROUK** M.A. Chargé de cours à l'ENSA

Pr M. OUNANE Professeur à l'ENSA

Année universitaire 2010-2011

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je tiens à remercier profondément **Dr. S. CHERID-TILIOUINE**, Maître de recherche à l'IAP pour m'avoir proposé ce sujet, pour ses précieuses orientations, pour son aide matérielle et bibliographique et pour ses remarques constructives.

Je tiens à remercier aussi **Mr DAOUD**, Professeur à l'ENSA d'avoir accepté de présider ce jury. Egalement je remercie vivement **Mme ZERROUK**, Maitre-assistante Chargé de cours à l'ENSA ainsi que **Mr OUNANE**, Professeur à l'ENSA d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes plus vifs remerciements vont également au personnel du département de sciences du sol, à **Mrs BELLAHMAR, LELLOUCHI, BENCHABANE** (techniciens de laboratoire de l'ENSA) et à **Mme BISKRI** (enseignante à l'USTHB) pour toute l'aide qu'ils m'ont apportée.

Je ne peux omettre de remercier **Mme SADOUDI-ALI AHMED** et **Mr HOUALI** Maîtres de conférences à l'UMMTO ainsi que **Mme LAMRI**, Ingénieur de laboratoire à L'UMMTO pour m'avoir accordé l'accès aux laboratoires de microbiologie du Département de biologie à l'UMMTO et pour avoir mis à ma disposition le matériel et les produits nécessaires à mon travail.

Mes remerciements vont également à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation du présent travail.

Résumé

La pollution par les hydrocarbures constitue une menace pour les sols algériens vu la longueur du réseau de canalisation servant à transporter le pétrole du sud vers le nord.

La dégradation biologique de ces produits est le moyen le plus intéressant pour leur élimination du sol mais elle est souvent confrontée à la disponibilité de certains des constituants du pétrole pour les souches capables de les dégrader. L'apport de biosurfactants permet de libérer les fractions adsorbées sur les particules du sol les rendant solubles et disponibles pour les microorganismes et améliorant ainsi l'efficacité de la biodégradation.

Le présent travail a pour objectif de décontaminer un sol artificiellement contaminé par du pétrole brut au moyen de l'inoculation de souches dégradant les hydrocarbures avec l'apport de l'azote et du phosphore. Ce traitement est associé à l'apport de biosurfactants produits par quelques unes des souches isolées et caractérisées au préalable.

Quatre souches ont été obtenues à savoir *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mendocina*, *Alcaligenes denitrificans* et *Aeromonas hydrophyla*. Seules les deux premières souches ont été capables de produire des biosurfactants.

L'apport des biosurfactants au sol contaminé a engendré la levée de l'inhibition du pétrole sur l'activité biologique du sol estimée par la quantité de CO₂ dégagé. L'association souches-biosurfactants a été moins efficace et l'inoculation seule n'a pas donné le résultat espéré.

Concernant la biomasse microbienne du sol, aucun traitement n'a eu un effet significatif bien que l'application du biosurfactant produit par *Pseudomonas fluorescens* ait donné des valeurs élevées par rapport aux autres traitements.

La germination des graines de blé n'a été sensible à aucun des traitements appliqués.

Mots clés : *souches bactériennes, pétrole, biosurfactants, activité biologique, biomasse microbienne, germination des graines.*

Abstract

Pollution by hydrocarbons constitutes a serious threat on Algerian soils because of the transport of oil by canalization from the south to the north of the country.

The biodegradation is the most interesting mean to eliminate these products from soils but it is limited by the less availability of some of their constituents for the strains degrading them. The biosurfactants remove the adsorbed fractions from soil particles solubilizing them to be available for the microorganisms improving the efficiency of the biodegradation process.

The aim of this study is to decontaminate a soil artificially polluted by oil by injecting hydrocarbon degrading microbial strains with nitrogenous and phosphorous fertilizers. This inoculation is associated to the utilization of biosurfactants produced by some of the isolated and characterized strains.

Four strains of bacteria were obtained: *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mendocina*, *Alcaligenes denitrificans* and *Aeromonas hydrophyla*. Only the two strains of *Pseudomonas* were able to produce biosurfactants.

The inhibition of oil on the soil microbial activity, estimated by the amount of CO₂ released, was attenuated by the use of the biosurfactants. The association strains-biosurfactants was less effective. The injection of the microbial strains had not the expected effect.

The soil microbial biomass was not influenced by all the treatments, even if the biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens* has given high values.

All applied treatments have not influenced the wheat seed germination.

Key words: *microbial strains, oil, biosurfactant, microbial activity, microbial biomass, seed germination.*

- ملخص -

يعتبر التلوث بالهيدروكربونات خطر يهدد الأراضي الجزائرية نظرا لطول شبكة القنوات المستعملة لنقل البترول من الشمال إلى الجنوب. إن التحليل البيولوجي للبترول هو الوسيلة الأكثر أهمية لتنظيف التربة من هذه المواد ولكنها غالبا ما تصطدم بعدم وصول البكتيريا لبعض مكونات البترول لتحللها. إضافة مستحلبات بيولوجية تسمح بتحرير أجزاء الهيدروكربونات المتصلة بجزئيات التربة مسهلة بذلك انحلالها في الماء لكي تحللها الميكروبات وتحسن بالتالي مردود التحلل البيولوجي.

الهدف من هذه الدراسة هو تنظيف تربة ملوثة اصطناعيا بالبترول بحقن أنواع بكتيرية قادرة على تحليل الهيدروكربونات وهذا بإضافة أسمدة أزوتية و فسفورية. هذا وقد تمت إضافة مستحلبات بيولوجية منتجة من طرف بعض من الأنواع البكتيرية التي تم الحصول و التعرف عليها مسبقا.

تم الحصول على أربع أنواع بكتيرية و هي بسودمونات فلويورسانس ، سودوماناس مندوسينا ، الكليجنس دينيتريفكانس و ايرومونات هيدروفيللا. النوعين الأولين هما فقط اللذان استطاعا إنتاج مستحلبات بيولوجية.

إضافة هذه المستحلبات الى التربة الملوثة أدى إلى رفع التأثير السلبي للبترول على النشاط البيولوجي للتربة و هذا يظهر في كمية ثاني أكسيد الكربون المنطلقة. من جهة أخرى، فإن إضافة كل من المستحلبات البيولوجية ، الأنواع البكتيرية أو الاثنين معا لم تؤدي الى رفع كمية المادة الحية لميكروبات التربة مع أن الكمية التي نتجت من استعمال المستحلبات البيولوجية كانت مرتفعة بالنسبة للإضافات الأخرى. انتشار بذور القمح لم يتأثر بأي من الإضافات التي أحدثت.

- الكلمات الأساسية : أنواع بكتيرية ، بترول ، مستحلبات بيولوجية ، نشاط بيولوجي ، المادة الحية للميكروبات ، انتشار البذور.

Liste des abréviations

S : Souche

BS : Biosurfactant

Cat : Catalase

O : Oxydase

ONPG : Orthonitrophénylgalactopyranoside

L : Lactose

G : Glucose

Esc : Esculine

ADH : Arginine Dihydrolase

LDC : Lysine Décarboxylase

Ind : Indole

TDA : Tryptophane Désaminase

HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique

Hc : Hydrocarbure

G : Gram

CMC : Concentration micellaire Critique

P. : *Pseudomonas*

M TEP : Million de Tonnes Equivalent Pétrole

ND : Non Déterminé

HAM : Hydrocarbure Aromatique Monocyclique

Liste des tableaux

Tableau 1 : Vitesses de dégradation de quelques hydrocarbures

Tableau 2 : Effets toxiques des hydrocarbures sur l'homme et les animaux

Tableau 3 : Effets cancérigène des hydrocarbures

Tableau 4 : Toxicité des hydrocarbures sur les végétaux et les organismes du sol

Tableau 5 : Valeurs limites d'exposition aux hydrocarbures

Tableau 6 : Estimation des coûts des procédés de décontamination

Tableau 7 : Caractéristiques analytiques de l'échantillon de sol

Tableau 8 : Caractéristiques analytiques des déchets d'hydrocarbures

Tableau 9 : Composition du milieu d'ensemencement

Tableau 10 : Test de mobilité

Tableau 11 : Caractéristiques morphologiques des colonies

Tableau 12 : Résultats de l'observation microscopique

Tableau 13 : Résultats des tests biochimiques

Tableau 14a : Effet de la température

Tableau 14b : Effet du pH

Tableau 14c : Effet de la concentration en hydrocarbures

Tableau 14d : Effet de la salinité

Tableau 15 : Tension de surface

Tableau 16 : Indice d'émulsification

Tableau 17 : Concentration micellaire critique (CMC)

Liste des figures

- Fig.1** : Devenir des hydrocarbures dans le sol. Adaptation de la figure proposée pour les pesticides par Barriuso et *al.* (1996)
- Fig.2** : Dégradation du pyrène proposée par Liang et *al.* (2006)
- Fig.3** : Chromatographie en phase gazeuse des déchets d'hydrocarbures
- Fig.4** : Schéma général d'isolement et d'ensemencement des souches microbiennes
- Fig.5** : Schéma général de purification des souches
- Fig.6** : Schéma général de la conservation des souches
- Fig.7** : Schéma de l'isolement et de la purification des biosurfactants
- Fig.8** : Traitements appliqués au sol
- Fig.9** : Dispositif expérimental
- Fig.10** : Observation de la souche S1 au microscope photonique au G100 après coloration de Gram
- Fig.11** : Observation de la souche S2 au microscope photonique au G100 après coloration de Gram
- Fig.12** : Observation de la souche S3 au microscope photonique au G100 après coloration de Gram
- Fig.13** : Observation de la souche S4 au microscope photonique au G100 après coloration de Gram
- Fig.14** : Evolution de la tension de surface
- Fig.15** : Dégagement cumulé de CO₂ dans le sol témoin et le sol contaminé
- Fig.16** : Dégagement cumulé de CO₂ dans le sol contaminé ayant reçu les différents traitements
- Fig.17** : Dégagement cumulé de CO₂. Comparaison des différents traitements au sol témoin
- Fig.18** : Dégagement hebdomadaire de CO₂. Comparaison des différents traitements
- Fig.19** : Biomasse microbienne dans le sol témoin et le sol contaminé
- Fig.20** : Biomasse microbienne dans le sol contaminé ayant reçu les différents traitements
- Fig.21** : Biomasse microbienne. Comparaison des différents traitements au sol témoin
- Fig.22** : Taux de germination du blé dans le sol témoin et le sol contaminé
- Fig.23** : Taux de germination du blé dans le sol contaminé ayant reçu les différents traitements
- Fig.24** : Taux de germination du blé. Comparaison des différents traitements au sol témoin

Liste des annexes

Annexe 1 : Quelques caractéristiques physico-chimiques des hydrocarbures

Annexe 2 : Modes opératoires des tests biochimiques

Annexe 3 : Protocole des tests physiologiques

Annexe 4 : Résultats de l'étude statistique

Sommaire

Sommaire

Introduction

Chapitre I : *Etude bibliographique*

I- Généralités	4
II- Les hydrocarbures et Environnement	4
II.1. Définition.....	5
II.2. Nature et origine.....	5
II.3. Composition et caractéristiques.....	5
II.3.1. Les hydrocarbures aliphatiques.....	5
II.3.2. Les hydrocarbures cycliques.....	6
II.4. Sources de contamination du sol.....	6
III -Devenir des hydrocarbures dans le sol	8
III.1. La mobilité.....	8
III.2. La rétention ou la sorption.....	9
III.3. La transformation.....	10
III.3.1. La transformation abiotique.....	10
III.3.1.1. La volatilisation.....	10
III.3.1.2. La photolyse.....	11
III.3.1.3. Les réactions d'oxydoréduction abiotiques.....	11
III.3.1.4. L'hydrolyse.....	11
III.3.2. La transformation biotique.....	12
III.3.2.1. La température.....	12
III.3.2.2. Le pH.....	13
III.3.2.3. L'humidité.....	13
III.3.2.4. Les nutriments.....	13
III.3.2.5. L'oxygène.....	14
III.3.2.6. La texture du sol.....	14
III.3.2.7. La nature et la concentration des hydrocarbures.....	14
IV- Risques écotoxicologiques	21
V- Procédés de traitement des sites contaminés par les hydrocarbures	30
V.1. Procédés physiques.....	30
V.1.1. Le lavage.....	30
V.1.2. Le venting.....	30
V.1.3. Le stripping.....	31
V.1.4. La stabilisation.....	31
V.1.5. Le pompage et traitement.....	31

V.2. Procédés chimiques.....	32
V.2.1. <i>La mobilisation et l'extraction</i>	32
V.2.2. <i>Les réactions chimiques</i>	32
V.3. Procédés thermiques.....	33
V.3.1. <i>L'incinération</i>	33
V.3.2. <i>La désorption thermique</i>	33
V.3.3. <i>La pyrolyse</i>	33
V.3.4. <i>La vitrification</i>	34
V.4. Procédés biologiques.....	34
V.4.1. <i>Le bioréacteur</i>	35
V.4.2. <i>La biodégradation en tas</i>	35
V.4.2.1. <i>Le compostage</i>	35
V.4.2.2. <i>Le land farming</i>	36
V.4.2.3. <i>Les biopiles ou biotertres</i>	36
V.4.3. <i>Le bioventing et le biosparging</i>	36
V.4.4. <i>La phytoremédiation</i>	37
V.4.4.1. <i>La phytotransformation</i>	37
V.4.4.2. <i>La phytostimulation</i>	37
V.4.5. <i>Les traitements combinés</i>	38
V.4.5.1. <i>La bioaugmentation</i>	38
V.4.5.2. <i>La biostimulation</i>	38
V.4.5.3. <i>L'utilisation d'inoculum fongique</i>	38
VI. Les biosurfactants	41
VI.1. Définition.....	41
VI.2. Propriétés.....	41
VI.2.1. La tension de surface.....	42
VI.2.2. La tension interfaciale.....	42
VI.2.3. La concentration micellaire critique.....	42
VI.3. Classification des biosurfactants.....	42
VI.3.1. Les glycolipides.....	42
VI.3.2. Les lipoprotéines.....	43
VI.3.3. Les lipopolysaccharides.....	43
VI.4. Production des biosurfactants.....	43
VI.5. Applications des biosurfactants.....	44
VII- Conclusions	45

Chapitre II : Matériels et méthodes

I-Introduction

II- Matériel d'études	46
II.1. Le sol.....	46
II.2. Les hydrocarbures.....	47
II.3. Matériels biologiques.....	50
II.3.1. Inoculum.....	50
II.3.2. Biosurfactants.....	50
III- Méthodes d'étude	50
III.1. Isolement et caractérisation des souches.....	50
III.1.1. Isolement.....	50
III.1.2. Identification.....	51
III.1.2.1. Etude morphologique.....	51
III.1.2.2. Etude biochimique.....	52
III.1.2.3. Etude physiologique.....	55
III.2. Mode de production des biosurfactants.....	55
III.2.1. Préculture.....	55
III.2.2. La culture.....	56
III.2.3. L'isolement et la purification des biosurfactants.....	56
III.2.4. Paramètres mesurés.....	58
III.2.4.1. La tension de surface.....	58
III.2.4.2. La CMC.....	58
III.2.4.3. L'indice d'émulsification E_{24}	58
III.3. Préparation du sol pour l'essai de décontamination.....	59
III.4. Tests biologiques permettant d'apprécier la toxicité des hydrocarbures.....	61
III.4.1. Dispositif respirométrique.....	61
III.4.2. Etude de la biomasse microbienne.....	61
III.4.2.1. Mise en place.....	63
III.4.2.2. Méthode de dosage du CO_2	63
III.4.3. Test de la germination.....	63
IV. Méthodes d'analyse	64
IV.1. Etude statistique.....	64

Chapitre III : Résultats et discussion

I-Introduction

II-Identification et caractérisation des souches isolées	65
II.1. Identification et principales caractéristiques morphologiques et biochimiques des souches isolées.....	66
II.1.1. Mobilité.....	66
II.1.2. Etude morphologique.....	67
II.1.2.1. Observation macroscopique.....	67
II.1.2.2. Observation microscopique.....	67
II.1.3. Tests biochimiques.....	71

II.2. Sensibilité des souches isolées à différentes conditions du milieu.....	74
II.2.1. Effet de la température.....	74
II.2.2. Effet du pH.....	75
II.2.3. Effet de la concentration en hydrocarbure.....	75
II.2.4. Effet de la salinité.....	76
II.3. Conclusion.....	77
III. Production de biosurfactants	79
III.1. La tension de surface.....	79
III.2. Indice d'émulsification.....	81
III.3. La CMC.....	82
III.4. Conclusion.....	83
IV. Essai de réhabilitation d'un sol contaminé par les hydrocarbures ; appréciée à l'aide de tests biologiques	85
IV.1. Hydrocarbures et activité biologique.....	85
IV.1.1. Production cumulée de CO ₂	85
IV.1.2. Production hebdomadaire de ...CO ₂	90
IV.2. Contamination en hydrocarbure et biomasse microbienne.....	92
IV.3. Contamination par les hydrocarbures et germination des graines.....	94
IV.4. Conclusion.....	96
Conclusion générale	97
Références bibliographiques	99

Introduction

Introduction

La pollution par les hydrocarbures constitue une menace très sérieuse pour l'environnement en Algérie. Les pertes et les fuites ainsi que les déversements accidentels font craindre une situation écologique irréversible.

L'Algérie est un pays producteur et exportateur de pétrole. En effet, la production du pétrole brut est en hausse. Elle a atteint 56.8 Millions de TEP en 2009. De nombreux puits ne cessent d'être découverts sur le territoire national par la Sonatrach et/ou par les Associés (Sociétés étrangères d'exploitation et de production), ceci constitue des sources de contamination du sol de plus en plus importante, de l'exploration au transport des hydrocarbures.

De nombreux déversements ont lieu au niveau des sites d'exploitation et de production générant des surfaces importantes de pollution de sol. Le pétrole est également transporté des lieux de production au sud vers les unités industrielles implantées au nord dans des oléoducs. La quantité transportée et livrée au nord à partir des gisements est estimée à 34.8 Millions de TEP ; 21.80 M de tonnes sont livrés aux raffineries. Le transport de ce produit augmente le risque de déversement accidentel par la corrosion des oléoducs ou la rupture de pipelines contaminant ainsi des hectares de sols le plus souvent voués à l'agriculture d'une part, ou effleurant de nappes souterraines. Avec la pose de 314 km en 2009, la longueur totale du réseau de canalisation a atteint 17450 km. Le réseau de transport sera en mesure d'acheminer plus de 330 millions de TEP et 20.7 M de tonnes de produits raffinés.

Ces hydrocarbures sont réceptionnés au niveau des raffineries ou au niveau des zones de stockage. A proximité de ces sites, les problèmes de contamination du sol et du sous sol ne sont plus à démontrer : cas des rejets de la raffinerie d'Alger ayant contaminé les zones agricoles de la région de la Mitidja.

La dégradation du sol peut être considérée comme une accumulation de plusieurs effets provoqués par les polluants sur les diverses transformations physiques, chimiques et biologiques se déroulant dans le sol.

L'ampleur croissante des dégradations chimiques, physiques et biologiques remet en cause le rôle de filtre, de support de vie et aussi d'outil écologique que remplit le sol.

La pollution des sols par les hydrocarbures pose d'importants problèmes d'élimination. Les voies d'élimination physique et chimique ont leurs limites du fait de leur coût ou de leur impact secondaire sur l'environnement. La voie biologique est actuellement en plein essor et suscite de très nombreux travaux de par le monde.

Cependant, si la voie biologique semble privilégiée pour des raisons d'une part économiques et d'autre part environnementales, il reste toutefois que la biodégradabilité des polluants en mélange est très souvent complexe et limitée par les facteurs de l'environnement et les caractéristiques liées aux polluants notamment leur accessibilité et leur toxicité envers la microflore locale. Il existe toutefois des moyens d'adaptation des souches aux types de polluants et aux caractéristiques des sols tels que le transfert micellaire du substrat et le transfert interfacial assisté par les tensioactifs.

Le présent travail est réalisé dans le but de traiter un sol contaminé par du pétrole en appliquant des techniques biologiques afin de pouvoir parer à d'éventuelles catastrophes.

Pour ce faire, un sol de texture moyenne et de pH neutre est contaminé artificiellement par du pétrole brut provenant du sud algérien afin de se rapprocher des conditions naturelles d'une éventuelle rupture de pipeline au niveau d'un terrain agricole.

La première partie est consacrée à la vérification de l'effet toxique du pétrole sur la microflore du sol et la germination de graines.

La seconde consiste à tenter de décontaminer ce sol en optimisant la biodégradation du pétrole au moyen de deux techniques, à savoir :

- la bioaugmentation en inoculant le sol avec des souches isolées et identifiées au préalable.
- La biostimulation par l'adjonction de fertilisants (N et P essentiellement).

Après avoir vérifié l'aptitude de quelques unes des souches isolées à produire des biosurfactants, nous nous sommes proposé de les utiliser en combinaison avec la bioaugmentation et la biostimulation pour accélérer le processus de dégradation du pétrole dans le sol.

La minéralisation des hydrocarbures du pétrole est estimée au moyen d'indicateurs biologiques tels que l'activité biologique globale du sol, la biomasse microbienne et la germination des graines de blé.

Notre choix s'est porté sur l'estimation de la respiration des microorganismes et de la biomasse microbienne car elles font partie, selon Chaussod et *al.* (1996), des indicateurs de la qualité biologique du sol. Ils estiment d'ailleurs que la biomasse microbienne est l'une des rares mesures biologiques encore fiables. La biomasse et la respiration des microorganismes sont également citées par Rivière (1998) comme étant deux des principaux paramètres structuraux mesurés pour évaluer l'écotoxicité dans les essais de laboratoire (bio-essais).

Nous avons choisi également d'évaluer la germination des graines parce qu'elle est considérée par certains auteurs (Kaputska et Reporter, 1993 ; OCDE, 1984 cités par Rivière, 1998) comme étant l'un des deux principaux points finaux utilisés pour évaluer la phytotoxicité des produits. Le choix du blé pour le test de germination s'est basé sur le fait que cette espèce soit citée comme l'une des plantes terrestres (avec la laitue, le chou et la carotte) utilisées dans les tests d'écotoxicité. Le choix de cette espèce se justifie aussi par la disponibilité des graines et par sa bonne capacité germinative.

Etude bibliographique

Chapitre I : Etude bibliographique

I- Généralités :

Le secteur pétrolier est le secteur industriel le plus polluant et le plus dangereux : risques de contamination des sols, sous sol, air, eau ...

Malgré le fait que Les hydrocarbures représentent la principale source d'énergie dans le monde, ce sont les polluants les plus dangereux de par leur toxicité, leur insiduosité, leur récalcitrance, leur persistance dans l'environnement, constituant un véritable risque pour la santé humaine.

De nombreux travaux ont été réalisés dans le domaine de la réhabilitation des sols. Il existe de nombreux moyens de traitement parmi lesquels figure la réhabilitaion biologique des sols.

Ce chapitre est consacré à la connaissance des principales caractéristiques des hydrocarbures et des nuisances telles que la toxicité, le degré de pollution qu'ils causent à l'environnement, ainsi que les différents traitements utilisés pour réhabiliter les sols contaminés.

II- Les hydrocarbures dans l'environnement :

Les hydrocarbures constituent une classe ubiquiste de composés naturels. On les rencontre non seulement dans les sites contaminés par le pétrole mais aussi dans la plupart des sols et sédiments en petite quantité (Rosenberg *et al.*, 1992).

La pollution des sols par les hydrocarbures est due à des rejets chroniques ou accidentels des produits pétroliers tant au niveau des sites d'exploration et d'exploitation qu'au niveau du transport. Elle constitue un problème économique majeur.

L'usage des hydrocarbures émet dans l'atmosphère, dans l'eau et dans le sol des quantités importantes de substances dangereuses. Le sol étant le support indispensable aux animaux, aux végétaux terrestres et à l'homme, toute pollution de celui-ci retentira sur la flore, la faune et sur l'homme lui-même (Koller, 2004).

II.1. Définition :

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

Ils constituent les produits de base du secteur énergétique et se trouvent souvent sous forme de mixture complexe. Le pétrole peut être défini comme étant un matériel organique dérivé naturellement, constitué au départ de composés hydrocarbonés retenus dans les réservoirs géologiques. Sa fraction liquide est le pétrole brut. Les pétroles bruts sont produits essentiellement sous de hautes pressions et températures sur le matériel biologique à travers les ères géologiques. La variabilité de tous ces facteurs fait qu'il existe une forte variabilité dans la composition chimique et les propriétés des différents bruts (Morgan et Watkinson, 1994).

II.2. Nature et origine :

Les hydrocarbures sont considérés comme étant des polluants à la fois organiques et chimiques (Koller, 2004) provenant des activités des secteurs énergétique et industriel. Certains composés ; les HAP, se forment naturellement par les incendies de forêt (Barriuso et al., 1996).

II.3. Composition et caractéristiques :

Malgré le fait que les principaux composants présents dans les hydrocarbures soient le carbone et l'hydrogène, une proportion significative d'autres atomes peut être présente. Celle-ci inclut l'oxygène, le soufre et l'azote (Morgan et Watkinson, 1994) et des métaux tels que le calcium et le magnésium (Chitour, 1983). Les hydrocarbures peuvent être classés en groupes de structures différentes.

II.3.1. Les hydrocarbures aliphatiques :

Ce sont des hydrocarbures à chaînes droites ; saturés ou insaturés.

Les hydrocarbures aliphatiques saturés sont des alcanes de formule générale C_nH_{2n+2} , ce sont les plus représentés dans le pétrole et vont du méthane aux chaînes contenant 40 atomes de carbone et plus.

Les insaturés comportent les alcènes de formule générale C_nH_{2n} . Ces molécules

contiennent une double liaison et les alcynes qui ont pour formule C_nH_{2n-2} et contenant une triple liaison dans leur molécule. Ils sont rares dans les pétroles bruts, plus communs dans les produits de raffinage.

II.3.2. Les hydrocarbures cycliques :

Ils peuvent être :

- saturés : appelés cyclanes qui sont des cycles saturés isomères des alcanes,
- ou insaturés appelés cyclènes s'ils possèdent une double liaison dans leurs cycles
- et cyclines s'ils ont une triple liaison.

Ils sont dits hétérocycliques si le cycle de leur molécule contient des atomes autres que le carbone tels que le soufre, l'azote et l'oxygène.

Les hydrocarbures aromatiques sont des composés contenant au moins un noyau benzénique dans leurs molécules. C'est un cycle insaturé à six atomes de carbone. Ils constituent une proportion très importante du pétrole et s'étalent du benzène aux HAP. Ce sont des composés hydrophobes, persistants dans les écosystèmes à cause de leur faible solubilité dans l'eau (Cerniglia, 1992) ; certains, tels que l'anthracène, sont quasiment insolubles (solubilité de 0.7 mg/l) (Smith, 1994).

II.4. Sources de contamination du sol :

La pollution par les hydrocarbures est en général :

- soit chronique se traduisant par des rejets continus tant en qualité qu'en quantité; ex : les rejets aqueux de raffineries
- soit accidentelle se traduisant par des rejets ponctuels massifs de produits dans l'espace et dans le temps se caractérisant par des déversements très localisés d'importantes quantités de produits bruts ; ex : la rupture de pipelines lors du transport des hydrocarbures, des accidents et renversement des camions citernes (Chaîneau et *al.*, 2000), rupture de bacs de stockage

Le raffinage du pétrole donne des rejets de produits toxiques tels que les HAP, alors que son stockage est souvent sujet à des fuites. Mais le transport représente la source la plus conséquente puisqu'à toutes ses étapes il y a des pertes. Plus de 60% du transport du pétrole se fait par voie maritime et peut générer des catastrophes

écologiques lors des naufrages de pétroliers tels que l'Erika en 1999 et le prestige en 2002 dans la méditerranée, l'Exxon Valdez aux Etats-Unis et autres. Mais la catastrophe la plus récente reste l'explosion de la plate forme pétrolière dans le golfe du Mexique en 2010.

Le risque de contamination par les hydrocarbures plane aussi sur nos plages quand on sait que sur les 300 millions de tonnes de pétrole qui transitent par la méditerranée, 100 M de T/an passent à proximité de nos rivages. Ceci équivaut au passage de 1800 pétroliers/an. Les quantités chargées à partir des principaux ports sont estimées à plus de 50 millions de tonnes/an. On évalue à 10000 tonnes/an les pertes difficilement évitables pendant les chargements (Larid et *al.*, 2001).

Le pétrole ainsi libéré parvient jusqu'aux plages polluant les côtes qui constituent le lieu de reproduction de poissons. Ce qui met en péril les populations d'algues, de crustacées, de coquillages et autres poissons et oiseaux qui peuplent ces écosystèmes.

Il faut noter également que les déballastages effectués en toute illégalité sont responsables d'une pollution 8 à 10 fois supérieure à celle des naufrages accidentels.

En effet, les navires vident leurs citernes et cuves dans la mer (Alger, Arzew, Bejaïa, Skikda...) pour échapper aux frais de dégazage et déballastage (La tribune, 2009). Cette même source fait état d'une fuite récente de pétrole au port d'Alger.

Le reste du transport est effectué par oléoducs pouvant entraîner des déversements importants de pétrole dans le sol de façon accidentelle, ou par trains et camions représentant des risques d'accidents qui entraînent l'écoulement des hydrocarbures sur le sol.

La presse locale a rapporté plusieurs accidents parmi lesquels nous pouvons citer la rupture de l'oléoduc reliant Hassi Messaoud au port de Bejaïa au niveau du village de Beni Mansour en 2008 provoquant le déversement d'importantes quantités de pétrole dans l'oued Amarigh. Cette fuite souterraine a déjà contaminé la nappe phréatique se trouvant sur les lieux (Le temps d'Algérie, 2010). En 2004, une fuite de pétrole provenant du pipeline qui dessert la raffinerie d'Alger a contaminé l'eau du barrage de keddara (Le matin, 2004). Plusieurs accidents du genre ont été enregistrés au niveau de pipelines qui alimentent cette raffinerie mettant en danger des terres

fertiles et des champs de captage.

En 2008, une fuite de mazout au niveau d'une conduite de Naphtal à Baraki a semé la panique chez les habitants de plusieurs quartiers de la capitale car l'eau de robinet sentait le mazout.

En France les sols pollués sont pour moitié contaminés par les hydrocarbures (Ngo et Regent, 2004). Aux USA, le pétrole et l'activité pétrochimique sont la cause de la pollution de 36% environ des sols contaminés selon l'EPA (Field et *al.*, 1989).

En Algérie, les déchets résultant de la production d'énergie (hydrocarbures) sont estimés à 49.700 tonnes/an ; ils représentent 34% des déchets totaux. La région de l'Est vient en tête notamment Skikda qui présente une importante activité pétrochimique et un transport actif d'hydrocarbures. Dans la région de l'Ouest, c'est la raffinerie d'Arzew qui produit la plus grande quantité de déchets. Le Sud, malgré la concentration de l'activité pétrolière et pétrochimique ne produit que 4.500 tonnes/an ; ce qui représente 1,4 % du total national (Le quotidien d'Oran, 2006 et Kaid-Tililane, 2005).

Par ailleurs, la fraction d'hydrocarbures la plus répandue dans le sol est représentée par les HAP (Bliefert et Perraud, 2004). En plus de l'extraction et du raffinage du pétrole qui représentent la cause majeure de cette pollution (Ramade, 1992), ils peuvent être introduits dans le sol par les retombées de particules atmosphériques générées par la combustion incomplète des matières organiques en général, les incendies de forêts et les émissions des automobiles (Lau et *al.*, 2003, Stapelton et *al.*, 1998, Grifoll et *al.*, 1992, Dean et *al.*, 2000).

III. Devenir des hydrocarbures dans le sol :

Les polluants organiques se trouvent trois phases : solide, liquide et vapeur. Ils y sont transférés ou éliminés par des processus biotiques ou abiotiques (figure 1).

III.1. La mobilité:

La mobilité est la tendance des produits à s'étendre dans d'autres compartiments de l'environnement depuis l'endroit où ils ont été appliqués ou utilisés pour la première fois (Bliefert et Perraud, 2004).

En règle générale, les substances ont la capacité de contaminer des surfaces importantes du lieu ou l'endroit où elles sont rejetées, mais passent d'un milieu à l'autre. Ainsi, des polluants du sol peuvent se retrouver facilement dans l'air ou dans l'eau. Les voies de dispersion des contaminants sont multiples ; on distingue principalement la propagation dans les eaux de surface et les eaux souterraine ainsi que dans l'air.

Le transport et la dispersion des hydrocarbures à partir du sol se font par les végétaux, la faune, la lixiviation, le lessivage, le ruissellement et la volatilisation (Barriuso et *al.*, 1996).

Le devenir dans le sol et les possibilités d'atteindre les nappes phréatiques ou les eaux de surface dépendent du régime des précipitations, de la nature du sol...

Les polluants capables de migrer par ruissellement sont présents dans le premier centimètre de sol. Cela concerne les composés caractérisés par une solubilité élevée dans l'eau et qui peuvent être entraînés en profondeur ou captés par les racines des plantes.

Le benzène est considéré comme l'un des hydrocarbures les plus mobiles dans le sol, ayant une pression de vapeur et une solubilité élevées (annexe 1). Il se volatilise à partir de la surface du sol et est entraîné vers les eaux souterraines par lixiviation.

Plus la solubilité dans l'eau d'un hydrocarbure est élevée, plus il est susceptible de se déplacer d'un compartiment de l'environnement à un autre (Saada et *al.*, 2005).

III.2. La rétention ou la sorption :

Elle peut être physique ou chimique mettant en jeu des liaisons très énergétiques qui peuvent rendre le phénomène irréversible. La sorption physique est un phénomène réversible et présente le risque de libérer une partie des substances piégées.

Après avoir pénétré dans le sol une partie des hydrocarbures peut s'adsorber à la matrice du sol et être incorporée à sa matière organique puisque cette dernière est un important absorbant pour toute sorte de constituants organiques car elle peut réagir avec leurs groupes fonctionnels.

La sorption est influencée par la solubilité du polluant, sa structure moléculaire,

les propriétés du sol. La présence d'argile et de matière organique favorise la rétention des polluants organiques dans un sol (Scriban, 1999). D'une façon générale, plus la taille de la molécule est importante et plus grande est son hydrophobicité, plus son adsorption sur la matrice solide sera importante (Scriban, 1999). Le taux d'humidité est inversement proportionnel au phénomène d'adsorption (Saada et *al.*, 2005).

C'est cette partie d'hydrocarbures qui régule tous les autres processus. Les polluants retenus sont à l'origine des contaminations futures lors des processus de dissolution et de vaporisation des constituants.

Selon Saada et *al.* (2005), plus le nombre d'atomes de carbone est élevé, plus la solubilité, la volatilité et la biodégradation sont faibles et l'adsorption importante. Les hydrocarbures aromatiques dont le nombre de cycles est supérieur à 3, sont très hydrophobes et peu solubles et ont tendance à se lier à la phase solide. L'adsorption devient le processus dominant pour les composés ayant une constante de Henry inférieure à 100.

Les polluants retenus sont à l'origine des contaminations futures (Scriban, 1999).

III.3. La transformation :

Il peut s'agir d'un phénomène biologique, lorsqu'elle fait intervenir la matière vivante, ou non biologique (hydrolyse, oxydations et réactions photochimiques).

III.3.1. La transformation abiotique :

Elle regroupe toutes les réactions de réduction et d'oxydation se déroulant dans le sol qui conduisent à l'altération du polluant, ainsi que la photominéralisation. Il s'agit des processus de dégradation physiques et chimiques y compris la volatilisation. La dégradation physique est basée sur les processus de photominéralisation essentiellement limités à la surface du sol.

III.3.1.1. La volatilisation :

C'est le passage d'une substance à l'état gazeux. Elle dépend de la pression de vapeur, de la densité des vapeurs de chaque composé et des propriétés du sol.

Certains constituants peuvent passer du sol à l'atmosphère. Ce phénomène est plus compliqué dans le sol que lorsque les hydrocarbures se trouvent à la surface de l'eau.

Ce phénomène dépend du type d'hydrocarbure et du nombre d'atomes de carbone, ainsi que du taux d'humidité du sol. Plus celui-ci est élevé, moins la volatilisation sera importante. Le toluène et le xylène, par exemple, présentent une densité de vapeur supérieure à celle de l'air, ce qui empêche la montée des vapeurs donc les pertes vers l'atmosphère. Le n-nonane et le n-décane, par contre, ont une densité de vapeur inférieure à celle de l'air ce qui favorise leur volatilisation (Saada et *al.*, 2005).

A partir d'une pression de vapeur supérieure à 133 Pa le produit est relativement volatile. Lorsque la constante de Henry dépasse $100 \text{ Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$, les composés passent facilement de la phase liquide à la phase gazeuse.

La demi-vie de volatilisation est de 0,4 à 3,2 h pour le naphthalène, 17 h pour l'anthracène et de 115 h à 3,2 ans pour le pyrène (Environnement Canada, 1994).

Cependant, il faut noter que la volatilisation est un mécanisme de transformation du polluant qui ne conduit pas à sa destruction.

III.3.1.2. La photolyse :

C'est un phénomène d'oxydation des substances sous l'action de la lumière. Il n'a lieu qu'en surface du sol ou de l'eau. Elle provoque des pertes de chaînes aliphatiques.

III.3.1.3. Les réactions d'oxydoréduction abiotique :

Elles peuvent avoir lieu dans les sols ou dans l'eau selon la nature du polluant et les conditions redox du milieu. Il est possible de favoriser l'atténuation naturelle ou, au contraire, d'augmenter la mobilité ou la toxicité du polluant.

d. L'hydrolyse :

Elle a lieu dans les phases aqueuses des milieux, il s'agit de l'action de l'eau sur les hydrocarbures.

III.3.2. La transformation biotique :

Les hydrocarbures dans le sol sont principalement dégradés par voie microbienne. La biodégradation peut être définie comme étant l'ensemble des mécanismes de transformation d'un contaminant en sous-produits par l'action des microorganismes. Ce processus est destructif, ce qui est particulièrement intéressant, à condition que les métabolites aient une toxicité moindre.

Le processus se développe selon une réaction en chaîne, où les composés carbonés sont transformés, par cassures successives en molécules de moins en moins complexes, jusqu'à l'obtention de sous produits simples, généralement le CO₂ et le H₂O (Rivière, 1998 b).

En conditions oxydantes on parle de transformation aérobie, en conditions réductrices on parle d'anaérobie.

La biodégradation des hydrocarbures est influencée par plusieurs facteurs dont les principaux sont la texture du sol, ses caractéristiques biologiques, sa structure, la concentration et les caractéristiques physico-chimiques des polluants ainsi que les paramètres environnementaux (Costes et Druelle, 1997).

III.3.2.1. La température :

La température peut avoir un effet marqué sur la dégradation des hydrocarbures. En effet, la température influence l'état physique des hydrocarbures, ainsi que la composition et l'activité de la communauté microbienne qui se reflète sur le taux de dégradation des hydrocarbures (Atlas, 1981).

La température optimale pour la biodégradation est située entre 20 et 30°C pour Margesin et Schinner (1997) et entre 25 et 35°C pour Yeung et *al.* (1997). Selon une étude réalisée par Song et *al.* (1990), la disparition de différents hydrocarbures dans des sols différents était maximale à 27°C. Toutefois, des auteurs ont rapporté que la biodégradation était possible à de basses températures, même inférieures à zéro (Atlas, 1981).

Selon Klug et Markovetz (1967) cités par Atlas (1981), les hydrocarbures peuvent être dégradés à 70°C.

Les basses températures réduisent le taux de volatilisation des hydrocarbures à faible poids moléculaire.

La température affecte l'activité microbienne. Le taux de dégradation diminue avec la baisse des températures et l'on peut observer une toxicité des hydrocarbures légers sur les membranes microbiennes (Bartha, 1990 ; Atlas, 1991). Les microorganismes restent viables à des températures inférieures à 0°C et vont reprendre leur activité lorsque la température augmente. La température affecte aussi les pertes non biologiques essentiellement par volatilisation. La solubilité est plus importante lorsque la température est élevée (Sims et *al.*, 1989).

III.3.2.2. Le pH :

Le pH favorable pour la biodégradation est un pH proche de la neutralité (Margesin et Schinner, 1997). Rivière (1998b) parle d'un optimum situé entre 5.5 et 8.5. Le pH affecte la solubilité et par conséquent, la disponibilité de plusieurs métaux toxiques pour les microorganismes. Ces métaux sont insolubilisés à des pH élevés.

III.3.2.3. L'humidité :

L'humidité du sol est un facteur qui influe sur la disponibilité des nutriments, sur le transfert du contaminant dans le sol, sur la dissolution et l'hydrolyse de celui-ci et sur l'activité des microorganismes et donc sur la biodégradation des hydrocarbures (Saada et *al.*, 2005).

L'humidité optimale pour la dégradation des hydrocarbures varie selon la nature du sol. Globalement, une humidité comprise entre 50 et 90% est favorable pour l'activité microbienne du sol (Phillips et *al.*, 2000)

III.3.2.4. Les nutriments :

La disponibilité des éléments nutritifs influe sur la population microbienne présente dans le sol. Les nutriments nécessaires pour la croissance des cellules sont N, P, K, S, Mg, Ca, Mn, Fe, Zn et Cu. N et P sont les nutriments les plus déficients dans les environnements contaminés par les hydrocarbures (Sims et *al.*, 1989).

En été, lorsque la température n'est pas un facteur limitant, la limitation

majeure de la biodégradation des hydrocarbures dans le sol est la disponibilité des nutriments (Atlas, 1981 ; Margesin et Schinner 1997). L'apport d'azote et de phosphore doit être suffisant pour établir des rapports C/N et C/P optimaux. Pour améliorer et accélérer la biodégradation des hydrocarbures, les auteurs parlent d'un rapport C/N/P de 100/10/1 (Atlas, 1981) à 120/10/1 (Morgan et Watkinson, 1989). Selon Rosenberg (1992), il faut environ 150mg d'azote et 30mg de phosphore pour convertir 1g d'hydrocarbures en cellules microbiennes.

III.3.2.5. L'oxygène :

L'importance de l'oxygène pour la dégradation des hydrocarbures est indiquée par le fait que le chemin majeur de dégradation des hydrocarbures implique des oxygénases et de l'oxygène moléculaire. Ainsi, la dégradation des hydrocarbures dépend de la disponibilité de l'oxygène ; le taux de biodégradation diminue lorsque la quantité d'oxygène diminue. Dans ces conditions, les hydrocarbures peuvent subir une dégradation anaérobie lente et les hydrocarbures persistent ainsi dans l'environnement. Les taux de dégradation anaérobie des hydrocarbures dans la nature sont négligeables (Atlas, 1981).

III.3.2.6. La texture du sol :

Elle influe sur les phénomènes de sorption des hydrocarbures en fonction du taux de matière organique et des minéraux argileux et sur le transfert du contaminant dans le milieu (Saada et *al.*, 2005). Selon Amellal et *al.* (2001), la texture du sol n'affecte pas de façon importante les concentrations adsorbées ou en solution des HAP relativement mobiles. Inversement, le contenu en matière organique influence très grandement la distribution des HAP entre les phases liquide et solide, et ainsi leur migration dans le sol.

III.3.2.7. La nature et la concentration des hydrocarbures :

La dégradation de ces substrats est plus ou moins facile suivant leur composition chimique, leur consistance, leur solubilité, leur toxicité et leur concentration dans le sol (Dommergues et Mangenot, 1970).

D'une façon générale, la biodégradation des hydrocarbures aliphatiques est

d'autant plus faible que la chaîne est longue et ramifiée. Celle des hydrocarbures aromatiques est significative lorsqu'ils ne contiennent pas plus de deux cycles (Saada et al., 2005).

La biodégradation est proportionnelle à la solubilité et est inversement proportionnelle à l'adsorption. Le tableau 1 illustre le temps de demi-vie de quelques hydrocarbures selon le nombre de cycles qu'ils contiennent.

Tableau 1: vitesse de dégradation de quelques hydrocarbures (Suthersan, 1996 in Saada et al., 2005 ; Pichard, 2005.)

Composé	Nombre de cycles	Temps de demi-vie (jours)
Hexane	0	<7
Isobutane	0	16-26
Benzène	1	10-720
Toluène	1	7-28
Xylène	1	14-360
Naphtalène	2	1-258
Phénanthrène	3	32-400
Anthracène	3	100-917
Pyrène	4	417-3792
Benzo[a]pyrène	5	114-1060
Dibenzo[a,h]anthracène	5	240-750
Benzo[k]fluoranthène	5	1095 à 1726
Benzo[g,h,i]pérylène	6	465-650

La biodégradation des hydrocarbures pose un certain nombre de défis aux micro-organismes. D'une part, le pétrole et ses dérivés se présentent comme des mélanges complexes. D'autre part, les hydrocarbures à faible poids moléculaire montrent une toxicité due à leur effet solvant sur les membranes. Enfin, la majorité des hydrocarbures présente une solubilité limitée dans l'eau (Morgan *et al.*, 1989).

Les microorganismes doivent donc s'adapter à ces substrats et être capables de les utiliser comme source de carbone. Il est actuellement établi que l'hydrocarbure, pour être assimilé par la cellule, doit subir une transformation. L'intervention de biosurfactants dans le phénomène de transfert du substrat vers l'intérieur de la cellule est un fait actuellement admis par tous les spécialistes.

Actuellement, on peut dire que les micro-organismes sont capables de dégrader certains constituants des pétroles, mais que les taux de décomposition dans les écosystèmes naturels sont encore très mal connus.

Par ailleurs, la pollution par les hydrocarbures peut souvent être qualifiée de multi-pollution car elle est associée aux métaux lourds, en particulier le vanadium et le nickel naturellement présents dans les pétroles. La concentration du vanadium peut atteindre les 400 à 580 ppm (Environnement Canada, 2005).

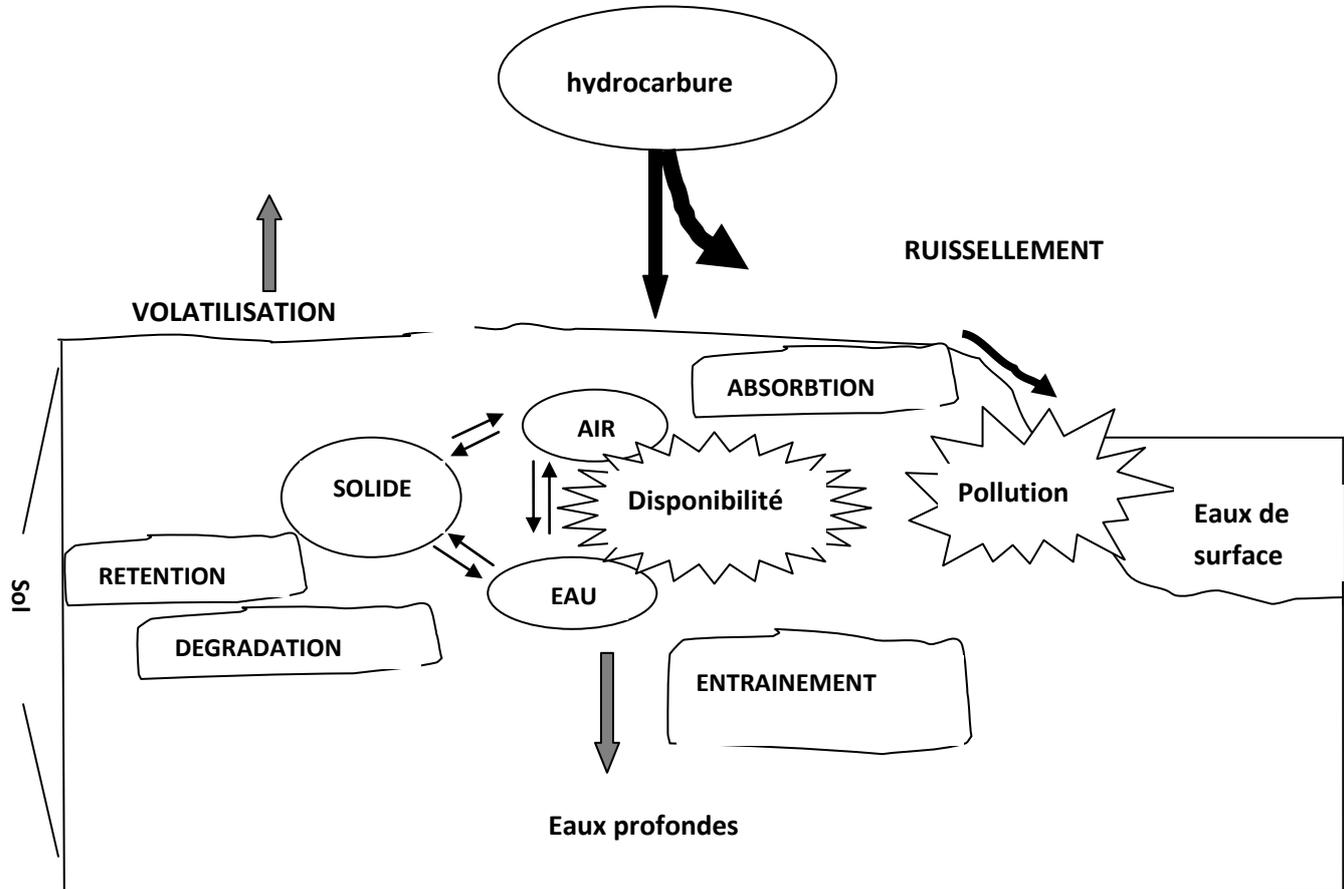


Fig. 1: Devenir des hydrocarbures dans le sol. Adaptation de la figure proposée pour les pesticides par Barriuso et al. (1996).

L'utilisation d'une grande variété d'hydrocarbures par les bactéries a été démontrée. En effet, des souches bactériennes dégradent les paraffines, les cycloparaffines, les HAM et les HAP (Morgan et Watkinson, 1989 ; Doelle, 1979 ; Schneider et *al.*, 1996 ; Sanseverino et *al.*, 1993 ; Malakul et *al.*, 1998 ; Dean et *al.*, 2001 ; Grifoll et *al.*, 1992 ; Scriban, 1999 et Boldrin et *al.*, 1993). Cette dégradation fait intervenir l'équipement enzymatique des germes caractérisé par une faible spécificité, ou par la synthèse de nouvelles enzymes spécifiques aux polluants présents. Cette voie peut s'opérer jusqu'à un stade avancé qui peut aller jusqu'à la minéralisation complète du substrat (Pelmont, 1993).

Certaines souches transforment les hydrocarbures en la présence obligatoire d'un autre substrat. Le cométabolisme est notamment la voie utilisée par *Mycobacterium sp.* pour transformer le fluorène en présence de l'extrait de levure et de la peptone (Boldrin et *al.*, 1993).

Par ailleurs, plusieurs espèces de champignons ont l'aptitude de transformer les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Bumpus, 1988 ; Stapleton et *al.*, 1998 ; Bezalel et *al.*, 1996 et Cerniglia, 1992). Les champignons lignolytiques tels que *Phanerochaete chrysosporium* dégradent les HAP au moyen des enzymes dégradant la lignine (Bumpus, 1988). Les champignons non lignolytiques utilisent les monooxygénases du cytochrome P-450. Le plus étudié est *Cunninghamella elegans* qui transforme les HAP en produits moins mutagènes, aboutissant ainsi à leurs détoxification (Cerniglia, 1992). L'attaque des HAP par les champignons conduit à la détoxification alors que la voie bactérienne conduit à la rupture des cycles avec assimilation du carbone (Cerniglia, 1984 ; Cerniglia et *al.*, 1992 ; Sutherland, 1992 cité par Cerniglia, 1992).

Les algues vertes et les cyanobactéries transforment les HAP sous conditions photoautotrophes. *Selenatrum capricornutum* dégraderait le Benz[a]pyrène en faisant intervenir une dioxygénase similaire à celle des bactéries (Cerniglia, 1992).

Le taux de dégradation des HAP est en général inversement proportionnel au nombre de cycle dans la molécule.

La biodégradation de ces composés aussi bien par les procaryotes que par les eucaryotes nécessite la présence d'oxygène pour effectuer la première attaque sur les noyaux (Gibson et Subramanian, 1984 cités par Cerniglia, 1992).

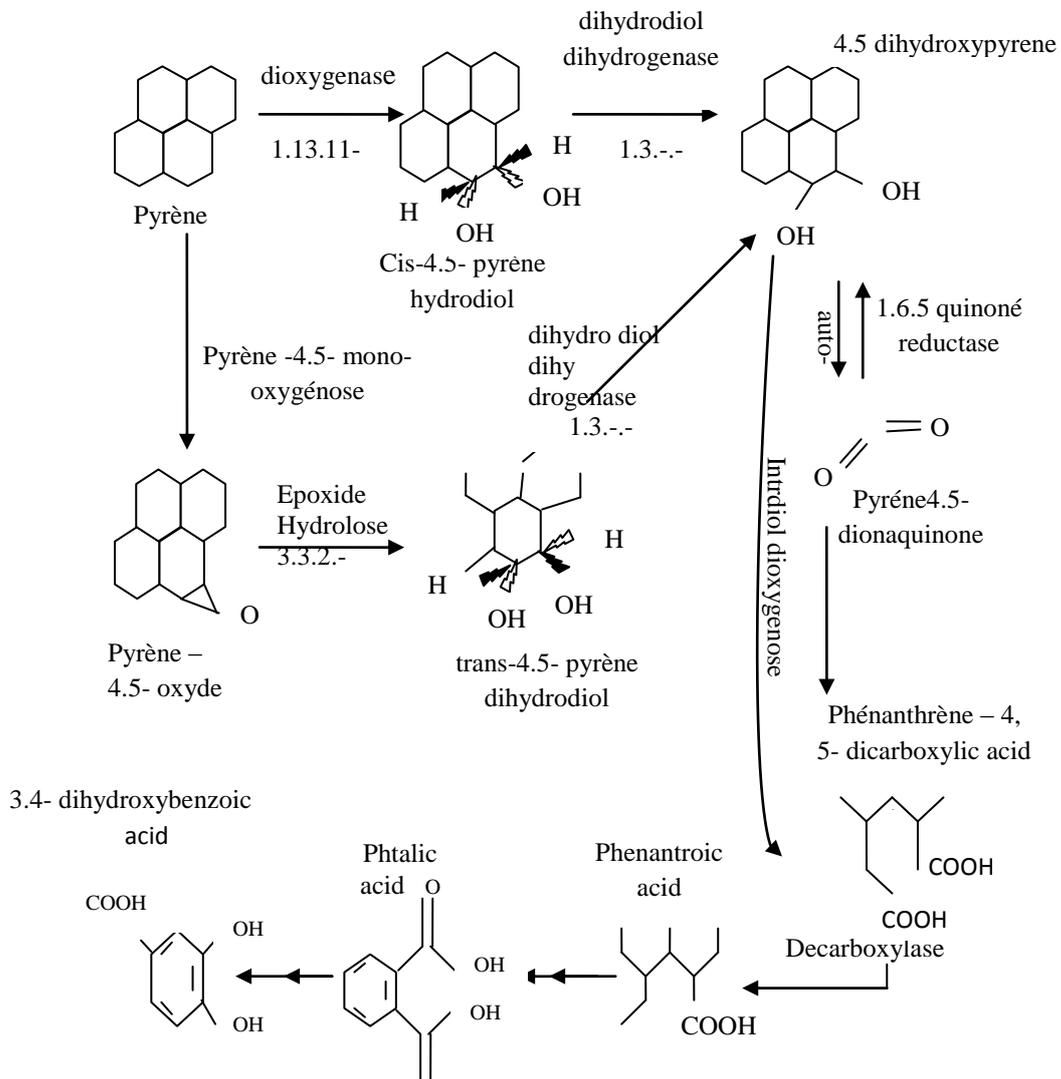


Fig. 2: Dégradation du pyrène proposée par Liang et al. (2006).

IV. Risques écotoxicologiques :

La pollution par les hydrocarbures pose d'importants problèmes dans l'environnement, vis-à-vis des microorganismes, des plantes, des animaux et de la santé humaine.

Il existe très peu d'études sur la toxicité des hydrocarbures vis-à-vis de l'homme, la plupart ont été menées sur des animaux, ce qui pose un problème d'extrapolation.

La toxicité diffère selon la voie et la durée d'exposition aux hydrocarbures (tableau 2).

Les hydrocarbures ont été classés pour leur cancérogénicité (tableau 3). Le 1,3-Butadiène et le benzène engendrent des leucémies, des tumeurs de l'estomac pour le premier et des cancers du système lymphatique, des poumons et de la vessie pour le second. Les HAP induisent des papillomes, des carcinomes et des adénomes chez le rat et la souris. Le benzo[a]pyrène est l'hydrocarbure aromatique polycyclique qui induit le plus grand nombre de tumeurs dans le délai le plus court (12 à 14 semaines). Il engendre des tumeurs de l'estomac, du pharynx, du larynx et de l'œsophage, en plus des tumeurs pulmonaires et des leucémies.

Certains hydrocarbures ne réagissent pas de la même façon quand ils sont seuls ou en mélange. En effet, le benzo[g,h,i]pérylène seul n'est pas cancérigène mais mélangé au benzo[a]pyrène il augmente la fréquence des cancers. Van Duuren et *al.* (1973) ont montré que l'exposition de souris au benzo[a]pyrène seul engendrait l'apparition de carcinomes et de papillomes chez 10 à 13 sur 50 contre 17 à 20 sur lorsqu'il est mélangé au benzo[g,h,i]pérylène. Selon Greiffe et Warshawsky (1993), cités par Pichard (2005), le fluorène seul n'induit pas de cancers sur les souris mais associé au benzo[a]pyrène il engendre l'apparition de papillomes.

Tableau 2: Effets toxiques des hydrocarbures sur l'homme et les animaux (Pichard, 2005 ; Bonner et al., 2005 ; Bonner et al., 2007 ; ICSC 2004 ; Cancel 2005).

Famille	Hydrocarbure	Exposition	Toxicité
Alcanes	Hexane	Aiguë	Chez l'animal : déresseur du système nerveux central (incoordination musculaire, coma), irritant respiratoire et cutané, aspiration du liquide létale en quelques secondes. Chez l'homme : somnolence avec céphalées, vertiges, nausées, irritation des yeux et des muqueuses respiratoires, l'ingestion et l'inhalation provoquent une pneumopathie avec détresse respiratoire.
		Chronique	Chez l'animal : neuropathie périphérique paralysie, irritation respiratoire et atteintes pulmonaires. Chez l'homme : atteintes du système nerveux (polynévrites périphériques sensitivo-motrices), dermatoses d'irritation
Alcènes	1,3-Butadiène	Aiguë	Chez l'animal : atteintes du système nerveux, mort par paralysie respiratoire (souris et rat), effet hématologique (lapin) et conjonctivite (lapin et souris). Chez l'homme : céphalées, flou visuel, irritation des yeux, de la gorge et des voies aériennes supérieures. Par contact, il entraîne des lésions de brûlures par le froid.
		Chronique	Chez l'animal : lésions dans le cœur, les poumons et l'estomac ; altération de la moelle osseuse : anémie macrocytaire....

Hydrocarbures aromatiques monocycliques	Benzène	Aiguë	Chez l'homme : dépression du système nerveux central, omnibulation et vomissement et enfin coma convulsif mortel.
		Chronique	Chez l'homme :
Hydrocarbures aromatiques polycycliques	Naphtalène	Aiguë	Chez l'animal : ingestion létale (souris, rat lapin), anémie hémolytique (chien), cataracte (lapin). Chez l'homme : anémie hémolytique, cataracte, intoxication aiguë, hémolyse, ictère...
		Chronique	Chez l'animal : anémie hémolytique, cataracte, inflammation chronique des poumons et des muqueuses nasales. Chez l'homme : céphalées, confusion, nausées, vomissements et anémie hémolytique.
	Fluorène	Aiguë	Chez l'animal : troubles hépatiques.
		Chronique	Chez l'animal : troubles hépatiques et hématologiques, ulcération de l'épithélium de l'intestin grêle.
	Fluoranthène	Aiguë	Chez l'animal : troubles du comportement.
		Chronique	Chez l'animal : néphropathie et lésions du foie.
	pyrène	Aiguë	Chez l'animal : néphropathie.
		Chronique	Chez l'animal : papillomes.

	Benzo[k]fluoranthène	Chronique	Chez l'animal : atteintes du système immunitaire.
	Benzo[a]pyrène		
		Chronique	Chez l'animal : lésions de l'estomac, du foie, des reins et de la moelle osseuse. Chez l'homme : lésions de la peau.

Tableau 3 : Effet cancérigène des hydrocarbures (Pichard, 2005 ; Bonner et al., 2005 ; Bonner et al., 2007 ; ICSC 2004 ; Cancel, 2005).

Hydrocarbure	Catégorie UE	Classe USEPA	Groupe IARC
1,3- Butadiène	1	-	-
Benzène	-	A	1
Naphtalène	3	C	2B
Fluorène	ND	D	3
Phénanthrène	ND	D	3
Anthracène	ND	D	3
Fluoranthène	ND	D	3
Pyrène	ND	D	3
Benzo[b]fluoranthène	2	B2	2B
Benzo[k]fluoranthène	2	B2	2B
Benzo[a]pyrène	2	B2	2A
Dibenzo[a,h]anthracène	2	B2	2B
Benzo[g,h,i]pérylène	ND	D	3
Indéno[1,2,3,c,d]pyrène	ND	B2	2B

Par ailleurs, les hydrocarbures peuvent avoir des effets génotoxiques. Le benzo[b]fluoranthène, le benzo[k]fluoranthène et le 1,3-Butadiène sont mutagènes.

Le dibenzo[a,h]anthracène induit des échanges de chromatides-sœurs et une détérioration de l'ADN in vitro. L'héxane est tératogène chez la souris.

La plupart des hydrocarbures reconnus pour leur toxicité sont naturellement présents en mélange dans le pétrole brut, l'être humain peut ainsi y être exposé (soit directement au pétrole, soit par l'utilisation de produits raffinés,...).

Concernant les effets écotoxiques, beaucoup d'études ont porté sur les organismes aquatiques mais très peu ont été menées sur les végétaux et les organismes vivants du sol (tableau 4).

D'après Dommergues et Mangenot (1970), l'épandage subit d'une quantité importante d'hydrocarbure sur un sol exerce une action dépressive sur la microflore surtout les germes nitrificateurs et cellulolytiques. L'ammonification est également réduite (Sparrow et Sparrow, 1988). Mais les espèces susceptibles de s'adapter prolifèrent et leur nombre et activité peuvent même dépasser leurs valeurs d'avant traitement.

Cependant, la dégradation des hydrocarbures par ces espèces provoque une immobilisation de l'azote contenu dans le sol du fait que ces composés ont un rapport C/N élevé. Ceci induit une réduction de la croissance des plantes et des rendements et de l'activité microbienne. On parle alors de toxicité indirecte.

Certains HAP agissent comme des solvants et sont alors vivement toxiques pour les organismes du sol. Ceci concerne en général les HAP de faible poids moléculaire.

Mais à fortes concentrations dans le sol, le pétrole provoque une mortalité totale des plantes et aucune végétation ne s'y installe par la suite (Sparrow et Sparrow, 1988).

Tableau 4 : Toxicité des hydrocarbures sur les végétaux et les organismes vivants du sol (Pichard, 2005).

Hydrocarbure	Organismes vivants du sol			
	Végétaux	CE50	Invertébrés	CE50
Phénanthrène			Annélides <i>Folsoma candida</i>	21j 88j
Anthracène	<i>Avena sativa</i> <i>Cucumis sativus</i>	30 720		
Benzo[a]pyrène			<i>Eisena fetida</i> <i>Enchytraeus crypticus</i> <i>Porcellis scraber</i> <i>Oniscus asellus</i>	28j 25j 63j 63j

CE50 : Concentration d'un polluant qui cause un effet toxique donné chez 50% des individus exposés après un temps d'exposition normalisé.

J : jours

Par ailleurs, la présence de fractions volatiles pollue l'atmosphère, alors que les composés hydrosolubles sont entraînés par lessivage, contaminant ainsi les eaux du sous-sol (Morill et *al.*, 1982 ; Cerniglia, 1992).

D'après Duchaufour (1991), les hydrocarbures soumis à une infiltration rapide sur un sol très perméable ou fissuré s'accumulent à la surface des nappes aquifères.

Aussi, Wilste et *al.* (1997) notent que si les composés aromatiques persistent dans le sol, il y a des risques de transfert de ceux-ci dans la plante et dans le corps des animaux d'élevage.

Les HAP sont classés par l'USEPA comme étant les polluants les plus sérieux. En effet, la santé de l'homme est mise en danger par la présence de tels hydrocarbures dans son environnement sachant qu'ils contiennent des composés à poids moléculaire élevé reconnus comme mutagènes et cancérigènes, d'où la nécessité de traiter les sites contaminés par ces substances.

Plusieurs organismes ont arrêté des seuils à partir desquels les hydrocarbures deviennent toxiques pour l'homme (tableau 5).

Tableau 5: Valeurs limites d'exposition aux hydrocarbures

Hydrocarbure	OMS ERU	USEPA ERU	RIVM CR	OEHHA ERU
1,3-Butadiène		2		
Benzène	1	0,5		
Naphtalène	5.10^{-2}	2.10^{-2}	4.10^{-2}	
Acénaphène	0,6	6.10^{-2}		
Fluorène	0,4	4.10^{-2}	4.10^{-2}	
Phénanthrène			4.10^{-2}	
Anthracène	10	0,3	4.10^{-2}	
Fluoranthène	0,5	4.10^{-2}	5.10^{-2}	
Pyrène		3.10^{-2}	0,5	
Benzo[b]fluoranthène			5.10^{-3}	
Benzo[k]fluoranthène			5.10^{-3}	$1,1.10^{-4}$
Benzo[a]pyrène		7,3	4.10^{-4}	$1,1.10^{-3}$
Dibenzo[a,h]anthracène			5.10^{-4}	4,1
Benzo[g,h,i]pérylène			30	
Indéno[1,2,3,c,d]pyrène			5.10^{-3}	$1,1.10^{-4}$

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

USEPA : US Environmental Protection Agency

RIVM : National Institute for Public Health and Environment

OEHHA : Office of Environmental Health Hazard Assessment

ERU : Excès de Risque Unitaire en $(\text{mg/kg/j})^{-1}$ ou en $(\mu\text{g/m}^3)^{-1}$

CR : Cancer Risk en mg/kg/j

V. Procédés de traitement des sites contaminés par les hydrocarbures :

La pollution par les hydrocarbures, qu'elle soit chronique ou accidentelle, pose d'importants problèmes d'élimination. Il existe de nombreux moyens de traitement ; physico-chimiques, thermiques et biologiques.

A chaque technique de traitement correspond un seuil susceptible d'être atteint. Les traitements biologiques nécessitent des traitements au laboratoire pour déterminer ce seuil (Mougin et *al.*, 1996).

V.1. Procédés physiques :

Plusieurs techniques sont utilisées parmi lesquelles figurent :

V.1.1. Le lavage :

La récupération de la phase résiduelle d'un polluant piégé dans la matrice du sol se fait par un simple lavage de la terre polluée.

Le lavage des sols se pratique principalement sur les matériaux grossiers. Hors site, il consiste en plusieurs opérations succédant à l'excavation de la terre souillée:

-un tri granulométrique préalable des terres permettant de séparer les particules grossières des particules les plus fines sur lesquelles la pollution a tendance à se concentrer. Les particules fines sont en général incinérées ;

-une élimination des polluants liés aux particules les plus grossières par l'extraction par un solvant, par la flottaison ou par des techniques utilisant les forces mécaniques pour détacher les polluants des particules de sol.

Sur site, la phase polluante est entraînée par injection de liquide ou de vapeur et en repompant l'ensemble liquide et polluant.

Le lavage s'applique surtout aux produits organiques, mais peut s'adresser à d'autres produits solubles tels que les sels minéraux.

V.1.2. Le venting :

C'est une technique très utilisée, pour sa grande efficacité et son coût relativement faible, pour l'extraction de polluants volatils contenus dans un sol tels que les hydrocarbures légers et d'autres produits volatils.

Elle est appliquée *in situ* pour traiter la partie non saturée du sol. Le principe consiste à envoyer dans le sol un flux d'air et à pomper au sein de la zone contaminée l'air chargé de gaz polluants. En sortie, les gaz polluants seront traités à leur tour avant la diffusion de l'air pompé dans l'atmosphère.

Cette technique n'est applicable que dans le cas où le polluant est suffisamment volatil (constante de Henry supérieure à 0.01).

V.1.3. Le stripping :

C'est l'extraction par venting appliquée à la nappe. Il est réalisé sur site après avoir pompé l'eau.

Le dispositif est généralement formé d'une colonne, l'eau est introduite au sommet et percole par gravité jusqu'au fond où elle est récupérée. L'air est introduit en bas de la colonne et est récupérée au sommet. Les polluants volatils contenus dans l'eau sont désorbés et entraînés par le flux d'air vers le sommet où ils sont récupérés puis traités avant que l'air ne soit rejeté dans l'atmosphère.

V.1.4. La stabilisation :

C'est une technique qui permet de piéger les polluants à l'intérieur d'une matrice : ils ne sont plus disponibles et leur potentiel de relargage dans le milieu naturel est neutralisé. Il s'agit de transformer un produit relativement soluble en un composé non soluble en le mélangeant à différents adjuvants pour en faire un matériau composite peu perméable et non réactif.

Elle peut se faire par liants minéraux ou organiques ou par vitrification.

Les polluants ainsi traités ne sont pas détruits mais leur impact potentiel sur l'environnement est fortement diminué.

V.1.5. Le pompage et traitement :

Lorsque la pollution atteint la nappe phréatique, l'eau est pompée puis traitée avant d'être réinjectée. Cette technique est améliorée par l'utilisation de tensioactifs.

Elle est utilisée pour les polluants liquides surnageant à la surface de la nappe phréatique tels que les hydrocarbures, les huiles...

Les principaux inconvénients de ces méthodes sont leurs coûts et leur spécificité car ils ne peuvent être appliqués que pour certains composés.

V.2. Procédés chimiques :

V.2.1. La mobilisation et l'extraction :

Il s'agit de mobiliser le polluant par une solution et de le transférer à l'extérieur du milieu pollué.

Cette technique peut être appliquée *in situ* en aspergeant le sol par une solution qui s'infiltré et mobilise le polluant avant d'être pompée. Sur site, le sol à traiter est mélangé à la solution dans un tambour tournant pour permettre un mélange parfait et provoquer la mobilisation du polluant.

Plusieurs types de produits sont utilisés parmi lesquels on distingue l'eau pure, les acides-bases, les solvants, les tensioactifs, en fonction du type de polluant. L'eau pure est utilisée pour les contaminants solubles dans l'eau, alors que les acides visent surtout les métaux lourds. Les surfactants quant à eux, sont utilisés pour les produits naturellement hydrophobes car leur fonction première est de favoriser la cassure des grosses molécules organiques.

V.2.2. Les réactions chimiques :

Le principe consiste à provoquer la réaction des polluants avec certains réactifs qui généreront des composés moins toxiques et éventuellement avec une mobilité différente.

Cette technique, habituellement appliquée sur site, est généralement réservée aux composés organiques peu volatils et difficilement biodégradables (solvants chlorés, HAP, pesticides...).

Il existe trois types de réactions : l'oxydation utilisant l'ozone ou l'eau oxygénée, la réduction par des métaux en poudre et la déchloration qui vise à transformer les molécules chlorées en molécules moins chlorées, donc moins toxiques.

V.3. Procédés thermiques :

Leur principe consiste à chauffer le matériel contaminé pour en extraire les polluants et les détruire dans la majorité des cas. Différentes techniques sont appliquées :

V.3.1. L'incinération :

C'est une technique très ancienne utilisée artisanalement par l'Homme pour se débarrasser de ses déchets. Elle s'adapte à tous les types de déchets et toutes les familles de polluants. Elle s'applique aux poussières résiduelles dans lesquelles se concentre la pollution jusqu'à 20g / Kg (Koller, 2004).

L'incinération est réalisée en deux étapes : la volatilisation est réalisée à une température de 400°C et la destruction à plus de 1000°C. A cette température, tous les polluants présents sont volatilisés et le sol sera remis en place après refroidissement. Les gaz volatilisés sont entraînés par un flux d'air qui sera soumis à une combustion à 900 – 1300°C. Tous les composés organiques sont détruits, les molécules étant décomposées en CO₂ et H₂O libérés dans l'atmosphère ; c'est la destruction.

L'incinération représente une des seules méthodes détruisant réellement les polluants, elle ne se limite pas à un simple déplacement ou confinement.

V.3.2. La désorption thermique :

C'est une technique appliquée pour les composés volatils ou semi-volatils, elle représente une option intéressante moins lourde à mettre en place que l'incinération.

Le matériel à traiter est mis dans un séchoir à une température de 250 à 450°C, de quelques dizaines de minutes à quelques heures. Le flux gazeux est entraîné vers la partie de traitement des gaz et les composés organiques sont concentrés en phase liquide par refroidissement et séparés de la phase gazeuse qui sera adsorbé sur charbon actif.

V.3.3. La pyrolyse :

C'est le chauffage du matériau pollué en l'absence d'oxygène à une température de quelques centaines de degrés (450 à 600°C). La pyrolyse provoque le « cracking »

des molécules organiques en composés simples tels que le méthane. Elle convient aux sols riches en matières organiques et aux déchets.

V.3.4. La vitrification :

Ce procédé consiste à transformer par élévation de la température un sol contaminé en place en un matériau fondu inerte. Le sol est chauffé par des électrodes à une température de l'ordre de 2000°C et il est transformé par pyrolyse en un verre silicaté où tous les composés présents sont fondus ou vaporisés.

Pour collecter les gaz, un couvercle et une aspiration d'air sont placés au dessus de la zone à vitrifier et traités séparément.

Le traitement thermique peut se faire soit dans un centre collectif de déchets, soit sur site. Le traitement dans un centre collectif est généralement réservé aux produits très chargés en hydrocarbures aromatiques polycycliques (Costes et Druelle, 1997 ; Mougin *et al.* 1996).

L'incinération n'est pas une technique optimale pour les sols. Il convient donc de développer des techniques économiques, environnementales et adaptées à toutes les fractions des hydrocarbures.

V.4. Procèdes biologiques :

La biodégradation d'un composé organique s'effectue sur plusieurs étapes. La réaction donnée par Chaineau *et al.* (1996) est la suivante :



Les procédés biologiques consistent à utiliser des organismes supérieurs et des microorganismes pour dégrader les polluants organiques.

Ils représentent une autre alternative pour le traitement des sols contaminés par les hydrocarbures. Leur principe de base est d'exploiter le pouvoir auto épurateur du sol.

Ces procédés reposent sur les populations microbiennes, elles-mêmes régies par les facteurs du milieu (Holden et Firestone, 1997).

La voie biologique est actuellement en plein essor et suscite de nombreux

travaux de par le monde. C'est un moyen plus économique étant donné qu'il ne coûte qu'environ 1/5 et 1/10 du coût des traitements chimiques et des procédés thermiques respectivement (Mougin et *al.*, 1996).

V.4.1. Le bioréacteur :

Son principe consiste à réaliser la biodégradation du polluant dans un contenant installé sur le site en ajoutant au matériel à traiter les ingrédients nécessaires à la réaction. On peut traiter de cette façon l'eau, pompée au préalable, le sol qui sera excavé et traité sous forme de boue ou des phases gazeuses (on parle alors de biofiltre).

Le bioréacteur permet de gérer précisément le processus de biodégradation par le contrôle du pH, de la température, de l'humidité et des teneurs en nutriments.

Les conditions optimales peuvent être rapidement atteintes, d'où les bons rendements opérationnels de la méthode.

En fonction du polluant on peut ajouter des microorganismes adaptés pour le traitement qu'il s'agisse de souches autochtones ou allochtones.

Dans la plupart des dispositifs, il y a plusieurs réacteurs en chaîne, le matériel à traiter transitant de l'un à l'autre. Les nutriments sont ajoutés au niveau du premier réacteur. Des microorganismes sont également ajoutés à ce niveau si nécessaire. Un brassage mécanique est réalisé dans chaque réacteur permettant un mélange vigoureux de l'ensemble des constituants de la réaction. L'air est pulsé par le fond du réacteur et est récupéré au sommet chargé d'une éventuelle phase gazeuse polluée qui est dirigée vers un système d'épuration.

Pour les sols ou les déchets, cette technique est particulièrement adaptée si on est en présence de fortes teneurs en polluants organiques. En revanche, les coûts sont nettement supérieurs à ceux des techniques de dépôt *in situ*.

V.4.2. La biodégradation en tas :

V.4.2.1. Le compostage :

Le sol excavé est déposé en andins régulièrement espacés. Dans des conditions naturelles, le processus de dégradation est très lent. Pour accélérer le phénomène, on

peut mélanger la terre à un substrat organique grossier qui favorisera l'aération et apportera un complément nutritif à la réaction.

Les rendements de cette technique étant très faibles, il est préférable de la réserver aux contaminants aisément biodégradables et qui doivent être peu volatils pour éviter leur libération dans l'atmosphère.

V.4.2.2. Le land farming :

Le sol est étalé sur une surface imperméable. Des fertilisants sont ajoutés au sol qui est travaillé, retourné et biné, à intervalles réguliers pour permettre son aération et pour favoriser le développement des microorganismes. C'est une technique adaptée aux contaminants peu volatils et est souvent utilisée pour restaurer les sols contaminés par les hydrocarbures. Les surfaces ainsi décontaminées peuvent être utilisées ultérieurement comme terrain agricole.

V.4.2.3. Les biopiles ou biotertres :

C'est une technique utilisée lorsque le sol pollué contient une fraction de contaminants volatils non négligeable. Elle nécessite une mise en tas du sol qui sera recouvert d'une membrane imperméable. Le matériau à traiter est étalé sur une surface imperméable légèrement en pente. A la base du tas, une tuyauterie est installée permettant l'aération du matériau et au sommet, un dispositif d'aspersion servira à l'humidifier. Des rigoles permettent de récupérer l'eau sortant du tas et à laquelle on ajoute les nutriments et les microorganismes nécessaires. Les gaz sont aspirés et traités avant d'être libérés dans l'atmosphère.

V.4.3. Le bioventing et le biosparging :

Consiste à introduire l'air au sein de la zone contaminée afin d'apporter l'oxygène nécessaire au métabolisme aérobie des microorganismes capables de dégrader les produits organiques à l'origine de la pollution.

Un apport de nutriments est généralement nécessaire pour rééquilibrer le rapport carbone / azote / phosphore. L'air est récupéré par aspiration.

Le débit d'injection / aspiration est maintenu suffisamment faible pour laisser le

temps à la flore microbienne de dégrader les produits polluants volatilisés.

Cette technique permet de supprimer ou de réduire la nécessité du traitement de l'effluent gazeux avant son rejet dans l'atmosphère.

V.4.4. La phytoremédiation :

Regroupe toutes les techniques qui utilisent les végétaux épurateurs du milieu. Les familles de polluants concernées sont d'abord les métaux lourds et les hydrocarbures.

Elle permet l'accélération des phénomènes naturels de biodégradation. Les racines interviennent directement ou indirectement en stimulant la croissance et l'activité des microorganismes (Joner et Leyval, 2003).

Duchaufour (1991), Wilste (1998) et Banks et *al.* (1999) préconisent l'utilisation de légumineuses, ou de plantes fourragères pérennes.

Les végétaux peuvent agir par différents processus : la rhizofiltration, la phytoextraction et la phytostabilisation adaptées aux métaux lourds, la phytotransformation et la phytostimulation applicables aux polluants organiques.

V.4.4.1. La phytotransformation :

Favorise la dégradation des polluants organiques complexes en composés plus simples qui seront intégrés dans les tissus végétaux. Elle est généralement associée à la biodégradation en tas et concerne les polluants facilement biodégradables.

V.4.4.2. La phytostimulation :

Il s'agit d'une stimulation de la dégradation microbienne par les exsudats et les enzymes libérés dans la rhizosphère, ce qui entraîne la destruction des polluants organiques présents.

Ces techniques sont adaptées à des sites présentant des pollutions à faible niveau de concentration mais sur de larges volumes. Elles sont considérées comme des techniques de finition, une fois que des traitements plus énergiques sont réalisés pour la zone très polluée.

Pour améliorer et compléter les procédés biologiques, certaines techniques peuvent être utilisées telles que :

V.4.5. Les traitements combinés :

Ils visent à réduire la taille des molécules des polluants ou à les solubiliser, par l'apport de biosurfactants par exemple, facilitant ainsi leur accessibilité aux microorganismes.

V.4.5.1. La bioaugmentation :

Consiste en l'introduction au sol de bactéries exogènes sélectionnées et multipliées au laboratoire.

V.4.5.2. La biostimulation :

Consistant en l'accélération des phénomènes biologiques de dégradation en apportant au sol des éléments nutritifs, généralement l'azote et le phosphore, ou d'autres substances augmentant le potentiel de biodégradation des sols.

V.4.5.3. L'utilisation d'inoculums fongiques :

Grâce à leur mécanisme d'attaque par des enzymes extracellulaires, ils confèrent au système enzymatique une accessibilité au substrat bien supérieure à celle des systèmes intracellulaires.

Les procédés biologiques sont souvent qualifiés d'économiques (tableau 6) et d'écologiques. Cependant, ceux-ci restent à développer compte tenu des nombreuses interactions entre le sol, les microorganismes et les polluants.

Tableau 6: Estimation des coûts des procédés de décontamination (Koller, 2004).

Procédés de décontamination		Coût (€)
Procédés physiques	Lavage sur / hors site	150 à 200
	<i>In situ</i>	60 à 100
	Stabilisation	27,7 à 221,5
	stripping	27,7 à 55,4
	pompage et traitement	18,5 à 92,3
	venting	10 à 40
Procédés chimiques	Lavage chimique sur sol excavé	28,7 à 110,7
	Réduction / oxydation	18,5 à 110,7
Procédés thermiques	Pyrolyse	100 à 400
	Incinération	240 à 554
	Vitrification	200 à 300
Procédés biologiques	biopiles	75 à 100
	compostage, land farming	18,5 à 73,8
	bioréacteurs	50 à 100
	biosparging, bioventing	18,5 à 55,4
	phytoremédiation (phytoextraction)	0,03 à 2,2

Selon Rosenberg (1992), la dégradation des hydrocarbures nécessite un contact direct des microorganismes avec leur substrat. Pour ce faire, les bactéries ont développé deux stratégies parmi lesquelles figure la production d'agents émulsifiants extracellulaires.

L'injection de tensioactifs permet d'améliorer la solubilité et le drainage des produits organiques tels que les hydrocarbures dont la dégradation sera achevée dans les réacteurs biologiques. Les durées seront ainsi sensiblement réduites.

Cependant, l'usage de surfactants chimiques peut occasionner des problèmes supplémentaires à cause de leur toxicité et leur non dégradabilité. C'est pourquoi, ils tendent à être remplacés par des surfactants biologiques qui feront l'objet de la partie suivante.

VI. Les biosurfactants :

L'intérêt accordé aux biosurfactants a augmenté ces dernières années, ceci étant dû essentiellement à leur application potentielle dans l'amélioration de la production assistée du pétrole.

Les biosurfactants sont préférés aux surfactants synthétiques par le fait qu'ils présentent une grande diversité structurale, ce qui élargit leurs domaines d'application (Lin et *al.*, 1994), mais c'est surtout pour leur biodégradabilité. Les surfactants synthétiques sont résistants à la biodégradation et sont toxiques quand ils s'accumulent dans les écosystèmes (Babu et *al.*, 1994 ; Banat, 1994 ; Lin et *al.*, 1994).

Les biosurfactants sont également plus économiques (Lin et *al.*, 1994) et sont moins sensibles aux températures et pH extrêmes et à la salinité (Singer, 1985).

VI.1. Définition :

Les biosurfactants sont des composés tensioactifs d'origine microbienne. Ces biomolécules peuvent réduire la tension de surface et la tension interfaciale (Georgiou, 1992 ; Jennings et Tanner, 2000). Ce sont des molécules amphiphiles avec une partie hydrophile et une partie hydrophobe. Ils sont sécrétés par les cellules pour faciliter l'absorption d'un substrat insoluble. Ils sont également impliqués dans l'adhésion des cellules microbiennes aux hydrocarbures (Fiechter, 1992).

Leurs propriétés permettent de créer des microémulsions : il se forme des micelles dans lesquelles les hydrocarbures peuvent se solubiliser dans l'eau ou inversement. La fonction des biosurfactants est de solubiliser les substances hydrophobes pour améliorer leur assimilation par les microorganismes.

VI.2. Propriétés :

Du point de vue structural, le fait que les biosurfactants soient des molécules amphiphiles leur confère l'aptitude à se concentrer aux interfaces réduisant ainsi la tension de surface et la tension interfaciale.

Par ailleurs, l'émulsification due aux biosurfactants augmente la surface entre deux phases immiscibles pour donner de petites gouttes de pétrole dans l'eau.

Ainsi les microorganismes utilisant des hydrocarbures insolubles dans l'eau

tirent profit de la présence des biosurfactants (Marikawa et *al.*, 1993).

Les paramètres permettant d'évaluer la production des biosurfactants par les différentes bactéries et leur efficacité sont la tension de surface, la tension interfaciale et la concentration micellaire critique (CMC).

VI.2.1. La tension de surface :

C'est la tension entre un liquide et un gaz (eau / air par exemple). Un bon surfactant est capable de réduire la tension de surface de l'eau distillée de plus de la moitié.

Les propriétés tensioactives des biosurfactants ne sont pas affectées par le pH, la température et la salinité (Gutnick, 1984 ; Rocha et *al.*, 1992). C'est un avantage de plus que présentent les biosurfactants par rapport aux surfactants de synthèse.

VI.2.2. La tension interfaciale :

C'est la tension aux interfaces liquide / liquide. Elle se mesure à l'interface d'un liquide typique. On utilise généralement des n-alcanes.

VI.2.3. La concentration micellaire critique :

C'est la concentration minimale à partir de laquelle un biosurfactant est efficace. Pour des concentrations supérieures ou égales à la CMC, la tension de surface diminue considérablement.

VI.3. Classification des biosurfactants :

Les biosurfactants forment un groupe hétérogène de composés tensioactifs vu la diversité de leurs molécules (Banat, 1994). En se basant sur leur structure chimique, ils sont classés en trois groupes principaux :

VI.3.1. Les glycolipides :

Dans ces molécules la partie hydrophobe est formée par une chaîne d'acides gras et la partie hydrophile par un sucre. Il peut s'agir du tréhalose, sucrose, fructose, rhamnose et autre. Leur structure comporte une ou deux molécules de sucre.

Pseudomonas aeruginosa produit des rhamnolipides dans lesquels la partie hydrophile est constituée de rhamnose.

VI.3.2. Les lipoprotéines :

Ce sont des acides aminés contenant des lipides. Leur partie hydrophile est constituée d'acides aminés. Ce groupe inclut les biosurfactants les plus puissants ; le plus connu étant la surfactine produite par *Bacillus subtilis*. Il résulte de la liaison de sept acides aminés à une molécule de lipide (Fiechter, 1992).

Ils sont plus hétérogènes que les glycolipides (Morikawa et al., 1993).

VI.3.3. Les lipopolysaccharides :

Ce sont des biosurfactants contenant des complexes polysaccharide-lipide. Ce type de biosurfactants s'obtient par la croissance des levures sur les hydrocarbures (Fiechter, 1992). Le plus connu est l'émulsan. C'est un lipo-hétérosaccharide produit par *Acinetobacter calcoacetus* capable de dégrader les hydrocarbures. L'émulsan stabilise l'émulsion formée par l'hydrocarbure dans l'eau et a une activité optimale en présence d'un mélange de composés aliphatiques et aromatiques, c'est le cas dans le pétrole brut (Foght et al., 1989).

VI.4. Production des biosurfactants :

Les biosurfactants sont produits par une variété de microorganismes incluant les bactéries, les champignons et les levures (Singer, 1985 ; Fiechter, 1992). Leur production est généralement associée à la croissance des microorganismes sur des n-alcanes. Mais de nombreux travaux ont montré que cette production était également possible dans un milieu contenant des glucides ou un mélange hydrocarbure et glucide. La souche PET. 1006 nécessite deux sources de carbone : une source facilement utilisable (glucose) et un hydrocarbure qu'elle utilisera après l'épuisement de la première (Banat et al., 1991).

D'autres substrats tels que l'huile d'olive ont été utilisés. Le type et la quantité de biosurfactants sont influencés par la composition du milieu minéral et par la source de carbone utilisée. Ainsi, la même souche peut produire des biosurfactants différents

si la composition du milieu de culture change.

Une même souche peut produire deux biosurfactants de même nature mais de structure différente. Ainsi *Pseudomonas aeruginosa* produit deux rhamnolipides : R-1 contenant deux molécules de rhamnose et R-2 constitué d'une seule molécule de rhamnose, et les deux sont essentiels pour la croissance de cette souche sur les hydrocarbures (Guerra Santos et al., 1984a).

La production des biosurfactants ne concerne pas que les bactéries capables de dégrader les hydrocarbures (Jennings et Tanner, 2000).

Pour une production industrielle, l'utilisation de sucres est préférable car elle est plus économique (Guerra-Santos et al., 1984b).

VI.5. Applications des biosurfactants :

Les domaines d'application potentielle des biosurfactants sont divers incluant le secteur de l'énergie, l'environnement, l'agriculture, le cosmétique, l'industrie pharmaceutique et l'alimentaire.

Les biosurfactants sont particulièrement intéressants dans l'amélioration de la production du pétrole. Ils sont utilisés dans la production assistée étant donné que seulement 30 à 50 % du pétrole peuvent être extraits. Des valeurs bien plus élevées peuvent être atteintes en utilisant les biosurfactants pour mobiliser le pétrole restant (Finnerty et Singer, 1984 ; Fiechter, 1992).

Une autre technique nouvelle consiste à injecter des cultures microbiennes dans les réservoirs et les biosurfactants qu'elles produisent augmentent la disponibilité du pétrole (Finnerty, 1992). Economiquement cette technique est très attirante (Georgiou et al., 1992).

Ils sont utilisés aussi pour le nettoyage des bacs de stockage et pour faciliter le transport du pétrole lourd en réduisant sa viscosité (Fiechter, 1992).

L'application des biosurfactants dans l'environnement est idéale puisqu'ils sont biodégradables. Les contaminants organiques sont adsorbés sur la matrice du sol limitant leur biodégradation. L'utilisation des biosurfactants les libère et les rend disponibles pour les souches capables de les dégrader (Dean et al., 2001).

Le lipopeptide produit par *Bacillus licheniformis* forme une émulsion avec le

pétrole brut, avec les pesticides et les détergents ce qui le rend intéressant pour une éventuelle utilisation dans la dépollution des sols (Babu, 1994).

L'utilisation des rhamnolipides pour le lavage de sables contaminés par du brut a été efficace (Georgiou, 1992 ; Harvey et *al.*, 1990). D'après Scheibenbogen (1994), 30 et 40 % des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques respectivement ont été éliminés comparés à 8,9 et 7,2 seulement en lavant ces mêmes sols avec de l'eau (Banat, 1994).

Les biosurfactants sont préférés aux surfactants chimiques car, en plus de leur meilleure biodégradabilité, ils sont moins toxiques (Gutnick, 1984 ; Banat, 2000).

VII. Conclusion :

La source de pollution la plus importante reste les combustibles fossiles où le pétrole occupe une place de choix. En effet, de par sa commodité au transport et au stockage, le pétrole est encore irremplaçable. Mais l'extraction, le raffinage, le transport, le stockage et l'utilisation de ce combustible ont des conséquences importantes en termes de pollution.

La voie la plus intéressante pour son élimination est la biodégradation. Mais cette voie est confrontée au problème de disponibilité de certaines fractions pour les microorganismes. Pour cette raison, nous nous proposons d'essayer de dépolluer un sol artificiellement contaminé par les hydrocarbures en utilisant des biosurfactants et des souches capables de dégrader les hydrocarbures en traitement combiné, en optimisant la biodégradation par l'apport de fertilisants.

Matériels et méthodes

Chapitre II : Matériels et méthodes

I- Introduction :

Notre travail a pour objectif d'essayer de réhabiliter un sol agricole contaminé par le pétrole en utilisant des souches bactériennes et des biosurfactants.

Ce chapitre a pour but de décrire les différents protocoles et méthodes mis en œuvre au cours de ce travail. Certains protocoles sont détaillés en annexe.

II -Matériels d'étude :

II.1. Le sol :

Notre choix s'est porté sur un sol de type rouge fersiallitique lessivé. Nous avons retenu l'horizon 0-15 cm de texture limoneuse et de pH neutre.

Les caractéristiques analytiques sont consignées dans le tableau 7.

Tableau 7: caractéristiques analytiques de l'échantillon de sol

Texture		limoneuse
COT (%)		1,92
MO (%)		3,30
C/N		13,71
N total (%)		0,14
Phosphore assimilable (ppm)		0,03
pH		7,3
Complexe absorbant (meq/100g de terre)	Na	0,09
	K	0,00
	Ca	0,36
	Mg	0,01

C'est un sol agricole présentant un rapport C/N légèrement élevé pour un horizon labouré. Il est carencé en cations avec dominance du calcium. La teneur de ce sol en potassium est nulle.

Selon Baize (2000), la dominance du calcium est observée en général dans les sols restaurés par des amendements agricoles. Il signale aussi que le rapport C/N est de l'ordre de 9 dans les horizons de surface labourés. Lorsqu'il est supérieur à 12, la minéralisation rencontre des difficultés.

II.2. Les hydrocarbures :

Les déchets d'hydrocarbures utilisés pour l'isolement de souches microbiennes proviennent de la raffinerie d'Alger.

Les caractéristiques analytiques sont consignées dans le tableau 8.

Tableau 8: *Caractéristiques analytiques des déchets d'hydrocarbures (Drider et Sennoun, 2000)*

Eléments	C	N	P
Teneur en %	45-50	0.2-0.8	0.015-0.03

A part une concentration élevée en carbone, on note des concentrations relativement faibles de tous les autres éléments : N, P, ...

Il faut souligner que ces hydrocarbures présentent des rapports C/N et C/P relativement élevés, de l'ordre de 95 et 2065 respectivement, ce qui peut constituer un handicap à leur biodégradation dans les sols.

Le recours à la chromatographie en phase gazeuse (figure 3) fait ressortir que ce matériel est constitué en majorité de n-paraffines. Il présente également d'autres fractions qui n'ont pas pu être identifiées, les pics leur correspondant étant trop petits.

Pour l'essai de décontamination, et afin de rapprocher cette étude de la source potentielle de pollution, notre étude a fait appel à un hydrocarbure provenant de Hassi Messaoud. Il s'agit du pétrole à l'état brut tel qu'il est habituellement acheminé via les

oléoducs. Il s'agit d'un mélange de composés aliphatiques et de composés aromatiques dans des proportions de 45 à 50% et 30 à 35% respectivement.

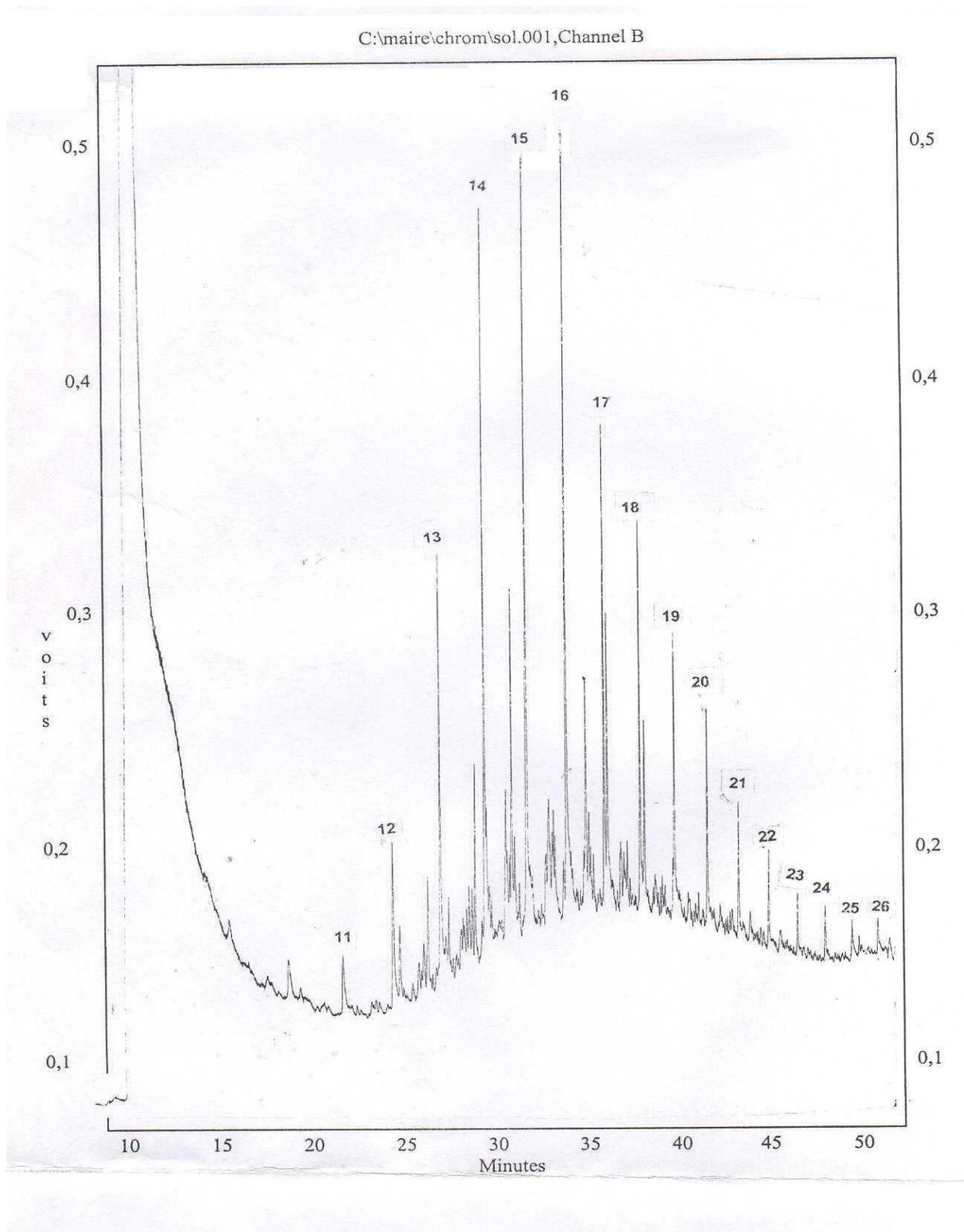


Fig. 3: Chromatographie en phase gazeuse des déchets d'hydrocarbures

II.3. Matériels biologiques :

II.3.1. Inoculum :

L'inoculation est réalisée par une culture mixte des quatre souches isolées. Il s'agit de :

- *Pseudomonas fluorescens*
- *Pseudomonas mendocina*
- *Alcaligenes denitrificans*
- *Aeromonas hydrophila*

Une étude morphologique et physiologique de ces souches a été effectuée dans la première partie de ce mémoire.

II.3.2. Biosurfactants :

Les biosurfactants expérimentés dans cette étude sont ceux produits par *P. fluorescens* et *P. mendocina*. Une étude détaillée de la méthode d'obtention de ces tensioactifs sera décrite ultérieurement.

III- Méthodes d'étude :

III.1. Isolement et caractérisation des souches :

III.1.1. Isolement :

L'isolement des souches (figure 4) a été effectué à partir de déchets d'hydrocarbures par culture d'enrichissement sur un milieu contenant une source de carbone, une source d'azote, de phosphore, de potassium, de magnésium, et de sodium (Foght et *al.*, 1988 ; Grifoll et *al.*, 1992 ; Dean et *al.*, 2001).

La composition du milieu est indiquée dans le tableau 9.

Après plusieurs étalements successifs (fig.5), la pureté des cultures a été vérifiée. Les bactéries ainsi isolées ont été entretenues sur un milieu ayant la composition indiquée dans le tableau 9 sauf que le glucose est remplacé par 1g de fructose (figure 6) et sont conservées ensuite à 4°C.

Tableau 9 : Composition du milieu d'ensemencement

KH ₂ PO ₄ -----	5g
K ₂ HPO ₄ -----	2g
MgSO ₄ -----	2g
NaNO ₃ -----	5g
NaCl -----	0,1g
Extrait de levure ----	3g
Glucose -----	15g
Agar agar -----	20g
Eau -----	1000 ml

III.1.2. Identification :

III.1.2.1. Etude morphologique :

L'aspect des colonies (diamètre, élévation, consistance...) a été déterminé après croissance sur gélose nutritive ; la morphologie cellulaire (forme, mensurations, mobilité...) a été examinée au microscope sur des cellules après croissance en notant l'aspect de la culture.

La coloration de Gram a été effectuée. Son principe consiste à colorer les cellules bactériennes au violet de Gentiane, puis à les décolorer avec de l'alcool et à les recolorer ensuite avec la fushine.

Observées au microscope photonique, les bactéries Gram positif apparaissent colorées en violet alors que les bactéries dites Gram négatif perdent la couleur violette après traitement à l'alcool pour prendre la teinte rose de la fushine.

III.1.2.2. Etude biochimique :

Elle comporte une série de tests permettant de mettre en évidence le type respiratoire des souches, leur métabolisme énergétique, la production d'indole et celle du sulfure d'hydrogène (H₂S), la réduction des nitrates ainsi que leur capacité à hémolyser le sang. Des activités enzymatiques telles que l'oxydase, la catalase, la β -

galactosidase, la tryptophane désaminase et les enzymes de transformation des acides aminés (ADH et LDC) ont été également recherchées. Les souches ont été testées aussi pour l'utilisation des citrates, du glucose, du lactose et de l'esculine.

Le mode opératoire des tests biochimiques est détaillé dans l'annexe 2.

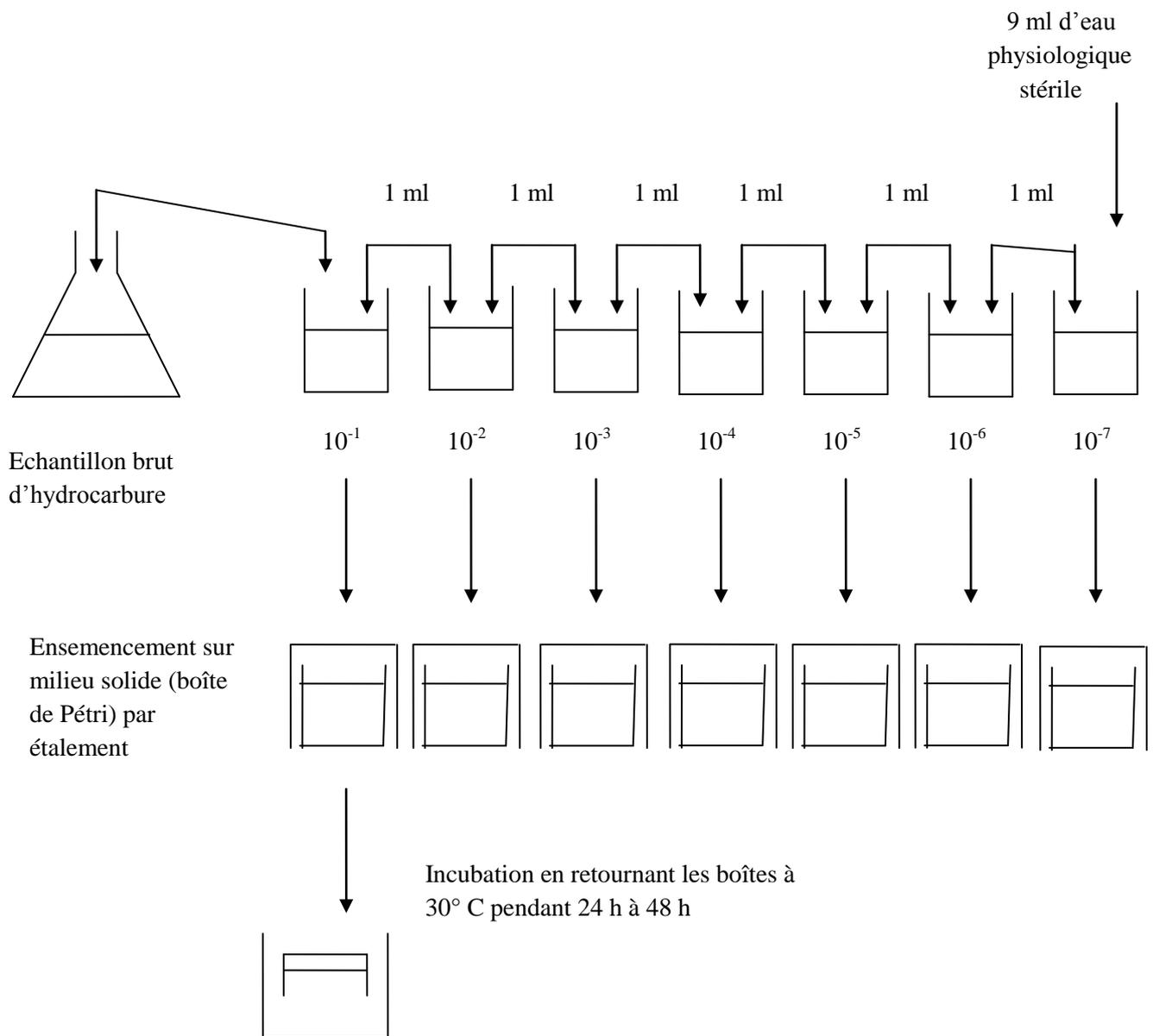


Figure 4 : Schéma général d'isolement et d'ensemencement des souches microbiennes.

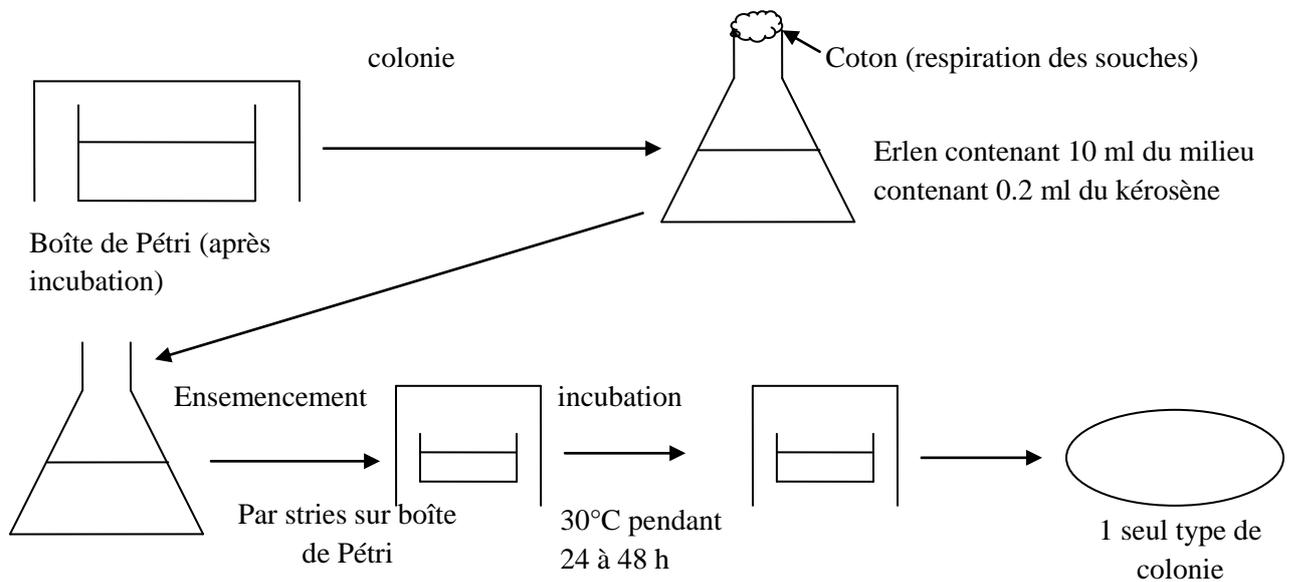


Fig. 5 : Schéma général de purification des souches

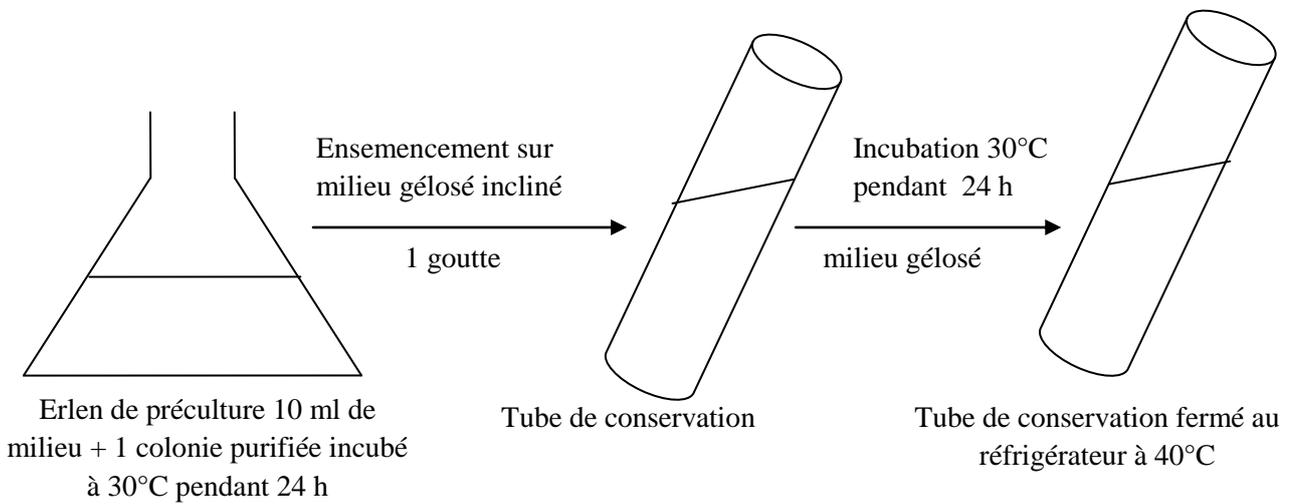


Fig. 6 : Schéma général de la conservation des souches

III.1.2.3. Etude physiologique :

Consiste à étudier la sensibilité des germes à différentes variations de facteurs de l'environnement.

Ont été testées les croissances des germes isolés à différentes températures (4, 20, 28, 37 et 41°C), à différents pH (4, 6, 7, 8 et 9), à la tolérance à la salinité, ainsi qu'à la tolérance à la concentration des hydrocarbures. Le protocole est détaillé dans l'annexe 3.

III.2. Modes de production des biosurfactants :

Cette étude a porté sur les quatre souches isolées, en l'occurrence : *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mendocina*, *Alcaligenes denitrificans* et *Aeromonas hydrophila*.

III.2.1. Préculture :

Sur des cultures fraîches, 5 à 6 colonies jeunes de chacune des quatre souches sont prélevées et sont mises en culture dans des Erlen de 500 ml contenant 150 ml du milieu minéral composé (en g / l) de :

NaHPO ₄	2,2
KH ₂ PO ₄	1,4
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,6
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0
NaCl.....	0,05
CaCl ₂	0,02
FeSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,01

A ce milieu est ajouté 1 ml d'une solution d'oligo-éléments constituée (en mg/l) de :

ZnSO ₄ , 7H ₂ O.....	525
MnSO ₄ , 4H ₂ O.....	200
CuSO ₄ , 5H ₂ O.....	705
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O.....	15
CoCl ₂ , 6H ₂ O.....	200
H ₃ BO ₃	15
NiSO ₄ , 6H ₂ O.....	27

Le pH est ajusté à 6,8.

Ce milieu est additionné, après stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 20 mn, de 20 ml de kérosène (Abu Ruwaida et *al.* 1991).

Ces cultures sont incubées à 28 à 30°C sous agitation à 105 trs / mn pendant 72 h.

III.2.2. La culture :

La préculture sert d'inoculum à la culture. 5 ml de la première sont prélevés et incorporés dans 1,5 l du milieu sus-cité contenu dans des Erlen de 5 l.

L'incubation se fait à 28-30°C sous agitation à 200 trs / mn pendant 15 jours.

III.2.3. L'isolement et la purification des biosurfactants :

Elle consiste à séparer le milieu des cellules bactériennes puis à extraire les biosurfactants en les émulsifiant dans du n-heptane. Le procédé est décrit par le schéma illustré par la figure 7.

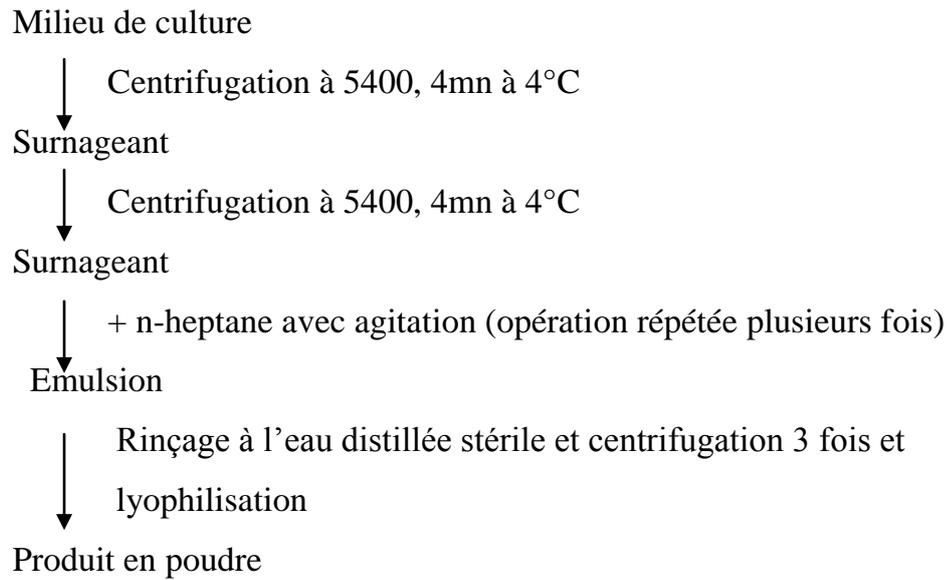


Fig. 7 : Schéma de l'isolement et de la purification des biosurfactants

III.2.4. Paramètres mesurés :

III.2.4.1. La tension de surface :

La tension de surface est un paramètre physique caractérisant les milieux liquides. Elle est de 72 dynes/cm pour l'eau distillée.

Un bon biosurfactant a la capacité de réduire cette tension aux environs de 30 à 40 dynes/cm.

Elle est mesurée par tensiométrie directement sur le milieu de culture. Le tensiomètre utilisé (Kruss K10T) est un appareil de haute précision, donnant directement la valeur de la tension de surface.

Son principe consiste à immerger l'anneau de platine dans un bêcher contenant le bain de culture à analyser, placé sur la table de l'appareil, puis augmenter la torsion du fil (auquel est attaché l'anneau) et descendre au même temps la table pour maintenir le repère à zéro. Ces réglages simultanés sont répétés jusqu'à ce qu'il y ait rupture du film. La valeur lue sur le cadran représente la tension de surface du liquide.

III.2.4.2. La CMC :

Elle est mesurée sur des solutions de concentration croissante du biosurfactant dans de l'eau distillée additionnée de NaCl à 0,9%.

La CMC correspond à la concentration à partir de laquelle on enregistre une diminution significative de la tension de surface.

III.2.4.3. L'indice d'émulsification E_{24} :

C'est le paramètre qui permet d'estimer le pouvoir émulsifiant des biosurfactants. Selon Abu Ruwaida et *al.* (1991), La stabilisation de l'huile dans l'eau est utilisée communément comme un indicateur de l'activité de surface.

Il se mesure selon la technique de Cooper et Goldenberg (1987) en introduisant 6 ml de kérosène dans un tube à fond plat contenant 4 ml de culture et agité au vortex pendant 2 mn à vitesse maximale. Après 24 heures, on obtient trois phases ; le moût de fermentation, l'émulsion et le kérosène de bas en haut, on mesure ensuite la hauteur de l'émulsion (H_e) et la hauteur totale (H_t) et l'indice d'émulsification est donné par la

formule :

$$E_{24}(\%) = (He / Ht) \times 100$$

III.3. Préparation du sol pour l'essai de décontamination :

L'expérience comporte deux parties (figure 8). La première étant consacrée à l'étude de l'effet du pétrole sur l'activité biologique, sur la biomasse microbienne et sur le taux de germination des graines. Elle consiste à comparer un sol témoin et un sol contaminé à 2 % (p/p) après l'avoir séché au préalable et tamisé à 2 mm.

La deuxième a pour objectif de déterminer lequel des différents traitements appliqués rapproche le sol contaminé du témoin. Le sol contaminé a reçu un supplément d'azote et de phosphore de 0.83g et 0.13g de $(NH_4)_2SO_4$ et KH_2PO_4 respectivement.

Les traitements consistent en un apport:

- de 5ml de suspension bactérienne mixte.
- de biosurfactant (BS1) produit par *P. fluorescens* à raison de 1.4g
- de biosurfactant (BS2) produit par *P. mendocina* à raison de 0.3g
- de 5ml de suspension bactérienne et de BS1 (1.4g)
- de 5ml de suspension bactérienne et de BS2 (0.3g)

Le sol est ensuite ramené à 90% de la capacité au champ et a fait l'objet de mesures multiples.

Chaque expérience a donné lieu à quatre répétitions.

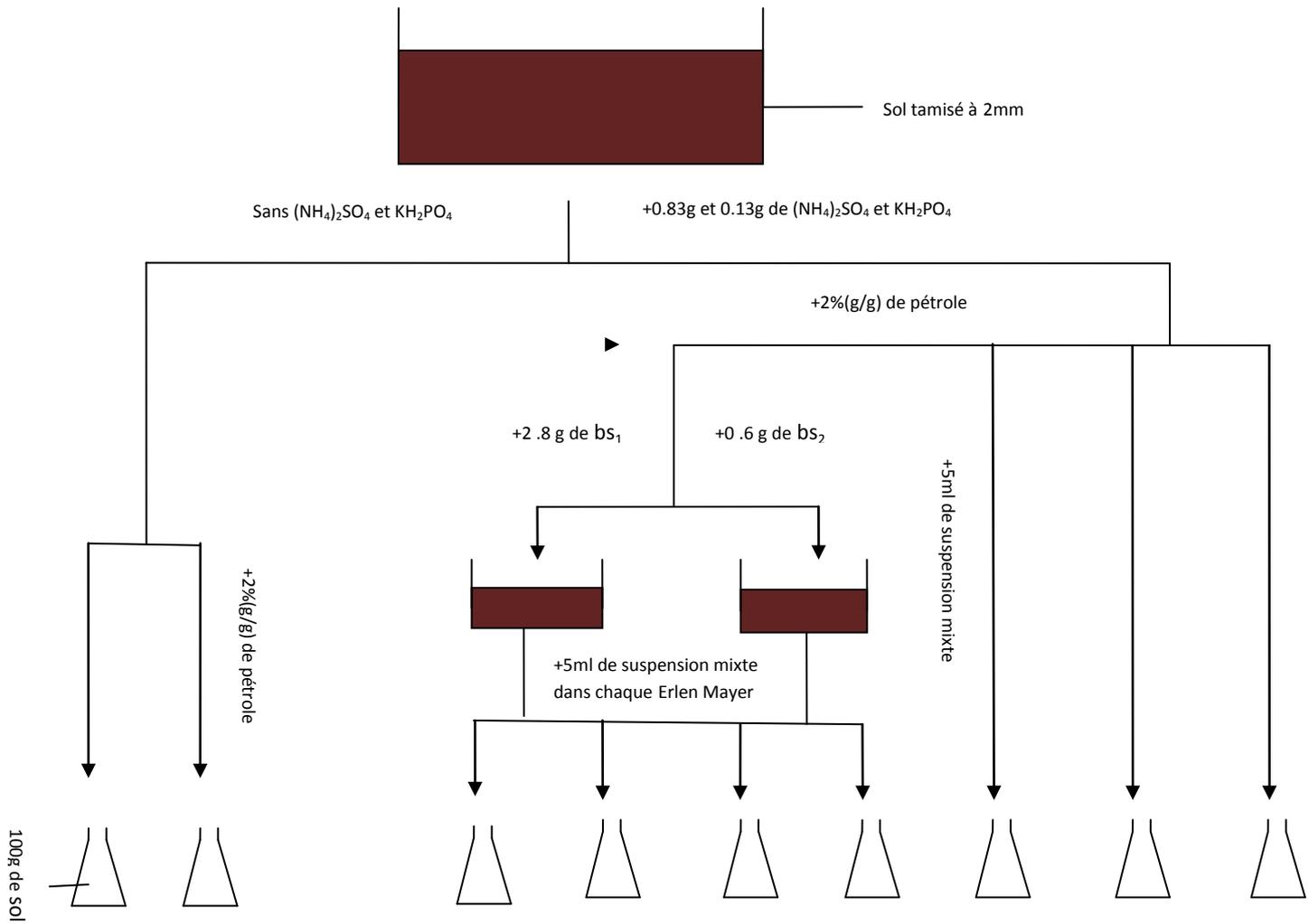


Fig. 8: Traitements appliqués au sol.

III.4. Tests biologiques permettant d'apprécier la toxicité des hydrocarbures :

III.4.1. Dispositif respirométrique :

Le dispositif respirométrique utilisé est celui décrit par Black (1976) (figure 9). Il s'agit d'un dispositif d'incubation aérobie, à température constante (30°C) permettant de mesurer la quantité de CO₂ dégagée ; cette dernière, provenant en majeure partie des matières organiques minéralisées par la microflore du sol, traduit l'intensité de l'activité biologique du sol (Dommergues, 1968).

Le CO₂ dégagé par les échantillons de sol est récupéré par barbotage dans la soude 0,2 N et dosé par titrimétrie. L'excès de soude est dosé par HCl 0.2N en présence de chlorure de baryum et de phénolphtaléine.

Chaque échantillon de sol (100 g) est introduit dans un Erlen de 500 ml et enrichi, soit par une culture mixte, soit par des biosurfactants, ou encore par une culture mixte et des biosurfactants à la fois (fig. 9). Tous les traitements sont répétés 4 fois.

III.4.2. Etude de la biomasse microbienne :

Ce protocole a pour objectif l'étude de l'effet des différents traitements sur la biomasse microbienne. Le protocole utilisé est celui décrit par Chaussod et Nicolardot (1982) cités par Chaussod et *al.* 1986. Il s'agit de déterminer la biomasse microbienne par la technique de fumigation-extraction.

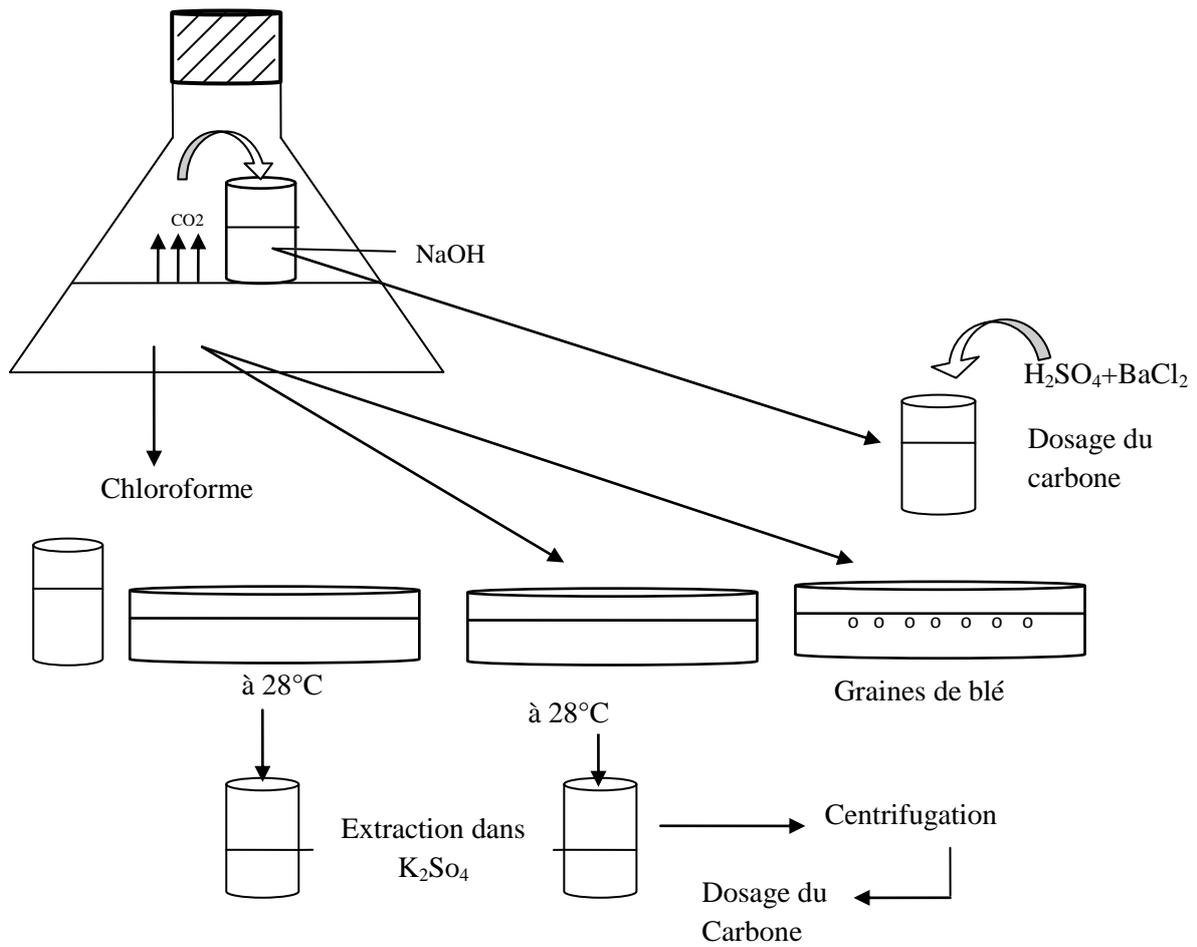


Fig. 9: Dispositif expérimental

III.4.2.1. Mise en place :

A la fin de l'incubation, le sol (30 g) est placé dans des boîtes de Pétri et exposé à des vapeurs de chloroforme pendant 18 heures à 20°C

La biomasse microbienne fait référence à la fraction vivante de la matière organique. C'est, selon Chaussod et *al.* (1996), l'une des rares mesures biologiques fiables.

Cette méthode est plus fiable que celle se basant sur le comptage des colonies microbiennes qui ne tient pas compte de la totalité des micro-organismes présents dans le sol.

III.4.2.2. Méthode de dosage du CO₂ :

L'extraction du carbone se fait par agitation de 40 mm du sol dans une solution de K₂SO₄ 0.05 N (rapport sol/solution = 1/5) suivie d'une centrifugation de 15mm à 4500 trs/mn. Le surnageant est séché à 50°C et le carbone est dosé par la méthode Anne.

Le carbone extractible microbien est égal au supplément de carbone extrait dans les échantillons fumigés par rapport aux échantillons témoins, non traités au chloroforme.

La biomasse microbienne est donnée par la formule :

$$\text{Biomasse} = \text{carbone extractible microbien} / 0.38$$

III.4.3. Test de la germination :

Parallèlement aux tests microbiologiques, un protocole visant à examiner l'effet de la contamination par les hydrocarbures sur la germination des graines a été réalisé

La plante testée est le blé. Ce choix s'est porté sur ce végétal en raison de sa bonne faculté germinative et sa sensibilité à la pollution.

Ce test a porté sur des graines de blé dur de la variété Vitron caractérisée par une capacité germinative de 95%. 100 graines de blé sont recouvertes de sol.

Le nombre de graines ayant germé est rapporté en pourcentage du nombre initial de graines.

IV. Méthodes d'analyse :

IV.1. Etude statistique :

Les données du test respirométrique, de la biomasse microbienne et du taux de germination des graines ont fait l'objet d'une analyse de la variance à un seul critère de classification. Les résultats sont indiqués dans l'annexe 4.

Résultats et discussion

Chapitre III : Résultats et discussion

I-Introduction :

Le chapitre III est consacré à l'exploitation des résultats analytiques des différentes étapes de l'expérimentation réalisée au laboratoire, à savoir l'identification des souches isolées, l'étude de leur aptitude à produire des biosurfactants et l'évaluation de la décontamination des sols pollués par les hydrocarbures après l'avoir inoculé avec les souches identifiées au préalable et les biosurfactants qu'elles ont produit, ainsi que la discussion de ces résultats et leur comparaison avec les données bibliographiques.

II- Identification et caractérisation des souches isolées :

L'utilisation des hydrocarbures comme source de carbone par les microorganismes est maintenant bien connue et présente plusieurs voies de catabolisme.

Ce processus a été mis en évidence par plusieurs auteurs (Morgan et Watkinson, 1989 ; Doelle, 1979 ; Schneider *et al.*, 1996 ; Sanseverino *et al.*, 1993 ; Malakul *et al.*, 1998 ; Dean *et al.*, 2001 ; Grifoll *et al.*, 1992 ; Scriban, 1999 et Boldrin *et al.*, 1993). L'utilisation d'une grande variété d'hydrocarbures par les bactéries a été démontrée en faisant intervenir l'équipement enzymatique des germes caractérisé par une faible spécificité, ou par la synthèse de nouvelles enzymes spécifiques aux polluants présents. Cette voie peut s'opérer jusqu'à un stade avancé qui peut aller jusqu'à la minéralisation complète du substrat (Pelmont, 1993).

Certaines souches transforment les hydrocarbures en la présence obligatoire d'un autre substrat ; c'est le cométabolisme (Pelmont, 1993 ; Boldrin *et al.*, 1993).

Par ailleurs, plusieurs espèces de champignons ont l'aptitude de transformer les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Bumpus, 1988 ; Stapleton *et al.*, 1998 ; Bezalel *et al.*, 1996 et Cerniglia, 1992). Les HAP sont transformés en produits moins mutagènes, aboutissant ainsi à leurs détoxification (Cerniglia *et al.*, 1992).

Les algues vertes et les cyanobactéries transforment les HAP sous conditions

photoautotrophes. Elles dégraderaient les HAP en faisant intervenir une dioxygénase similaire à celle des bactéries (Cerniglia, 1992).

Ces microorganismes seraient donc capables de croître en présence de ce polluant qui serait toxique pour d'autres microorganismes. D'après Dommergues et Mangenot (1970), l'épandage d'une quantité importante d'hydrocarbure sur un sol exerce une action dépressive sur la microflore surtout les germes nitrificateurs et cellulolytiques. L'ammonification est également réduite (Sparrow et *al.*, 1988).

Dans cette première partie de notre travail, nous nous sommes proposé d'isoler des souches bactériennes à partir de déchets d'hydrocarbures provenant des bacs de stockage de la raffinerie d'Alger.

Outre l'identification des souches isolées, nous avons également examiné la tolérance et la sensibilité des différentes souches isolées à la variation de certains facteurs du milieu.

II.1. Identification et principales caractéristiques morphologiques et biochimiques des souches isolées :

Les résultats obtenus font état de la présence dans l'hydrocarbure de 4 souches différentes.

II.1.1 Mobilité :

Tableau 10 : *Test de mobilité*

Souche	Mobilité
S1	+
S2	+
S3	+
S4	+

Les caractères ont été codés « + » pour présente ; « ++ » pour très présente et « - » pour absente.

Le test de mobilité s'est avéré positif pour toutes les souches, ce qui signifie que leurs cellules seraient dotées d'un ou plusieurs flagelles.

II.1.2. Etude morphologique :**II.1.2.1. Observation macroscopique :**

La description macroscopique des colonies développées sur gélose après 24 heures d'incubation est indiquée dans le tableau 11 ci- après.

Tableau 11 : *Caractéristiques morphologiques des colonies*

Souche	Couleur	Forme	Opacité	Surface	Elévation	Consistance
S1	Blanche	Circulaire	Opaque	Lisse	Convexe	Non visqueuse
S2	Blanche	Irrégulière	Opaque	Rugueuse	Convexe	Non visqueuse
S3	Jaune	Circulaire	Transparente	Lisse	Plate	Non visqueuse
S4	Jaune	Circulaire	Opaque	Lisse	Convexe	visqueuse

II.1.2.2. Observation microscopique :

La forme des cellules des quatre souches isolées, leurs tailles ainsi que leur réponse à la coloration de Gram sont représentées par le tableau 12.

Tableau 12 : *Résultats de l'observation microscopique*

Souches	Forme des cellules	Coloration de Gram	Taille (µm)
S1	Bacille	Gram ⁻	1,6/0,5
S2	Bacille	Gram ⁻	2,2/0,7
S3	Bacille	Gram ⁻	2,0/0,6
S4	Bacille	Gram ⁻	0,8/0,3

Observées au microscope photonique, les cellules des quatre souches se présentent sous forme de bacilles, elles sont individuelles et parfois regroupées par paires (pour S1, S2 et S3).

La coloration de Gram a révélé que les souches isolées appartiennent toutes au groupe des bactéries G⁻ en prenant la teinte rose.

Par ailleurs l'observation des cellules après la double coloration des Gram nous a permis de confirmer la forme des cellules. Nous avons également constaté que les cellules de S4 sont sensiblement plus petites que celles des trois autres souches.

Les figures 10, 11, 12 et 13 illustrent les observations microscopiques effectuées.

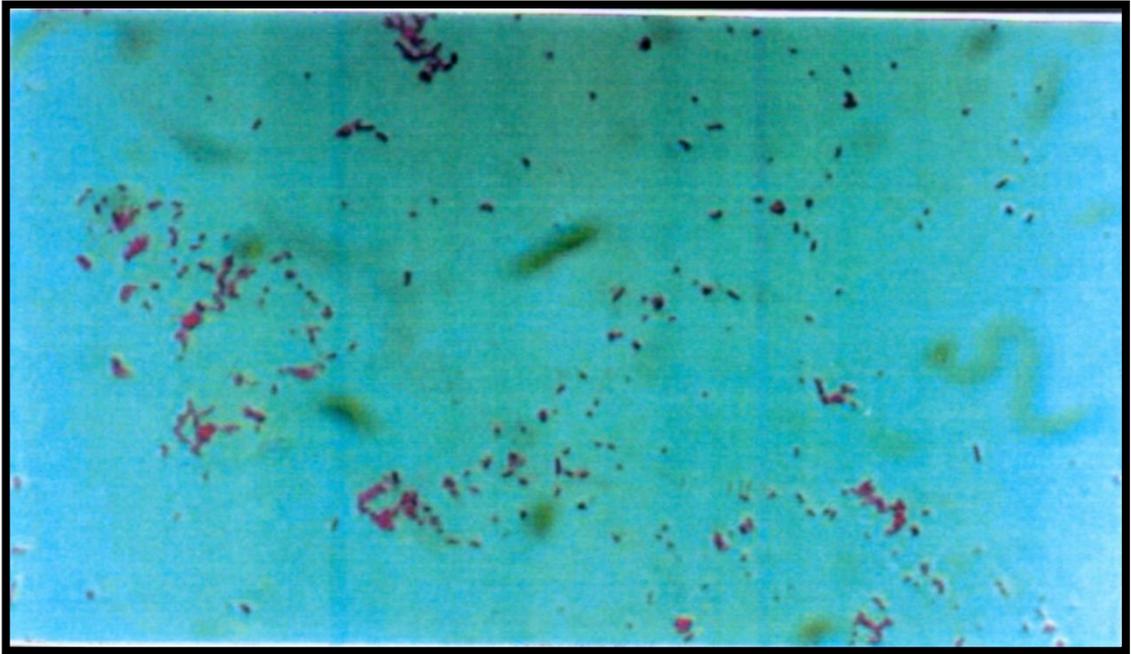


Fig. 10 : Observation de la souche S1 au microscope photonique
au grossissement 100 après coloration de Gram

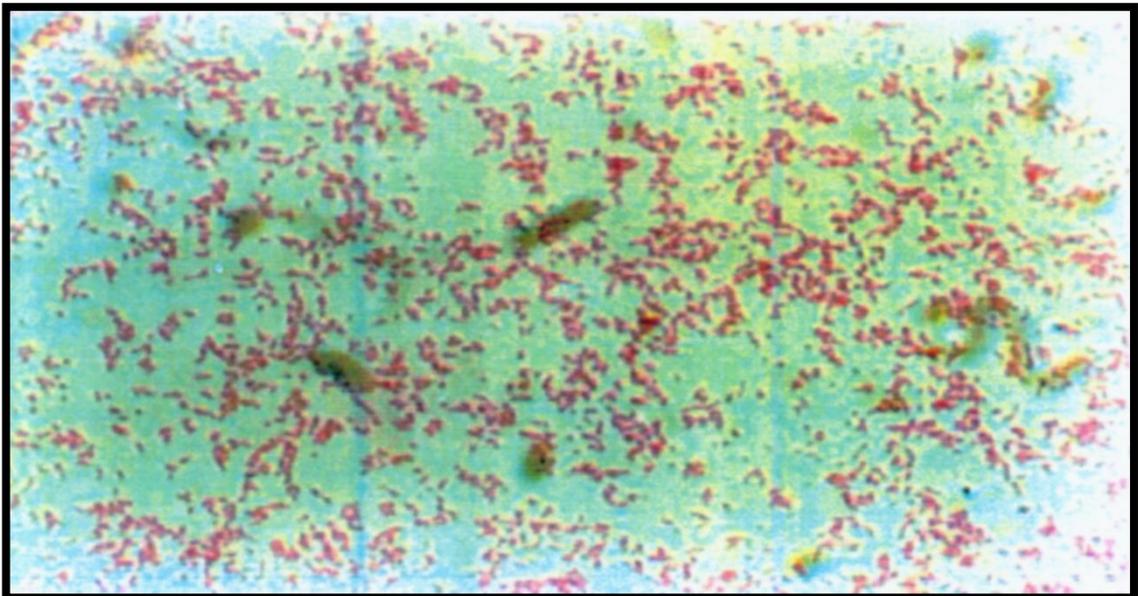


Fig. 11 : Observation de la souche S2 au microscope photonique
au grossissement 100 après coloration de Gram

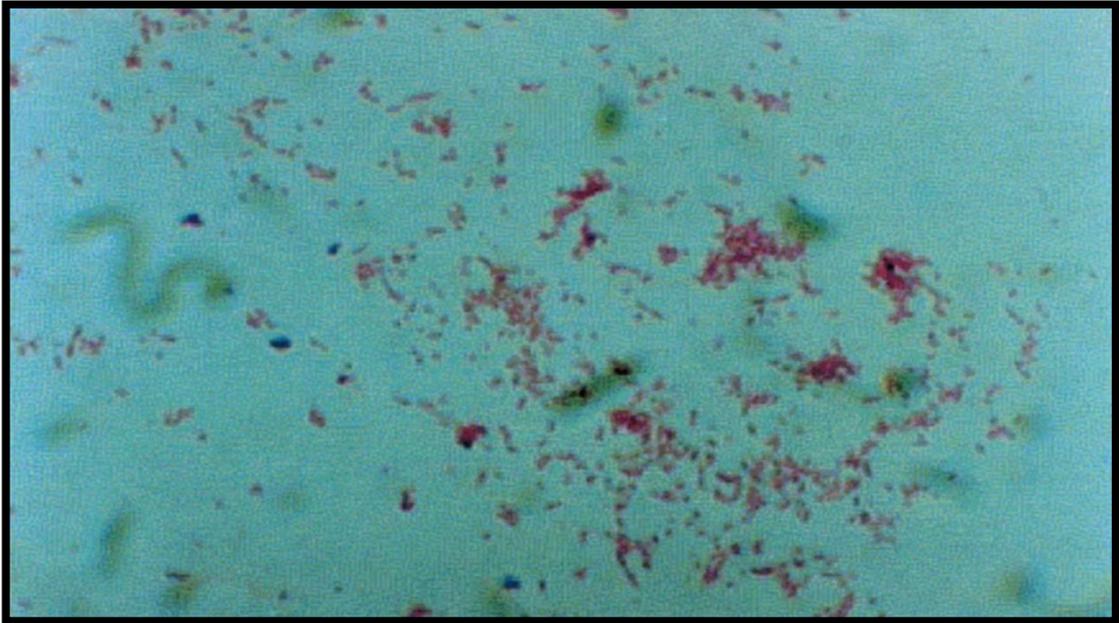


Fig. 12 : *Observation de la souche S3 au microscope photonique au grossissement 100 après coloration de Gram*

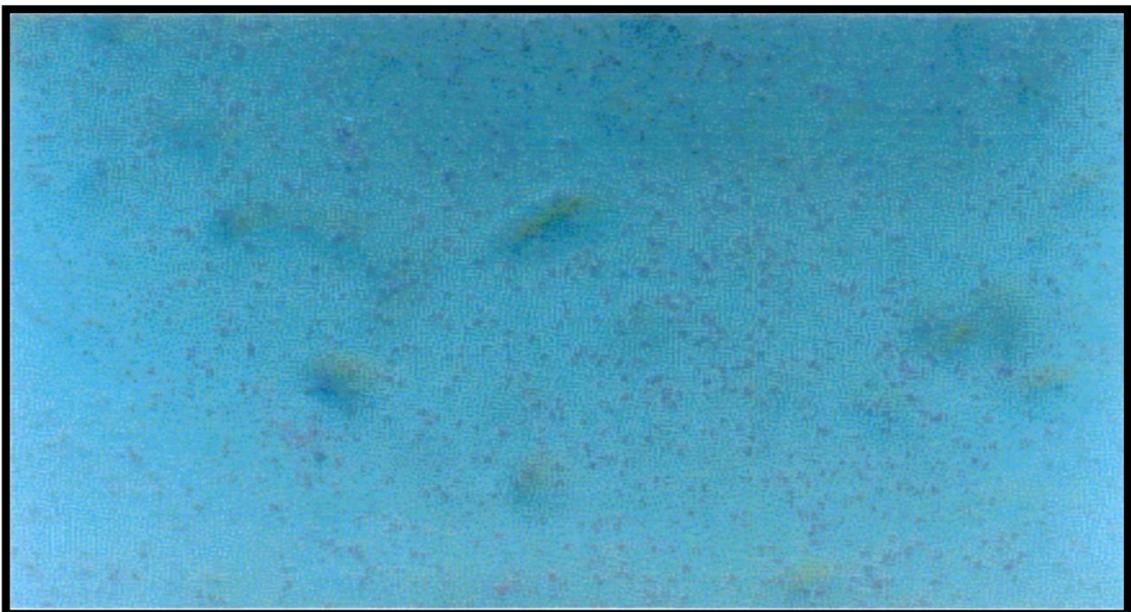


Fig. 13 : *Observation de la souche S4 au microscope photonique au grossissement 100 après coloration de Gram*

II.1.3. Tests biochimiques :

Le tableau 13 récapitule les résultats des tests que nous avons effectués sur chacune des souches isolées.

Tableau 13 : Résultats des tests biochimiques

S	Cat	Ox	ONPG	L	G	H ₂ S	GS	Esc	ADH	LDC	Ind	TDA	NO ₃	Citrate	O/F	Vf
S1	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	O	As
S2	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	O	As
S3	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	O	As
S4	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	O / f	Af

O/F : métabolisme oxydatif/ fermentatif

Vf : viande-foie

Après l'examen macroscopique, l'observation microscopique et l'étude biochimique, nous sommes arrivés à caractériser les quatre souches comme suit :

- **Souche S1 :**

Les cellules sont en bâtonnets individuels et mobiles de 1,6 µm sur 0,5 µm. Cette espèce appartient au groupe de bactéries G- à métabolisme oxydatif. Elle peut avoir une respiration anaérobie en présence de nitrates.

Elle répond positivement aux tests de catalase, d'oxydase, de gélose au sang, d'indole, de nitrate et de citrate.

Elle est ONPG négative, n'utilise pas le lactose, le glucose et l'esculine, ne produit pas d'H₂S à partir de sulfure de métaux.

Elle n'a pas d'activité désaminase, décarboxylase et déshydrogénase sur le tryptophane, la lysine et l'arginine respectivement.

- **Souche S2 :**

Les cellules se présentent sous la forme de bâtonnets mobiles de 2,2 µm sur 0,7 µm, individuels ou en paires. Les cultures produisent un pigment fluorescent diffusible dans le milieu.

Les souches de cette espèce sont capables d'utiliser 60 à 80 sources différentes de carbone et même plus. Ce sont des aérobies obligatoires qui peuvent être rencontrées dans l'eau et dans le sol.

Elle est catalase et oxydase positive, utilise le citrate, le lactose et le glucose mais pas l'esculine. Elle répond positivement au test Indole. Elle a une activité arginine déshydrolyse, mais n'a pas d'activité lysine décarboxylase et tryptophane désaminase ainsi que la galactosidase. Elle ne peut pas produire de l'H₂S et n'est pas capable d'utiliser les nitrates. Elle a un métabolisme oxydatif.

- **Souche S3 :**

Ce sont des bacilles de 2 µm sur 0,6 µm, individuelles ou groupées en paires et sont mobiles. Les colonies sont jaunâtres à cause de la production d'un pigment caroténoïde intracellulaire.

Ses souches sont capables d'utiliser 56 à 65 ou plus de composés organiques différents comme source de carbone.

Ce sont des aérobies obligatoires à métabolisme oxydatif. Elle répond positivement aux tests de catalase, d'oxydase, de gélose au sang, d'ADH, d'indole et de citrate. Elle est ONPG, lactase, glucose, H₂S, esculine, LDC, TDA et NO₃ négatifs.

- **Souche S4:**

Ce sont de petits bacilles G- de 0,8 µm sur 0,3 µm, mobiles, pouvant vivre en absence d'oxygène, ce sont des anaérobies facultatifs. Se rencontrent dans l'eau, le sol, les aliments et les égouts.

Elle répond positivement aux tests d'oxydase, de catalase et de nitrate réductase, ainsi que l'ONPG. Elle a une activité d'hémolyse. Elle utilise l'esculine, le glucose et le citrate, mais n'utilise pas le lactose. Elle produit l' H₂S, et peut utiliser les nitrates. Elle est ADH positive mais LDC et TDA négative.

La synthèse des résultats obtenus et leur comparaison à ceux de nombreux auteurs (Bergey, 1974 ; Marchal, 1987 ; Larpent et *al.*, 1990 et Larpent et *al.*, 1998) nous conduisent aux conclusions suivantes :

S1 : Famille : Pseudomonadaceae

Genre : Alcaligenes

Espèce : *Alcaligenes denitrificans*

S2 : Famille : Pseudomonadaceae

Genre : Pseudomonas

Espèce : *Pseudomonas fluorescens*

S3 : Famille : Pseudomonadaceae

Genre : Pseudomonas

Espèce : *Pseudomonas mendocina*

S4 : Famille : Vibrionaceae

Genre : Aeromonas

Espèce : *Aeromonas hydrophila*

De nombreux travaux signalent l'implication des souches obtenues dans la dégradation des hydrocarbures.

En effet, parmi les souches connues pour leur capacité à dégrader les alcanes figurent *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas mendocina*.

Ces deux souches sont également retenues comme capables de dégrader certains composés aromatiques (Cerniglia, 1992 ; Fan et Scow, 1993 ; Sanseverino et *al.*, 1993).

Alcaligenes denitrificans est, elle aussi, capable de dégrader les hydrocarbures aromatiques tels que le pyrène et le naphthalène, le fluoranthène et le benz[a]anthracène (Cerniglia, 1992).

Des souches du genre *Aeromonas* sont également impliquées dans la

dégradation des hydrocarbures aromatiques tels que le phénanthrène (Cerniglia, 1992).

II.2. Sensibilité des souches isolées à différentes conditions du milieu : concentration des hydrocarbures, pH, température et salinité

La présence de colonies est codée par le signe « + », leur abondance par « ++ » et leur absence par « - ».

II.2.1. Effet de la température :

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau 14a.

Tableau 14a : Effet de la température

Facteur Souche	Température (°C)				
	4	20	28	37	41
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	+	+	++	++	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	+	++	+	-
<i>Pseudomonas mendocina</i>	-	+	++	++	+
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	+	++	+	-

On note un optimum de croissance à 28°C pour l'ensemble des souches. Certaines souches ont eu une bonne croissance à 37°C. Il s'agit de *Alcaligenes denitrificans* et *Pseudomonas mendocina* qui ont présenté quelques colonies même à 41°C.

Seule *Alcaligenes denitrificans* a pu se multiplier à 4°C pour donner un nombre très limité de colonies.

En revanche, on note l'absence de *Pseudomonas fluorescens* et *Aeromonas hydrophila* aux températures extrêmes de 4°C et de 41°C.

Ce qui traduit le caractère mésophile de ces souches (Bergey, 1974).

II.2.2. Effet du pH :

L'influence des valeurs de pH testées sur les souches est représentée par le tableau 14b.

Tableau 14b : Effet du pH

Facteur Souche	pH				
	4	6.2	7	7.8	9
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	+	+	++	+	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+	+	+	-
<i>Pseudomonas mendocina</i>	-	+	+	+	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	+	+	+	-

Toutes les souches ont présenté une bonne croissance entre 6 et 8 avec un optimum à pH 7. La croissance des souches *Pseudomonas mendocina* et *Aeromonas hydrophila* se limite entre 6 et 8.

La croissance de *Pseudomonas fluorescens*, quant à elle se limite de pH 4 à pH 8.

II.2.3. Effet de la concentration en hydrocarbure :

Le tableau 14c montre l'influence de la concentration en hydrocarbure sur les souches isolées.

Tableau 14c : Effet de la concentration en hydrocarbures

Facteur Souche	Concentration du kérosène (% v/v)					
	0	2	5	10	20	30
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	+	++	++	+	+	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	++	++	+	+	+
<i>Pseudomonas mendocina</i>	+	++	++	+	+	+
<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	++	++	+	+	+

Globalement, les souches ont montré une bonne croissance même aux concentrations les plus élevées, avec un optimum à 2 et à 5%. Cette propriété de

résister à des concentrations élevées en hydrocarbures serait liée à l'aptitude des bactéries à produire des biosurfactants qui les protègent au contact direct avec les hydrocarbures. Ils leur permettent de les émulsionner pour faciliter leur assimilation.

II.2.4. Effet de la salinité :

La réaction des souches aux différentes concentrations testées de NaCl est représentée par le tableau 14d.

Tableau 14d : Effet de la salinité

Facteur Souche	Salinité (g/l de NaCl)				
	0	0.01	0.1	1	10
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	+	++	++	+	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	++	++	+	+
<i>Pseudomonas mendocina</i>	+	++	+	+	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	++	+	+	-

Les souches étudiées ont pu croître à des concentrations allant de 0 à 1% présentant un optimum à 0.01g/l de NaCl. Cependant *Pseudomonas mendocina* et *Aeromonas hydrophila* n'ont pu tolérer la concentration de 10% de NaCl. Ces deux souches ont montré une croissance limitée à 1%, concentration à laquelle 2 à 3 colonies en moyenne ont été observées. Ceci n'est pas le cas de *Alcaligenes denitrificans* et de *Pseudomonas fluorescens* dont la croissance reste possible à la concentration de 10%.

Selon Soltani (2004) et Minh Ngoc (2010), les bactéries réagissent aux modifications de l'environnement (température, pH, salinité et source de carbone) en modifiant la composition lipidique de leur membrane. De plus, la couche de peptidoglycanes de la paroi bactérienne par sa rigidité permet aux cellules de résister à la pression osmotique.

II.3. Conclusion :

L'objectif fixé est d'isoler des souches ayant l'aptitude de dégrader les hydrocarbures.

Les souches isolées sont au nombre de quatre et sont toutes des bactéries Gram-Trois d'entre elles sont des Pseudomonadacées: *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mendocina* et *Alcaligenes denitrificans*, la quatrième est une souche anaérobie facultative de la famille des Vibrionnaces ; *Aeromonas hydrophila*.

L'étude complémentaire de la physiologie de ces souches a démontré ce qui suit :

- *Alcaligenes denitrificans* :

- * croissance optimale entre 28°C et 37°C,
- * pH7
- * Concentration en hydrocarbures entre 2% et 5%.
- * Salinité entre 0.01 g/l et 0.1 g/l

- *Pseudomonas fluorescens* :

- * croissance optimale à 28°C,
- * pH 7
- * Concentration en hydrocarbures entre 2% et 5%.
- * Salinité entre 0.01 g/l et 0.1 g/l

- *Pseudomonas mendocina* :

- * croissance optimale entre 28°C et 37°C,
- * pH 7
- * Concentration en hydrocarbures entre 2% et 5%
- * Salinité à 0.01 g/l

- *Aeromonas hydrophila* :

- * croissance optimale à 28°C,
- * pH 7
- * Concentration en hydrocarbures entre 2% et 5%
- * Salinité à 0.01 g/l

Seule *Alcaligenes denitrificans* a montré une grande aptitude d'adaptation par rapport aux variations des facteurs testés. Elle peut donc croître dans des conditions extrêmes de température et de pH et s'adapter à une salinité assez forte.

Les quatre souches ainsi isolées et caractérisées sont capables d'utiliser les hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie. Elles doivent développer un certain nombre d'adaptations pour pouvoir utiliser de tels substrats. Très souvent les microorganismes dégradeurs produisent des biosurfactants pour émulsifier les hydrocarbures et augmenter ainsi leur disponibilité. C'est pourquoi, nous nous proposons, d'étudier l'aptitude des souches obtenues à produire des biosurfactants.

III- Production de biosurfactants :

La dégradation des hydrocarbures est souvent limitée par la disponibilité du substrat dissout. Le transfert de la phase solide à la phase liquide peut être augmenté par l'utilisation de surfactants (Boldrin et *al.*, 1993). Mais les surfactants de synthèse risquent de poser autant de problèmes environnementaux qu'ils en résolvent d'où les avantages et l'intérêt des biosurfactants.

Il a été démontré qu'ils avaient des propriétés d'émulsification équivalentes à celles des surfactants de synthèse et qu'ils présentaient l'avantage d'être biodégradables et non toxiques (Banat, 2000).

Les biosurfactants confèrent aux souches qui les secrètent un avantage compétitif ; d'où l'intérêt de rechercher parmi les souches isolées celles qui ont l'aptitude de produire des biosurfactants.

III.1. La tension de surface :

La mesure de la tension de surface sur les différents moûts de fermentation à la fin de l'incubation est représentée par le tableau 15. Les mesures ont été effectuées au laboratoire d'hydraulique de l'ENSA avec un tensiomètre Kruss K10T.

Tableau 15 : résultats de mesure de la tension de surface en dynes/cm

Souche	Tension de surface
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	33,5
<i>Pseudomonas mendocina</i>	40,5
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	54,5
<i>Aeromonas hydrophila</i>	57
Témoin	61,5

Les valeurs de la tension de surface des moûts de fermentation de

Pseudomonas fluorescens et de *Pseudomonas mendocina* ont baissé par rapport au témoin, alors que celle obtenues pour les deux autres souches sont restées proches de celle du témoin. Ceci indique que les deux souches du genre *Pseudomonas* auraient produit des biosurfactants sur kérosène.

Un surfactant puissant est capable de réduire la tension de surface du milieu de près de la moitié. Les résultats obtenus pour la tension de surface (fig. 14) montrent que la souche *Pseudomonas fluorescens* a produit un bon biosurfactant (BS1), sur kérosène, qui a réduit la tension de surface à 33,5 dynes/cm, suivie de *Pseudomonas mendocina* avec une valeur de 40,5 dynes/cm. Ces résultats indiquent aussi que *Alcaligenes denitrificans* et *Aeromonas hydrophila* n'ont pas pu produire des biosurfactants, les valeurs de la tension de surface étant trop élevées et proches de celles du témoin. Ceci serait dû à la composition du milieu de culture qui peut représenter un facteur limitant.

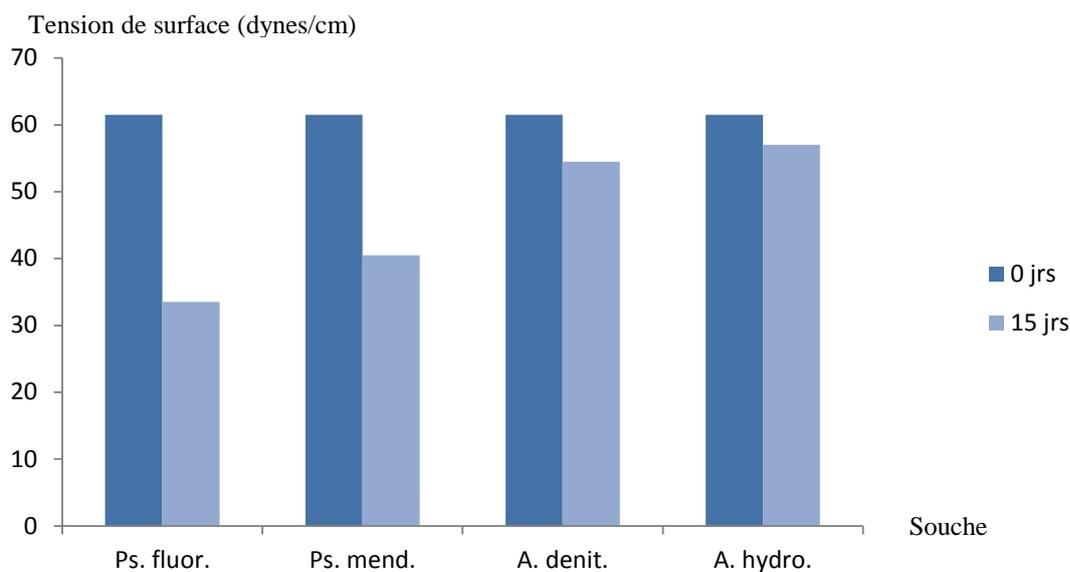


Fig.14 : Evolution de la tension de surface

Le biosurfactant produit par *Pseudomonas fluorescens* semble avoir de bonnes propriétés comparé à la surfactine (considéré comme un biosurfactant puissant) qui induit une baisse de la tension de surface jusqu'à 27 dynes/cm (Singer, 1985).

De nombreux auteurs ont mis en évidence la production de biosurfactants par *Pseudomonas fluorescens* donnant des valeurs voisines de celle obtenue dans cette

étude. D'après Georgiou (1992), cette souche a produit un complexe protéine-glucide sur sucrose atteignant une tension de 27 dynes/cm et la viscosine sur glycérol avec 26,5 dynes/cm. Abouseoud et *al.* (2008) ont obtenu une réduction de la tension de surface jusqu'à 32 dynes/cm avec une souche de *Pseudomonas fluorescens* ayant produit un rhamnolipide.

Lorsque le n-hexadécane est utilisé comme source de carbone, la tension de surface est de 29 dynes/cm pour deux souches différentes de *Pseudomonas fluorescens* (62 et 45). Mais si ces souches sont cultivées sur glucose, elles donnent des valeurs de 52 et 39 dynes/cm respectivement pour *P. fluorescens* 62 et *P. fluorescens* 45 (Shafeeq et *al.*, 1989 ; Kokub et *al.*, 1989).

Persson et *al.* (1988) ont établi la production par une souche de *Pseudomonas fluorescens* (378) d'un composé unique ayant un poids moléculaire élevé mais présentant de très bonnes propriétés tensioactives.

Concernant *P. mendocina*, et malgré l'absence de données bibliographiques sur son aptitude à produire des biosurfactants, celle-ci en serait capable selon les résultats obtenus.

En effet la valeur de la tension de surface obtenue (40,5 dynes/cm) est comparable avec celle donnée par des surfactants synthétiques possédant de bonnes propriétés, tel que le Tween 80 (45 dynes/cm) (Zajic et *al.*, 1977).

D'une manière générale, la production de biosurfactants est souvent associée aux souches du genre *Pseudomonas* (Persson et Molin, 1987 ; Jennings et Tanner, 2000) avec une réduction effective de la tension de surface à 38,2 dynes/cm pour *P. pseudomallei* (Kokub et *al.*, 1989) et 32, 32.7, 30 et même moins par les biosurfactants produits par *P. putida*, *P. diminuta* (Pruthi et Cameotra, 1995) et *P. aeruginosa* (Reiling et *al.*, 1986 ; Pruthi et Cameotra, 1995) respectivement.

Par ailleurs, la diminution des concentrations des sels de Mg, de K, de Ca et des éléments traces induit selon Käpelli et Fiechter (1986) une diminution de la tension de surface, et donc une production de biosurfactants. Mais c'est surtout la source de carbone qui peut être à l'origine de l'absence de la production des biosurfactants. En effet, certaines bactéries ne sont capables d'une telle production que lorsqu'elles croissent sur des n-alcane de C₁₂ à C₂₀. Dans d'autres conditions de culture de

Alcaligenes denitrificans et *Aeromonas hydrophila*, la production de biosurfactants serait possible.

III.2. Indice d'émulsification :

C'est un paramètre se basant sur la stabilité de l'émulsion formée avec le kérosène après 24h. Après avoir mesuré la hauteur de l'émulsion et la hauteur totale dans les tubes à essai, l'indice d'émulsification est alors calculé. Les résultats sont présentés dans le tableau 16.

Tableau 16 : résultats de mesure de l'indice d'émulsification

Souche	E ₂₄ (%)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	48
<i>Pseudomonas mendocina</i>	29
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	8
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2

Les valeurs obtenues du E₂₄ pour *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas mendocina* qui sont de 48% et 29% respectivement confirment la production de biosurfactants par ces deux souches. Mais le résultat donné par *Pseudomonas mendocina* n'indique pas une forte activité émulsifiante. Ceci serait dû à une faible affinité du biosurfactant avec le kérosène. Quand à *Alcaligenes denitrificans* et *Aeromonas hydrophila*, les résultats du E₂₄ obtenus sont en conformité avec ceux de la tension de surface obtenus pour ces souches ; l'activité émulsifiante étant directement proportionnelle à la réduction de la tension de surface.

Abu Ruwaida et *al.* (1991) estiment que des valeurs de E₂₄ inférieures à 30 ne donnent pas une émulsification efficace. Ils suggèrent que cette activité dépend de l'affinité du biosurfactant avec l'hydrocarbure utilisé.

III.3. La CMC :

La CMC n'a été estimée que pour *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas mendocina* étant donné qu'elles sont les seules à produire des biosurfactants. Les valeurs obtenues pour la CMC figurent dans le tableau 17.

Tableau 17 : Résultat de mesure de la concentration micellaire critique (CMC)

Souche	CMC (g / l)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,2
<i>Pseudomonas mendocina</i>	0,6

Il apparaît de ces résultats que les deux biosurfactants produit ont des CMC assez faibles. Ceci est particulièrement intéressant pour une éventuelle utilisation à grande échelle car de petites quantités de ces biosurfactants seront efficaces.

Le tensioactif de *P. fluorescens* est efficace à partir de la concentration de 0,2 g/l alors que celui produit par *P. mendocina* est efficace à partir de la concentration 0,6 g/l.

Les résultats que nous avons obtenus pour la CMC sont comparables à ceux des surfactants chimiques les plus utilisés. Le Tween 80 possède une CMC de 0,6 g/l.

III.4. Conclusion :

Parmi les quatre souches testées, *P. fluorescens* et *P. mendocina* ont été capables de produire des biosurfactants (BS1 et BS2, dans l'ordre) dans les conditions de l'expérimentation.

Les biosurfactants produits par ces deux souches ont permis de réduire la tension de surface à 33.5 et 40.5 dynes/cm respectivement par rapport à celle du témoin (milieu de culture) qui est de 61,5 dynes /cm.

Les valeurs du E_{24} obtenues pour ces souches montrent que les biosurfactants qu'elles ont produits ont une bonne capacité d'émulsification, ce qui

leur serait profitable dans la dégradation des hydrocarbures.

L'émulsion est effective à partir de 0.2 g/l pour BS1 et de 0.6 g/l pour BS2.

Concernant *Alcaligenes denitrificans* et *Aeromonas hydrophila*, les valeurs de la tension de surface et du taux d'émulsification enregistrées dans ces conditions ne permettent pas de conclure quant à leur aptitude à produire des biosurfactants. Celle-ci serait peut être possible dans d'autres conditions et en utilisant d'autres sources de carbone.

Il est clair que la production de biosurfactants par certaines souches microbiennes constitue un avantage, permettant à ces souches-là une meilleure accessibilité aux hydrocarbures. Mais l'effet de l'inoculation des sols contaminés avec des souches pouvant dégrader les hydrocarbures, associée à l'apport des biosurfactants produits par ces mêmes souches sur la dépollution de ces sols n'est pas encore bien établi. Aussi, nous avons réalisé un essai de réhabilitation d'un sol contaminé par les hydrocarbures en l'inoculant avec une culture mixte des souches que nous avons isolées et en apportant à ce sol-là les biosurfactants que les deux souches de *Pseudomonas* ont produit.

IV- Essai de réhabilitation d'un sol contaminé par les hydrocarbures ; appréciée à l'aide de tests biologiques :

Les données bibliographiques exposées dans la première partie ont montré que les hydrocarbures perturbent les processus biologiques qui se déroulent dans le sol.

La première approche expérimentale de notre travail a donc été :

1°/ de contaminer le sol en hydrocarbures afin de mesurer l'impact de ce polluant sur la biomasse du sol, l'activité biologique mesurée par le CO₂ et la germination d'une culture qui est le blé.

2°/ d'introduire parallèlement des souches isolées dans la première partie ou des biosurfactants obtenus par voie biologique dans la deuxième partie. Les biosurfactants ont été utilisés dans le but de vérifier l'amélioration de la biodégradation des hydrocarbures en facilitant l'accessibilité des souches bactériennes à ces polluants.

IV.1. Hydrocarbures et activité biologique :

La production de CO₂ est un paramètre qui caractérise l'activité biologique globale d'un sol. Le dégagement de CO₂ a été mesuré après 7, 14 et 28 jours.

IV.1.1. Production cumulée de CO₂ :

L'effet de la contamination par le pétrole sur l'activité biologique totale du sol est illustré par la figure 15.

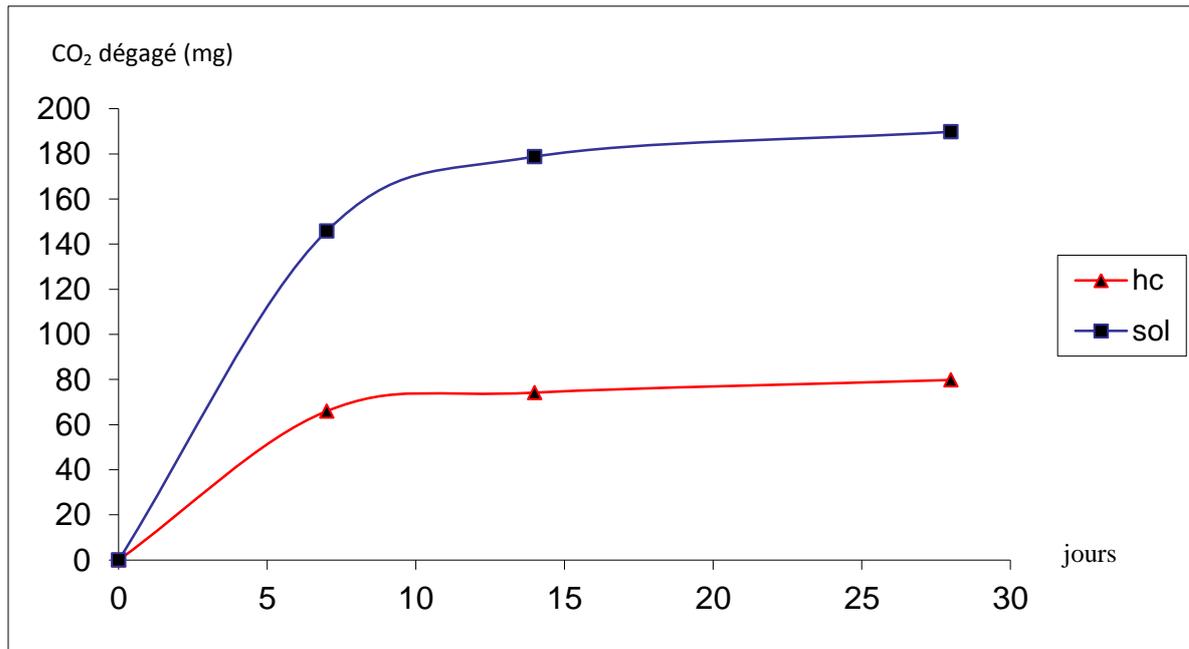


Fig. 15: Dégagement cumulé de CO₂ dans le sol témoin et le sol contaminé

L'analyse de la courbe montre que la quantité de CO₂ cumulée produite est plus importante dans le sol non contaminé, témoignant de l'effet inhibiteur du pétrole sur l'activité biologique du sol. L'analyse de la variance fait ressortir un effet très hautement significatif.

Cette inhibition peut être expliquée par la toxicité directe des composés du pétrole, notamment les HAP vis-à-vis de la microflore du sol. Elle pourrait être due aussi à une immobilisation de l'azote et du phosphore.

Nous pouvons également émettre l'hypothèse de la fixation de certains composés sur la matrice organo-minérale du sol, les mettant ainsi hors de la portée des micro-organismes.

Les résultats de la respirométrie obtenus suite au traitement du sol contaminé par inoculation des souches, par l'apport des biosurfactants ou par la combinaison des deux sont représentés par la figure 16.

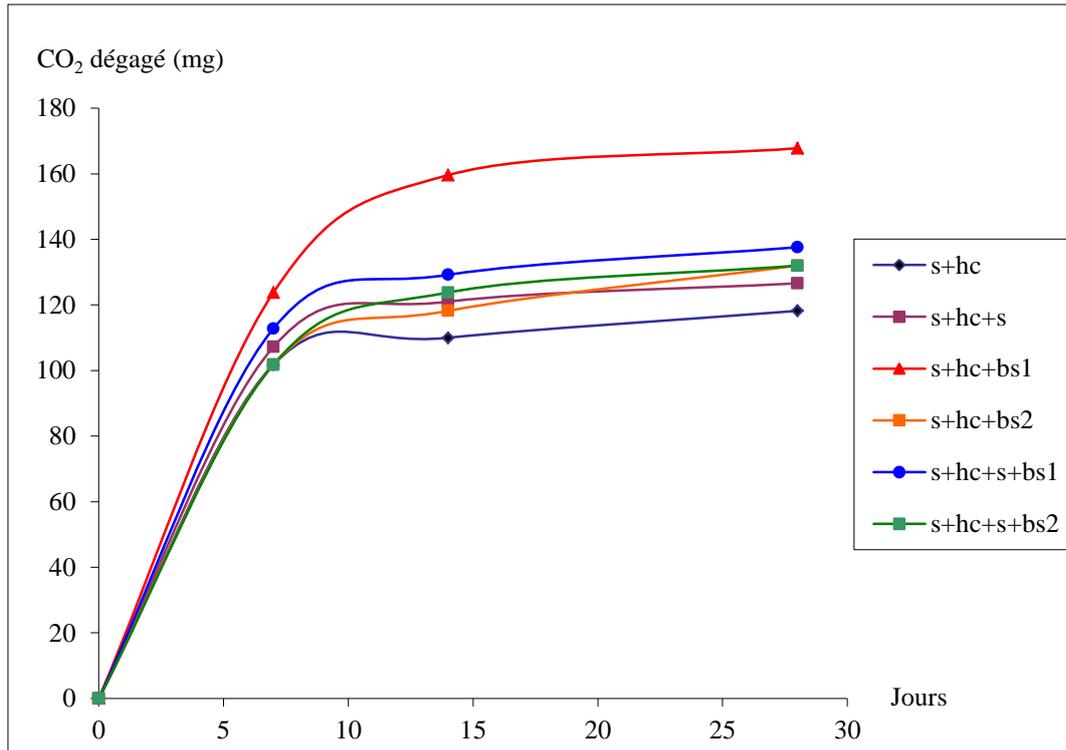


Fig. 16 : Dégagement cumulé de CO_2 dans les sols contaminés traités

L'examen de la courbe de production cumulée de CO_2 fait ressortir l'efficacité du traitement par BS_1 qui a induit la levée de l'inhibition des composés du pétrole brut sur la microflore du sol. L'effet du BS_1 est hautement significatif à partir de la deuxième semaine d'incubation.

La solubilité des hydrocarbures notamment des HAP, est probablement le facteur clef influençant leur biodisponibilité, d'où une plus grande production de CO_2 .

La bioaugmentation n'a pas eu l'effet espéré, probablement parce que les souches ne se sont pas bien adaptées aux conditions du sol.

La production relativement élevée de CO_2 dans le sol traité avec le BS_1 entre 7 et 14 jours dépassant ainsi le sol témoin.

Le BS_2 quant à lui, a eu un effet stimulateur sur la minéralisation du pétrole entre 14 et 28 jours. Notons également que l'association souches – biosurfactant a été plus efficace que l'utilisation des souches seules.

La figure 17 montre l'effet des traitements appliqués au sol contaminé par rapport au sol témoin en ce qui concerne l'activité biologique.

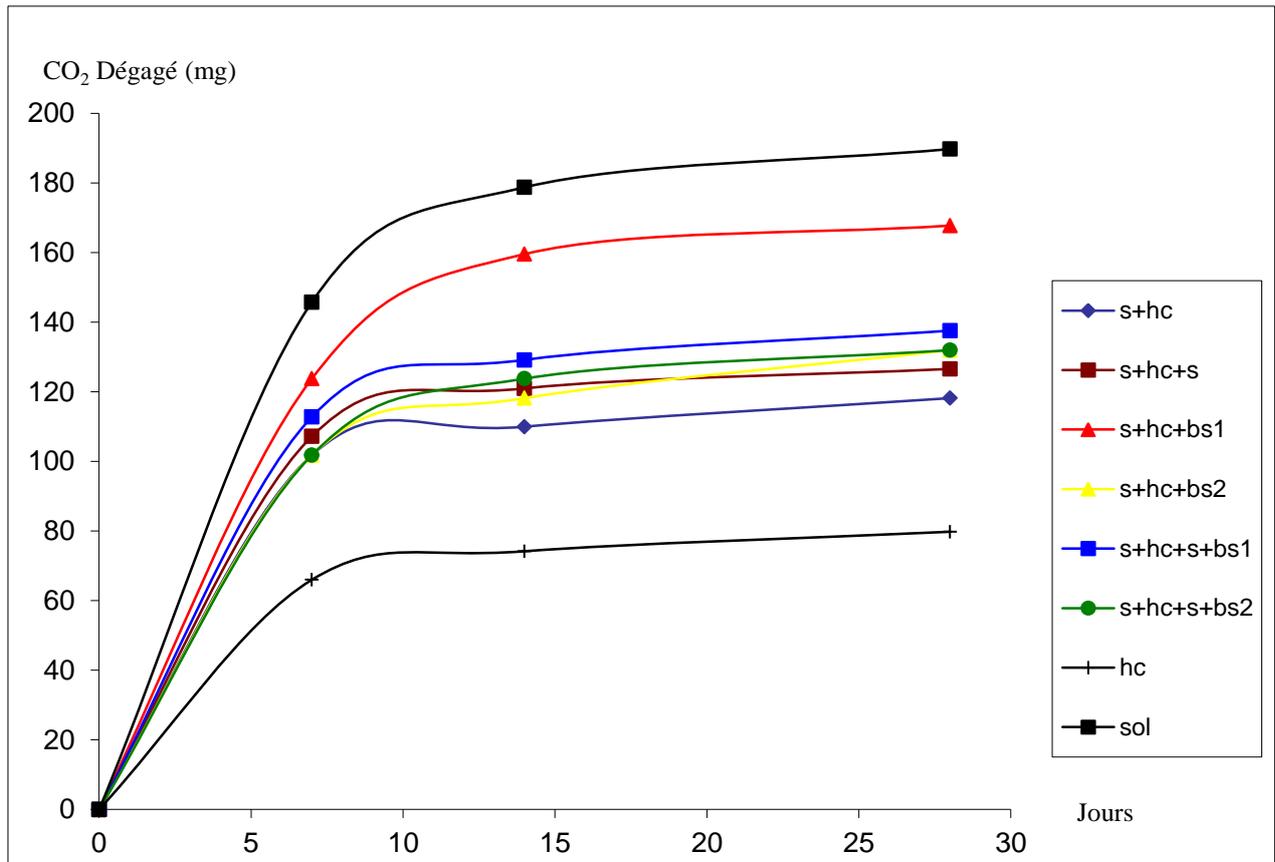


Fig. 17 : Dégagement cumulé de CO₂. Comparaison des différents traitements au sol témoin

La comparaison des résultats des traitements à ceux du sol n'ayant reçu que du pétrole fait ressortir l'effet améliorant des fertilisants (N et P) sur la production de CO₂ et donc sur la biodégradation des hydrocarbures.

L'effet améliorant des biosurfactants sur l'activité biologique de notre sol concorde avec les résultats obtenus par plusieurs auteurs. Banat (2000) note que l'adjonction des biosurfactants aux milieux pollués par les hydrocarbures améliore la biodégradation des composés adsorbés sur la matrice du sol en les solubilisant. Abousseoud *et al.* (2010) ont observé que la solubilité du naphthalène a été améliorée par un biosurfactant produit par *Pseudomonas fluorescens*.

Leur dégradation produit des métabolites pouvant être incorporés dans l'humus (Ritchnow *et al.*, 1997).

D'après Mattei (2001), en conditions optimisées par l'apport de biosurfactants on aboutit à la dégradation de 88% des composés saturés et de 78% des composés aromatiques en milieu liquide. Banat (1994), note toutefois que les biosurfactants (rhamnolipides) solubilisent les hydrocarbures aromatiques plus que les aliphatiques.

D'autre part, selon Banat (1994) et Koller (2004), les biosurfactants améliorent la biodégradation des hydrocarbures par les bactéries indigènes du sol plus que par les cellules incorporées au sol, ceci pouvant être lié à leur aptitude limitée à s'adapter au sol contaminé.

D'après Dean et *al.* (2001), la co-inoculation avec *Pseudomonas aeruginosa* d'un sol a amélioré la minéralisation du phénanthrène par des souches capables de le dégrader en présence de biosurfactants par un mécanisme qui reste inconnu. Le surfactant, en quelque sorte, améliore les interactions entre les souches et il en résulte une augmentation du taux de minéralisation du phénanthrène.

Mais selon Stelmack et *al.* (1999), la désorption des contaminants de la matrice du sol grâce aux biosurfactants augmente leur concentration aqueuse mais ne conduit pas nécessairement à l'amélioration de leur biodégradation.

L'effet améliorant des fertilisants (N et P), illustré par la figure 16, sur la production de CO₂ et donc sur la biodégradation des hydrocarbures a été signalé dans la littérature (Chaîneau et *al.*, 2000 ; Pritchard et *al.*, 1992). D'après Abouseoud et *al.* (2008), le rapport C/N influence l'activité émulsifiante d'un rhamnolipide produit par *Pseudomonas fluorescens* ; cette dernière étant meilleure avec un rapport C/N du milieu égal à 10.

En effet, les microorganismes ont besoin de l'azote et du phosphore pour les incorporer dans leur biomasse ; ils sont nécessaires à la croissance des cellules et au métabolisme microbien (Atlas, 1981 ; Sims et *al.*, 1989 ; Rosenberg et *al.*, 1992).

La carence du sol en potassium n'a pas été limitante pour l'activité biologique. Les résultats obtenus par Laribi (1998) sur un sol non carencé en potassium sont comparables à ceux obtenus dans cet essai. L'apport du potassium par l'engrais phosphaté aurait suffi pour pallier cette carence.

IV.1.2. Production hebdomadaire de CO₂ :

La production hebdomadaire de CO₂ calculée à partir des données de la production cumulée est illustrée par la figure 18.

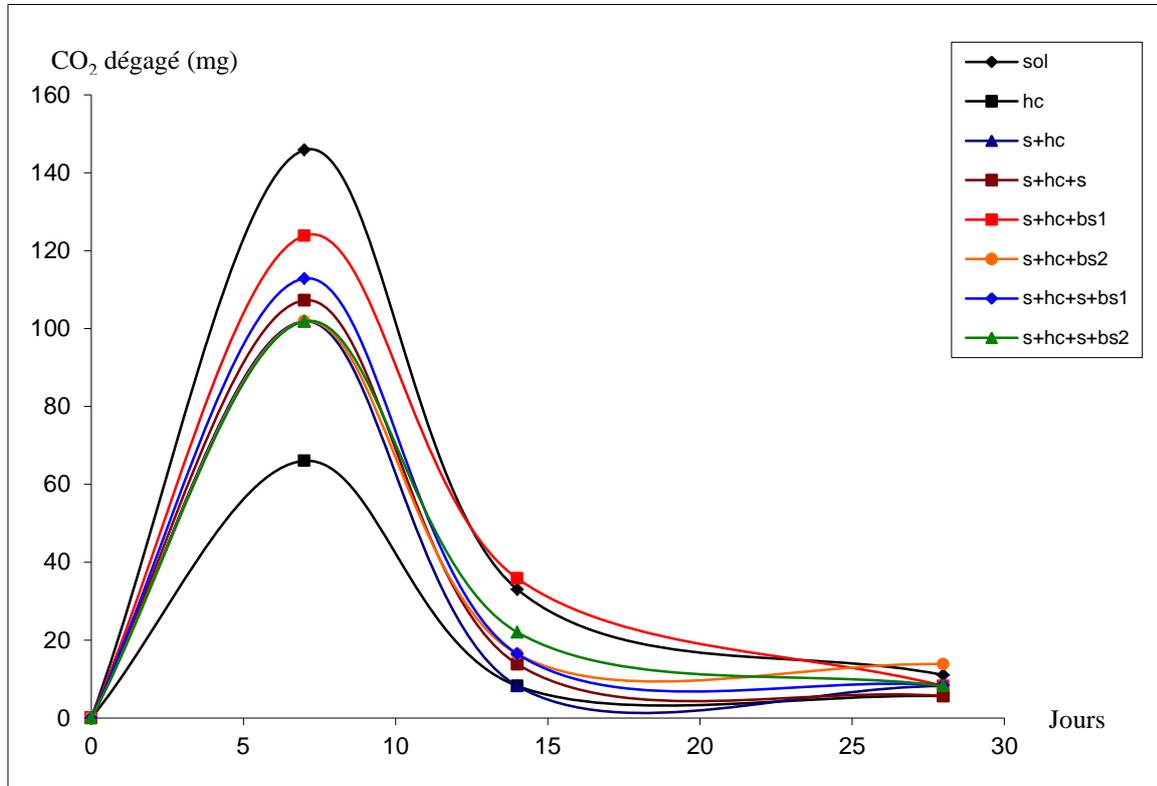


Fig. 18 : Dégagement hebdomadaire de CO₂.

Comparaison des différents traitements au sol témoin

La production de CO₂ est significativement plus intense dans le sol témoin que dans le sol contaminé traduisant l'effet dépressif des hydrocarbures vis-à-vis de l'activité biologique du sol. Cette production est plus importante entre 0 et 7 jours puis diminue de plus en plus. Cette diminution est plus marquée entre 14 et 28 jours, ceci peut être dû à la diminution des sources de carbone facilement utilisable.

Aussi, la production hebdomadaire de CO₂ est plus intense entre 0 et 7 jours pour tous les traitements avec des différences non significatives entre eux. Entre 7 et 14 jours, la quantité de CO₂ produite a baissé notablement mais différemment entre les traitements suivant l'ordre :

$$BS_2 > BS_1 + S > HC = BS_1 = BS_2 + S > S.$$

L'analyse de la variance fait ressortir des différences significatives.

La quantité de CO₂ produite entre 14 et 28 jours est encore plus faible pour la quasi-totalité des traitements.

La réduction de l'activité biologique dans le sol contaminé est due à l'effet dépressif, signalé par Dommergues et Mangenot (1970) et Duchaufour (2001), des hydrocarbures vis-à-vis de la microflore du sol. Selon Chaussod et *al.* (1986), la plus grande partie du carbone minéralisable est dégagée sous forme de CO₂ en 7 jours à 28°C, vu la vitesse de minéralisation des corps microbiens. Le carbone non microbien est estimé par la quantité de CO₂ dégagée entre 10 et 20 jours.

Par ailleurs, la présence de certains biosurfactants peut inhiber la minéralisation des alcanes saturés et stimuler la minéralisation de certains composés aromatiques (Foght et *al.*, 1989).

IV.2. Contamination en hydrocarbures et biomasse microbienne :

La biomasse microbienne est un paramètre qui permet d'estimer la flore viable du sol. La figure 19 montre l'effet du pétrole sur la biomasse du sol pollué.

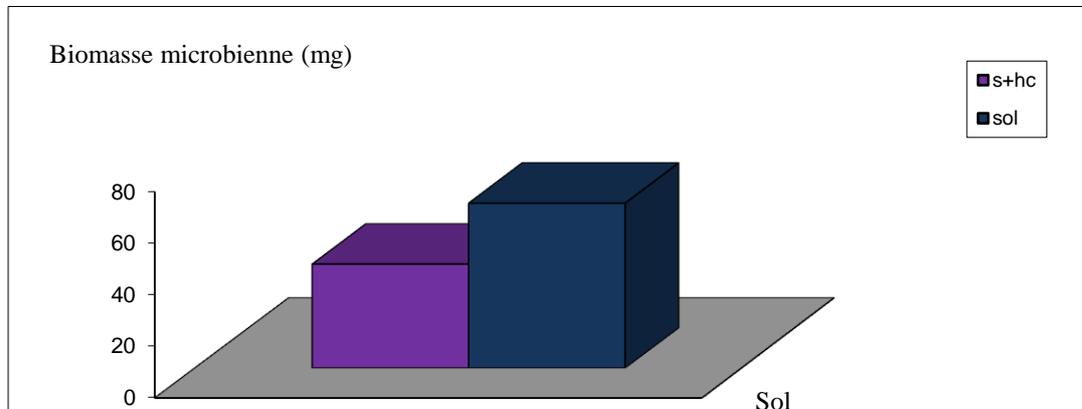


Fig. 19 : La biomasse microbienne dans le sol témoin et le sol contaminé

Le niveau de la biomasse est réduit dans les sols contaminés par les hydrocarbures induisant une faible activité microbienne. Ceci serait dû à l'action toxique du pétrole vis-à-vis des microorganismes du sol.

L'effet de l'apport des biosurfactants et des quatre souches bactériennes sur la biomasse microbienne du sol est illustré par la figure 20. La figure 21 représente une comparaison des résultats obtenus par les différents traitements à ceux enregistrés dans le sol témoin et dans le sol contaminé.

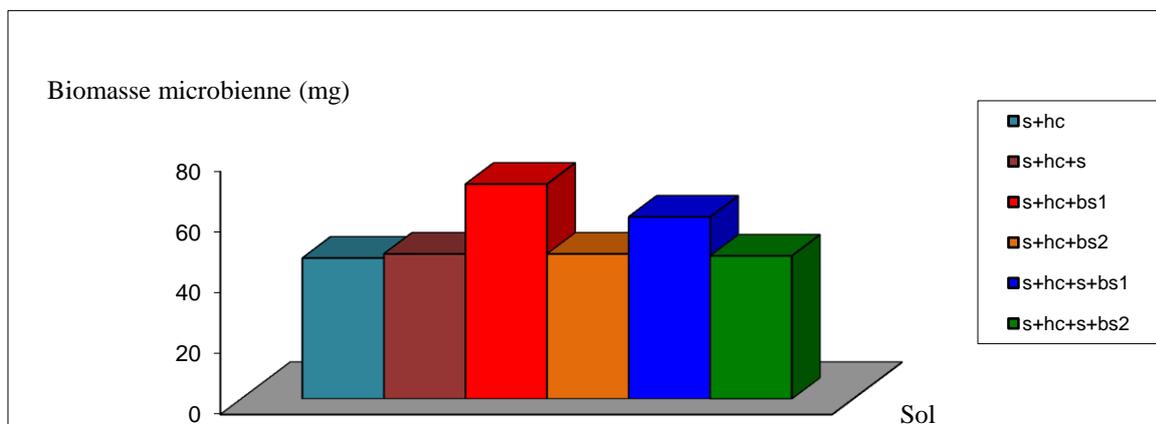


Fig. 20 : La biomasse microbienne dans les sols contaminés traités

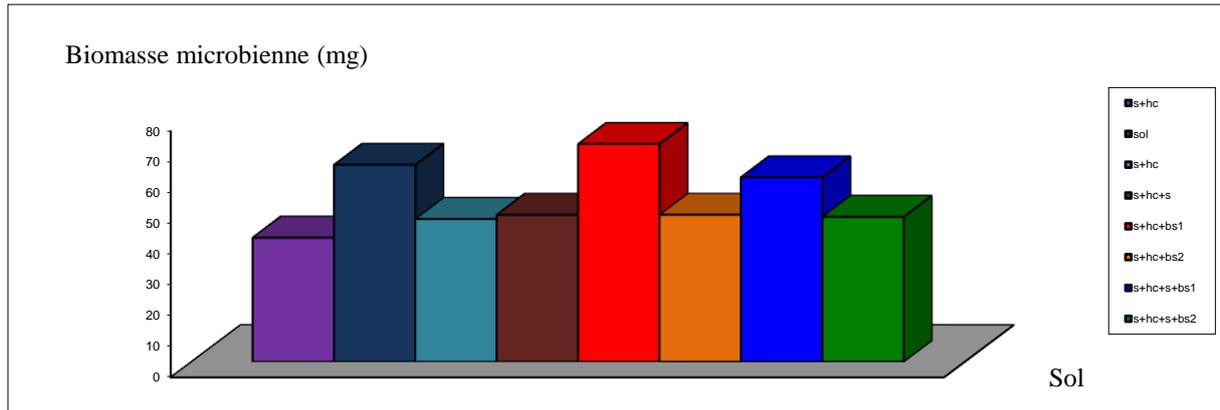


Fig. 21 : La biomasse microbienne. Comparaison des différents traitements au sol témoin

La présence du BS₁ semble favoriser la microflore du sol se traduisant par une biomasse élevée dépassant la valeur enregistrée dans le sol témoin, mais elle n'est pas affectée significativement. La fertilisation n'a pas eu d'effet significatif sur la biomasse microbienne ainsi que l'inoculation par les cellules bactériennes. La biomasse passe parfois du simple au double selon les traitements, bien que les différences entre eux ne soient pas statistiquement significatives.

D'après Barriuso (1996), la réduction de la biomasse microbienne est due à l'action toxique du polluant vis-à-vis de la biomasse microbienne du sol. En effet, Jennings et Tanner (2000) ont noté que le nombre des hétérotrophes aérobies était réduit de plus de la moitié dans un sol de prairie contaminé avec du pétrole. La diminution de la biomasse dans le sol contaminé affecte la décomposition de la matière organique (Sparrow et Sparrow, 1988). Mais l'inverse n'est pas vérifié.

L'effet stimulant de la fertilisation sur l'activité biologique n'affecte pas forcément la biomasse des microorganismes. Selon Pritchard et al. (1992), la fertilisation a augmenté de 3 fois la dégradation du pétrole dans le sol contaminé suite à la catastrophe de l'Exxon Valdez en Alaska, mais n'a pas eu d'effet significatif sur la biomasse microbienne.

IV.2. Contamination par les hydrocarbures et germination des graines :

La germination des graines est un indicateur de la qualité biologique du sol. Elle est estimée par le calcul du taux de germination. La figure 22 représente les taux de germination des graines de blé dans le sol témoin et dans le sol contaminé par le pétrole.

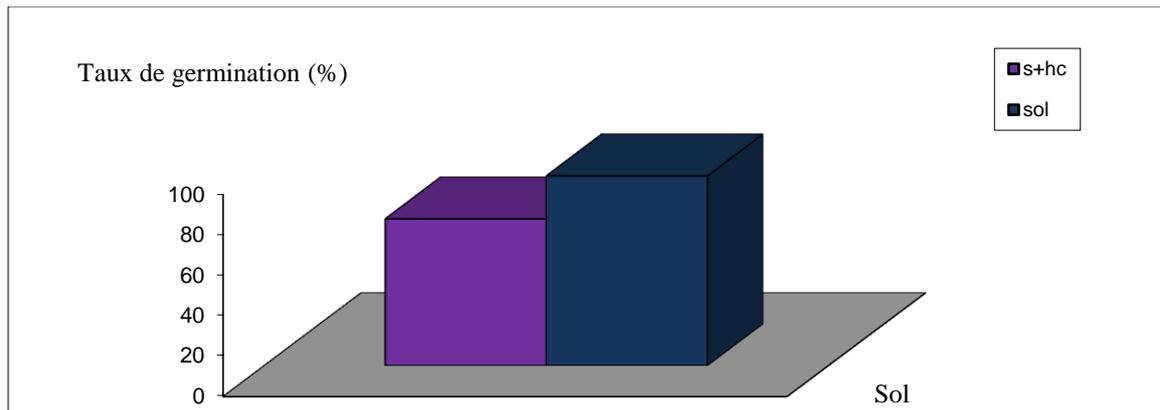


Fig. 22 : Le taux de germination du blé dans le sol témoin et le sol contaminé

Le taux de germination a baissé sensiblement dans le sol contaminé avec du pétrole. Cette baisse serait due à la toxicité de ce dernier vis-à-vis de l'embryon. Elle peut être causée également par la diminution de la mouillabilité des graines à cause de la présence du pétrole qui est une substance huileuse, surtout quand on sait que l'eau est le premier facteur limitant pour la germination.

La figure 23 représente les résultats obtenus pour la germination des graines par les différents traitements appliqués au sol contaminé. La figure 24 montre l'effet de ces traitements par rapport au sol contaminé.

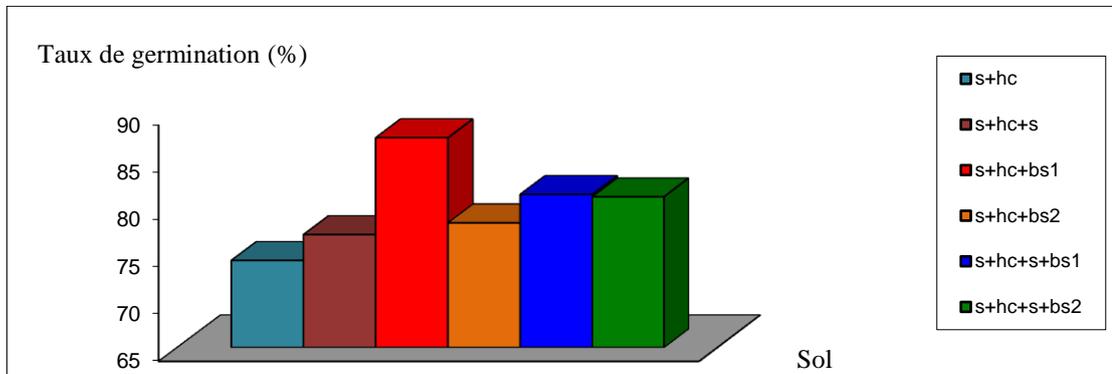


Fig. 23: Le taux de germination des grains de blé dans les sols contaminés traités

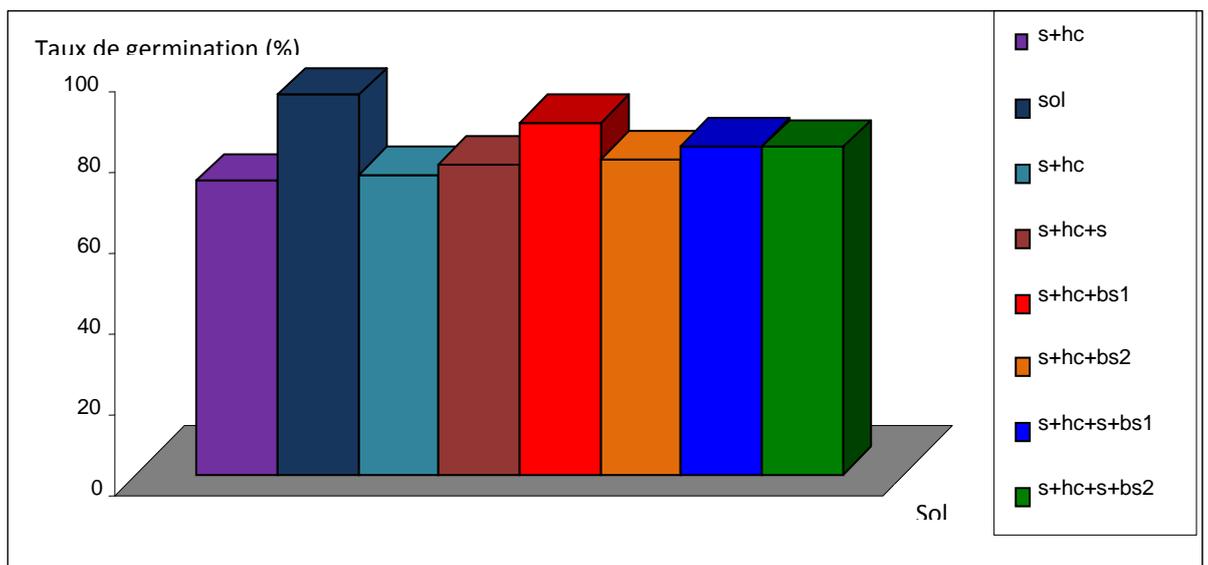


Fig. 24 : Le taux de germination des grains de blé. Comparaison des différents traitements au sol témoin

Les valeurs du taux de germination du blé enregistrées dans le sol traité avec BS1 se rapprochent beaucoup des valeurs obtenues dans le sol témoin. Mais, là encore,

les différences entre les traitements se sont révélées statistiquement non significatives, et ce malgré les faibles taux enregistrés dans le sol contaminé et dans le sol traité avec les souches ou encore avec le BS2 et qui restent bien en dessous des taux de germination sur le sol témoin et sur le sol contaminé traité avec BS1. Ce dernier a peut être permis un meilleur contact des graines avec l'eau en émulsifiant le pétrole. Il a pu aussi engendrer la dégradation des composants du pétrole toxiques pour l'embryon.

D'après Amakiri Onofeghara (1983) et Udo et Fayemi (1975) cités par Chaîneau et al. (1997), la diminution du taux de germination des graines est due à la réduction de la mouillabilité des sols traités par le pétrole.

L'inhibition de la germination est corrélée avec les propriétés hydrophobes des pétroles qui peuvent réduire les échanges d'eau et de gaz. (Amakiri Onofeghara, 1984 ; Udo et Fayemi, 1975 ; Amadi et al., 1992 in Chaîneau et al., 1996).

Selon Chaîneau et al. (1996), la germination des graines est affectée différemment par les fractions du pétrole, les aromatiques étant moins toxiques.

Le pétrole peut pénétrer dans les graines et altérer les réactions métaboliques et/ou tuer l'embryon. (Udo et Fayemi 1975 in Chaîneau et al. 1996).

IV.4. Conclusion :

L'apport de biosurfactants a engendré la levée de l'inhibition du pétrole sur l'activité microbienne du sol. L'inoculation des souches isolées quand à lui n'a pas eu l'effet attendu, mais leur association avec les biosurfactants s'est révélée être plus efficace.

Le BS1 a été plus efficace dans la production de CO₂ entre 7 et 14 jours alors que le BS2 l'a été entre 14 et 28 jours.

Seul le biosurfactant produit par *P. fluoescens* a augmenté la biomasse microbienne dépassant même celle du sol témoin et se rapprochant du sol témoin, en ce qui concerne le taux de germination et la production cumulée de CO₂.

L'apport de l'azote et du phosphore a permis une amélioration de l'activité biologique du sol ainsi que sa biomasse. Il a également eu un effet positif sur la germination des graines.

Conclusion

Conclusion générale

Le pétrole se présente comme un mélange complexe d'hydrocarbures. Sa dégradation implique une microflore diversifiée du fait de la spécificité des fonctions dégradatives. Il est caractérisé par l'hydrophobicité de ses molécules très peu solubles dans l'eau, ce qui réduit leur biodisponibilité.

Ce travail a pour objectif d'optimiser la biodégradation des hydrocarbures dans le sol par le biais de l'inoculation de souches capables de les dégrader, de la fertilisation azotée et phosphatée et de l'apport de biosurfactants qui permettent une meilleure solubilité des hydrocarbures du pétrole dans l'eau.

Dans la première partie de ce travail, quatre souches bactériennes ont été isolées à partir des fonds de bacs de stockage de raffinerie. Elles ont été identifiées, après examen des colonies, des cellules, et de leurs réponses aux tests biochimiques, comme étant *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mendocina*, *Alcaligenes denitrificans* et *Aeromonas hydrophila*. L'étude de la physiologie de ces souches a révélé qu'elles étaient toutes tolérantes par rapport à la concentration des hydrocarbures, mais que seule *Alcaligenes denitrificans* a pu croître à 0 et 41°C, dans un milieu acide ou basique ou même à 10% de NaCl.

La deuxième partie ayant porté sur l'aptitude des souches isolées à produire des biosurfactants a révélé que les souches *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas mendocina* ont pu produire des biosurfactants qui ont réduit la tension de surface du milieu jusqu'à 33,5 et 40,5 dynes / cm respectivement. Ces biosurfactants présentent des CMC de 0,2 g/l et 0,6 g/l leur permettant d'être efficaces même à faible concentration. Les deux autres souches n'ont pas été capables de produire des biosurfactants dans les conditions de l'expérimentation. La composition du milieu et plus particulièrement la source de carbone utilisée a été probablement le facteur limitant.

Dans la dernière partie, nous avons réalisé un essai de réhabilitation d'un sol agricole artificiellement contaminé avec du pétrole brut en utilisant les souches isolées et les biosurfactants produits et en optimisant l'activité microbienne du sol par un supplément d'azote et de phosphore. La réhabilitation est évaluée par l'activité

biologique globale, la biomasse microbienne et le taux de germination des graines de blé qui sont des indicateurs de la qualité biologique du sol.

Il en ressort que l'apport du biosurfactant produit par *P. fluorescens* a amélioré la biodégradation du pétrole brut dans le sol, estimée par la quantité de CO₂ dégagée. L'association souches-biosurfactant s'est révélée être d'une efficacité relative.

Le biosurfactant par son action de solubilisation et d'émulsification des hydrocarbures a augmenté la disponibilité de ceux-ci pour les microorganismes, augmentant ainsi leur taux de dégradation.

L'inoculation du sol avec les souches n'a pas eu l'effet améliorant attendu. Ceci serait lié à un problème d'adaptation de ces souches-là au sol.

L'apport des éléments minéraux a eu l'effet attendu en augmentant l'activité biologique du sol car l'azote et le phosphore sont des facteurs limitants dans la dégradation d'hydrocarbures.

En outre, aucun des traitements n'a eu un effet significatif sur la biomasse microbienne et la germination des graines de blé, bien que l'apport du BS1 se démarque en donnant des valeurs allant jusqu'au double de celles obtenues avec les autres traitements. C'est celui qui se rapproche le plus du sol témoin.

Ce travail a permis également de vérifier l'effet inhibiteur du pétrole brut sur l'activité biologique du sol ainsi que son effet dépressif vis-à-vis de la microflore du sol et de la germination des graines.

Pour une meilleure compréhension des relations biosurfactants-souches-hydrocarbures dans le sol, l'extraction des biosurfactants à partir du sol et leur caractérisation semblent être indispensables.

La caractérisation des métabolites de la biodégradation des hydrocarbures s'avère nécessaire pour pouvoir suivre leur cinétique dans le sol.

Enfin, pour une bioaugmentation effective il serait préférable de sélectionner des souches indigènes.

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

Abouseoud M.; Maachi R.; Amrane A.; Bouderga S.; Nabi A., 2008: Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. Desalination. Vol. 223. pp: 143-151.

Abouseoud M.; Yataghene A.; Amrane A.; Maachi R., 2010: Production of a biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens* – Solubilisation and wetting capacity. Chemical Engineering Transactions. Vol. 20. pp: 291-296.

Abu Ruwaida A.S.; Banat I.M.; Haditirto S.; Salem A.; Kadri M., 1991 : Isolation of biosurfactant-producing bacteria. Product characterization and evaluation. Acta Biotechnologica. Vol.11. N°4. pp : 315-324.

Amellal N.; Portal J.; Vogel T.; Berthelin J., 2001 : .Distribution and location of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and PAH-degrading bacteria within polluted soil aggregates. Biodegradation. Vol.12. N°1. pp : 49-57.

Environnement Canada 1994 : Loi canadienne sur la protection de l'environnement. Liste des substances d'intérêt prioritaire. Rapport d'évaluation. N° En40-215/42F ISBN 0-662-99956-8. National printers, Ottawa. 11p.

Le matin, 2004 : L'Algérienne des Eaux rassure. Article publié dans le quotidien algérien Le matin du 11 mars 2004.

Environnement Canada, 2005 : Valorisation des combustibles- Procédés de raffinage. Environnement Canada. Site d'Environnement Canada.

(http://www.ec.gc.ca/clenair-airpur/CAOL/OGEB/fuels/reports/cnslt_rpts/lit_rev/litsec9_f.htm).

Le quotidien d'Oran, 2006 : Plus de deux millions de tonnes de déchets dangereux stockés en Algérie. Le Quotidien d'Oran du 09/01/2006.

La tribune, 2009 : Dégazage et déballastage sauvages des navires en mer- Marée noire sur la « grande bleue ». Article du quotidien algérien La tribune du 22 juillet 2009.

Le temps d'Algérie, 2010 : Les habitants de la vallée de la Soummam risquent de boire de l'eau polluée à l'essence. Alors que le pétrole continue de contaminer des cours d'eau. Article du quotidien algérien Le temps d'Algérie du 15 février 2010.

Atlas R.M., 1981 : Microbial degradation of petroleum hydrocarbons : an environmental perspective. Microbiological Reviews. Vol.45. pp : 180-209.

Atlas R.M., 1991 : Microbial hydrocarbon degradation-Bioremediation of oil spills. Journal of Chemistry, Technology and Biotechnology. Vol.52. pp : 149-156.

Babu P.S. ; Deshpande M. ; Juwarkar A. ; Khanna P., 1994 : Characterization and properties of the microbial biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain BS1. Biotechnology. Vol.4. N°5. pp : 302-305.

Baize D., 2000: Guide des analyses en pédologie. 2^{ème} éd revue et augmentée. Ed. INRA. 257p.

Banat I.M. ; Samarah N. ; Murad M. ; Horne R. ; Banerjee S., 1991 : Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Vol.7. pp : 80-88.

Banat I.M., 1995 : Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation : a review. Bioresource Technology. Vol.51. pp : 1-12.

Banat I.M., 2000 : Les biosurfactants plus que jamais sollicités. Biofutur. Vol.198. pp : 44-47.

Banks M.K. ; Lee E. ; Schwab A .P., 1999 : Evaluation of dissipation mechanisms for benz[a]pyrene in the rhizosphere of tall fescue. Journal of Environmental Quality. Vol. 28. pp : 294-298.

Barriuso E. ; Calvet R. ; Schiavon M. ; Soulas G., 1996 : Les pesticides et les polluants organiques des sols. Etude et gestion des sols. Vol. 3. N°4. pp : 279-296. N° spécial.

Bartha R., Song H-G., Wang X., 1990 : Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 56. N°3. pp : 652-656.

Black C.A., 1965 : Methods of soil analysis. Part2. Chemical and microbiological properties. Edt American Society of Agronomy, Inc Publisher, Madison, Wisconsin USA. 784p.

Bliefert C. ; Perraud R., 2004 : Chimie de l'environnement ; Air, Eau, Sols, Déchets. 1^{ère} éd De Boeck Université. 477p.

Bergey D.H., 1974 : Bergey's manual of determination bacteriology. Edt Williams et Wilkins, Baltimore. 1266 p.

Bezalel L. ; Hadar Y. ; Cerniglia C.E., 1996 : Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology. Vol.62. N°1. pp : 292-295.

- Boldrin B. ; Tiehm A. ; Fritzsche C., 1993** : Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene and pyrene by *Mycobacterium sp.*. Applied and Environmental Microbiology. Vol.59. N°6. pp : 1927-1930.
- Bonnard N.M., Brondeau T., Falcy M., Jaraot D., Psauier E., 2007** : Fiche toxicologique T.49 Edt INERIS. 5p.
- Bumpus J.A., 1989** : Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology. Vol.55. N°1. pp : 154-158.
- Cancel N., 2005** : Evaluation détaillée des risques. Rapport d'étude ARCADIS. 71p.
- Cerniglia C.E., 1992** : Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation. Vol.3. pp : 351-368.
- Chaineau C.H. ; Morel J.L. ; Oudot J., 1996** : Land treatment of oil based drill cuttings in an agricultural soil. Journal of Environmental Quality. Vol.25. N°4. pp : 858-867.
- Chaineau C.H. ; Morel J.L. ; Oudot J., 2000** : Biodegradation of fuel oil hydrocarbons in the rhizosphere of maize. Journal of Environmental Quality. Vol.29. pp : 569-578.
- Chaussod R. ; Nicolardot B. ; Catroux G., 1986** : Mesure en routine de la biomasse microbienne des sols par la méthode de fumigation au chloroforme. Science du Sol. Vol.86. N°2. pp : 201-211.
- Chaussod R ; Zuvia M. ; Breuil M. ; Hetier J., 1992** : Biomasse microbienne et « statut organique » des sols tropicaux : exemple d'un sol vénézuélien du Llanos sous différents systèmes de culture. Cahiers Orstom. Série Pédologie. Vol.27. N°1. pp : 59-67.
- Chaussod R., 1996** : La qualité biologique des sols, évaluation et implication. Etude et Gestion des sols. Vol. 3. N°4. pp : 245-260.
- Chitour C., 1983** : Le raffinage du pétrole. T1 Edt OPU. 93p.
- Costes J.M. ; Druelle B., 1997** : Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement : la réhabilitation des anciens sites industriels. Revue de l'Institut Français du Pétrole. Vol.52. N°4. pp : 944-947.
- Dean S.M. ; Jin Y. ; Cha D.K. ; Wilson S.V. ; Radosevich M., 2001** : Phenanthrene degradation in soils co-inoculated with phenanthrene-degrading and biosurfactant-producing bacteria. Journal of Environmental Quality. Vol.30. pp : 1126-1133

Doelle R.M., 1979 : Aerobic respiration- Hydrocarbon metabolism. Marcel Dekker. NY. 557p.

Dommergues Y., 1968 : Principes de méthodologie en microbiologie en microbiologie du sol. Nouveaux documents pour une étude intégrée en écologie du sol. pp : 13-30. Edt Centre National de la Recherche Scientifique.

Dommergues Y. ; Mangenot F., 1970 : Ecologie microbienne du sol. Edt Masson, Paris. 796p.

Dridier N., Sennoun S., 2000 : Essai d'amélioration de la biodégradation des hydrocarbures dans les sols. Thèse Ing. Agro., INA, Alger. 55p.

Duchaufour Ph., 1991 : Abrégé de pédologie : sol, végétation et environnement. Edt Masson, Paris. 334p.

Duchaufour Ph., 2001 : Introduction à la science du sol. Sol, végétation, environnement. 6^{ème} edt Dunod, Paris. 395p.

Fan S. ; Scow K .M., 1993 : Biodegradation of trichloroethylene and toluene by indigenous microbial populations in soil. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 59. N°6. pp : 1911-1918.

Fiechter A., 1992 : Biosurfactants moving towards industrial application. Tibtech. Vol.10. pp : 208-217.

Field S.D., 1989 : Biological treatment of oilfield and petrochemical hazardous wastes. Microbial degradation of organic compounds, Gibson D ;T. Marcel Dekker. NY. pp : 289-299.

Finnerty W.R. ; Singer M.E., 1984: The microbial biosurfactant-physiology, Biochemistry and Applications. Development in Industrial Microbiology. Vol.25. pp : 31-40.

Finnerty W.R, 1992: Microbial enhanced oil recovery. Genetic Engineering and Biotechnology Monitoring. Vol.32. pp : 36-43.

Foght J. ; Gutnick D. ; Westlake D.W.S., 1989 : Effect of emulsan on degradation of crude oil by pure and mixed bacterial cultures. Applied Environmental Microbiology. Vol.55. N°1. pp : 36-42.

Georgiou G. ; Lin S.C., Sharma M.M., 1992 : Surface-active compounds from microorganisms. Biotechnology. Vol.10. pp : 60-65.

Grifoll M. ; Casellas M . ; Bayona J.M. ; Solanas A.M., 1992 : Isolation and characterization of a fluorene-degrading bacterium. Identification of ring oxidation and

ring fission products. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 58. N°9. pp : 2910-2917.

Guerra-Santos L. ; Kappeli O. ; Fiechter A., 1984 a: *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. Applied and Environmental Microbiology. Vol.48. N°2. pp : 301-305.

Guerra-Santos L. ; Kappeli O. ; Fiechter A., 1984 b: Process development for the production of biosurfactants. Eur. Cong. Biotech. Vol.3. N°1. pp : 21-24.

Harvey S., Elashvili I., Valdes J.J., Chakrabarty A.M., 1990 : Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant. Biotechnology. Vol.8. pp : 228-230.

Holden A. ; Firestone M.K., 1997 : Soil microorganisms in soil clean-up : How can we improve our understanding. Journal of Environmental Quality. Vol.26. N°1. pp : 32-40.

ICSC, 2004 : Fiches internationales de sécurité chimique. Edt National Institute for Health Occupational Safety. 5p.

Jennings E.M. ; Tanner R.S., 2000 : Biosurfactant-producing bacteria found in contaminated and uncontaminated soils. Proceedings of the 2000 Conference on Hazardous Waste Research. pp : 299-305.

Joner E.J. ; Leyval C., 2003 : Phytoremediation of organic pollutants using mycorrhizal plants : a new aspect rhizosphere interactions. Agronomie. Vol.23. pp : 495-502.

Kappeli O. ; Fiechter A., 1986 : Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. Applied Environmental Microbiology. Vol.65. N°1. pp : 163-168.

Kaid-Tlilane N., 2005 : Espace, emploi et environnement : Cas de l'Algérie. Document Ministère de l'environnement et de l'aménagement du territoire. Direction de l'environnement. 16p.

Kokub D. ; Shafeeq M. ; Khalid Z.M. ; Malik M.A., 1989 : Isolation, screening and characterization of biosurfactant producing bacteria. Proceeding International Symposium Biotechnology and Energy. From 16 to 21 dec. pp : 221-231.

Koller E., 2004 : Traitement des pollutions industrielles. Eau. Air. Déchets. Sols. Boues. Edt Dunod, Paris. Série Environnement et sécurité. L'usine nouvelle. 424p.

Larid M. ; Boulahdid M. ; Belkessa R. ; Sefiane O. ; Boutiba M. ; Louanchi F., 2001 : Le littoral, état et perspectives. Edt Aceti, Alger. 71p.

Laribi A., 1998 : Etude de la composition des déchets d'hydrocarbures en vue de leur utilisation en agriculture. Mém. Ing. Agro., INA Alger, 59p.

Larpent J-P., 1990 : Mémento technique de microbiologie. Microorganismes eucaryotes et procaryotes. 2^{ème} edt, Lavoisier, Paris. 417 p.

Larpent J-P., 1998 : Mémento technique de microbiologie. Microorganismes eucaryotes et procaryotes. 3^{ème} edt, Lavoisier, Paris. 396 p.

Lau K.L. ; Tsang Y.Y. ; Chin S.W., 2003 : Use of spent mushroom compost to bioremediate PAH- contaminated samples. Chemosphere. Vol.52. pp : 1539-1546.

Liang Y, Gardner D.R., Miller C.D., Chen D., Anderson A.J., Weimer B.C., Sims R.C., 2006 : Proposed pyrene degradation pathway of Mycobacterium sp. Strain KMS. Applied and Environmental Microbiology. Vol.72. N°12. pp : 7821-7828.

Lin S.C. ; Carswell K.S. ; Sharma M.M., 1994 : Continous production of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus licheniformis* JF-2. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol.41. pp : 281-285.

Malakul P. ; Srinivasan K.R. ; Wang H.Y., 1998 : Metal toxicity reduction in naphtalene biodegradation by use of metal-chelating adsorbants. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 64. N°11. pp : 4610-4613.

Marchal A., 1987 : Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Edt Doin, Paris. 505 p.

Margesin R. ; Schinner F., 1997 : Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted microorganisms for biodegradation of Diesel oil in Alpire soils. Applied and Environmental Microbiology. Vol.63. N°7. pp : 2660-2664.

Mattei G., 1995 : Dégradation des hydrocarbures d'origine pétrolière par voie microbiologique. Bionergies N°2. pp : 1-5.

Minh Ngoc T.T., 2010: Mécanismes physiologiques et biochimiques induits chez *Yarrowia lypolytica* en réponse à des modifications de l'environnement physico-chimique des cellules. Thèse de Doctorat de l'Université de Bourgogne.107p.

Morgan P. ; Watkinson R.J., 1989 : Microbiological methods for the clean-up of soiland ground water contaminated with halogenated hydrocarbons. FEMS Microbiology reviews. Vol.63. pp : 277-300.

Morgan P. ; Watkinson R.J., 1994 : Biodegradation of components of petroleum. Biochemistry of Microbial Degradation. Vol.2. N°1. pp : 1-31.

Morikawa M. ; Daido H. ; Murata S. ; Shimonishi Y. ; Imanaka T., 1993 : A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter sp.* strain MIS38. journal of Bacteriology. Vol.175. N°20. pp : 6456-6466.

Morill L.G. ; Mahilum B.C. ; Mohaidin S.H., 1982 : Organic compounds in soil : sorption, degradation and persistence. Edt Ann. ARBOR. 326p.

Mougin C. ; Chaplain V. ; Gaillardon P., 1996 : Le traitement biologique des sols pollués par des composés organiques. Intérêts des champignons filamenteux. Le courrier de l'Environnement n°28, Août 1996.

Ngo C., 2002 : L'énergie. 2^{ème} edt Dunod, Paris. 109p .

Ngo C. ; Régent A., 2004 : Déchets et pollution. Edt Dunod, Paris. 152p.

Pelmont J., 1993 : Bactéries et environnement. Adaptations physiologiques. Presses universitaires de Grenoble. 899p.

Persson A. ; Osterberg E. ; Dostalek M., 1988 : biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* 378 : growth and product characteristics. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol.29. pp : 1-4.

Persson A. ; Molin G., 1987 : Capacity for biosurfactant production of environmental *Pseudomonas* and *Vibrionaceae* growing on carbohydrates. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol.26. N°5. pp : 439-442.

Phillips T.M. ; Seech A.G. ; Lin D. ; Lee H. ; Trevors J.T., 2000 : Monitoring biodegradation of creosote in soils using radiolabels, toxicity tests and chemical analysis. Environmental Toxicology. Vol.15. N°2. pp : 99-106.

Pichard A., 2005 : Fiches de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. INERIS-DRC.

Pritchard P.H. ; Mueller J.G. ; Rogers J.G. ; Kremer F.V. ; Glaser J.A., 1992 : Oil spill bioremediation : experience, lessons and results from the Exxon Valdez oil spill in Alaska. Biodegradation. Vol.3. pp : 315-335.

Pruthi V. ; Cameotra S.S., 1995 : Rapid method for monitoring maximum biosurfactant production obtained by acetone precipitation techniques. Biotechnology. Vol.9. N°4. pp 271-277.

Ramade F., 1992 : Précis d'écotoxicologie. Edt Masson, Paris. 300p.

Reiling H.E. ; Thanei-wyss U. ; Guerra-Santos L. ; Hirt R. ; Kappeli O. ; Fiechter A., 1986 : Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. Applied Environmental microbiology. Vol.51. N°5. pp : 985-989.

Ritchnow H.H. ; Seifert R. ; Hefter J. ; Link M. ; Francke W. Schaefer G. ; Michaelis W., 1997 : Organic pollutants associated with micromolecular soil organic matter : Mode of binding. *Organic Geochemistry*. Vol.26. N°3. pp : 745-758.

Rivière J.L., 1998 a: Evaluation du risque écologique des sols pollués. Edt Lavoisier Tec et Doc, Paris. 230p.

Rivière J.L., 1998 b: Les sites pollués : Traitement des sols et des eaux souterraines Edt Lavoisier Tec et Doc, Paris. 204p.

Rocha C. ; San-Blas F. ; San-Blas G. ; Vierma L., 1992 : Biosurfactant production by two isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol.8. N°2. pp : 125-128.

Rosenberg E. ; Legmann R. ; Kushmaro A. ; Taube R. ; Ron E.Z., 1992 : Petroleum bioremediation- A multiphase problem. *Biodegradation*. Vol.3. pp : 337-350.

Saada A. ; Nowak C. ; Coquereau N., 2005 : Etat des connaissances sur l'atténuation naturelle des hydrocarbures. Rapport du BRGM. RP 53739-FR. 107p.

Sanseverino J. ; Applegate B.M. ; Henry King J.M. ; Saylor G.S., 1993 : Plasmid-mediated mineralization of naphthalene, phenanthrene and anthracene. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 59. N°6. pp : 1931-1937.

Schneider J. ; Grosser R. ; Joyasimhulu K. ; Xue W. ; Warshawsky D., 1996 : Degradation of pyrene, Benz[a]anthracene and benz[a]pyrene by *Mycobacterium sp.* strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol.62. N°1. pp : 13-19.

Scriban R., 1999 : La restauration par voie microbiologique des sols contaminés par les polluants organiques. 5^{ème} ed. Tec et Doc. 865p.

Shafeeq M. ; Kokub D. ; Khalid Z.M. ; Malik K.A., 1989 : Comparison of some indigenous bacterial strains of *Pseudomonas aeruginosa* for production of biosurfactants. *Proceeding International Symposium Biotechnology for Energy from 16 to 21 dec.* pp : 243-249.

Sims J.L. ; Sims R.C. ; Matthews J.E., 1989 : Bioremediation of contaminated surface soils. Rapport EPA 600/9-89/073. Washington, D.C.

Smith M.R., 1994 : The physiology of aromatic hydrocarbon degrading bacteria. In : *Biochemistry of microbial degradation (Ratledge C)*. Edt Kluwer Academic publishers. Netherlands. 356p.

Singer M.E., 1985 : Microbial biosurfactants. Microbial and oil recovery. International Bioresources Journal. Vol.1. pp : 19-38.

Soltani 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 de Paris 6. 284p.

Sparrow S.D. ; Sparrow E.B., 1988 : Microbial biomass and activity in a subarctic soil ten years after crude oil spills. Journal of Environmental Quality. Vol.17. N°2. pp : 304-309.

Stapleton R.D. ; Savage D.C. ; Sayler G.S. ; Stacey G., 1998 : Biodegradation of aromatic hydrocarbons in an extremely acidic environment. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 64. N°11. pp : 4180-4184.

Stelmack P.L. ; Gray M.R. ; Pickard M.A., 1999 : Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. Applied Environmental Microbiology. Vol.65. N°1. pp : 163-168.

Van Duuren B.L. ; Sivak A. ; Segal A. ; Seidman L. ; Katz C., 1973 : Dose-response studies with a pure tumor-promoting agent phorbolmyristat acetate. Cancer Research. Vol.33. pp : 2166-2172.

Van Gestel C.A.M., 1993 : Assessment of ecotoxicological risk values for chemicals in soil, water and sediments. Proceedings third SRA- Euro Conference on risk analysis, Paris du 16 au 18 dec. pp : 269-277.

Wilste C.C. ; Rooney W.L. ; Chen Z. ; Schwab A.P. ; Banks M.K., 1998 : Greenhouse evaluation of agronomic and crude oil-phytoremediation potential among Alfalfa genotypes. Journal of Environmental Quality. Vol.27. N°1. pp : 169-173.

Yeung P.Y. ; Johnson R.L. ; Xu J.G., 1997 : Biodegradation of petroleum hydrocarbons in soil as affected by heating and forced aeration. Journal of Environmental Quality. Vol.26. pp : 1511-1516.

Zajic J.E. ; Guignard H. ; Gerson D.F. , 1977 : Properties and biodegradation of a bioemulsifier from *Corynebacterium hydrocarbonoclastus*. Biotechnology and Bioengineering. Vol.19. pp : 1303-1320.

Annexes

Annexe 1 : quelques caractéristiques physico- chimiques des hydrocarbures
(Saada et al., 2001 et Pichard, 2005).

	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Pression de vapeur (Pa) à 20°C	Solubilité (g.l ⁻¹)	Constante de Henry (Pa.m ³ .mol ⁻¹) à 25°C
Naphtalène	128,2	7,2	31,8	48,9
Acénaphène	154,21	0,282	3,7	14,7
Fluorène	166,2	4.10 ⁻²	1,98	9,2
Phénanthrène	178,23	0,091	1,2	2,9
Anthracène	178,23	3,6.10 ⁻⁴	1,29	4,05
Fluoranthène	202,26	0,8.10 ⁻³	0,16	0,8
Pyrène	202,26	1,2.10 ⁻²	0,13	1,1.10 ⁻³
Benzo[b]fluoranthène	252,3	6,7.10 ⁻⁵	0,012	0,05
Benzo[k]fluoranthène	252,3	1,3.10 ⁻⁸	7,6.10 ⁻⁴	0,069
Benzo[a]pyrène	252,3	7,3.10 ⁻⁷	3.10 ⁻³	4.10 ⁻²
Dibenzo[a,h]anthracène	278,35	1,3.10 ⁻⁸	0,5.10 ⁻³	4,8.10 ⁻³
Benzo[g,h,i]pérylène	276,3	1,4.10 ⁻⁸	2,6.10 ⁻⁴	2,7.10 ⁻²
Indeno[1,2,3,c,d]pyrène	276,34	1,3.10 ⁻⁸	0,062	2,9.10 ⁻²
Benzène	78,11	10032	1,83	558
Toluène	92,14	2922	0,52	673
Xylène	106,16	663	0,15	523

Annexe 2 : Mode opératoire des tests biochimiques

1. Catalase :

Etaler une crème bactérienne sur une lame contenant 2 à 3 gouttes d'eau oxygénée à 10 v. La présence de la catalase se traduit par une production de bulles de gaz indiquant la conversion de l'eau oxygénée en eau et oxygène.

2. Oxydase :

Une crème bactérienne est déposée sur un disque imprégné de diméthyl paraphénylène et imbibé d'eau sur une lame de microscope.

La présence du cytochrome oxydase se manifeste par l'apparition d'une couleur violette indiquant la réduction de l'oxygène.

3. B-galactosidase :

Préparer une suspension bactérienne dense dans 25 ml d'eau physiologique à laquelle on ajoute un disque d'ONPG et l'incuber à 37°C pendant 24h.

Une coloration en jaune indique la présence de cette enzyme.

4. Test TSI :

Le milieu TSI est ensemencé par piqûre centrale du culot et en stries au niveau de la pente. Après incubation à 28°C pendant 24h, la production d'H₂S à partir des acides aminés soufrés est révélée par un noircissement au niveau de l'inoculation.

Ce test permet également de vérifier l'utilisation du glucose et du lactose par la souche étudiée. Si la couleur du culot vire au jaune, le test du glucose est positif et si le culot reste rouge, le test est négatif. Le test lactose est dit positif si la pente vire au jaune.

5. Test gélose au sang (GS) :

Le milieu GS ensemencé par stries vire du rouge au noir lorsque le test est positif, traduisant la capacité des souches testées à hémolyser le sang.

6. Utilisation d'hétérosides :

L'utilisation de l'esculine est décelée par une coloration noirâtre du milieu après incubation à 28°C pendant 24h.

7. Test de l'arginine dihydrolase (ADH) :

Deux tubes à hémolyse contenant de l'arginine dont un est complété avec de l'huile de vaseline sont ensemencés par la suspension bactérienne et incubés à 30°C pendant 24 à 72h. Un témoin sans arginine est réalisé.

La dégradation de l'arginine est mise en évidence au biais de l'indicateur de pH qui vire du rouge au violet dans le milieu contenant l'huile de vaseline.

8. Test de la lysine décarboxylase (LDC) :

Un tube à hémolyse contenant le milieu Moller contenant de la lysine est ensemencé puis incubé à 30°C pendant 24 à 48h. Un témoin sans lysine est réalisé en parallèle.

La décarboxylation de la lysine est indiquée par l'apparition d'une coloration pourpre dès qu'on ajoute une solution de soude 4N puis 2 ml de chloroforme.

9. Test de l'indole :

Des tubes contenant de l'eau peptonée sont inoculés puis incubés à 28°C 24 à 48h. La production d'indole à partir du tryptophane se traduit par l'apparition d'un anneau rouge en surface après avoir ajouté quelques gouttes du réactif de Kovacs.

10. Recherche de la tryptophane désaminase (TDA) :

Le milieu urée-indole est ensemencé avec une suspension épaisse et est incubé à 37°C pendant 18 à 24h.

La désamination du tryptophane se traduit par l'apparition d'une couleur brun-rouge après addition de quelques gouttes de TDA.

11. Réduction des nitrates :

Le bouillon contenant des nitrates est ensemencé et incubé pendant 24h. On y ajoute alors une goutte du réactif de Greiss A puis une goutte de réactif de Greiss B.

L'absence d'une coloration révèle qu'il y a eu réduction des nitrates.

12. Utilisation des citrates :

Le milieu Simmons au citrate est ensemencé en stries sur pente puis incubé à 28°C pendant 24h. L'utilisation des citrates se traduit par un changement de couleur du vert au bleu.

13. Test d'oxydation-fermentation :

Il s'agit de déterminer le type de métabolisme énergétique. Pour ce faire, le milieu de Hugh-Leifson est ensemencé dans deux tubes, l'un contenant de l'huile de vaseline.

Si le milieu reste vert, la souche est dite inactive. S'il vire au jaune, en aérobiose, le métabolisme est oxydatif ; en anaérobiose, il est fermentatif, et dans les deux tubes, il est oxydatif et fermentatif.

14. Test VF :

Le milieu viande-foie est inoculé par piqûre centrale puis incubé à 28°C pendant 24h. Une souche qui se développe en surface elle est aérobie stricte, celle qui se développe au fond du tube est dite anaérobie stricte, et celle qui se développe sur tout le milieu est aérobie facultative.

Annexe 3 : protocoles des tests physiologiques

Effet de la température :

Des boîtes de Pétri contenant le milieu dont la composition est détaillée dans le tableau 9, sont ensemencées par stries avec chacune des souches isolées.

Chaque série de boîtes est incubée à une température, soit 4°C, 20°C, 28°C, 37°C ou 41°C.

Effet du pH :

Une gamme de 5 pH est testée comprenant le pH 4 (acide), pH 6,2 (légèrement acide), pH 7 (neutre), pH 7,8 (légèrement alcalin) et pH 9 (alcalin). Le pH du milieu est ajusté à la valeur voulue en ajoutant au milieu tout en l'agitant, des gouttes de HCl ou de NaOH. Le milieu utilisé est le milieu détaillé dans le tableau 9 et les boîtes sont incubées à 28°C.

Effet de la concentration de l'hydrocarbure :

L'hydrocarbure utilisé est le kérosène à différentes concentrations qui sont : 0%, 2%, 5%, 10%, 20% et 30% qui sont ajoutées au milieu décrit dans le tableau 9.

L'incubation se fait à 28°C.

Effet de la salinité :

En ce qui concerne la salinité, le milieu du tableau 9 est utilisé en faisant varier la concentration du NaCl de 0% ; 0,01% ; 0,1% ; 1% et 10%.

Les observations ont été faites quotidiennement pendant une semaine et ont porté sur la présence ou l'absence des colonies, ainsi que sur leur abondance.

Annexe 4 : Résultats de l'analyse statistique

- CO₂ dégagé après 7 jours (sol témoin et sol contaminé):

ddl	CM	Fobs	ET	P	CV
Var. tot. 7	1899,27				
Var. fact. 1	12720,13	132,79	9,79	0,0001	9,2 %
Var. résid. 6	95,79			THS	

- CO₂ dégagé après 14 jours (sol témoin et sol contaminé):

ddl	CM	Fobs	ET	P	CV
Var. tot. 7	3249,71				
Var. fact. 1	21840,50	144,4	12,30	0,0001	9,7 %
Var. résid. 6	151,25			THS	

- CO₂ dégagé après 28 jours (sol témoin et sol contaminé) :

ddl	CM	Fobs	ET	P	CV
Var. tot. 7	3552,21				
Var. fact. 1	24200,00	218,18	10,53	0,0000	7,8 %
Var. résid. 6	110,92			THS	

- Biomasse microbienne (sol témoin et sol contaminé) :

ddl	CM	Fobs	ET	P	CV
Var. tot. 7	315,24				
Var. fact. 1	1113,80	6,11	13,5	0,0473	25,8 %
Var. résid. 6	182,14			S	

- Germination des graines (sol témoin et sol contaminé) :

ddl	CM	Fobs	ET	P	CV
Var. tot. 7	227,7				
Var. fact. 1	903,13	7,84	10,73	0,0307	12,9 %
Var. résid. 6	115,13			S	

- CO₂ dégagé après 7 jours (sol ayant reçu les différents traitements) :

ddl	CM	Fobs	ET	P	CV
Var. tot. 23	584,60				
Var. fact. 5	681,07	1,22	23,62	0,3396	22,6 %
Var. résid. 18	557,8			NS	

- CO₂ dégagé après 14 jours (sol ayant reçu les différents traitements) :

ddl	CM	Fobs	ET	P	CV
Var. tot. 23	440,34				
Var. fact. 5	1177,87	5	15,35	0,0049	12,1 %
Var. résid. 18	235,47			HS	

-CO₂ dégagé après 28 jours (sol ayant reçu les différents traitements) :

ddl	CM	Fobs	ET	P	CV
Var. tot. 23	533,10				
Var. fact. 5	1157,57	3,22	18,96	0,0299	14 %
Var. résid. 18	359,64			S	

- Biomasse microbienne (sol ayant reçu les différents traitements) :

ddl	CM	Fobs	ET	P	CV
Var. tot. 23	143,31				
Var. fact. 5	267,29	2,46	10,43	0,0726	18,2 %
Var. résid. 18	108,87			NS	

- Germination des graines (sol ayant reçu les différents traitements) :

ddl	CM	Fobs	ET	P	CV
Var. tot. 23	48,93				
Var. fact. 5	80,07	1,99	6,35	0,1288	7,9 %
Var. résid. 18	40,28			NS	

- Comparaison des différents traitements au sol témoin :

Paramètres calculés	ddl	CM	Fobs	P	ET	CV	Moyennes
CO ₂ dégagé après 7 jours	31 7 24	559,99 2043,50 127,30	16,05	0,0000 THS	11,28	10,5 %	Témoin 145,75 BS ₁ 123,75 BS ₁ +S 112,75 S 107,25 S.cont.F 101,75 BS ₂ 101,75 S.C 66 C
CO ₂ dégagé après 14 jours	31 7 24	1060,54 3961,55 214,42	18,48	0,0000 THS	14,64	11,5 %	Témoin 178,75 BS ₁ 159,5 BS ₁ +S 129 BS ₂ +S 123,75 S 121 BS ₂ 118,25 S.cont.F 110 S.C 74,25
CO ₂ dégagé après 28 jours	31 7 24	1197,8 4284,7 297,46	14,40	0,0000 THS	17,25	12,7 %	Témoin 189,75 BS ₁ 167,75 BS ₁ +S 137,5 BS ₂ +S 132 S 126,5 BS ₂ 132 S.cont.F 118,25 S.C 79,75
Biomasse microbienne	31 7 24	182,71 373,07 127,19	2,93	0,0229 S	11,28	20,1 %	Témoin 64,05 BS ₁ 70,81 BS ₁ +S 64,08 BS ₂ +S 49,91 S 53,95 BS ₂ 51,93 S.cont.F 53,95 S.C 40,45
Germination des graines	31 7 24	90,14 196,96 58,99	3,34	0,0126 S	7,68	9,5 %	Témoin 94 BS ₁ 87,25 BS ₁ +S 81,25 BS ₂ +S 81 S 77 BS ₂ 78,25 S.cont.F 74,25 S.C 72,75