



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
جامعة باجي مختار - عنابة  
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE  
PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION D'UN DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES

**Spécialité: BIOLOGIE VEGETALE**

**Intitulé**

**Biodégradation des Hydrocarbures (Pétrole brut et  
Kérosène) par la Microflore Microbienne des Eaux  
de la région de Skikda**

**Presentée par: HASSAINE Amina**

**Directeur de thèse : Pr.BORDJIBA Ouahiba  
Annaba**

**Professeur Université de**

**Devant le Jury:**

**Pr. TAHAR Ali  
Pr. BEDDIAR Arifa  
Pr. SOLTANE Mahmoud  
Pr. MEZEDJRI Lyamine  
Pr NASRI Hichem**

**Président  
Examinatrice  
Examinateur  
Examinateur  
Examinateur**

**Université de Annaba  
Université de Annaba  
Université d'El Taref  
Université de Skikda  
Université d'El Taref**

**Année universitaire: 2015 /2016**

# *Remerciements*

Je rends grâce à Dieu de m'avoir donné le courage, la santé physique et mentale pour compléter cette maîtrise.

Je tiens tout d'abord à adresser mes plus vifs et sincères remerciements à mon directeur de thèse, M<sup>me</sup> BORDJIBA Ouahiba, pour son expérience, son temps, ses conseils constructifs, sa confiance tout au long de ces années et qui m'ont fait vivre cette unique expérience très enrichissante. Qu'elle trouve ici l'expression de mon entière gratitude et le témoignage de ma grande estime.

J'exprime ma gratitude aux membres de jury pour avoir accepté d'examiner ce travail ainsi que pour la discussion apportée sur ce projet. Je témoigne mes vifs remerciements au Pr TAHAR Ali qui a bien voulu présider le jury de ce doctorat, au Pr BEDDIAR Arifa, Pr SOLTANE Mahmoud, Pr MEZEDJRI Lyamine et Pr NASRI Hichem qui m'ont honoré de leur présence et pour avoir accepté de juger ce travail.

Un projet de thèse ne se réalise jamais seul, c'est pourquoi je souhaiterai ici remercier toutes les personnes qui ont participé à des années d'aventure scientifique et humaine.

Je souhaiterai tout d'abord exprimer mes remerciements à tous les enseignants de la faculté des Sciences de l'Université Badji Mokhtar d'Annaba surtout Pr Djebar M.R et Pr Soumati B., ainsi que le corps technique, chacun d'entre vous a participé activement au bon déroulement de ce travail de thèse et sans vous, certaines études expérimentales n'auraient pu être réalisables. Et puis, j'ai tous mes amis proches à remercier, ça fait du monde ! Rahima, Chafia, Ismahene et Sabrina...tous les doctorants et docteurs du laboratoire de Biologie Végétale et Environnement ; car ce fut vraiment un plaisir de travailler avec vous. Merci, chère Farida, Nora, Nadjet, Meriem, Houda, Nora, Hana, Rafika, Ahlem, Souad, Roubeila et Imene. Merci aussi à Hakim, Ali, Salah, Abd el Jalil, Samir, Rachid et Tarek aussi ! dont le rire communicatif mettait de la joie dans notre laboratoire. Merci pour tous ces bons moments!.Un peu plus tard est arrivée Wafa, Asma et Imène que je remercie vivement pour votre gentillesse.

Je remercie chaleureusement toute la joyeuse bande de l'Université Kasdi Merbah de Ouargla : Rabia, Nawel, Ghania, Amel et Wafa. Combien il m'est difficile de survivre au quotidien de la vie du thésard souvent remplie de frustration !

Je vais de toute manière oublier des gens, mais j'aimerais remercier particulièrement Mokhtaria pour le soutien moral, la famille Dob surtout Hassina.

L'un des côtés agréables du domaine de la recherche est la possibilité de faire de nombreuses rencontres, plus ou moins éphémères, toutes différentes les unes des autres. Je souhaiterais remercier l'ensemble du personnel de la cellule environnement de sonatrach Skikda en particulier Mr Mokhnach. Un merci particulier à Mr et Mme Guitari du Laboratoire Horizon d'Annaba.

Je tiens également à remercier tous ceux et celles qui m'ont aidé, dans le cadre de ce projet, tout au long du parcours de ces années consacrées à l'achèvement de ma maîtrise.

*Merci*

# SOMMAIRE

**Remerciements**

**Dédicace**

**Abréviations**

**Liste des tableaux**

**Liste des figures**

**Résumé**

**Introduction générale**

1

## **CHAPITRE.I. ETAT DES CONNAISSANCES SUR LES HYDROCARBURES**

**1. Introduction**

5

**2. Définition et propriétés des hydrocarbures**

5

2.1. Définition

5

2.2. Les propriétés physiques

6

2.2.1. Densité

7

2.2.2. Viscosité

8

2.2.3. La tension de vapeur

8

2.2.4. Le point d'écoulement

8

2.2.5. Le point d'éclair

8

2.2.6. Le point d'ébullition (la température d'ébullition)

9

2.2.7. Coefficient de partage octanol/eau (log Kow)

9

2.2.8. La solubilité

9

2.2.9. Constante de Henry ( $K_H$ )

9

2.2.10. Coefficient de partage du carbone organique ( $K_{oc}$ )

10

1.2.11. Facteur de bioconcentration (BFC)

10

2.3. Les propriétés chimiques

10

2.3.1. Réaction de destruction/combustion

10

2.3.2. Réaction de substitution

11

2.3.3. Réactions d'addition

11

2.4. Classification

11

2.4.1. Les hydrocarbures saturés

12

**2.4.2. Hydrocarbures aromatiques (HAP)**

13

**2.4.3. Composés polaires**

13

2.4.4. Résines et asphaltènes

13

**3. Les sources d'hydrocarbures**

14

**4. Ecotoxicité des hydrocarbures**

15

**5. Les hydrocarbures et l'environnement**

16

5.1. La pollution directe

17

5.2. La pollution indirecte

18

**6. Les hydrocarbures dans le monde**

18

6.1. Les hydrocarbures en Algérie

21

6.2. Les problèmes liés aux hydrocarbures en Algérie

22

## **CHAPITRE. II. EVALUATION DU DEGRE DE POLLUTION DES EAUX PAR LES HYDROCARBURES AU NIVEAU DE LA ZONE D'ETUDE**

<b>1. Introduction</b>	25
<b>2. La zone d'étude</b>	25
2.1. Oued Saf-Saf	26
2.2. La zone pétrochimique	26
2.3. Site témoin	27
2.4. Sites de prélèvement	28
<b>1. Echantillonnage et techniques de prélèvement</b>	29
3.1. Eau	29
3.2. Autre matériel de prélèvement : urine, lait de bovins et eau d'abreuvement	29
<b>4. Techniques de prélèvement et conservation</b>	29
<b>5. Détermination des paramètres physico-chimiques</b>	30
<b>6. Résultats</b>	31
6.1. Paramètres physico-chimiques des eaux étudiées	31
6.1.1. La température	31
6.1.2. Le pH	31
6.1.3. La conductivité électrique (CE)	32
6.1.4. La salinité	33
6.1.5. La demande biologique en oxygène (DBO <sub>5</sub> )	33
6.1.6. La demande chimique en oxygène (DCO)	34
6.1.7. Les chlorures	35
6.1.8. Les ions sulfates (SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> )	35
6.2. Les hydrocarbures totaux dissous dans l'eau	36
<b>7. Paramètres physico-chimiques des échantillons étudiés</b>	37
7.1. La demande chimique en oxygène (DCO)	37
7.2. La demande biologique d'oxygène (DBO)	37
7.3. Les ions sulfates (SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> )	38
7.4. Les hydrocarbures totaux dissous	38
<b>8. Discussion</b>	39
<b>9. Conclusion</b>	41

## **CHAPITRE. III. LA MICROFLORE DES EAUX**

<b>1. Introduction</b>	43
<b>2. Les champignons microscopiques</b>	44
2.1. Classification des micromycètes	44
2.2. Caractéristiques morphologiques et reproduction	45
2.3. Rôle écologique des champignons filamenteux	47
2.4. Stratégies adaptatives des champignons aquatiques	49
<b>3. Les bactéries</b>	50
3.1. Classification des bactéries	54
3.2. Evolution d'une culture bactérienne	54
3.3. Dynamique et fluctuation de la population bactérienne	55
3.4. Stratégies adaptatives des bactéries aquatiques	57
<b>4. Les techniques d'étude des microorganismes : de l'observation au MALDI-TOF (MatrixAssisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight)</b>	58
<b>1. Matériel et méthodes</b>	61
1.1. Les eaux	61
1.2. Dénombrement de la microflore totale	61
1.2.1. Milieux de culture	61

1.2.2.	Préparation des suspensions à partir des prélèvements	63
1.2.3.	Ensemencement et isolement	63
1.2.4.	Purification et conservation	63
1.3.	Evaluation de la charge microbienne totale	64
1.4.	Caractérisation phénotypique des souches isolées	64
1.4.1.	Les bactéries	64
1.4.1.1.	Examen macroscopique	64
1.4.1.2.	Examen microscopique	65
1.4.1.3.	Test oxydase	66
1.4.1.4.	Test catalase	66
1.4.1.5.	Systèmes d'identifications à l'aide de galeries API 20E et API 20NE	66
1.4.2.	Les champignons microscopiques	68
1.4.2.1.	Examen macroscopique	68
1.4.2.2.	Examen microscopique	68
2.	Résultats	69
2.1.	Evaluation de la charge microbienne totale	69
2.1.1.	Les bactéries	69
5.1.1.1	Caractérisation des différents isolats bactériens	70
2.1.2.	Les champignons microscopiques	70
2.1.2.1.	Caractérisation des différents isolats fongiques	73
3.	Discussion	77
4.	Conclusion	79
<b>CHAPITRE.IV. BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES</b>		
1.	Introduction	81
2.	<b>Biodégradation : notions de base</b>	81
2.	<b>Principe de la biodégradation</b>	82
3.	<b>Mécanismes de biodégradation</b>	84
3.1.	La minéralisation	85
3.2.	Le cométabolisme	86
3.3.	La polymérisation	87
3.4.	L'accumulation cellulaire	87
4.	<b>Facteurs influençant la biodégradation des hydrocarbures</b>	88
4.1.	Structure et nature du milieu récepteur	88
4.2.	Nature, composition chimique et concentration des hydrocarbures	89
4.3.	Facteurs microbiologiques	91
4.4.	Facteurs environnementaux	93
6.	<b>Les agents de la biodégradation</b>	95
6.1.	La communauté bactérienne	95
6.2.	Les champignons microscopiques ou fungi	100
7.	<b>Accession des microorganismes aux hydrocarbures</b>	102
7.1.	L'assimilation des hydrocarbures solubles	103
7.2.	L'accession interfaciale	103
7.3.	L'accession interfaciale facilitée (émulsification)	104
7.4.	Le transfert micellaire	104
8.	<b>Les voies biologiques de dégradation des hydrocarbures</b>	104
8.1.	Voies biologiques aérobies	106
8.1.1.	Les bactéries	106

8.1.1.1.	Biodégradation aérobie des hydrocarbures saturés	106
8.1.1.2.	Biodégradation aérobie des hydrocarbures aromatiques	112
8.1.2.	Voies biologiques fongiques	117
8.2.	Voies biologiques anaérobies	119
8.2.1.	Les bactéries	119
8.2.1.1.	Biodégradation anaérobie des hydrocarbures saturés	120
8.2.1.2.	Biodégradation anaérobie des hydrocarbures polyaomatiques	122
<b>9.</b>	<b>Matériel et méthodes</b>	123
9.1.	Principe	123
9.2.	Microorganismes	123
9.3.	Les milieux de culture	123
9.4.	Les produits chimiques utilisés	125
9.4.1.	Le pétrole brut	125
9.4.2.	Le kérosène	126
9.4.3.	Les molécules composant le pétrole brut et le kérosène	126
9.5.	Préparation des précultures	129
9.6.	Etude de la biodégradation	129
9.6.1.	Etude de la croissance microbienne en présence des produits hydrocarbonés	131
9.6.1.1.	Détermination de la densité optique	133
9.6.1.2.	Mesure du pH	133
9.6.1.3.	Evaluation de la consommation d'oxygène (O <sub>2</sub> C)	133
9.6.1.4.	Le poids sec de l'inoculum microbien	133
9.7.	Evaluation des taux de biodégradation des hydrocarbures	134
9.7.1.	Conditions chromatographiques	134
<b>10.</b>	<b>Résultats et discussion</b>	134
10.1.	Etude de la croissance microbienne en présence des produits hydrocarbonés	134
10.1.1.	Détermination de la densité optique	134
10.1.2.	Mesure du pH	138
10.1.3.	Evaluation de la consommation d'oxygène (O <sub>2</sub> C)	139
10.1.	Le poids sec de l'inoculum microbien	141
10.2.	Evaluation des taux de biodégradation des hydrocarbures	142
<b>11.</b>	<b>Discussion</b>	152
<b>12.</b>	<b>Conclusion</b>	158
	<b>CONCLUSION GENERALE et PERSPECTIVES</b>	160
	<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	163
	<b>ANNEXES</b>	197

## *Liste des abréviations*

API	American Petroleum Institute
BTEX	Benzène, Toluène Ethylbenzène et Xylène
CE	La conductivité électrique
<i>Cst</i>	centistoke
CP1K	complexe pétrochimique de Skikda
°C	Degré Celcius
DBO	La demande biologique en oxygène
DCO	La demande chimique en oxygène
DO	Densité Optique
°F	Degré Fahrenheit
g/l	gramme/litre
g.mol <sup>-1</sup>	Gramme/mole
GNL	gaz naturel liquéfié
GPL	Gaz de pétrole liquéfié
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HPLC	chromatographie liquide à haute performance (High Performance Liquid Chromatography)
log K <sub>ow</sub>	Coefficient de partage octanol/eau
ng/g	nanogramme/gramme
O <sub>2</sub> C	Concentration en oxygène
RA1K.	Raffinerie de Skikda
RTE	complexe de transport des hydrocarbures par canalisation
µg/l	micro gramme/litre
UFC	Unité Formant Colonie



## *Liste des tableaux*

<b>N°</b>	<b>Titres</b>	<b>Pages</b>
<b>1</b>	Etat physique de la molécule en fonction du nombre d'atome de carbone (Gomez, 2010)	<b>6</b>
<b>2</b>	Propriétés des différentes classes de produits pétroliers (compilation d'après Morales-Caselles et <i>al.</i> , 2008).	<b>7</b>
<b>3</b>	Température d'ébullition de différents mélanges d'hydrocarbures (Sarais, 2008).	<b>9</b>
<b>4</b>	Les différents sites de prélèvement	<b>28</b>
<b>5</b>	Méthodes d'analyse des différents paramètres physico chimiques	<b>30</b>
<b>6</b>	Composition des milieux de culture utilisés	<b>62</b>
<b>7</b>	Inventaire de la microflore bactérienne totale	<b>71</b>
<b>8</b>	Taxonomie bactérienne des souches inventoriées	<b>72</b>
<b>9</b>	La liste des espèces fongiques identifiées dans chaque site	<b>74</b>
<b>10</b>	Taxonomie fongique des souches inventoriées	<b>76</b>
<b>11</b>	Enzymes capables d'oxyder les alcanes (van Beilen et Funhoff, 2005).	<b>110</b>
<b>12</b>	Composition élémentaire d'un pétrole brut, (Bocard, 2006)	<b>125</b>
<b>13</b>	Quelques propriétés physiques du kérosène	<b>126</b>
<b>14</b>	Propriétés chimiques et physiques des HAP (Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR, 1995)	<b>128</b>
<b>15</b>	Potentiel cancérigène des HAP (IARC, 1987)	<b>128</b>
<b>16</b>	Les souches microbiennes utilisées	<b>131</b>
<b>17</b>	Caractéristiques des souches étudiées	<b>132</b>

## *Liste des figures*

N°	Titres	Pages
<b>1</b>	Représentation schématique des principales familles d'hydrocarbures et autres composés d'un pétrole avec quelques exemples de molécules. (Modifiés d'après Syakti, 2004).	<b>11</b>
<b>2</b>	Classement des hydrocarbures en fonction de leur structure (Gomez, 2010)	<b>12</b>
<b>3</b>	Les plus grands pays exportateurs et importateurs de pétrole (British Petroleum, 2014 In Errard, 2014)	<b>19</b>
<b>4</b>	Les grands producteurs de pétrole dans le monde (British Petroleum, 2014 In Errard, 2014)	<b>20</b>
<b>5</b>	Répartition géographique des réserves de pétrole en Algérie (Attar et Hammat, 2000).	<b>22</b>
<b>6</b>	Situation géographique de la wilaya de Skikda	<b>25</b>
<b>7</b>	Présentation du bassin versant d'Oued Saf-Saf	<b>26</b>
<b>8</b>	Présentation du bassin versant d'Oued Guebli	<b>27</b>
<b>9</b>	Localisation géographique des points de prélèvement	<b>28</b>
<b>10</b>	Localisation des sites de prélèvement dans l'Oued Saf Saf	<b>29</b>
<b>11</b>	Les valeurs de la température des sites d'étude	<b>31</b>
<b>12</b>	Les valeurs du pH des sites d'étude	<b>31</b>
<b>13</b>	13a. Les valeurs de CE des sites 1 et 2	<b>32</b>
	13b. Les valeurs de CE du restes des sites	<b>32</b>
<b>14</b>	14a. Les valeurs de la salinité des sites 1 et 2	<b>33</b>
	14b. Les valeurs de la salinité du reste des sites	<b>33</b>
<b>15</b>	Les valeurs de la DBO des sites d'étude	<b>34</b>
<b>16</b>	Les valeurs de la DCO des sites d'étude	<b>34</b>
<b>17</b>	Les valeurs des chlorures des sites d'étude	<b>35</b>
<b>18</b>	18a. Les valeurs du sulfate des sites 1 et 2	<b>35</b>
	18b. Les valeurs du sulfate du reste des sites	<b>35</b>
<b>19</b>	Les valeurs des hydrocarbures totaux dissous des sites	<b>36</b>
<b>20</b>	DCO des échantillons étudiés	<b>37</b>
<b>21</b>	DBO des échantillons étudiés	<b>37</b>
<b>22</b>	Les ions sulfates des échantillons étudiés	<b>38</b>
<b>23</b>	Les hydrocarbures totaux dissous des échantillons étudiés	<b>38</b>
<b>24</b>	Structure de l'hyphe. (A) hyphe coenocytique, (B) hyphe cloisonné.	<b>46</b>
<b>25</b>	Schématisation de la reproduction d'un champignon filamenteux.	<b>46</b>
<b>26</b>	Epuration biologique aérobie (Brouzes, 1973)	<b>52</b>
<b>27</b>	Schéma du principe de la nutrition bactérienne (Edeline, 1988).	<b>53</b>
<b>28</b>	Courbe de croissance d'une population bactérienne dans un milieu confiné	<b>55</b>
<b>29</b>	Les réseaux trophiques microbiens dans les écosystèmes aquatiques (Bianchi et al., 1988).	<b>57</b>
<b>30</b>	Profil d'une API test 20E	<b>67</b>
<b>31</b>	La microflore bactérienne totale des sites échantillonnés	<b>69</b>
<b>32</b>	Distribution des souches bactériennes isolées	<b>71</b>
<b>33</b>	La densité fongique totale des sites échantillonnés	<b>73</b>
<b>34</b>	Distribution des souches fongiques isolées par point de prélèvement	<b>75</b>
<b>35</b>	Principe générale de la dégradation des hydrocarbures (D'après Widdel et Rabbus, 2001).	<b>83</b>

36	Mécanisme général de dégradation des hydrocarbures par les microorganismes (DAS et <i>al.</i> , 2011)	85
37	Comportement des hydrocarbures pétroliers lors d'un déversement en milieu aquatique (Genivar, 2013)	90
38	Schéma conceptuel des facteurs affectant la biodégradation. (Head et <i>al.</i> , 2006 In Sauret, 2011)	92
39	Les mécanismes d'accession des microorganismes aux hydrocarbures (Vandecasteele, 2005)	103
40	Etapes initiales des mécanismes de biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (Haristah et Kaushik, 2009)	105
41	Les voies métaboliques de dégradation des <i>n</i> -alcanes et <i>iso</i> -alcanes (Ballerini et Vandecasteele, 1999 ; van Beilen et <i>al.</i> , 2003)	107
42	Biodégradation aérobie des alcanes (Maier et <i>al.</i> , 2000)	108
43	Voie métabolique de la dégradation du squalane par <i>Mycobacterium fortuitum</i> et <i>M. ratisbonense</i> (Berekaa et Steinbüchel, 2000).	109
44	Voies métaboliques impliquées dans la dégradation du cyclohexane (Sayyed et Patel, 2011)	111
45	Les différents produits issus de l'oxydation du toluène par <i>P. putida</i> , F1, <i>P.putida</i> , PAW15 (a leucine auxotrophe de la souche mt-2), <i>Burkholderia cepacia</i> G4, <i>Ralstonia pickettii</i> , PK01 et <i>Pseudomonas mendocina</i> KR1. (Parales et <i>al.</i> , 2000)	112
46	La voie métabolique de dégradation du naphthalène par <i>Pseudomonas sp</i> et <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (Sutherland et <i>al.</i> , 1995).	114
47	La voie aérobie de dégradation de l'anthracène par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Sutherland et <i>al.</i> , 1995).	115
48	La voie aérobie de dégradation bactérienne du pyrène par <i>Mycobacterium spp</i> (Sutherland et <i>al.</i> , 1995).	116
49	Métabolisme du phénanthrène par différentes espèces de champignons (Sutherland et <i>al.</i> , 1995).	118
50	Les différentes voies métaboliques de la dégradation des hydrocarbures en fonction de l'accepteur d'électrons. (Widdel et Rabus, 2001)	120
51	La structure des 16 HAP prioritaires composant le pétrole brut et le kérosène (United States Environmental Protection Agency (US- EPA), 1985)	127
52	Phases de la méthodologie utilisée pour l'évaluation de la biodégradation des molécules d'hydrocarbure	130
53	Concentration (DO) des souches bactériennes sans hydrocarbure	135
54	Concentration (DO) des souches bactériennes en présence du pétrole brut	135
55	Concentration (DO) des souches fongiques sans hydrocarbure	136
56	Concentration (DO) des souches fongiques en présence du pétrole brut	136
57	Concentration (DO) des souches bactériennes en présence du kérosène	137
58	Concentration (DO) des souches fongiques en présence du kérosène	137
59	pH final des cultures bactériennes en présence du pétrole brut	138
60	pH final des cultures bactériennes en présence du kérosène	138
61	pH final des cultures fongiques en présence du pétrole brut	139
62	pH final des cultures fongiques en présence du kérosène	139
63	Evaluation de l'O <sub>2</sub> C en présence du pétrole brut cas des bactéries	140
64	Evaluation de l'O <sub>2</sub> C en présence du kérosène cas des bactéries	140
65	Evaluation de l'O <sub>2</sub> C en présence du pétrole brut cas des champignons	140
66	Evaluation de l'O <sub>2</sub> C en présence du Kérosène cas des champignons	140

<b>67</b>	Poids sec de la biomasse bactérienne total de l'inoculum	<b>141</b>
<b>68</b>	Poids sec de la biomasse bactérienne total de l'inoculum	<b>141</b>
<b>69</b>	Poids sec de la biomasse fongique total de l'inoculum en présence du pétrole	<b>142</b>
<b>70</b>	Poids sec de la biomasse fongique total de l'inoculum en présence du kérosène	<b>142</b>
<b>71</b>	Pourcentage des produits pétroliers biodégradés par les bactéries	<b>142</b>
<b>72</b>	Pourcentage des produits pétroliers biodégradés par les champignons microscopiques	<b>143</b>
<b>73</b>	Pourcentage des composés restants de la biodégradation du pétrole brut par les bactéries	<b>143</b>
<b>74</b>	Pourcentage des composés restants de la biodégradation du kérosène par les bactéries	<b>144</b>
<b>75</b>	Pourcentage des composés restants de la biodégradation du pétrole brut par les champignons microscopiques	<b>145</b>
<b>76</b>	Pourcentage des composés restants de la biodégradation du kérosène par les champignons microscopiques	<b>145</b>
<b>77</b>	Chromatogramme des taux de biodégradation du témoin avec le pétrole brut	<b>147</b>
<b>78</b>	Chromatogramme des taux de biodégradation du témoin avec le kérosène	<b>147</b>
<b>79</b>	Chromatogramme des taux de biodégradation du pétrole brut par <i>P. aeruginosa</i> l	<b>147</b>
<b>80</b>	Chromatogramme des taux de biodégradation du kérosène par <i>P. aeruginosa</i> l	<b>147</b>
<b>81</b>	Chromatogramme des taux de biodégradation du pétrole brut par <i>Aeromonas hydrophila</i>	<b>148</b>
<b>82</b>	Chromatogramme des taux de biodégradation du kérosène par <i>A. hydrophila</i>	<b>148</b>
<b>83</b>	Chromatogramme des taux de biodégradation du pétrole brut par <i>Serratia marcescens</i>	<b>148</b>
<b>84</b>	Chromatogramme des taux de biodégradation du kérosène par <i>S. marcescens</i>	<b>148</b>
<b>85</b>	Chromatogramme des taux de biodégradation du pétrole brut par la population bactérienne mixte	<b>149</b>
<b>86</b>	Chromatogramme des taux de biodégradation du kérosène par la population bactérienne mixte	<b>149</b>
<b>87</b>	Chromatogramme des taux de biodégradation du pétrole brut par <i>A fumigatus</i>	<b>150</b>
<b>88</b>	Chromatogramme des taux de biodégradation du kérosène par <i>A fumigatus</i>	<b>150</b>
<b>89</b>	Chromatogramme des taux de biodégradation du pétrole brut par <i>A niger</i>	<b>150</b>
<b>90</b>	Chromatogramme des taux de biodégradation du kérosène par <i>A niger</i>	<b>150</b>
<b>91</b>	Chromatogramme des taux de biodégradation du pétrole brut par <i>Alternaria alternata</i>	<b>151</b>
<b>92</b>	Chromatogramme des taux de biodégradation du kérosène par <i>Alternaria alternata</i>	<b>151</b>
<b>93</b>	Chromatogramme des taux de biodégradation du pétrole brut par la population fongique mixte	<b>151</b>
<b>94</b>	Chromatogramme des taux de biodégradation du kérosène par la population fongique mixte	<b>151</b>

## Résumé

Les hydrocarbures sont des polluants ubiquitaires. Ils sont hydrophobes dont la persistance dans les écosystèmes est principalement due à leur faible solubilité aqueuse. En raison de leurs potentialités toxiques, mutagènes et cancérigènes, certains d'entre eux sont considérés comme des substances dangereuses. Leur présence au niveau des composantes des différents maillons de la chaîne alimentaire constitue un risque important pour l'environnement et la santé humaine. Le pétrole brut et le kérosène sont constitués de sous produits qui sont signalés par l'agence de protection de l'environnement américaine (EPA) comme étant des substances récalcitrantes dangereuses. La biodégradation microbienne est un processus majeur qui s'intéresse au sort des hydrocarbures dans l'environnement dans le but de la biodépollution. C'est dans ce cadre que s'insère notre travail dont le but majeur était d'étudier les potentialités cataboliques de quelques souches microbiennes isolées des eaux contaminées par les hydrocarbures.

Dans une première approche, il a été question de déterminer tout d'abord, les caractéristiques physico-chimiques des eaux et d'en évaluer les quantités d'hydrocarbures présentes. Les hydrocarbures totaux ont été également déterminés dans le lait et les urines des bovins ayant été abreuvés de ces eaux. Les différentes analyses ont révélé la présence d'une pollution importante par les hydrocarbures dans la partie aval de l'oued SafSaf avec des doses d'hydrocarbures dépassant les LMR admissibles dans les différents échantillons analysés. De même, la microflore microbienne des eaux étudiées a été recensée et a fait l'objet d'un inventaire riche avec une prédominance de *Pseudomonas aeruginosa*, d'*Aspergillus niger* et d'*A.fumigatus*.

Dans une seconde approche, les potentialités cataboliques des agents microbiens les plus représentatifs vis à vis du kérosène et du pétrole brut ont été déterminées via quelques paramètres de tolérance et par chromatographie liquide à haute performance HPLC à partir de cultures batch. Les dosages chromatographiques révèlent un fort pouvoir de dégradation pour les deux composés de la part de *Pseudomonas aeruginosa* avec un taux de disparition dépassant les 80% et une disparition de plus de la moitié des composés par *A. niger* et *A.fumigatus*. Des taux de transformation non négligeables ont été également enregistrés en présence de *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophila* et *Altenaria alternata*. Tous les profils de l'HPLC ont révélé l'apparition de pics mineurs pendant la disparition de ces composés, indiquant leur biotransformation. Toutefois, nous pensons qu'il n'est pas exclu qu'un autre processus comme celui de la bioaccumulation soit impliqué dans les processus de disparition des composés.

**Mots clés :** pétrole brut, kérosène, bactéries, fungi, biodégradation

## Abstract

Hydrocarbons are ubiquitous and hydrophobic pollutants and whose persistence in the ecosystems is mainly due to their low aqueous solubility. Because of their toxic, mutagenic and carcinogenic potentialities, they are considered as dangerous substances. Their presence at the various levels of the food chain represents significant risks to the environment and to the public health. Crude oil and kerosene consist of compounds which are indicated as dangerous recalcitrant substances by the Environment Protection Agency (USA). The microbial biodegradation is a major process of bioremediation of hydrocarbons in the environment. In this context, the present work evaluates the catabolic potentialities of some microbial strains isolated from waters contaminated with hydrocarbons.

In a first step, analysis of the physical and chemical characteristics of polluted waters of Saf-Saf river enabled the assessment of the quantity of hydrocarbons. Total hydrocarbons were also estimated in milk and in urine of cattle being watered from these contaminated waters. Analysis of the various samples revealed the presence of significant oil pollution in the downstream part of Saf-Saf river with hydrocarbons concentrations exceeding the acceptable levels. The identification of the microflora of these waters showed a noticeable predominance of *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger* and *A. fumigatus*.

In a second approach, the catabolic potentialities of the most representative microbial agents of biodegradation of crude oil and kerosene were evaluated via some tolerance parameters and by high performance liquid chromatography (HPLC) of batch cultures. The chromatographic assessments show a high power of biodegradation of both pollutants with a rate over 80% for *Pseudomonas aeruginosa* and more than 50% for *Aspergillus niger* and *A. fumigatus*. Significant transformation rates were also recorded in the presence of *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophila* and *Alternaria alternata*. All the HPLC profiles showed the appearance of minor peaks during the disappearance of the pollutants indicating their biotransformation. However, it is not excluded that other processes such as bioaccumulation could be involved in the disappearance of crude oil and kerosene.

**Key words:** crude oil; kerosene; bacteria; fungi; biodegradation.

## الملخص

المحروقات ملوثات واسعة الانتشار. هي كارثة للماء و يعود الثبات في الأنظمة البيئية أساسا إلى قلة انحلالها في الماء. يعتبر البعض منها مواد خطيرة لإمكانية تسببها في التسمم، الطفرات و السرطان ويشكل وجودها ضمن مكونات الحلقات المختلفة في السلسلة الغذائية خطرا حقيقيا على البيئة وصحة الإنسان، إذ يتكون النفط الخام والكروسيين من مواد أشير إليها من قبل الوكالة الأمريكية لحماية المحيط (EPA) على أنها مواد خطيرة و متمرده.

التحلل الحيوي الميكروبي آلية هامة تهتم بمصير المحروقات في المحيط و تهدف إلى المعالجة البيولوجية و ضمن هذا الإطار يندرج عملنا الذي يهدف أساسا إلى دراسة قدرة بعض سلالات الميكروبات المعزولة من المياه الملوثة بالمحروقات على القيام بعملية الهدم، و قد تم هذا العمل في جزئين.

في الجزء الأول من العمل تم تحديد الخصائص الفيزيائية والكيميائية للمياه وتقدير كمية المحروقات الموجودة فيها، و تم أيضا تحديد مجموع المحروقات في حليب و بول أبقار إرتوت بهذه المياه، حيث بينت مختلف التحاليل وجود تلوث كبير بالمحروقات في مصب وادي الصفصاف بكميات تفوق MRL المقبولة في مختلف العينات التي خضعت للتحاليل، كما بين جرد الميكروبات في المياه المدروسة غناها بالميكروبات مع وجود غالب ل *Pseudomonas aeruginosa* ، *Aspergillus niger* و *A.fumigatus*.

أما في الجزء الثاني فقد تم تحديد قدرة الميكروبات الأكثر تمثيلا بالنسبة للكروسيين و النفط الخام على القيام بالهدم عن طريق بعض عوامل الاحتمال و الفصل الكروماتوغرافي ذو الأداء العالي في وسط سائل (HPLC) انطلاقا من زراعات batch ، حيث أظهر الفصل الكروماتوغرافي قدرة هدم عالية للمركبين من طرف *Pseudomonas aeruginosa* بمعدل اختفاء يفوق 80% و يفوق النصف من طرف *A.niger* و *A.fumigatus* كما تم أيضا تسجيل معدلات تحويل هامة في وجود *Serratia marcescens* ، *Aeromonas hydrophila* و *Altenaria alternata*. أما فيما يخص منحنيات HPLC فقد أظهرت جميعها قمم طفيفة خلال اختفاء هذين المركبين مما يدل على التحويل الحيوي لهما. ومع ذلك، فإننا نعتقد أنه من غير المستبعد وجود آليات أخرى تساهم في عملية اختفاء المركبين مثل التراكم الحيوي.

**الكلمات المفتاحية:** النفط الخام، الكروسيين، بكتيريا، الفطريات، التحلل البيولوجي



**INTRODUCTION  
GENERALE**



### INTRODUCTION GENERALE

La découverte des hydrocarbures « or noir » a résolument bouleversé notre mode de vie à tel point que la quasi-totalité de nos activités dépendent aujourd'hui de son utilisation. Le rôle grandissant des hydrocarbures aussi bien dans l'équipement économique des pays, la motorisation, la mécanisation et la raffinerie ne cessant de se développer, les besoins en pétrole dans la gamme de ses dérivés s'élèvent peu à peu à des chiffres presque fantastiques. En effet, rien que pour l'année 2000, la production mondiale a atteint 11 millions de tonnes par jours de produits pétroliers (Soltani, 2004). Il faut donc convenir que l'ère du pétrole n'est pas encore à son déclin. Elle ne fait même que commencer.

Au cours de son développement, l'Algérie a pour sa part érigé le long de ses côtes d'importantes infrastructures d'industries pétrolières dont Arzew, Béjaïa et Skikda, alimentées par des gazoducs et oléoducs depuis Hassi Messaoud. Par la diversité de ses activités, par le confort et le bien-être qu'elle procure, par l'importance des emplois générés, l'industrie pétrochimique a pris une place essentielle dans l'économie.

Cependant, Les hydrocarbures posent un problème environnemental dans la mesure où ils ont des propriétés toxiques, cancérigènes, voire même tératogènes.

L'hydrophobie, la persistance environnementale et la génotoxicité augmentent avec la taille des hydrocarbures. Leur persistance dans l'environnement augmente généralement avec leur poids moléculaire et donc avec le nombre de cycles aromatiques présents dans leurs molécules (Haritash et Kaushik, 2009).

Au cours de ces dernières années, l'intérêt de l'opinion publique et des chercheurs à l'égard de l'utilisation des hydrocarbures et de ses conséquences sur l'environnement n'a cessé d'augmenter. L'utilisation systématique de ces produits est remise en question, avec la prise de conscience croissante des risques qu'ils peuvent générer pour l'environnement, voire pour la santé de l'homme. Il est connu que ces substances sont largement réparties dans les sédiments, l'eau, l'air, les plantes et les animaux. Les hydrocarbures gagnent souvent la chaîne alimentaire par exposition et bioaccumulation. Pour l'homme, il est admis que l'exposition moyenne aux hydrocarbures des populations se fait à 90 % par la voie alimentaire, principalement la viande, les produits laitiers, les poissons et les fruits de mer (Feidt, 2000).

L'extraction, le transport et la transformation des hydrocarbures génèrent des molécules persistantes, toxiques, bioaccumulatrices et mobiles. Il en est de même pour le pétrole et le kérosène qui font l'objet de cette étude.

Pour réduire la toxicité des molécules à risque ou pour les transformer en métabolites moins toxiques ou moins dangereuses, la biodégradation est l'un des processus les plus envisagés dans le domaine de la biodépollution. Si les applications dans la biodégradation se sont jusqu'à présent majoritairement focalisées sur les bactéries et la diversité métabolique qu'elles offrent, la biodégradation fongique se révèle également prometteuse (Juhász et Naidu, 2000; Zhang *et al.*, 2006; Acevedo *et al.*, 2011). Cette propriété est à mettre en lien avec les capacités métaboliques du règne fongique qui leur permettent de dégrader des molécules naturelles complexes (Bennett *et al.*, 2002), en particulier la lignine, un polymère de structure complexe contenant des noyaux aromatiques.

Plusieurs facteurs environnementaux peuvent affecter, positivement ou négativement, le métabolisme microbien. S'il est clair que les conditions environnementales vont directement affecter les caractéristiques intrinsèques des hydrocarbures pétroliers, le même constat peut être fait en ce qui concerne leur biodégradabilité par les communautés microbiennes de ces milieux. Ils peuvent empêcher, inhiber ou favoriser le développement et la prolifération de ces organismes actifs.

L'objectif suprême des scientifiques qui mesurent la biodégradation consiste d'une part à documenter la perte des hydrocarbures qu'ils peuvent attribuer à l'activité microbienne. Traditionnellement, de telles mesures se sont concentrées sur la disparition de composants pétroliers particuliers, sur l'apparition des produits de la biodégradation (comme le dioxyde de carbone) sur la raréfaction de l'oxygène et sur l'accroissement des populations microbiennes qui dégradent le pétrole. On a récemment découvert de nouvelles stratégies pour évaluer la progression de la biodégradation, dont la modélisation computationnelle et les outils moléculaires qui permettent d'évaluer les changements survenus dans les communautés microbiennes. D'une autre part, la mesure de la vitesse de dégradation des hydrocarbures nous renseigne à quel rythme ils sont consommés et à quel moment ils disparaîtront complètement. Bien entendu, la dégradation microbienne ne se calcule pas de façon linéaire dans le temps. Ainsi, le fait que la moitié du pétrole disparaisse en une semaine ne signifie pas que tout le pétrole aura disparu en deux semaines. Généralement, la dégradation s'effectue plus lentement à mesure que la teneur en pétrole diminue et que les composants plus dégradables disparaissent, laissant derrière les composants plus récalcitrants.

Au regard des informations apportées dans cette étude bibliographique, il est indéniable que les connaissances concernant le fonctionnement des communautés microbiennes dans les environnements pollués par les hydrocarbures ont largement été améliorées. Il est possible d'isoler en laboratoire des microorganismes qui présentent une capacité accrue de dégradation des hydrocarbures, mais de tels microbes risquent de ne pas avoir un effet important dans l'environnement. Ce n'est non plus le métabolisme bactérien ou fongique qui limite la vitesse de biodégradation, mais c'est bien la sélection naturelle qui agit sur les microorganismes depuis des milliards d'années, affinant jusqu'à un niveau très efficace les voies métaboliques qui permettent la dégradation des hydrocarbures. Collectivement, les communautés naturelles ont acquis de remarquables capacités qui leur permettent de tirer parti de chaque joule d'énergie qui peut être extraite des composants pétroliers. L'utilisation de micro-organismes autochtones qui peuplent des niches polluées par les hydrocarbures pour la biodégradation a été largement acceptée comme une formidable approche en raison du succès enregistré par divers chercheurs : (Leahy *et al.*, 2003 ; Saratale *et al.*, 2007 ; Adekunle et Adebambo, 2007 ; Al-Jawhari, 2014). Une part importante des phénomènes qui gouvernent le devenir des hydrocarbures dans l'environnement dépend du milieu récepteur (propriétés physicochimiques et microbiologiques). Plusieurs études ont montré que l'élimination des hydrocarbures dépend des conditions environnementales comme le pH, la salinité et la température (Walworth *et al.*, 2005) ; mais aussi de la présence de microflore dégradatrices compétentes (Solano-Serena *et al.*, 2001).

Depuis la découverte de la biodégradation par les micro-organismes, dans différents biotopes même extrêmes, de nombreuses recherches se sont penchées sur le sujet et ont permis de développer, d'améliorer et de comprendre ses techniques, ses différentes voies, les agents pertinents, les conditions qui la favorisent ainsi que les moyens d'optimisation.

Pourtant, malgré la multitude d'études réalisées en milieux pollués, les stratégies de biodégradation, souvent efficaces en condition contrôlée, donnent des résultats parfois mitigés lorsqu'ils sont appliqués à la réalité des environnements naturels. Cela s'explique en grande partie par la complexité du processus de biodégradation, de la diversité génétique et métabolique des microorganismes en jeu, des facteurs environnementaux affectant aussi bien le pétrole lui-même que les bactéries dans leur fonction de biodégradation et enfin par la difficulté de prévoir précisément les effets de la bioremédiation sur les microorganismes autochtones et donc sur l'efficacité de l'élimination des hydrocarbures.

Le travail de thèse présenté ici, a été réalisé dans le but de répondre à un certain nombre de questions encore inabordées dans la littérature, de manière à améliorer notre compréhension du processus de biodégradation des hydrocarbures pétroliers dans les eaux de surfaces, notamment les oueds et ainsi contribuer au perfectionnement des techniques d'élimination favorisées des polluants. A travers cette étude, nous avons abordé les problématiques suivantes :

1. Estimation des paramètres environnementaux intervenant dans le processus de dépollution pour évaluer leur influence sur l'efficacité de la biorémédiation naturelle par la microflore indigène du milieu.
2. Dresser un inventaire de la microflore microbienne des eaux polluées et non polluées par les hydrocarbures ;
3. L'adoption d'une méthodologie permettant d'évaluer la biodégradabilité du pétrole brut et du kérosène en conditions aérobies.

Ce document comporte quatre grands chapitres :

Dans l'introduction générale, sont présentés la problématique générale, le contexte scientifique et les objectifs tracés. Le premier chapitre de ce travail est une synthèse des connaissances actuelles sur les hydrocarbures. Dans le second chapitre est mentionnée l'approche méthodologique développée pour estimer la qualité physicochimique des eaux au niveau de la zone d'étude. Le chapitre.III. est consacré à l'étude de la microflore des eaux, et a pour objectif de dresser un inventaire des divers microorganismes (bactéries et champignons filamenteux) qui colonisent ces milieux en présentant les approches méthodologiques et les techniques d'analyses employées. Le dernier chapitre nous renseigne sur la biodégradation des hydrocarbures. Enfin, une conclusion générale ainsi que des perspectives de recherche finalisent ce manuscrit.



**CHAPITRE.I.**  
**ETAT DES CONNAISSANCES**  
**SUR LES HYDROCARBURES**

## CHAPITRE.I. ETAT DES CONNAISSANCES SUR LES HYDROCARBURES

### 1. Introduction

Les hydrocarbures sont quotidiennement présents dans notre proche environnement. Sous forme de carbone fossile, ce sont une ressource énergétique essentielle pour l'économie depuis la révolution industrielle, mais aussi source de dérèglement climatique de leur utilisation massive. Les hydrocarbures pèsent très lourdement dans l'activité globale du monde et contribuent à lui donner une consistance économique et sociale.

Les hydrocarbures sont majoritairement utilisés comme combustible à des fins énergétiques, domestiques ou professionnelles. Tout au long de la chaîne allant de la production à la consommation, ces composés organiques subissent un certain nombre de traitements, de stockage et de transferts. Ceci multipliant les facteurs de risque liés à ces produits dangereux.

Leurs propriétés se révèlent très utiles pour évaluer leurs impacts potentiels dans l'environnement. Elles vont notamment permettre de mieux prévoir leur répartition, ainsi que leur comportement dans les différents compartiments de l'environnement (eau, sol, sédiments, atmosphère, végétaux, êtres vivants).

La pollution pétrolière est très dangereuse car elle perturbe l'équilibre environnemental, y compris la vie des êtres vivants.

Nous présentons, dans cette partie, une revue bibliographique sur les hydrocarbures et plus particulièrement sur leurs caractéristiques physico chimiques, qui eux mêmes dépendent de la structure et de la masse moléculaire ; conditionnant ainsi leur distribution dans l'environnement.

### 1. Définition et propriétés des hydrocarbures

#### 1.1. Définition

Un hydrocarbure est un composé organique contenant exclusivement des atomes de carbone (C) et d'hydrogène (H) (Heider et *al.*, 1999), où le carbone présente 83 à 87% en volume et l'hydrogène 10 à 14 %. (Durousset, 1999).

Le terme « *Hydrocarbures* » est une appellation générique qui désigne le pétrole sous toutes ses formes (pétrole brut, le fuel-oil, les résidus d'hydrocarbures et les produits raffinés, « condensats », huiles minérales, gasoils et essences,...etc.) (Cabane, 2012).

Ils possèdent en conséquence une formule brute de type :  $C_nH_m$ , où n et m sont deux entiers naturels. Ils sont, selon les conditions de température et de pression, solides (paraffine), liquides (essences, pétrole, etc.) ou gazeux (méthane, butane,...etc.). Les hydrocarbures peuvent aussi comprendre des atomes d'oxygène, d'azote et de soufre (Lefebvre, 1986) et des métaux à l'état de traces (nickel, vanadium, etc.) (BastienVentura *et al.*, 2005).

## 1.2. Les propriétés physiques

Les hydrocarbures se présentent à l'état naturel et dans les conditions normales, sous les trois formes physiques de la matière, gazeuse, liquide ou solide (Tab.1.).

**Tableau.1.** Etat physique de la molécule en fonction du nombre d'atome de carbone  
(Gomez, 2010)

Etat	Nombre d'atome de carbone
Gaz	C1 à C4
Liquide volatils	C5 à C8
Liquide peu volatils	C9 à C16
Solides	> C16

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), sont très hydrophobes, peu volatiles (excepté pour les HAP à deux noyaux comme le naphthalène) et ont une faible solubilité dans l'eau. Leur propriétés physico-chimiques les rendent récalcitrants à la dégradation naturelle, et donc persistants sur les sites contaminés (Doyle *et al.*, 2008). Leur structure moléculaire varie et influe sur les propriétés de ces hydrocarbures. Plus le nombre de carbones est important, plus la masse volumique, le point de fusion et le point de d'ébullition seront, d'une manière générale, élevés. En revanche la solubilité, la volatilisation et surtout la biodégradabilité diminuent.

Les propriétés physiques des hydrocarbures responsables de son comportement dans l'environnement sont: la densité, la viscosité, la tension de vapeur, le point éclair et le point d'écoulement (Le Gentil, 2009). Le tableau qui suit, en résume quelques propriétés.

**Tableau. 2.** Propriétés des différentes classes de produits pétroliers  
(Compilation d'après Morales-Caselles et *al.*, 2008).

	Produits à faible viscosité	Produits à viscosité moyenne	Produits à haute viscosité	Produits solides/semi-solides
Produit	-Essence -Kérosène -Diesel -Huile à chauffage	-Bruts légers -Mazout intermédiaire	-Bruts lourds -Mazout lourd (Bunker C) -Produits à plus faible viscosité ayant vieilli	-Produits à plus faible viscosité ayant beaucoup vieilli -Produits ayant atteint leur point d'écoulement
Caractéristiques	-Faible viscosité (semblable à l'eau) -Très volatils	Viscosité moyenne (du lait à la peinture) Volatilité moyenne	Haute viscosité (semblable à la mélasse) Peu ou pas volatils	-Semi-solides
Comportement	-Évaporation très rapide -Étalement rapide -Biodégradation rapide	-Évaporation partielle rapide (jusqu'à 40 %) -Fractions lourdes formant une émulsion -Infiltration dans les sédiments (diminuant avec l'émulsion)	-Très peu d'évaporation -Formant une émulsion -Faible pénétration dans les sédiments	-Étalement presque nul -Pénétration nulle dans les sédiments
Toxicité	-Fractions légères toxiques	-Toxicité plus faible que les produits à faible viscosité	-Faible toxicité	-Toxicité très faible
Contaminants	Certains métaux peuvent être présents surtout dans les pétroles lourds (ex : le zinc, le plomb, le cuivre, le nickel, le vanadium, le mercure, etc.).			

### 1.2.1. Densité

La densité d'un pétrole dépend de celle de ses constituants et détermine la flottabilité. Presque tous les hydrocarbures liquides sont plus légers que l'eau.

Le "degré API" (American Petroleum Institute) est l'unité de mesure, utilisée dans le système anglo-saxon, pour mesurer la densité d'un liquide, en particulier d'un brut pétrolier, on parle généralement de brut lourd pour moins de 20°API, moyen dans les 20 à 30°API et léger au-delà, mais ces bornes varient selon les pays.



### **1.2.2. Viscosité**

La viscosité mesure la résistance à l'écoulement d'un liquide (Fingas, 2013), et donc son taux de dispersion dans l'environnement marin. Son unité de mesure est le centistoke (*Cst*). Elle diminue lorsque la température augmente (Fingas, 2013) et elle s'accroît par évaporation des composés volatils, par l'oxydation photochimique et surtout par formation d'émulsions inverses qui modifient le comportement initial du produit.

### **1.2.3. La tension de vapeur**

La tension de vapeur contrôle le taux d'évaporation et la concentration dans l'air des hydrocarbures, généralement citée en pression de vapeur Reid mesurée à 37,8 °C. Dans la plupart des conditions, une pression de vapeur supérieure à 3 kPa (kilo-pascal) (23 mm Hg) est requise pour que l'évaporation se produise.

### **1.2.4. Le point d'écoulement**

Le point d'écoulement est la température en dessous de laquelle le pétrole cesse de s'étaler lorsqu'il est sujet à un faible mouvement (Fingas, 2001). La majorité des hydrocarbures a un point d'écoulement inférieur à 0°C. Quand ce point est atteint, l'hydrocarbure commence à se solidifier, il s'exprime en °F ou °C.

### **2.2.5. Le point d'éclair**

Le point d'éclair d'un produit pétrolier correspond à la température la plus basse à laquelle une quantité de vapeurs émise est suffisante pour produire une déflagration à l'air libre (Fingas, 2013). Pour les hydrocarbures, il est grandement variable et une bonne partie d'entre eux sont considérées inflammables (Fingas, 2001).

Le point d'éclair nous renseigne sur la volatilité du pétrole (BastienVentura et *al.*, 2005). Par exemple, un pétrole déversé sur l'eau peut demeurer inflammable jusqu'à ce que les produits les plus volatils se soient évaporés (Fingas, 2013). Cette propriété doit donc être considérée lorsqu'une intervention est envisagée.

### **2.2.6. Le point d'ébullition (la température d'ébullition)**

Le point d'ébullition conditionne la vitesse à laquelle les hydrocarbures s'évaporent. Les hydrocarbures ont une température d'ébullition variant en fonction de leur longueur de chaîne carbonée (Tab.3.).

**Tableau.3.** Température d'ébullition de différents mélanges d'hydrocarbures (Sarais, 2008)

Produit	Longueur de chaîne carbonée (en nombre d'atome carbone)	Température d'ébullition (°C)
Gaz pétrolier	1 à 4	40
Essence	5 à 12	40 à 205
Kérosène	10 à 18	175 à 325
Diesel	12 et plus	250 à 500
Fioul	20 à 70	370 à 600

### 2.2.7. Coefficient de partage octanol/eau ( $\log K_{ow}$ )

Ce coefficient traduit la répartition d'une molécule d'un soluté entre la phase lipophile (octanol) et la phase hydrophile (eau). Il donne une indication sur sa capacité à s'adsorber sur des surfaces hydrophobes ; sa polarité ou hydrophobicité. Par exemple, ce coefficient est un bon indicateur de la capacité des polluants à pénétrer les membranes biologiques qui sont des bicouches lipidiques, et donc à s'accumuler dans les organismes vivants (Fu *et al.*, 1994) .

Il permet donc d'évaluer le caractère polaire des molécules. Si :

$\log K_{ow} < 1,5$  : substances non bioaccumulables ;

$\log K_{ow} > 3$  : substances bioaccumulables.

Pour les HAP, les  $\log K_{ow}$  varient de 3,37 à 6,5 (Mackay *et al.*, 1992). Les  $K_{ow}$  sont relativement élevés, ce qui indique un fort potentiel d'adsorption sur les matières particulaires, mais aussi sur la matière organique des sols, leur permettant de persister dans l'environnement (Bouwer et Zehnder, 1993 ; Hartmann, 1996).

### 2.2.8. La solubilité

Donne une idée de la capacité d'une molécule organique à se dissoudre dans l'eau. Elle est de l'ordre de :  $\mu\text{g/l}$  (solubilité faible) ;  $\text{mg/l}$  (solubilité moyenne) ;  $\text{g/l}$  (solubilité importante). En général, les HAP ont une faible solubilité, comprise entre 30  $\text{mg/l}$  pour les composés légers et 10 – 4  $\text{mg/l}$  pour les plus lourds (Wauquier, 1994).

### 2.2.9. Constante de Henry ( $K_H$ )

La constante de Henry ( $K_H$ ) est un coefficient qui exprime le ratio de la concentration dans l'air et dans l'eau à l'équilibre. Elle est caractéristique de l'équilibre entre les phases gazeuses et aqueuses ( $C_{\text{air}(eq)}/C_{\text{eau}(eq)}$ ).

### **2.2.10. Coefficient de partage du carbone organique ( $K_{oc}$ )**

C'est le coefficient d'adsorption au carbone organique des sols, qui définit la distribution d'un composé entre les phases solide et liquide d'un sol ou d'un sédiment.

Il caractérise la tendance d'un composé à être retenu par la matière organique des sols : plus le  $K_{oc}$  est élevé, plus le composé tend à quitter l'eau pour se fixer sur la matière organique qui est présente à des proportions variables dans tous les sols.

### **2.2.11. Facteur de bioconcentration (BFC)**

Ce facteur donne la tendance qu'a une molécule à se bioaccumuler dans un organisme vivant donné.

## **7.3. Les propriétés chimiques**

La multitude des hydrocarbures tient au fait que l'atome de carbone a de très nombreuses possibilités de se lier à l'atome d'hydrogène en formant des chaînes moléculaires linéaires ou fermées (cycliques) ; et l'atome de carbone peut non seulement être associé à des atomes d'hydrogène, mais encore être lié à un autre atome de carbone formant des composés saturés (ne contenant que des liaisons simples) ou insaturés (contenant au moins une double liaison) ; les combinaisons chimiques possibles se démultiplient encore avec la capacité d'autres atomes de se substituer à certains atomes d'hydrogène (chlore, brome, azote, soufre, iode, fluor).

Les propriétés chimiques dépendent donc de la structure et de la masse moléculaire de ces composés.

### **2.3.1. Réaction de destruction/combustion**

Cette réaction est très importante ; en effet les hydrocarbures sont d'excellents combustibles utilisés quotidiennement sous formes de gaz de chauffage (butane et propane) ou de carburants liquides (essence, fioule, kérosène).

La réaction libère une grande quantité d'énergie, qui est mise en œuvre pour l'utilisation directe dans le chauffage ou pour sa transformation partielle en énergie mécanique dans les moteurs à combustion interne par exemple. On peut arrêter avant son terme cette combustion et isoler les composés oxygénés intermédiaires qu'elle produit ; c'est alors l'oxydation (Lefebvre, 1986).

### 2.3.2. Réaction de substitution

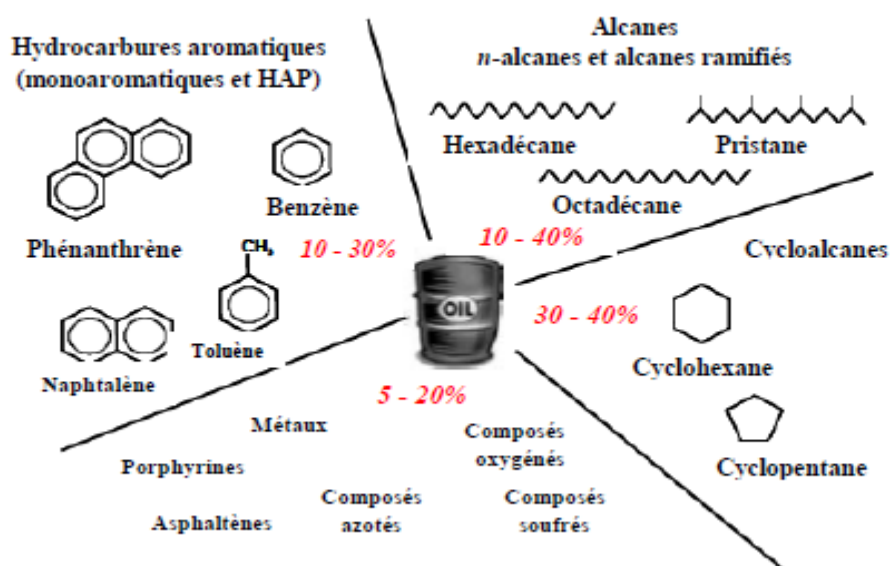
Dans ce type de réaction, on remplace dans une molécule un atome (ou un groupement d'atome) par un autre atome (ou un groupement d'atome). Des réactions intéressantes sont celles avec le dichlore ou il résulte le monochlorométhane, le dichlorométhane, le trichlorométhane (chloroforme) ou le tétrachlorométhane (Lefebvre, 1986).

### 2.3.3. Réactions d'addition

Les composés présentant une insaturation localisée dans une chaîne hydrocarbonée (alcènes, cylo-oléfines, dioléfines, acétyléniques) ou répartie dans un cycle (aromatiques) sont susceptibles d'ajouter certains réactifs. La liaison  $\pi$  est alors transformée en  $\sigma$  (Lefebvre, 1986).

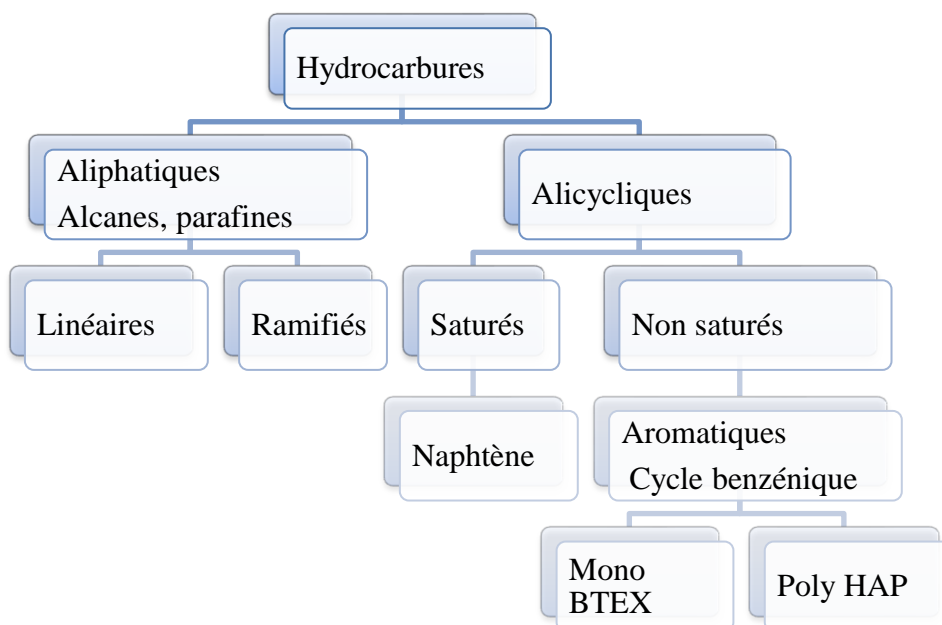
## 2.4. Classification des hydrocarbures

Les hydrocarbures constituent la fraction la plus importante d'un brut pétrolier, ils représentent entre 65 et 95% de la plupart des pétroles bruts. Ces hydrocarbures peuvent être regroupés en quatre familles principales qui sont présentes en proportions variables selon leur origine : les hydrocarbures saturés (20 à 70%), les hydrocarbures aromatiques et poly aromatiques (20 à 40%), les composés polaires (5 à 25%) et les asphaltènes (0 à 10%) (Syakti, 2004) (Fig.1.).



**Figure.1.** Représentation schématisée des principales familles d'hydrocarbures et autres composés d'un pétrole avec quelques exemples de molécules. (Modifiés d'après Syakti, 2004).

Les hydrocarbures peuvent aussi être classés en fonction de leur structure. C'est le classement le plus employé en raison de l'importance de l'arrangement moléculaire sur le devenir et la mobilité de ces molécules dans l'environnement (Gomez, 2010). On distinguera par la suite, les formes aliphatiques (paraffiniques), naphténiques (cyclanes) ou aromatiques (BTEX et HAP) (Fig.2.).



**Figure.2.** Classement des hydrocarbures en fonction de leur structure (Gomez, 2010)

En général, les hydrocarbures pétroliers sont classés comme suit :

#### 2.4.1. Les hydrocarbures saturés

Parmi ces hydrocarbures, on distingue :

❖ **Alcane linéaires (n-alcane,  $C_nH_{2n+2}$ )**

Ils constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40% des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier), avec une longueur de chaîne variant de 7 à 40 atomes de carbone.

❖ **Alcane ramifiés**

Les alcane ramifiés les plus abondants sont les iso-alcane (groupement méthyle en position 2). Les autres composés ramifiés antéiso (groupement méthyle en position 3) ou polyramifiés tels que les isoprénoides (exemple : pristane, phytane), sont beaucoup moins

nombreux. Ces composés se trouvent dans le pétrole brut à des proportions sensiblement égales à celles des n-alcanes.

#### ❖ Cycloalcanes

Les Cycloalcanes renferment des composés cycliques (à 5 ou 6 atomes de carbone) saturés et le plus souvent substitués. Quelques dérivés polycycliques sont aussi présents et certains d'entre eux tels que les stéranes et les triterpanes sont caractéristiques d'un pétrole brut. Cette famille peut représenter entre 30 et 40% des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut.

#### 2.4.2. Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

Plusieurs familles d'hydrocarbures aromatiques et polycycliques (HAP), dont le nombre de noyaux varie de 2 à 6 sont présentes dans les pétroles bruts. Ces composés sont dominés par des composés mono-, di- et tri-aromatiques, les cycles aromatiques peuvent être agencés de manière linéaire (anthracène), angulaire (phénanthrène) ou groupé (pyrène). Au sens strict, ils ne contiennent donc que des atomes de carbone et d'hydrogène (Vandecasteele, 2005b ; Seo et *al.*, 2009). Les HAP se subdivisent en deux groupes :

- Les légers, dont la masse molaire est comprise entre 150 et 180 g.mol<sup>-1</sup> (HAP de moins de quatre cycles) ;
- Les lourds (au moins quatre cycles) ; dont les masses molaires varient de 200 à 280 g.mol<sup>-1</sup>

#### 2.4.3. Composés polaires

Les composés polaires correspondent à des molécules hétérocycliques, telle que :

- Des composés oxygénés : phénols, acides carboxyliques, alcools, aldéhydes,...etc.
- Des composés soufrés : mercaptans, sulfures, disulfures,...etc.
- Des composés azotés : pyridines, quinoleines,...etc.

#### 2.4.4. Résines et asphaltènes

Les résines sont des composés très polaires ayant un caractère aromatique très marqué, soluble dans les solvants organiques, tels que le *n*-heptane. Les asphaltènes correspondent à une classe de composés de hauts poids moléculaires, insolubles dans le pentane ou l'hexane.

Les composés appartenant à la fraction des résines et asphaltènes peuvent être complexés à des éléments autres que l'hydrogène et le carbone tels que l'azote, l'oxygène et le soufre pour former des hétéro éléments. Ces éléments peuvent également être complexés à

des métaux lourds, tels que le nickel et le vanadium, généralement présents à l'état de trace dans les pétroles (Tissot et Welte, 1984).

### 3. Les sources d'hydrocarbures

Les hydrocarbures sont émis dans l'environnement par des processus naturels ou anthropiques. Selon leur origine, les hydrocarbures sont regroupés en trois catégories : pyrolytiques, pétrogéniques et diagénétiques :

- **Pyrolytique** : Formation par combustion incomplète de matière organique d'origine naturelle (feux, volcanisme) ou anthropique (activité domestique ou industrielle) (Rocher, 2002). Cette source est responsable de la majorité des émissions des hydrocarbures dans l'atmosphère.
- **Pétrogénique** : Formation à partir des produits pétroliers ou des dérivés des produits pétroliers. Cette source est responsable d'émissions plus localisées chroniques (activité portuaire, raffinerie, lessivage des infrastructures routières) ou accidentelle (marée noire).
- **Diagénétique (ou biogéniques)** : Formation par transformation par les organismes vivants.

Les origines pyrolytiques et pétrogéniques constituent les 2 sources majeures d'émission des hydrocarbures dans l'environnement (Kuony, 2005).

Les véhicules émettent des gaz d'échappement provenant de la combustion incomplète des carburants et sont aussi à l'origine de déversements de produits variés (carburants, huiles lubrifiantes, débris de pneu, etc.). Le chauffage urbain et les diverses industries employant des processus pyrolytiques (production de coke, craquage catalytique, etc.) constituent aussi des sources importantes d'hydrocarbures en milieu urbain. Des variations dans le temps et dans l'espace sont observées:

➤ **Echelle saisonnière** : généralement les niveaux les plus élevés sont observés pendant les périodes froides. L'augmentation des sources issues du chauffage domestique, la réduction de l'épaisseur de la couche de mélange, ainsi qu'une augmentation du temps de vie atmosphérique induit par la réduction de l'ensoleillement en sont les principaux responsables.

Les concentrations dans l'herbe et dans l'air en hiver sont de 2 à 4 fois supérieures à celles d'été et peuvent l'être jusqu'à 50 fois pour le benzo[a]pyrène (Smith et *al.*, 2001 ; Juhasz et Naidu, 2000).

- **Echelle journalière** : les concentrations diurnes sont supérieures aux concentrations nocturnes, principalement du fait de la diminution des sources,
- **Echelle horaire** : des pics de concentration d'hydrocarbures en matinée et en fin de journée sont constatés. Ils sont le résultat d'une circulation automobile plus importante.
- **Echelle spatiale** : les concentrations en hydrocarbures peuvent varier significativement selon la distance entre la zone source et la zone réceptrice, la direction et la provenance de la masse d'air. De plus, au sein d'une même zone, des secteurs très localisés (tunnel routier, carrefour très fréquenté), peuvent présenter des concentrations largement supérieures aux concentrations moyennes. Tuhackova et *al.* (2001) ont en effet mis en évidence une concentration en HAP dans des échantillons de sol inversement proportionnelle à la distance à la source d'émission. Les prélèvements effectués à proximité d'une autoroute sont près de 30 fois supérieurs (3095 ng/g de sol sec) à ceux prélevés à 500 mètres de cette même source (106 ng/g MS sol).

### 3. Ecotoxicité des hydrocarbures

Dans l'environnement, les agents polluants peuvent être présents sous différentes formes, augmentant ainsi les risques d'exposition. En effet, à température ambiante, les hydrocarbures (de C1 à C4) sont gazeux. Plus leur masse moléculaire est élevée (C5 à C16), les hydrocarbures deviennent plus complexes et ont tendance à devenir liquide; et enfin, ceux au-delà de C16 sont des solides.

Ces formes induisent des modes de contaminations différents. Par ordre d'importance, on notera l'inhalation, la pénétration à travers la peau puis l'ingestion (Baudouin et *al.*, 2002).

La toxicité des hydrocarbures pétroliers est fonction de leur persistance, de leur biodisponibilité et de leur cinétique de pénétration dans l'organisme. Elle dépend aussi des capacités des organismes à les bio accumuler et à les métaboliser (BastienVentura et *al.*, 2005).

En terme de toxicité intrinsèque, il est généralement admis que les composés aromatiques sont les plus toxiques (Lacaze, 1980). La toxicité augmente avec le poids moléculaire et ce sont les hydrocarbures aromatiques polycycliques les plus dangereux en raison de leur faible solubilité et de leur capacité à s'accumuler dans les organismes vivants (Lee et Page, 1997 ; BastienVentura et *al.*, 2005). Les composés monoaromatiques (benzène) et diaromatiques (naphtalène) sont intrinsèquement moins toxiques car ils sont de plus faible poids moléculaire.



Paradoxalement, la phase de toxicité aiguë qui suit l'introduction d'importants volumes d'hydrocarbures en mer est plutôt associée aux aromatiques légers (benzène et naphthalène notamment), car si leur toxicité intrinsèque est inférieure à celle des composés de hauts poids moléculaires, ils sont en général plus abondants dans le pétrole épandu (Bastien Ventura et *al.*, 2005).

Du fait de leur caractère lipophile, ces polluants ont une tendance à la bioaccumulation via les réseaux trophiques (Fent, 2004).

Les principaux effets toxiques sont la génotoxicité (altération de l'ADN), la cancérogénicité et le tératogénicité (altération du développement de l'embryon) (Spencer et *al.*, 2002). Les HAP ont d'autres effets toxiques tel que la perturbation du système endocrinien et donc de la reproduction, du système immunitaire, du comportement...etc. La toxicité des hydrocarbures peut être aiguë, faible ou modérée selon le composé considéré. Aux vues des concentrations auxquelles sont exposées les populations, les risques toxiques qui leur sont associés, sont généralement liés à une exposition chronique. On doit confirmer aussi que la population est généralement exposée à un mélange d'hydrocarbures et la principale source d'exposition est l'alimentation (OMS, 2000). Chez les sujets non fumeurs, l'alimentation représente ainsi environ 96 % des expositions totales en HAP (Tarantini, 2009).

L'effet phytotoxique des hydrocarbures a été observé à travers la diminution de la germination, des retards de croissance et de rendement (Chaineau et *al.*, 1996 ; Reilley et *al.*, 1996 ). L'apparition de chloroses, des diminutions de l'activité photosynthétique et des stress hydriques (Reilley et *al.*, 1996).

#### **4. Les hydrocarbures et l'environnement**

Les hydrocarbures sont présents dans l'environnement associé à la matière organique et non en solution dans l'eau. Le transfert aux organismes vivants va dépendre de plusieurs paramètres et en particulier de la biodisponibilité (qui elle même dépend de la nature de la matière organique, des caractéristiques des hydrocarbures et des caractéristiques du milieu).

Les composés les plus volatils des pétroles et produits pétroliers déversés s'évaporent d'autant plus rapidement dans l'atmosphère que la température de l'air est élevée. Les hydrocarbures les plus légers peuvent être dissous dans les masses d'eau, notamment ceux qui ont de nombreux composés dont le poids moléculaire est faible (Lacaze, 1980).

Les hydrocarbures peuvent aussi être dispersés (émulsion directe) sous forme de gouttelettes par le brassage des eaux de surface, sinon sous l'action mécanique des vagues (agitation), formant un produit plus stable, plus visqueuse et plus volumineuse (Fattal, 2006).

Ils peuvent également être oxydés (photo-réduction) par la lumière, un phénomène qui ne concerne que les films minces d'hydrocarbures frais ou les couches superficielles d'une nappe épaisse (Marchand, 1998 *In* Fattal, 2006).

Ces processus de transfert ainsi évoqués se produisent à des échelles de temps variables et modifient considérablement la composition chimique et les caractéristiques physiques des hydrocarbures. Ces transformations ont des répercussions sur leur transport horizontal et vertical et l'influence des agents de transport diffère selon leurs stades de vieillissement et les produits concernés (Le Gentil, 2009).

Souvent dues à des actes inciviques ou irresponsables, parfois à des accidents, ces polluants hydrocarbonés se retrouvent dans les différents compartiments des écosystèmes et seront la cause directe ou indirecte de pollution.

Les industries pétrolières pénètrent aujourd'hui des écosystèmes fragiles et lointains, dans des zones de biodiversité exceptionnelle où les gouvernements ont souvent peu de moyens pour protéger l'environnement, les habitants et les autres activités économiques.

### **4.1. La pollution directe**

La pollution pétrolière est rarement une pollution ciblée sur un seul composé chimique. Elle recouvre plusieurs séries de molécules d'hydrocarbures selon des combinaisons extrêmement variées. L'impact de la pollution sur l'environnement et sur la biosphère sera par conséquent en partie fonction de ce mélange.

Les hydrocarbures sont des contaminants environnementaux omniprésents. Ils constituent une classe des produits chimiques organiques dangereux et représentent une menace pour la santé publique (Eriksson et *al.*, 2003).

Les sols contaminés par les hydrocarbures présentent un danger lors d'un contact direct avec l'homme ou l'animal ou lors de leur transfert dans les chaînes alimentaires. C'est le phénomène de bioaccumulation avec le piégeage par les végétaux et les animaux des polluants ou de leurs produits de dégradation jusqu'à des teneurs atteignant les seuils de toxicité (Gabet, 2004). La présence d'hydrocarbures est unanimement reconnue dans les déchets graisseux (Barranco et *al.*, 2004), ceci est dû à leur nature hydrophobe.

Aux polluants transitant par les cours d'eau et quel que soit le type de chaussée, les eaux de ruissellement présentent des concentrations en hydrocarbures supérieures à celle des eaux de pluies (Gryniewicz et *al.*, 2002).

Les déversements d'hydrocarbures, souvent qualifiés par les médias de « catastrophes écologiques », sont responsables de conséquences terribles pour la survie de la faune et de la flore marine.

Outre les activités humaines littorales et en mer (activités maritimes), qui sont susceptibles de générer des pollutions, chroniques ou aiguës, involontaires et accidentelles ou volontaires; en mer, les navires, mais aussi les plates-formes de recherche ou d'exploitation pétrolière offshore, sont sources de rejets polluants.

### **4.2.La pollution indirecte**

Les effets indirects représentent « la diminution des services des écosystèmes touchés par la pollution » (Bonnieux et Rainelli, 2002). Ils prennent en compte les secteurs marchands tels que la pêche et le tourisme mais également les secteurs non marchands comme la perte d'agrément (valeur patrimoniale) des habitants, les atteintes aux loisirs et l'impact sur l'écosystème (Bonnieux et Rainelli, 2002). Les effets indirects sont variés, en voici quelques exemples.

Le pétrole fait de notre jour parti de la vie. Il est absolument partout, même là où on ne s'y attend pas. On pense principalement aux dérivés plastiques tels que les bouteilles qui s'entassent dans des décharges à ciel ouvert ou sont jetés dans la nature. Ces déchets salissent l'esthétique de la nature, ils sont néfastes et peuvent être ingérés par des animaux.

Le pétrole a plusieurs dérivés qui sont utilisés dans les cosmétiques et les produits pharmaceutiques et alimentaires. Les parabens paraoxybenzoate sont les plus connus. Ils sont fréquents dans plusieurs produits alimentaires sous l'appellation E<sub>214</sub> et E<sub>219</sub>.

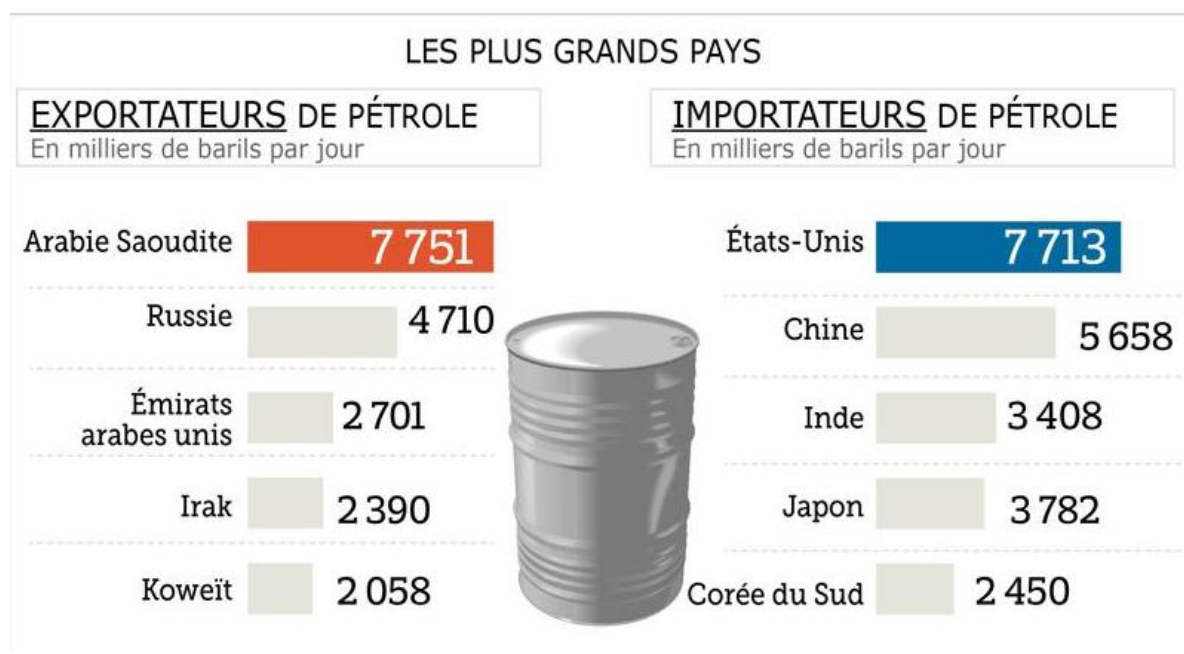
## **5. Les hydrocarbures dans le monde**

Ressources énergétiques fossiles, les hydrocarbures sont de purs produits de la géologie. Longtemps considérés comme infiniment surabondants, ils sont aujourd'hui, quoique très polluants, partout présents dans notre vie. Ils sont très utilisés dans tous les secteurs énergétiques, mais c'est dans les transports que sa domination est la plus nette. Ressource stratégique devenue extrêmement lucrative, le pétrole attise les convoitises.

D'ailleurs, aujourd'hui, le pétrole est la première source d'énergie mondiale (37,3 % de l'énergie mondiale) devant les houilles (26,6 %) et le gaz naturel (23,9 %). Réunis, les seuls hydrocarbures représentent donc près des deux tiers (61,2 %) de l'énergie consommée à l'échelle de la planète (Dubois, 2007).

L'ère des hydrocarbures est en effet confrontée à des problématiques nouvelles, notamment la question de la fin de la ressource.

Dans ce contexte, un jeu pétrolier et gazier mondial hiérarchise de plus en plus l'espace géographique, divisant les grandes régions du monde entre aires consommatrices importatrices et zones productrices exportatrices. Tous les États mettent aujourd'hui en œuvre de subtiles politiques pétrolières (Fig.3.). Pour les grands pays exportateurs, les hydrocarbures sont perçus comme des leviers pour s'affirmer tant sur le plan économique que géopolitique. Pour les États importateurs, il faut coûte que coûte sécuriser au maximum les approvisionnements tout en songeant à des formes d'énergies alternatives. De fait, en créant des interdépendances majeures à l'échelle planétaire, le pétrole et le gaz contribuent remarquablement à la permanence toujours plus accrue du phénomène de mondialisation (Dubois, 2007).



**Figure.3.** Les plus grands pays exportateurs et importateurs de pétrole  
(British Petroleum, 2014 In Errard, 2014)

Les ressources disponibles se trouvant pour l'essentiel au Moyen-Orient, en Afrique, en Asie centrale et en Amérique latine, cela complique encore un peu plus les nombreux conflits et les instabilités politiques chroniques qui caractérisent ces régions.

Avec plus de 60 % des réserves mondiales prouvées, le Moyen-Orient est, sans contestation possible, le cœur pétrolier du monde. En son sein, l'Arabie saoudite arrive largement en tête avec quelque 264 milliards de barils de réserves prouvées sur un total mondial de 1 200 milliards, elle est suivie par quatre autres Etats riverains du golfe Persique : l'Iran (137 milliards de barils), l'Irak (115), le Koweït (101) et les Emirats arabes unis (98) (Mathieu, 2011).

Côté production, là encore, les Etats du Moyen-Orient occupent le premier rang. Si l'on met en rapport production et réserves disponibles, cette région bénéficie d'un potentiel de plus de quatre-vingt années de production, soit dix fois plus que l'Europe et quatre fois plus que l'Amérique.



**Figure.4.** Les grands producteurs de pétrole dans le monde (British Petroleum, 2014  
 In Errard, 2014)

Selon l'Agence internationale de l'énergie (AIE) (2012), les principaux pays producteurs de pétrole représentent à eux seuls plus de 64% de la production mondiale.

- C'est l'Arabie Saoudite qui atteint la 1<sup>ère</sup> place du classement avec une production journalière d'environ 11,75 millions de barils. Le pays représente plus de 13% de la production mondiale.

- Avec une réserve prouvée de plus de 21 milliards de barils, les États-Unis est le second plus grand pays producteur de pétrole. Sa production journalière est d'environ 11,11 millions de barils – soit 12% de la production mondiale.
- La Russie représente à elle seule 11,4 % de la production pétrolière mondiale.
- La Chine est non seulement le pays le plus peuplé du monde, mais également le 4<sup>ème</sup> plus grand producteur mondial de pétrole. Sa production journalière s'étend à environ 4,19 millions de barils.

Selon le rapport annuel sur l'énergie de British Petroleum, les États-Unis sont devenus en 2014 le premier producteur mondial de pétrole, devant l'Arabie saoudite et la Russie.

### **5.1. Les hydrocarbures en Algérie**

Avec un volume initial en place de 16 milliards de mètres cubes équivalent-pétrole découvert depuis 1948, date de la première découverte commerciale à Oued Guétérini, près de Sidi Aissa, en pleine zone des nappes, l'Algérie occupe le troisième rang parmi les pays producteurs de pétrole en Afrique, et le 12<sup>ème</sup> rang dans le monde (Attar et Hammat, 2000).

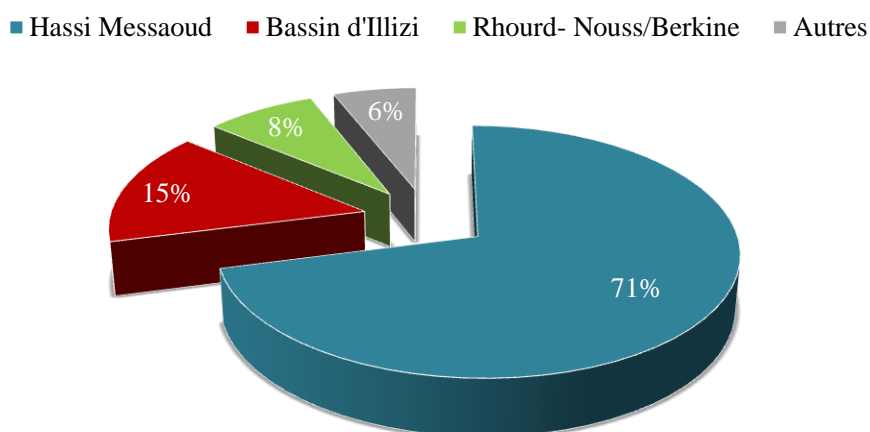
La présence des roches mères épaisses, riches en matière organique, les conditions de génération des hydrocarbures et les multiples réservoirs et couvertures répartis à travers la section stratigraphique font que le potentiel en hydrocarbures de l'Algérie est très important et ce aussi bien en gaz qu'en huile, sur la plate-forme saharienne et le Nord de l'Algérie.

Les hydrocarbures en Algérie ont été nationalisés juste après l'indépendance (24 Février 1971), ils occupent une place importante par rapport à l'économie nationale.

L'Algérie dispose de potentialités importantes en pétrole et gaz naturel lesquels ne sont pas exploités sous forme de matières premières mais transformés en partie sur place, selon une stratégie et une planification rigoureuses.

Les réserves en hydrocarbures découvertes en Algérie à ce jour sont renfermées dans un peu plus de 200 gisements d'huile et de gaz, dont 73 sont situés dans le bassin d'Illizi, 57 dans les bassins du Sahara Central, 34 dans les bassins de Ghadamès – Rhourde Nouss, et 31 dans le bassin de Oued Mya (Attar et Hammat, 2000) (Fig.5.).

Le champ Hassi Messaoud, est le plus grand gisement de pétrole d'Algérie - et de tout le continent africain, par sa dimension et ses réserves importantes. Il fut découvert la même année que le gisement de gaz de Hassi R'Mel, son équivalent pour le gaz (principal gisement de gaz d'Afrique).



**Figure.5.** Répartition géographique des réserves de pétrole en Algérie (Attar et Hammat, 2000)

La recherche, la production, le transport, la transformation et la commercialisation des hydrocarbures ont été confiés à la société nationale SONATRACH, qui constitue une véritable métropole économique, dont les principaux sièges se trouvent à Hassi Messaoud, Alger, Arzew, Adrar et Skikda (Guermouche M'Rassi, 2014.). Sonatrach est une compagnie nationale algérienne d'envergure internationale, c'est la clé de voûte de l'économie

En 2004, le Groupe Sonatrach s'est classé 12<sup>ème</sup> mondial en production de pétrole, 2<sup>ème</sup> exportateur de gaz naturel liquéfié (GNL) et de Gaz de pétrole liquéfié (GPL) et 3<sup>ème</sup> exportateur de gaz naturel, selon la revue internationale Petroleum Intelligence Weekly (PIW) (Martinez, 2008).

*Le pétrole algérien* est l'un des plus chers au monde, parce que c'est un pétrole léger (sa densité est entre 43 et 47° API), à moindre teneur en soufre (0,1%). Il est de ce fait apprécié des raffineurs. La variété du brut algérien est appelée Sahara Blend.

Néanmoins, le développement d'une telle industrie s'est fait au détriment de l'environnement qu'on voit se dégrader d'année en année.

## 5.2. Les problèmes liés aux hydrocarbures en Algérie

A nos jours l'environnement est rarement propre. Sa pureté est définie par rapport aux normes fixées par les législations.

D'une manière générale, les dangers présentés par les hydrocarbures sont le risque d'incendie et d'explosion, ainsi que la toxicité. Ces dangers diminueront au fur et à mesure que l'hydrocarbure vieillit.

L'Algérie, jalonnée de sites naturels méditerranéens d'une richesse inestimable, doit être mise à l'abri des différentes pollutions. Il est à noter qu'au cours de son développement, l'Algérie a dressé d'importantes infrastructures d'industries pétrolières dont Arzew-Bethioua, Béjaïa et Skikda. Ces installations pétrolières sont sources potentielles de pollution par les hydrocarbures (Buscaïl et *al.*, 1999).

La ville de Skikda occupe une place de choix dans la stratégie du développement économique, compte tenu de ses richesses et atouts. C'est ainsi que la loi du 04-20 du 25 décembre 2004, à décrétée Skikda zone à haut risque, une loi qui été interprétée comme un mea culpa assez tardif d'un système qui à privilégié la productivité au détriment de la sécurité. Les incidents et les catastrophes répétitifs qui ont eu lieu au niveau de la zone pétrochimique sont venus témoigner sur la dangerosité de la situation.

Ainsi le premier incident important qui s'est produit dans la zone industrielle de Skikda, remonte au début des années 1980, quand des fuites massives de chlore à l'état gazeux survenues au complexe pétrochimique (CP1K) avaient failli asphyxier des milliers de personnes (Bendjemila, 2011). Le complexe a été également le théâtre de plusieurs incidents plus ou moins graves. Au mois de février 2003, une défaillance relevée dans des turbo générateurs avait engendré une grande explosion d'éthylène, et au mois d'août de la même année, un silo de polyéthylène a également explosé à la raffinerie, plusieurs autres incidents sont également à rapporter, tels que les déversements, souvent accidentels, de produits pétrochimiques. Les travailleurs évoquent à ce sujet l'unité du bitume qui s'était enflammée, le déversement d'essence à l'unité reforming et du bitume dans les années 1970. La raffinerie de Skikda a été aussi le théâtre en 1996 d'un grand déversement de xylène qui avait à l'époque causé une grande catastrophe écologique. D'autres incidents ont concerné le port pétrolier de Skikda, le plus important date de 1986 suite à l'explosion d'un navire pétrolier le Southern pétrolier.

Le 19 janvier 2004, l'Algérie a connu la plus grande catastrophe industrielle depuis l'indépendance. Une explosion a retenti dans le complexe de gaz naturel liquéfié (GNL) de Skikda, faisant 27 morts et de 74 blessés et un mouvement de panique dans la ville (Bendjemila, 2011 ; Hadeff, 2008). On note aussi la destruction de trois trains de liquéfaction GNL (20, 30, 40) sur 6 (50%). La même année, le complexe des matières

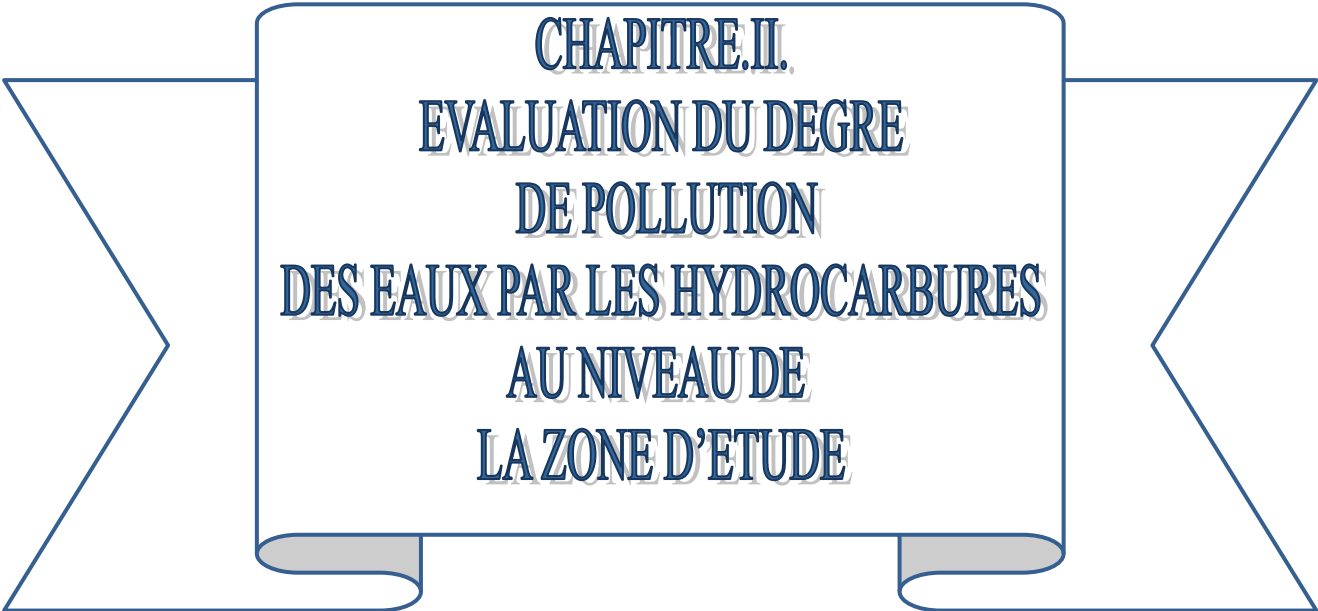


plastiques CP1K a été secoué par une forte déflagration suite à l'explosion d'un ballon de gaz. Le 19 mai 2006, un feu de broussaille, s'est déclaré dans l'enceinte de la zone dont l'origine serait en relation avec des étincelles qui aurait émané de la torche de l'unité de gaz propane liquéfié du complexe gazier GNL (Bendjemila, 2011).

En 2005, un feu s'est déclaré dans une des sept cellules composant la tour de refroidissement et s'est propagé à d'autres cellules. Dans la même année, une explosion d'un bac de stockage de pétrole brut (N106) dont la capacité est de 51.200m<sup>3</sup>, a causé 02 morts, 05 blessés et plusieurs cas de difficulté respiratoire au sein d'une population apeurée (Bendjemila, 2011). En 2013, se répète la scène dans le four 100 F1 à la raffinerie, mais le feu a été vite neutralisé et le complexe a frôlé le pire grâce au courage et interventions des éléments de la force d'intervention de réserve et des moyens propres du RA1K.

La ville de Skikda et sa population ont, à chaque fois, échappée à une réelle catastrophe humaine, économique et écologique.

A cette succession de sinistre, vient s'allier les accidents maritimes : en 1994, un vraquier grec, le Sea Prince s'échoua à El Marsa, ou l'épave corrodée git encore. Ensuite vint une longue série d'échouement inaugurée par la dérive du plus grand navire de la SNTM « El Hadjar » en 2002 dans ses soutes 200 tonnes de fuel et 19.000 litres de lubrifiants. En 2003, ce sont trois pétroliers en attente de chargement qui sont venus également s'échouer sur la même plage dont les soutes contenaient 4700 tonnes de fuel, 340 tonnes de gasoil et plus de 72000 litres de lubrifiants. Le 23 décembre 2003, se sont encore deux autres épaves, le KastorI et le Tenerife qui vont s'échouer à la plage Ben M'hidi déversant leur contenu de fuel dans la mer, et demeurent à ce jour ensablées (Hadeff, 2008).



**CHAPITRE.II.**  
**EVALUATION DU DEGRE**  
**DE POLLUTION**  
**DES EAUX PAR LES HYDROCARBURES**  
**AU NIVEAU DE**  
**LA ZONE D'ETUDE**

## CHAPITRE. II. EVALUATION DU DEGRE DE POLLUTION DES EAUX PAR LES HYDROCARBURES AU NIVEAU DE LA ZONE D'ETUDE

### 1. Introduction

Suite aux tissus industriels très denses, les eaux de la wilaya de Skikda sont menacées par la dégradation de leur qualité. Occupant la partie centrale de la wilaya, l'oued Saf-Saf est soumis dans sa partie aval à une pollution des hydrocarbures due essentiellement aux rejets incontrôlés des effluents de la plateforme pétrochimique.

Face à cette situation précaire et pour une bonne préservation du milieu récepteur, nous essayons au cours de ce travail, d'apprécier le degré de pollution de l'eau d'oued Saf-Saf, par l'analyse de différents paramètres de caractérisation d'une eau polluée. Les polluants organiques lipophiles évacués dans les eaux se concentrent progressivement tout au long de la chaîne trophique, et peuvent représenter un réel danger pour les consommateurs finaux. C'est dans cette optique qu'on a analysé des échantillons de lait, urine et eau d'abreuvement, pour estimer ces polluants organiques.

### 2. La zone d'étude

L'évaluation du niveau de pollution d'une région quelconque repose sur le choix d'un nombre représentatif de stations correctement distribuées tout autour des sources potentielles de pollution. La zone objet de cette étude se situe dans la wilaya de Skikda au Nord-est de l'Algérie (Fig.6.) ou, on a sélectionné deux sites d'études : un à l'intérieur de la plate forme pétrochimique de Skikda, l'autre au niveau de l'oued Saf-Saf et un site témoin localisé à oued Guebli.



Figure.6. Situation géographique de la wilaya de Skikda

## 2.1. Oued Saf-Saf

L'oued Saf-Saf est l'un des trois principaux oueds de la wilaya de Skikda. Il constitue son axe hydrographique central (Fig.7.) d'un débit moyen de  $150 \text{ hm}^3/\text{an}$  ; sa partie aval est purement dominée par l'industrie pétrochimique polluante, ainsi qu'une pollution ménagère due aux rejets des agglomérations limitrophes (Chafai, 2006).

L'Oued est alimenté en amont exclusivement par les apports hydriques du barrage de Zerdaza, sur ses deux rives se trouve la commune de Skikda à l'ouest et la plate-forme pétrochimique à l'est. Il est soumis à de nombreux rejets permanents y compris les apports d'oued Marhoum et oued Zeramna qui tout deux acheminent des polluants dans leurs effluents (Rouidi, 2014).

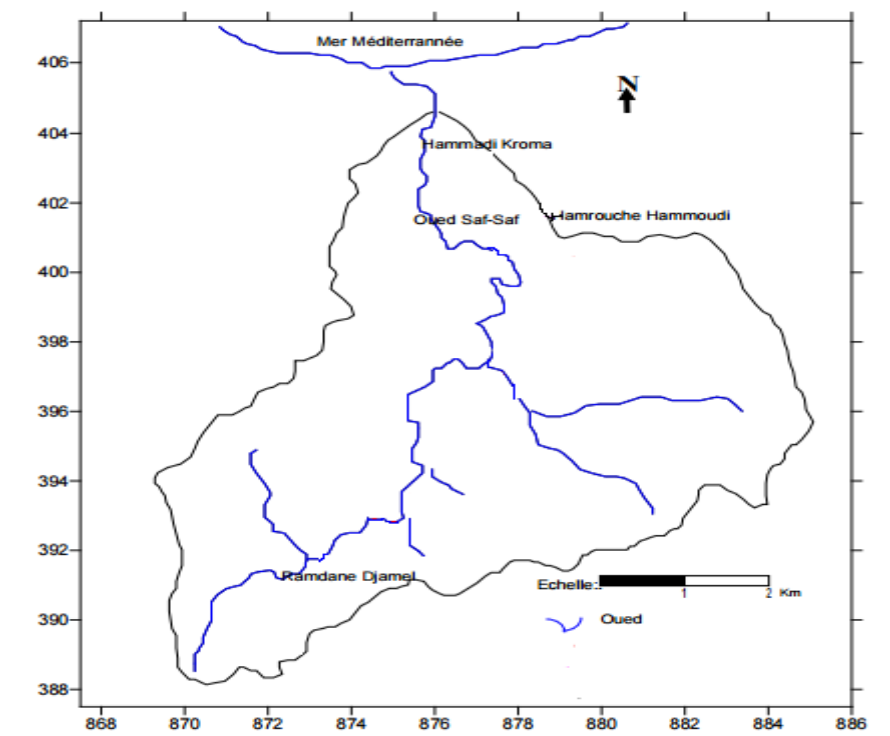


Figure.7. Présentation du bassin versant d'oued Saf-Saf

## 2.2. La zone pétrochimique

Sonatrach est la plus importante compagnie d'hydrocarbures en Algérie et en Afrique. Elle intervient dans l'exploration, la production, le transport par canalisations, la transformation et la commercialisation des hydrocarbures et de leurs dérivés.

Le site industriel de Skikda dite zone industrielle, réalisée en 1971, constitue le grand pôle industriel de l'Est dans le domaine des industries chimiques et pétrochimiques.

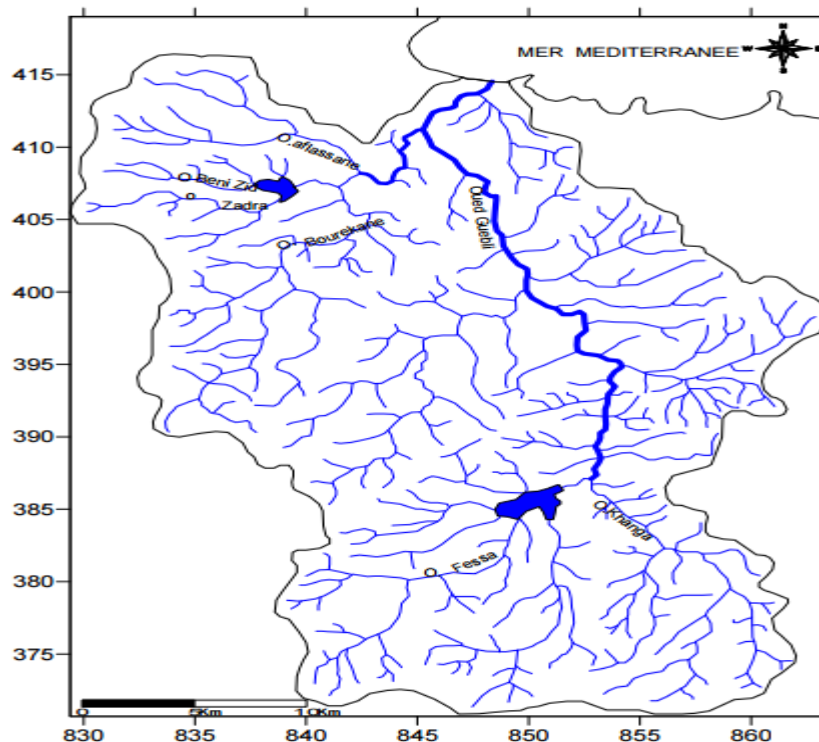
Elle regroupe deux grandes catégories d'activité au niveau de 11 établissements :

- Les industries chimiques : qui produisent ou qui utilisent des produits chimiques en grande- quantité tels que : ENIP, CP1K, POLYMED...etc.
- Les industries pétrolières ou pétrochimiques : qui produisent, transforment ou stockent- l'ensemble des dérivés du pétrole et du gaz tels que : RA1/K, GL1/K ...etc.

### 2.3. Site témoin

Le site témoin choisi est l'oued Guebli, principal cours d'eau des petits bassins côtiers indépendants de l'Algérie orientale est situé au Nord-ouest de la wilaya de Skikda. D'une longueur de plus de 45km, drainant une superficie de 993 km<sup>2</sup>; l'oued est alimenté par les eaux provenant de l'oued Guergoura, l'oued Fessa et des massifs montagneux ; et il se déverse dans la Méditerranée au voisinage de la ville de Collo (Fig.8.).

Notre site est supposé non polluer par les hydrocarbures. Selon Ben Rabah (2006), oued Guebli est classé dans la catégorie de qualité moyenne des eaux, tant que l'indice global (sur une durée d'observation de 15 années), est de 46 %.



**Figure.8.** Présentation du bassin versant d'oued Guebli

## 2.4. Sites de prélèvement

Notre travail consiste à prélever des échantillons d'eau de différents endroits de la zone d'étude. Les points de prélèvement sont présentés dans le tableau.4, ainsi que la figure.9.

**Tableau.4.** Les différents points de prélèvement

Points de prélèvement	
La raffinerie	Raf
Le complexe de transport des hydrocarbures par canalisation (RTE)	RTE
Oued Saf-Saf 1 à proximité du poste N°3 de Sonatrach d'environ 300m	Saf1
Oued Saf-Saf 2 (du coté de Hamadi Krouma)	Saf2
Puit 1 (El Hadaik) utilisé par la population	Puit 1
Puit2 (Béni Béchir) utilisé par la population	Puit 2
Oued Guebli à Collo	Témoin



**Figure.9.** Localisation géographique des points de prélèvement

Selon la figure 10, on a regroupé nos points de prélèvement en deux groupes selon qu'ils sont en amont ou en aval de l'oued Saf-Saf.



Figure.10. Localisation des sites de prélèvement dans l'Oued SafSaf

### 3. Echantillonnage et technique de prélèvement

#### 3.1. Eau

Le choix des points de prélèvement tient compte de leur position vis-à-vis de la zone pétrochimique, l'accessibilité et la qualité de l'eau prélevée. L'échantillonnage a été effectué en 2011 dans des conditions d'asepsie rigoureuse pour éviter toute contamination accidentelle durant la manipulation.

#### 3.2. Autre matériel de prélèvement : urine, lait de bovins et eau d'abreuvement

Les hydrocarbures sont responsables de la contamination de matrices environnementales et biologiques. Ces contaminants s'accumulent préférentiellement dans les matières grasses et peuvent ainsi représenter un risque de transfert dans la chaîne alimentaire.

C'est donc pour toutes ces raisons, que nous avons essayé d'estimer le degré de contamination de ces matrices. On a effectué des prélèvements d'urine et lait de vache ayant consommées de l'eau contaminée par les hydrocarbures (eau d'abreuvement) à partir d'une ferme à Béni Béchir (Skikda) ainsi qu'un échantillon d'eau de la raffinerie de Skikda.

### 4. Techniques de prélèvement et conservation

Le prélèvement manuel des échantillons d'eau est effectué, au niveau d'une zone assez agitée par le courant de l'effluent. Au moment du prélèvement, les flacons sont rincés trois fois avec de l'eau à analyser, puis remplis complètement et sont fermés hermétiquement pour

assurer une protection contre toute contamination probable. Les eaux industrielles sont rapidement modifiées sous l'action de divers microorganismes qu'elles renferment. Pour limiter les possibilités d'évolution entre l'instant de prélèvement et l'analyse, les flacons remplis sont soigneusement étiquetés, conservés à l'abri de la lumière à basse température (4°C) et transportés immédiatement au laboratoire pour les analyses, selon les recommandations préconisées par Rodier (2009). Au même moment des mesures de certains paramètres sont effectuées in situ.

Les prises d'essais des échantillons du lait et d'urine bovine sont réalisées le matin. Au cours du prélèvement, des instructions stérilisantes citées par (HOGAN et *al.*, 1999) ont été suivies, afin de réduire le risque de contamination par les nombreux microorganismes présents sur la peau et des trayons de mamelle, ainsi que sur les mains de l'échantillonneur.

### 5. Détermination des paramètres physico-chimiques

Pour évaluer la qualité physico-chimique de l'eau échantillonnée, nous avons eu recours à l'étude des paramètres initiés dans le tableau suivant : température; pH; conductivité électrique ; les chlorures ; Demande chimique en oxygène (DCO); Demande biologique en oxygène (DBO<sub>5</sub>);et les hydrocarbures totaux dissous. En ce qui concerne les échantillons de lait, d'urine et d'eaux, nous avons effectué des analyses de la DBO, DCO, ions sulfates et hydrocarbures totaux dissous (Tab.5.).

**Tab.5.** Méthodes d'analyse des différents paramètres physico chimiques

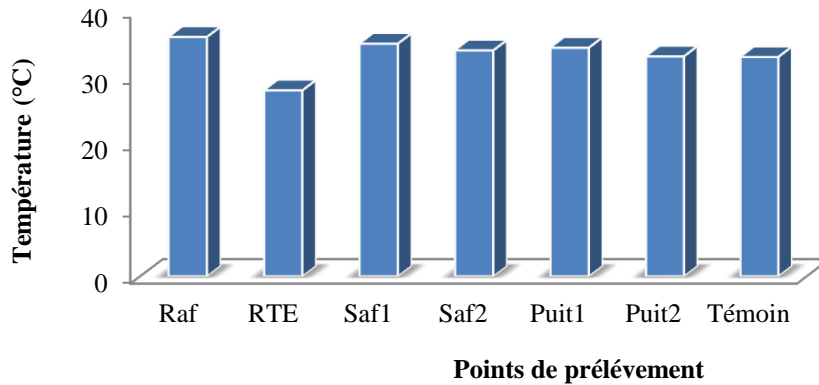
Paramètres	Méthodes d'analyse	Unités
Température	Thermomètre à mercure	°C
pH	pHmètre de terrain (HANNA)	
Conductivité	Conductimètre de type (HANNA)	µs/ cm
DCO	Spectrophotomètre (DIN ISO 15705/ 2002)	mg/l O <sub>2</sub>
DBO <sub>5</sub>	Spectrophotomètre (DIN EN1899 H51)	mg/l O <sub>2</sub>
Sulfates	Spectrophotomètre (DIN38405-D5-2)	mg/l SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
Chlorures	Méthode de Mohr : dosage des chlorures par une solution de nitrate d'argent en présence de chromate de potassium	mg/l Cl <sup>-</sup>
Hydrocarbures	Spectrophotomètre (Art n°985 057)	mg/l



## 6. Résultats

### 6.1. Paramètres physico-chimiques des eaux étudiées

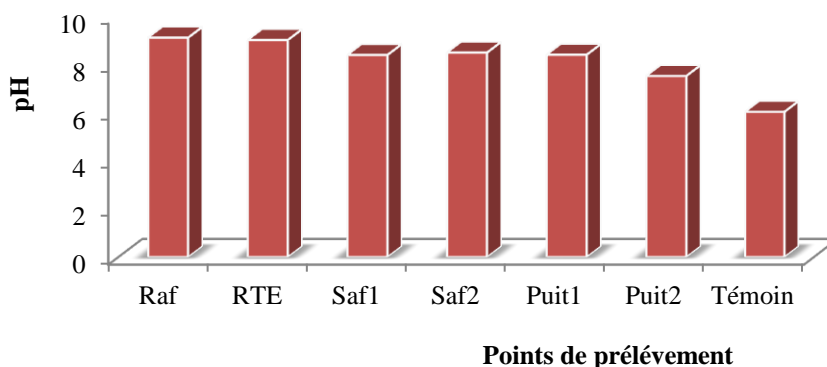
#### 6.1.1. La température



**Figure.11.** Température des eaux étudiées

La température de l'eau est mesurée in situ, est de 36°C et 28°C. Ces valeurs sont enregistrées respectivement pour les points de prélèvement Raf et RTE (Fig.11.). Ceux le long de l'oued : aux points Saf1 et Saf2 présentent un maximum de 35 °C et un minimum de 33,1 °C. Ces résultats dépassent de loin la valeur limite donné par (JORA, 2009) et qui est fixée à 30°C.

#### 9.1.2. Le pH



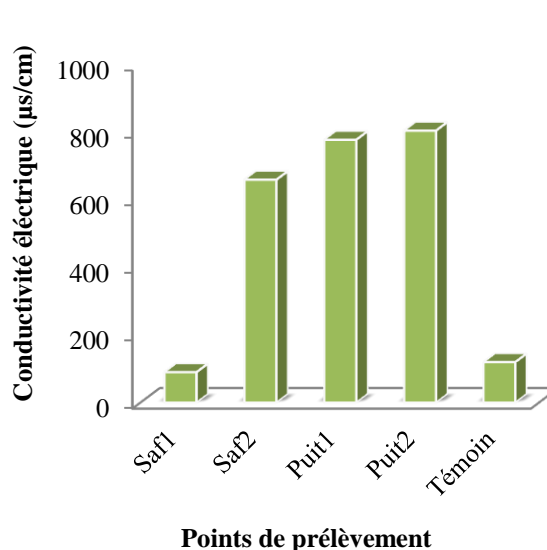
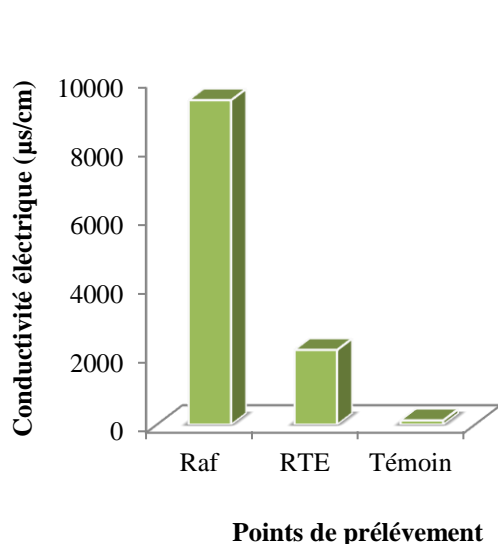
**Figure.12.** pH des eaux étudiées

Le pH est considéré comme étant l'un des paramètres les plus importants de la qualité des eaux. Les sites présentent une eau basique (Fig.12.); cependant les valeurs du pH des points de prélèvement Raf et RTE, situés à l'intérieur de la zone pétrochimique, vont entre 9

et 9,1. Ces valeurs enregistrées sont différentes des valeurs limites maximales des eaux des installations industrielles (JORA, 2009) ou le pH est généralement compris entre 5,5 et 8,5.

Les points Saf1, Saf2 et Puit1 tendent vers un pH de 8, tandis que le point de prélèvement Puit2 vire vers la neutralité avec une valeur de 7,51. Une valeur de 6,02 est enregistrée au niveau du site témoin

### 9.1.3. La conductivité électrique (CE)



**Figure.13a.** Valeurs de CE des eaux des points de prélèvements Raf et RTE

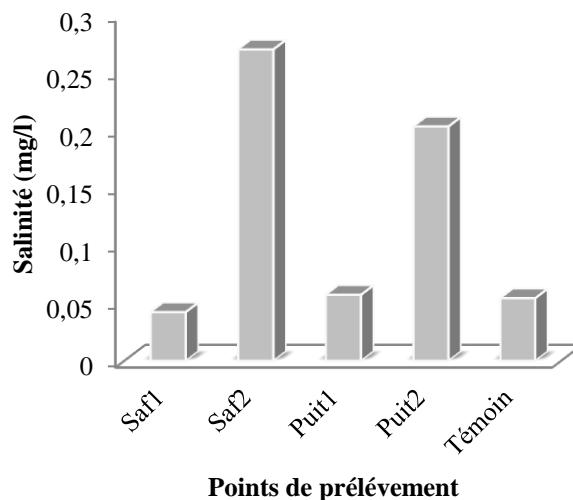
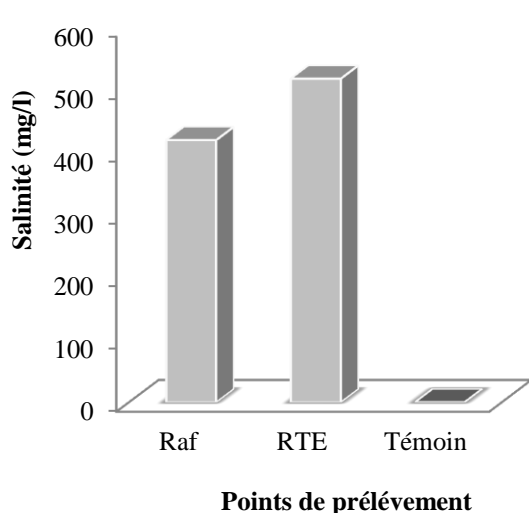
**Figure.13b.** Valeurs de CE des eaux des points Saf1, Saf2, Puit1 et Puit2

La conductivité électrique indique la salinité qui est traduite par la concentration des sels dissous dans l'eau Elle est souvent utilisée pour le contrôle de la qualité de l'eau (Satin, 1999). Les valeurs de la conductivité électrique sont variables d'un site à l'autre (Fig.13a et 13b).

Les valeurs enregistrées, révèlent que la majorité des sites présentent une conductivité électrique élevée (Saf2, Puit1 et Puit2) et très élevée (Raf et RTE) ; Cette augmentation est probablement due à la charge organique (Chafai., 1996). Le point de prélèvement Saf1 présente une conductivité électrique faible. Selon Rodier (2009), dans les rejets d'eaux usées des modifications importantes de la conductivité électrique peuvent intervenir rapidement au cours de la journée.

Contrairement aux autres sites, le témoin révèle une valeur de conductivité presque nulle. La valeur la plus élevée a été enregistrée au niveau de la Raf qui est égale à 9410  $\mu\text{s}/\text{cm}$

#### 9.1.4. La salinité



**Figure.14a.** Les valeurs de la salinité des eaux des points de prélèvement Raf et RTE

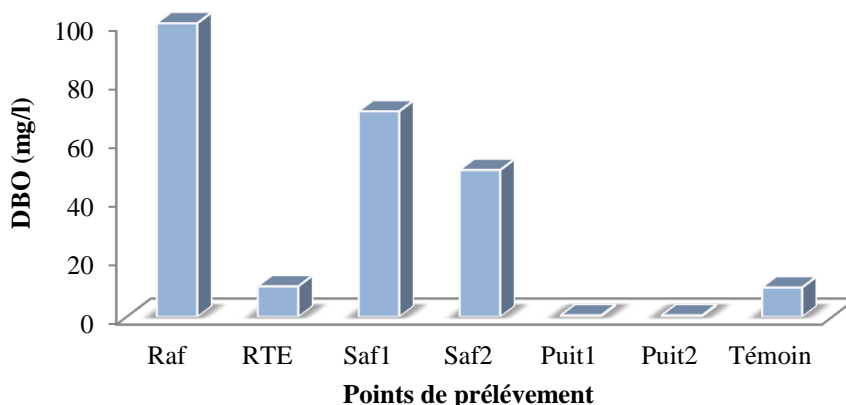
**Figure.14b.** Les valeurs de la salinité des eaux des points de prélèvement Saf1, Saf2, Puit1 et Puit2

La conductivité électrique et la salinité : sont deux paramètres liés à la concentration en sels dissous.

Il est évident de différencier deux groupes : l'un marquant des valeurs très élevées ; il s'agit des points Raf et RTE avec respectivement 518mg/l et 420 mg/l (Fig.14a); et l'autre composé des points Saf1, Saf2, Puit1 et Puit2 avec des valeurs très faibles allant de 0,042 mg/l pour le point Saf1 à 0,27 mg/l au point Saf2 (Fig.14b).

#### 9.1.5. La demande biologique en oxygène (DBO<sub>5</sub>)

Cette mesure est très utilisée pour le suivi des rejets des stations d'épuration, car elle donne une approximation de la charge en matières organiques biodégradables

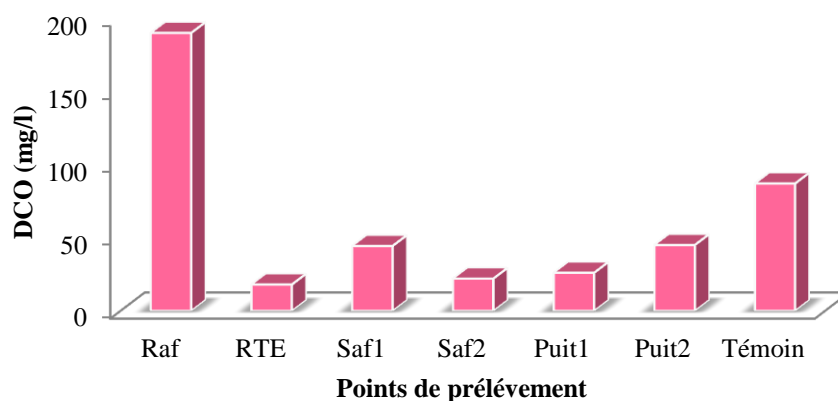


**Figure.15.** DBO des eaux étudiées

Les valeurs de la  $DBO_5$  des points de prélèvement Puit1 et Puit2 sont très faibles (0.5 mg/l) et reflètent la qualité des eaux des puits. Celle enregistrée au niveau des points de prélèvement Raf, Saf1 et Saf2 sont élevés et sont respectivement de l'ordre de 100 mg/l, 70 mg/l et 50 mg/l. Ce sont des valeurs qui dépassent les normes admissibles des rejets industriels limités à 40 mg/l (JORA, 2009) (Fig.15.).

En ce qui concerne le point RTE et le témoin, la valeur enregistrée est d'environ 10 mg/l

#### 9.1.6. La demande chimique en oxygène (DCO)



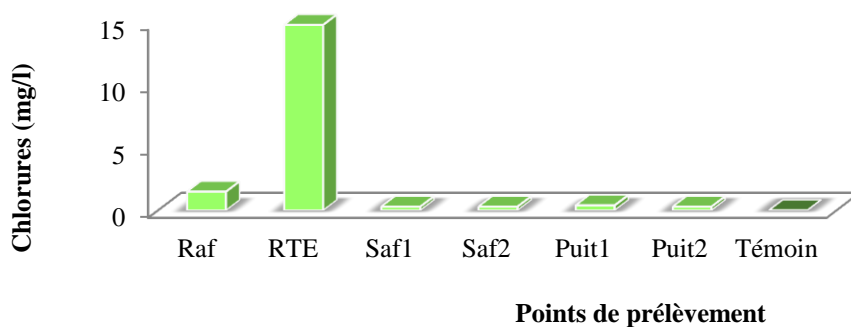
**Figure.16.** DCO des eaux étudiée

D'après les résultats obtenus (Fig.16.), on remarque que les valeurs de la DCO sont faibles, sauf celle du point Raf; qui est élevée avec une charge de 190 mg/l. Par contre, la valeur la plus faible est celle du point RTE avec 18 mg/l.

Globalement, toutes les valeurs obtenues sont en dessous du seuil limite de la DCO des rejets industriels (JORA, 2009) qui sont fixés à 120 mg/l, sauf le site Raf.

Les résultats obtenus de la DCO et DBO, nous permettent d'avancer que la charge polluante des eaux échantillonnées est essentiellement organique.

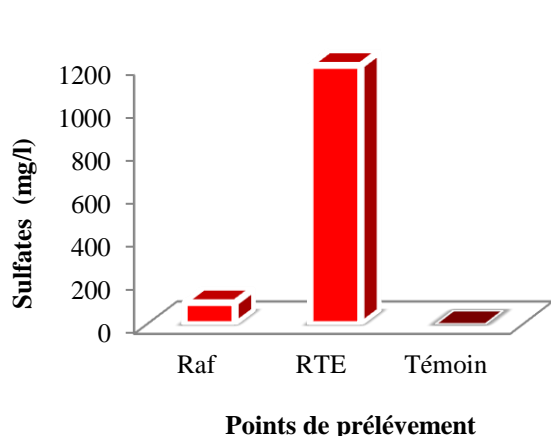
### 9.1.7. Les chlorures



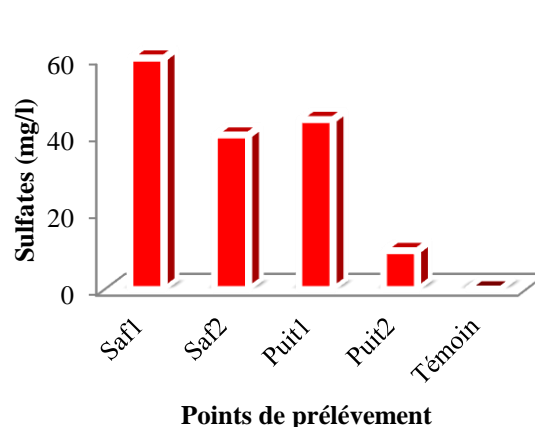
**Figure.17.**Chlorures des eaux étudiées

Le taux de chlorures est extrêmement varié et lié principalement à la nature des terrains traversés par les eaux. L'examen de la figure 17, nous informe de la présence des chlorures dans l'eau de tous les points de prélèvement, avec une valeur maximale égale à 14.8 mg/l au niveau du point RTE et minimale de 0,3 mg/l au niveau des autres points de prélèvement. Les chiffres enregistrés sont similaires à des teneurs en chlorures d'une eau de rivière naturelle (Rodier, 2009).

### 9.1.8. Les ions sulfates ( $SO_4^{-2}$ )



**Figure.18a.** Sulfates des eaux des points Raf et RTE

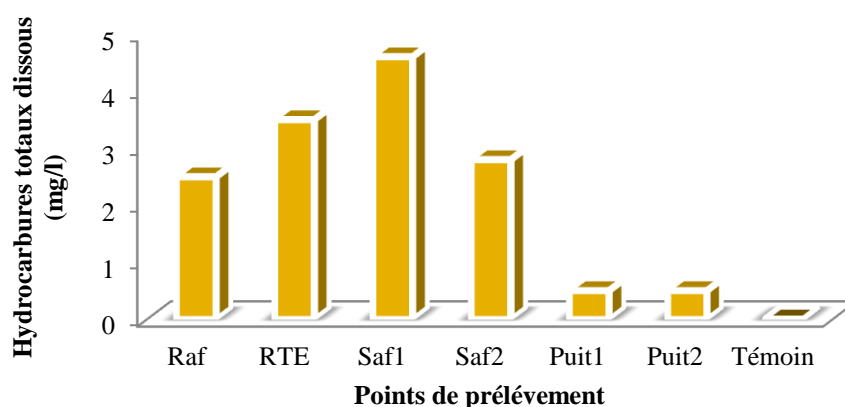


**Figure.18b.** Sulfates des eaux des points de Saf1, Saf2, Puit1 et Puit2

Comme pour la CE, on est tenté de subdiviser les sites étudiés en deux groupes, ceux dont les taux sont les plus importants; il s'agit notamment des point Raf et RTE avec

respectivement une valeur minimale de 100 mg/l et maximale de 1200 mg/l (Fig.18a.) ; et ceux à teneurs extrêmement faible à savoir les points Saf1, Saf2, Puit1 et Puit2 et sont respectivement de l'ordre 60 mg/l, 40 mg/l, 44 mg/l et 10 mg/l. Le site témoin révèle des traces (Fig.18b.).

### 9.2. Les hydrocarbures totaux dissous dans l'eau



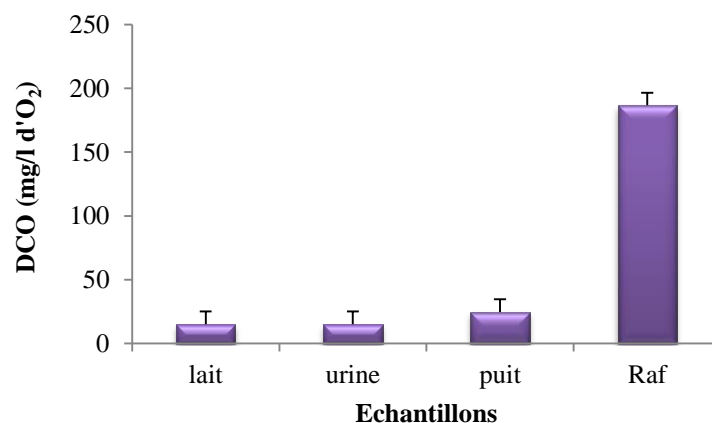
**Figure.19.** Les hydrocarbures totaux dissous des eaux étudiées

Les teneurs en hydrocarbures, dans les eaux analysées présentent des valeurs variant entre 4.6 mg/l au niveau du point de prélèvement Saf1 et 0,5 mg/l enregistrée au niveau des points Puit1 et Puit2 (Fig.19.). Par contre les eaux du site témoin sont presque exemptes d'hydrocarbures.

Nos résultats montrent que les hydrocarbures sont présents dans presque tous les sites d'échantillonnage, avec des valeurs qui ne dépassent pas les taux acceptables admises selon JORA (2009).

## 10. Paramètres physico-chimiques des échantillons étudiés

### 10.1. La demande chimique en oxygène (DCO)

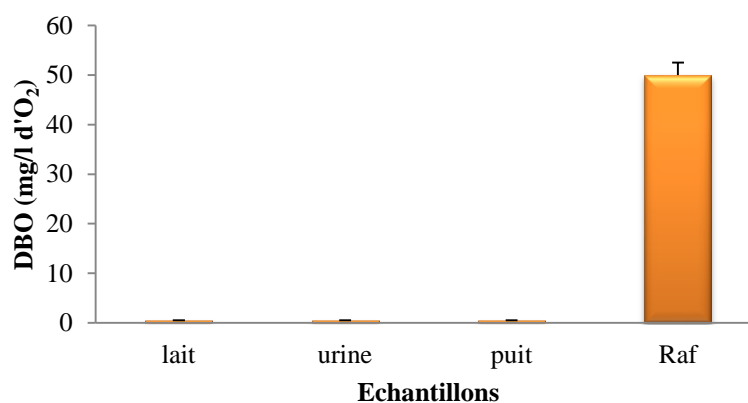


**Figure.20.** DCO des échantillons étudiés

La DCO est un paramètre de qualité qui permet d'évaluer une charge polluante. D'après les résultats obtenus (Fig.20.), on remarque que les valeurs de la DCO sont faibles, sauf celle de la Raf; qui est élevée avec une charge moyenne de 186,66 mg/l, suivie par celle du puit avec 24,26 mg/l. Les deux autres valeurs du lait et urine sont similaires (15mg/l) mais qui semblent tout de même indiquer un signal d'alarme.

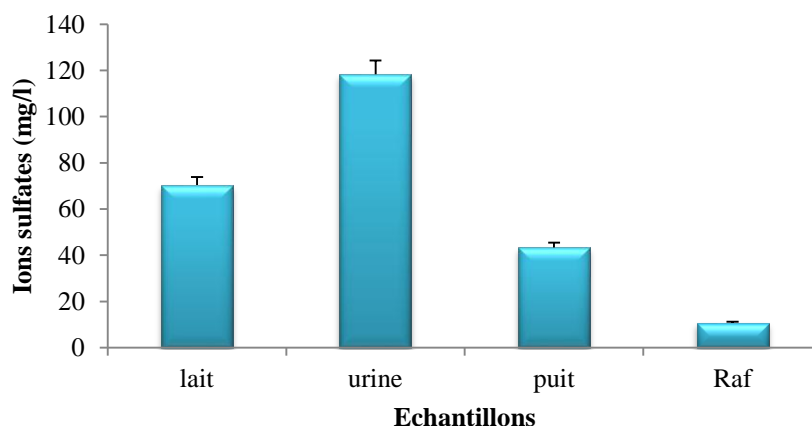
Globalement, l'échantillon de la raffinerie dépasse le seuil limite de la DCO des rejets industriels (JORA, 2009) fixée à 120 mg/l.

## 10.2. La demande biologique d'oxygène (DBO)



Les valeurs de la DBO<sub>5</sub> de l'urine, du lait et de l'eau de puit sont assez faibles (0.5 mg/l). En revanche, la valeur de l'échantillon Raf semble élevée (50 mg/l). Elle dépasse les normes admissibles des rejets industriels limités à 40 mg/l (JORA, 2009) (Fig.21.).

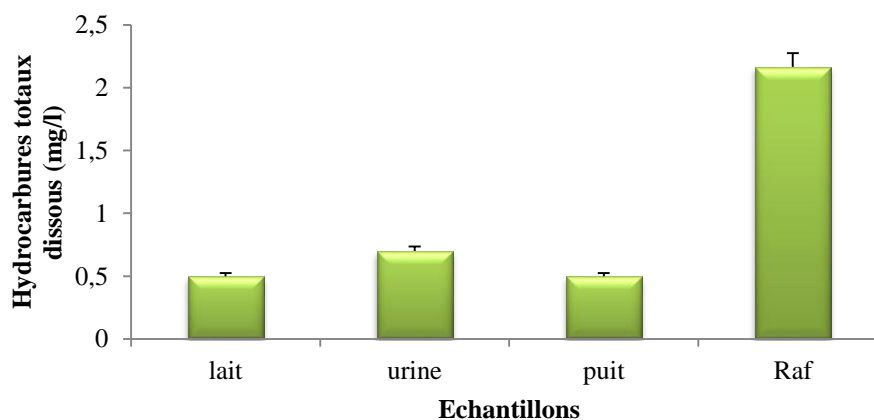
## 10.3. Les ions sulfates (SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>)



**Figure.22.** Les ions sulfates des échantillons

Les ions sulfates sont présents dans tous nos échantillons étudiés, avec une teneur moyenne maximale de 118,33 mg/l enregistrée dans les urines suivi par celle du lait de vache avec une teneur moyenne de 70,33 mg/l. Les eaux de puit et de la Raf ont donné des valeurs respectives de l'ordre de 43,33 mg/l et 10,66 mg/l. (Fig.22).

#### 10.4. Les hydrocarbures totaux dissous



**Figure.23.** Les hydrocarbures totaux dissous des échantillons

Nos échantillons contiennent tous des hydrocarbures avec des valeurs variables. Leurs teneurs présentent des valeurs moyennes respectivement de 2.16 mg/l au niveau de la Raf, de 0,7 mg/l enregistrée au niveau de l'échantillon des urines et 0,5mg/l pour le lait et les eaux du puit. (Fig.23.).



Nous ne pouvons pas se prononcer sur les valeurs enregistrées à partir de nos analyses par manque de normes nationales et internationales. Très peu de données sont publiées et les analyses de contrôle ne sont pas faites systématiquement notamment en ce qui concerne les pays du tiers-monde.

### **11. Discussion**

Le suivi de quelques paramètres physico chimiques des eaux prélevées des différents sites d'échantillonnage le long d'oued Saf-Saf, nous a permis de visualiser une dégradation relative spatiale de la qualité de ces eaux en aval qu'en amont ; avec une augmentation de la DBO<sub>5</sub>.

La qualité des eaux de l'oued Saf-Saf dans sa partie amont est considérée comme bonne ; du fait que la DCO et la DBO<sub>5</sub> sont conformes aux normes des eaux industrielles et naturelles, sauf pour les valeurs de la DBO<sub>5</sub> des points de prélèvement Saf1 près du poste 3 de sonatrach et Saf2 à proximité de Hamadi Krouma. Le même résultat a été signalé par Mezedjeri (2008), et Mecibah (2008), qui confirment tout deux que Oued Saf-saf est un cours d'eau relativement non contaminé.

En aval, l'oued Saf-Saf a connu une dégradation à cause des rejets de la plate forme industriels. Les DBO<sub>5</sub> et DCO du point de prélèvement raffinerie sont de l'ordre de 100 mg/l et 190 mg/l, révélant ainsi une pollution organique.

Les résultats des analyses physico-chimiques obtenus à partir des eaux prélevées montrent une bonne concordance avec ceux que fournissent Mohamed Ben Ali (2014) et Khelfaoui (2010) ; sur la qualité des eaux rejetées par le complexe de la raffinerie de Skikda (RAF/K). Les auteurs signalent que les eaux rejetées la plus part du temps sont chaudes, neutre à alcalin, avec une minéralisation importante.

Selon Mohamed Ben Ali (2014) ; les eaux rejetées par le complexe de la raffinerie de Skikda (RAF/K), ne sont pas conformes aux normes, et sont toxiques or ces eaux résiduelles rejetées dans le milieu récepteur (oueds, mer) entraînent sa pollution, voire son eutrophisation.

L'extension de la pollution est liée à des facteurs climatiques, en l'occurrence, la pluviométrie. Selon Saihi, 2005, elle joue un rôle prépondérant dans les processus chimiques, tels que le lessivage, le transport et la diffusion des polluants gazeux et particulaires. Notons aussi que les différents rejets sporadiques influent considérablement sur les variations spatio-temporelles des concentrations en polluants.

Nous tenons à signaler que la concentration des ions sulfates ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) est très variable dans les eaux de prélèvements. Cependant plus on s'éloigne de l'enceinte pétrochimique vers l'amont de l'oued Saf-Saf, plus le taux de sulfates diminue progressivement du fait que les eaux de l'oued sont soumises constamment aux déchets industriels. Par ailleurs, les concentrations des chlorures diminuent progressivement en s'approchant vers l'amont de l'oued Saf-Saf; ceci pourrait être lié également aux sources anthropiques (industrialisation)

Pour ce qui est des hydrocarbures dissous, considérés comme index particulièrement fiable dans l'évaluation de la pollution pétrolière, ils ont tendance à diminuer en s'éloignant de l'enceinte pétrochimique. Le point de prélèvement au niveau de Saf1 est le seul point de déversement des effluents pollués dans les eaux de l'oued, ce qui explique sa charge en hydrocarbures dissous (4,6mg/l). Cette valeur dépasse de loin la valeur préconisée par l'OMS.

Le point de prélèvement Saf1 appartient aux points les plus contaminées de l'oued, recevant à la fois des rejets urbains et des rejets industriels variés provenant de la plate forme pétrochimique (Rouidi, 2014). Les travaux réalisés par Khelfaoui (2010), signalaient déjà que la qualité des eaux de l'oued Saf-Saf dans sa partie amont est considérée bonne, par contre dans sa partie aval, elle est passée de bonne à mauvaise, parfois très mauvaise en période sèche.

A titre comparatif, les concentrations en hydrocarbures dans les eaux étudiées sont nettement supérieures à celles rencontrées lors des travaux de Kabzinski et *al.*(2002) du Lac Sulejow en Pologne (22 ng/l - 13832 ng/l), Olivella(2006), du Lac Superieur aux USA (5,8ng/l), Mitra et Bianchi (2003), de la rivière Mississippi aux USA (7 - 70 ng/l), Fernandes et *al.* (1997), de la rivière Seine en France (4 - 26 ng/l).

Toute substance qui contamine le milieu naturel peut être concentrée par les êtres vivants grâce aux échanges permanents avec le milieu extérieur et aux divers processus métaboliques. Cette concentration se fait selon un niveau variable suivant le maillon de la chaîne trophique considéré et qui subit les effets à long terme. La présence d'animaux laitiers exposés aux hydrocarbures via les matrices environnementales contaminées est en effet un point d'entrée de polluant dans la chaîne alimentaire (Crépineau et *al.*, 2003), du fait que les produits laitiers occupent une place majeure et croissante dans la consommation.

Peu de données existent sur les concentrations des HAP dans le lait. Grova et *al.* (2000) relatent des concentrations pour la somme de 8 HAP de l'ordre de 36 ng/g de matière grasse

dans du lait de ferme située dans une zone rurale et 27 ng/g MG dans des laits prélevés en zone urbaine ; avec la prépondérance du phénanthrène et du pyrène.

A partir de nos résultats, on peut déduire une importante concentration des hydrocarbures dans l'urine, suivi par une teneur moindre dans le lait et l'eau d'abreuvement, sachant que la ferme se situe non loin de la plate forme pétrochimique, source de la pollution hydrocarbonée. Grova et *al.* (2005) ont mis en évidence, un transfert d'hydroxymétabolites d'HAP, et plus précisément du phénanthrène vers le lait en quantité plus faibles que dans l'urine.

Nos résultats sont en accord avec les résultats antérieurs de détection des hydrocarbures dans le lait collecté en été (Grova et *al.*, 2000) à une distance proche de la source polluante (Bryselbout et *al.*, 2000). La concentration en hydrocarbures dans nos échantillons est largement supérieure aux normes européennes préconisées pour l'eau (0,1µg/l). En effet, après absorption dans le corps, les hydrocarbures sont soit distribués dans les tissus (foie et les reins) (Husain, 1997 *In* Grova et *al.*, 2002) ou accumulés dans le tissu adipeux (Withey, 1991 *In* Grova et *al.*, 2002) et peut être excrétée dans le lait (Grova et *al.*, 2000). En outre, les HAP sont en grande partie excrétés dans l'urine sous forme de métabolites hydroxylés (Viao, 1995 *In* Grova et *al.*, 2002) .

## 12. Conclusion

L'évaluation de la qualité des eaux de oued Saf-Saf de la région de Skikda, notamment par des analyses physico chimiques (température, pH, conductivité...) et organique (hydrocarbures totaux) ; nous a permis d'établir un diagnostic préliminaire de l'état de santé de l'écosystème en question.

Cette partie de notre travail, a permis de visualiser une altération et une dégradation spatiale de la qualité des eaux de l'oued, avec une augmentation des concentrations des éléments chimiques de l'amont vers l'aval.

Les résultats ainsi obtenus, ont mis en évidence des concentrations élevées de polluants, dépassant de loin les valeurs limites fixées par la réglementation algérienne et mondiale. Il s'agit des points de prélèvement représentant la Raf et la RTE ( complexe de transport des hydrocarbures par canalisation); situés à l'intérieur de l'enceinte pétrochimique.

Le point Saf1 situé d'environ 300 m du poste N°3 de sonatrach, point de relais de différents rejets, est confronté à une pollution organique, ; sa DBO<sub>5</sub> et son taux d'hydrocarbures totaux sont élevés et ont atteint respectivement 70 mg/l et 100mg/l.

En ce qui concerne les points de prélèvement représentant respectivement les eaux d'oued Saf Saf du coté de Hamadi Krouma (Saf2), eaux du puit1 à El Hadaik et eaux du puit2 à Béni Béchir, leurs valeurs sont en-dessous de la valeur limite fixée dans le (JORA, 2009), les qualifiants ainsi de bonne qualité. Le site témoin, situé à oued Guebli ; est quasi dépourvu d'hydrocarbures.

En général, le diagnostic de l'état de la qualité des eaux de l'oued Saf-Saf se présente assez bonne sur une bonne partie de son parcours (amont), à l'exception du tronçon situé en aval des rejets industriels, qui dégradent de façon notable la qualité des eaux.

Malgré l'importance indéniable des aspects quantitatifs, les questions de qualité de l'eau sont au cœur des enjeux futurs de la gestion des ressources hydriques de oued Saf-Saf, qui se trouvent donc menacées dans leur qualité, sous l'effet des pollutions qu'elles subissent, principalement des pratiques industrielles. Il s'agit donc d'un problème à grande échelle, dont l'extension est constante.

Le lait est une denrée fragile et sa consommation augmente régulièrement. La problématique de sécurité des aliments nous amène à étudier particulièrement le transfert dans le lait dont les formes de consommation multiples et les quantités absorbées quotidiennement en font un vecteur majoritaire d'exposition de polluants chez l'être humain. Pourtant aucune réglementation ne prévoit de concentrations maximales en hydrocarbures dans les denrées alimentaires et aucune limite n'est imposée dans les produits de grande consommation. L'enjeu global est d'assurer une qualité sanitaire des aliments par des normes réglementées.



**CHAPITRE. III.  
ETUDE DE LA  
MICROFLORE  
DES EAUX**

## **CHAPITRE. III. ETUDE DE LA MICROFLORE DES EAUX**

### **1. Introduction**

Les eaux abritent une grande diversité biologique notamment des bactéries, des champignons microscopiques, des algues et des protozoaires. Dans un seul millilitre d'eau douce, peuvent se développer de 1 à 10 millions de micro-organismes (Amblard, 2001). Ce sont des acteurs clés du fonctionnement de la biosphère, notamment dans les flux de matière et d'énergie au sein des écosystèmes (Pomeroy, 1974). Les processus microbiens opèrent de nos jours, et notre société en dépend pour assurer qualité de l'eau, nourriture et santé (Allison et Martin, 2008).

Les communautés microbiennes sont reconnues pour être contrôlées par des facteurs abiotiques tels que les nutriments et le carbone qui servent de ressources pour leur métabolisme énergétique (Schmidt, 2006). Ce sont les agents catalytiques centraux des grands cycles (carbone, azote, soufre, oxygène, phosphore et des métaux de transition). Ces processus biogéochimiques sont liés à la grande diversité taxonomique (génétique) et fonctionnelle (phénotypique) des microorganismes et à leur formidable flexibilité métabolique qui leur permet de tolérer et de s'adapter rapidement aux changements de conditions (Guerrero et Berlanga, 2006). Ces métabolismes sont versatiles et flexibles et permettent aux microorganismes de transformer des molécules d'origine anthropique ou encore des nutriments peu biodisponibles ou toxiques (Schmidt, 2006). La boucle microbienne a intégré le rôle clé de reminéralisation de la matière organique par les microorganismes.

Les produits pétroliers et leurs dérivés constituent les principaux polluants organiques des sols et des eaux souterraines (Solano-Serena, 2001). Cependant les polluants déversés dans un environnement, subissent une série de transformations physiques, chimiques et microbiologiques aboutissant à plus ou moins long terme à leur disparition totale ou partielle. Les transformations microbiologiques ou biodégradation sont à elles seules à l'origine de la disparition de la majeure partie d'un polluant donné déversé dans un environnement.

Une communauté bactérienne très diversifiée sera plus à même de faire face à une perturbation du milieu et reviendra plus rapidement à son état d'origine qu'une communauté moins diversifiée (Atlas et *al.*, 1991; Girvan et *al.*, 2005). En effet, de nombreuses études ont montré que les modifications de la biodiversité pouvaient affecter le fonctionnement global des écosystèmes aquatiques et terrestres (Kinzig et *al.*, 2002).

Les microorganismes sont les compagnons omniprésents de notre vie et de notre environnement immédiat. Leur activité est extraordinaire, permanente et fondamentale. Nous la devinons parfois, nous la favorisant empiriquement, nous l'entravons ou nous la subissons. Les microorganismes répondent naturellement aux variations de leur environnement (physico chimique, biologique) en mettant en place des mécanismes d'acclimatation physiologiques afin de survivre et de maintenir un certain niveau d'activité face à ces modifications. Les bactéries aérobies sont considérées comme des acteurs majeurs de la dépollution de l'environnement.

## **2. Les champignons microscopiques**

Les champignons sont un règne du vivant regroupant 99000 espèces en une dizaine de phylums, et dont la classification est régulièrement revue (James et *al.*, 2006 ; Hibbet et *al.*, 2007 ; McLaughlin et *al.*, 2009 ; Blackwell, 2011). Ce sont des organismes aérobies, ubiquistes, retrouvés dans tous les écosystèmes et dotés d'activités biologiques bénéfiques (Bills et Polishook, 1991; Hawksworth, 2004 ; Musavi et Balakrishnan, 2014).

On estime que les champignons représentent le deuxième règne le plus riche en espèces de la biosphère après les insectes (Cordier, 2012). Leur développement est dépendant de l'environnement. Le facteur environnemental le plus important est l'humidité relative (HR) qui est elle-même fonction de l'activité de l'eau, c'est-à-dire la disponibilité en eau d'un substrat. La majorité des moisissures se développent pour une activité de l'eau comprise entre 0,85 et 0,99 (Pitt et Hacking 1997). Les exigences thermiques pour le développement des moisissures diffèrent d'une moisissure à l'autre. Il existe des mésophiles, des thermophiles, des thermotolérantes ou des psychrophiles. Enfin, le pH peut avoir une influence sur leur croissance et développement. Elles peuvent se développer avec un pH compris entre 4,5 et 8, bien que le pH optimum soit compris entre 5,5 et 7,5.

### **6.1. Classification des mycomycètes**

La classification actuelle du règne des champignons s'appuie sur des critères morphologiques et sur le mode de reproduction. Elle est pratique, mais insatisfaisante (Cordier, 2012). Parmi les phylums les plus importants, on retrouve les Chytridiomycota, les Zygomycota, les Gloméromycota, les Basidiomycota et les Ascomycota.

Les Chytridiomycota regroupent les espèces produisant des spores uniflagellées (zoospores), témoignant d'une vie majoritairement aquatique, et constituent la lignée évolutive la plus ancienne des champignons (James et *al.*, 2006). Ce groupe comprend 4

ordres, 13 familles, 99 genres et près de 686 espèces (Kirk et *al.*, 2008). Le groupe des Zygomycota est plus récent, il regroupe de nombreux saprotrophes et parasites d'insectes. Les Gloméromycota regroupent des champignons symbiotiques et biotrophes stricts de plantes, qui forment des mycorhizes à arbuscules. Les Ascomycota, le plus grand groupe de champignons microscopiques, comprenant 15 classes, 68 ordres, 327 familles et environ 64163 espèces (Kirk et *al.*, 2008), regroupe les champignons à lichens, de nombreux pathogènes des plantes et des levures utiles pour l'homme (*Saccharomyces cerevisiae*). Les Basidiomycota regroupent la majorité des champignons mycorhiziens à carpophores, mais aussi des parasites des plantes et des levures. Ce phylum est représenté en 31515 espèces rangées dans 1589 genres, 177 familles, 52 ordres et 16 classes (Lee et *al.*, 2012).

Les phylogénies moléculaires des champignons sont régulièrement remises en question suite à la découverte de nouvelles espèces, l'intégration de séquences environnementales et les avancées dans les méthodes de reconstruction phylogénétique. Ainsi, les Cryptomycota ont récemment été ajoutés à la classification (Jones et *al.*, 2011).

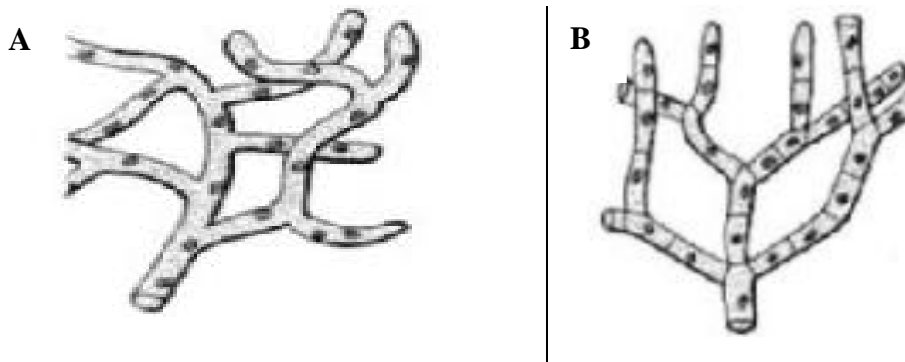
## **6.2. Caractéristiques morphologiques et reproduction**

D'un point de vue structural, on trouve une grande variété de champignons. Ils sont classés en deux grandes catégories : la forme levure unicellulaire et la forme mycélienne pluricellulaire constituée d'hyphes (Redecker, 2002). Certaines espèces ont la capacité d'adopter les deux formes, levure et mycélienne, tandis que d'autres sont restreintes à l'une ou l'autre (Jennings et Lysek, 1996).

Les champignons filamenteux sont composés d'un appareil végétatif appelé thalle. Il est composé de filaments ou hyphes enchevêtrés les uns par rapport aux autres, et l'ensemble des hyphes constitue un réseau appelé mycélium. Les hyphes sont diffus, tubulaires et fins avec un diamètre compris entre 2 et 15  $\mu\text{m}$  et sont plus ou moins ramifiés. Chez certaines moisissures, comme par exemple *Mucor*, les cellules ne sont pas séparées par une cloison transversale, le thalle est alors dit coenocytique ou « siphonné » alors que chez d'autres, comme par exemple *Aspergillus*, le thalle est cloisonné ou « septé » (Fig.24). Les cloisons, appelées septa possèdent des perforations assurant la communication entre les cellules. Les caractéristiques morphologiques de ces microorganismes sont liées à leur substrat nutritif. La colonisation du substrat est réalisée par extension et ramification des hyphes. Cette forme mycélienne assure donc une surface maximale de contact et permet une exploration et une



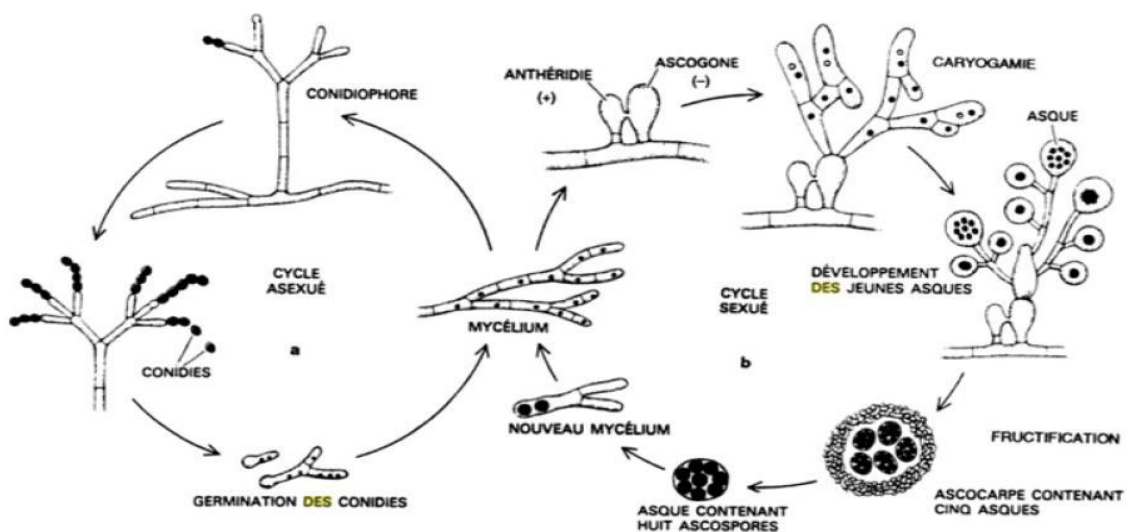
recherche de l'eau et des nutriments dans les trois dimensions (Carlile et Watkinson, 1994 ; Jennings et Lysek, 1996).



**Figure.24.** Structure de l'hyphe. (A) hyphe coenocytique, (B) hyphe cloisonné.

Les modalités de la reproduction chez les champignons présentent une très grande variabilité. Leur cycle de vie comprend deux types de reproduction (Fig.25.) :

- ⇒ une reproduction asexuée (multiplication végétative), au cours de laquelle une spore ou un fragment de mycélium croît et se développe sur un substrat;
- ⇒ la reproduction sexuée, implique la rencontre de deux mycéliums de signes sexuels opposés. Un mycélium haploïde va rencontrer un autre mycélium à polarité complémentaire pour donner lieu à la fusion des cytoplasmes, ce qui engendre un nouveau mycélium diploïde. Les cycles de vie diffèrent d'un champignon à un autre selon leur type de spores.



**Figure.25.** Schématisation de la reproduction d'un champignon filamenteux.

### **6.3. Rôle écologique des champignons filamenteux**

Le développement des moisissures est dépendant de facteurs nutritifs et environnementaux. Les champignons filamenteux étant cosmopolites et hétérotrophes, ils présentent différents types d'habitat au sein desquels ils vont établir des interactions différentes avec leur environnement et il existe donc différents modes de nutrition des champignons filamenteux. Les éléments nutritifs les plus importants sont le carbone et l'azote comme composés organiques, les ions minéraux comme le potassium, le phosphore, le magnésium, le fer ou le soufre. Les acides aminés peuvent pénétrer dans la cellule sans transformation, alors que des molécules complexes comme l'amidon, la cellulose ou les protéines nécessitent une digestion enzymatique préalable. Cette digestion s'effectue par production d'enzymes ou d'acides par les moisissures, permettant ainsi une altération du substrat.

Les champignons filamenteux sont hétérotrophes, et plus particulièrement absorbotrophes. Ils jouent un rôle très important dans le cycle du carbone par le recyclage des matières organiques, comme les débris végétaux et animaux, en puisant leur énergie à partir de ces sources carbonées externes. Les mycètes aquatiques et aéroaquatiques contribuent aussi à l'autoépuration des masses d'eau. Ils vivent donc en saprophytes, parfois en symbiotiques mais aussi en parasites.

En association avec les bactéries, les champignons interviennent dans la dégradation de la matière organique allochtone telle que la litière, parfois présente en grande quantité dans certains milieux aquatiques d'eau douce (Suberkropp et Weyers, 1996). Les champignons de pourriture blanche sont ceux qui ont le plus d'intérêt pour leur pouvoir de dégradation des polymères de haut poids moléculaire tels que la lignine, la cellulose et l'hémicelluloses (Abdullah et Taj-Aldeen, 1989 ; Pusch *et al.*, 1998 ; Sigeo, 2005). Cette propriété est basée sur la capacité à produire des enzymes extracellulaires, capables également de dégrader une série de micro-polluants (Shah *et al.*, 2002; Wesenberg *et al.*, 2003). Les enzymes les plus importantes sont la laccase (Lac), la manganèse peroxydase (MnP) et la lignine peroxydase (LiP) (Wesenberg *et al.*, 2003). Les champignons saprophytes dominant quantitativement les assemblages microbiens (Badly *et al.*, 1995 ; Gulis et Suberkropp, 2003), et ils sont impliqués dans les premiers stades de la décomposition de la biomasse foliaire. En formant des substrats de plus grande surface et en libérant des substances labiles, ils permettent aux bactéries de coloniser efficacement ces substrats. Les interactions entre les bactéries et les champignons

dans les processus de transformation de la litière restent peu connus (Mille-Lindblom et Tranvik, 2003).

Les associations symbiotiques entre champignons et végétaux supérieurs (mycorhize) constituent la forme de symbiose la plus répandue à l'échelle planétaire (Jennings et Lysek, 1996). On estime que 90% des végétaux contractent spontanément cette association (Smith et Read, 1997). Les champignons vont développer un réseau de filaments mycéliens à partir de la racine et vont être impliqués dans la nutrition minérale des plantes. C'est d'ailleurs une association symbiotique qui aurait permis aux plantes de coloniser le milieu terrestre (Simon et *al.*, 1993). Outre leur capacité à augmenter l'exploration du milieu extérieur, les champignons vont également contribuer à la phytoprotection par élicitation des mécanismes de défense (Smith et Read, 1997), et produire des substances antibiotiques permettant de lutter contre d'autres microorganismes pathogènes à la plante. La contrepartie de l'association est que le champignon va recevoir de la plante des photosynthétats.

Des recherches indiquent que plusieurs champignons microscopiques peuvent conférer aux plantes hôtes une tolérance à divers stress biotiques et abiotiques tels : la sécheresse, la chaleur, les herbivores et les attaques de pathogènes (Rodriguez et *al.*, 2008).

Le développement des moisissures est dépendant des facteurs biotiques et abiotiques des milieux aquatiques qu'ils colonisent. Il s'agit de trophie (Duarte et *al.*, 2009), de variations saisonnières (Webster, 1977 ; Mer et *al.*, 1981) ou même d'interactions durables. Viennent ensuite les exigences en température, pH, pression, salinité, gaz et minéraux dissous dans l'eau, présence de métaux, dont le fer, ...etc (Mazurkiewicz-Zapałowicz et *al.*, 2012).

Coulibaly et *al.*, (2003) ont montré que les champignons avaient de nombreuses potentialités pour la dégradation de nombreux polluants organiques et inorganiques (Gao et *al.*, 2010). En biotechnologie ils ont attiré l'attention sur leur capacité à éliminer/oxyder des micropolluants présents dans les eaux usées. L'adaptation d'un microorganisme au polluant l'incite à développer la machinerie enzymatique nécessaire à la dégradation dudit polluant (Grady, 1985; Arai et *al.*, 1998 ; Labreque, 2003). Ce sont des espèces bioindicatrices de pollution (Terekhova, 2007).

Une grande diversité de bactéries et champignons peut dégrader les polluants organiques (biodégradation), dont les hydrocarbures et leurs produits de dégradation. Ces derniers deviennent de nouvelles sources de carbone: les microorganismes s'en nourrissent et les transforment en eau et en CO<sub>2</sub> (Pelmont, 2005). Cependant, tous les composés organiques

ne seront pas dégradés de la même façon. Plus la biodiversité des microorganismes est gigantesque, plus énorme sera le nombre d'activité biocatalytiques.

#### **6.4. Stratégies adaptatives des champignons aquatiques**

Les champignons aquatiques ou champignons amphibies forment l'hydromycoflore. Ce sont des organismes capables d'effectuer tout leur cycle de développement sous l'eau, ou à l'intérieur ou extérieur d'organismes aquatiques vivants qu'ils parasitent. Ils constituent une part significative de la mycobiodiversité qui a elle-même été longtemps ignorée puis sous-estimée (Schmit et Mueller, 2007 ; Shearer et *al.*, 2007).

Les moisissures montrent une grande faculté d'adaptation, tant pour les conditions de croissance que pour les nutriments utilisés. Elles peuvent envahir tous les supports disponibles grâce à une dissémination efficace et un riche arsenal moléculaire. Ils peuvent développer des surfaces de contacts très importantes par simple prolifération des hyphes et production d'exoenzymes. Cette forme est adaptée à l'exploration de grands volumes de substrat (Le Tacon et Selosse, 1997). Les hyphes fongiques ont la capacité d'excréter dans le milieu extérieur des quantités importantes de protons qui ont la propriété de désorganiser les réseaux cristallins (Lapeyrie et *al.*, 1991). Les éléments minéraux sont ainsi libérés de ces réseaux et passent de la forme insoluble à la forme soluble.

Les Chytridiomycota regroupent des espèces fongiques produisant des spores uniflagellées (zoospores) grâce auxquelles, ils ont la faculté de nager (Carlile et Watkinson, 1994) et témoignent d'une vie majoritairement aquatique (James et *al.*, 2006).

Les champignons sont donc caractérisés par une bonne adaptation au milieu aquatique, en particulier une dispersion extrêmement efficace sous la forme de spores asexuées. Ils libèrent ainsi jusqu'à plusieurs dizaines de milliers de propagules (conidiospores) par litre d'eau de rivière (Bärlocher, 1992), elles-mêmes remarquablement bien adaptées au milieu aquatique (Webster et Davey 1984), avec souvent une forme tétra radiée, comme une molécule de méthane CH<sub>4</sub> ou filiforme, en lune ou « S ».

La diversité des formes des spores des hyphomycètes aquatiques influe sur leur efficacité d'attachement aux substrats foliaires. La morphologie des spores et la structure de la surface de la feuille ont eu une influence significative sur l'établissement des communautés fongiques, avec en particulier une efficacité d'attachement supérieure des spores tétraédriques sur les spores compactes.

Les biologistes ont été surpris de découvrir que les conidies de certaines espèces produisent un mucilage abondant. Celui-ci pourrait jouer un rôle important dans l'adhésion de la conidie à un substrat lisse ou exposé au courant (Barron, 1980). Ce mucilage pourrait aussi protéger certaines espèces marines du sel, ou dans les eaux vives être un moyen de protéger des enzymes sécrétés par les champignons le temps qu'ils attaquent le substrat-cible, alors que sans ce mucilage, ces enzymes seraient dissous ou emportés par l'eau courante environnante (Bärlocher, 2012).

Certaines espèces (parfois pathogènes comme *Sporothrixglobosa*) sont trouvées sur presque toute la planète (Madrid et al., 2009), et leur relative homogénéité génétique montre des contacts et des échanges génétiques réguliers et intenses entre les différentes populations géographiques du monde. Ceci démontre que ces espèces ont développé d'excellentes capacités de dispersion mais aussi d'adaptation à différents hôtes et habitats.

## **7. Les bactéries**

Le monde bactérien, c'est une diversité infinie de formes et de couleurs. En bâtonnets ou arrondies, spiralées ou de structure non définies, les bactéries peuvent produire différents pigments leur conférant une grande variété de couleurs.

Les bactéries sont ubiquitaires et sont présentes dans tous les types de biotopes rencontrés sur terre. Elles peuvent être isolées du sol, des eaux douces, marines ou saumâtres, de l'air, des profondeurs océaniques et des déchets radioactifs (Fredrickson et al., 2004). Elles sont omniprésentes dans l'environnement naturel de l'homme (eau, sol, surfaces diverses), sur l'homme lui-même (peau, tube digestif) et sur tous les êtres vivants (plantes et animaux), dont elles tirent alimentation. En effet, neuf bactéries sur dix sont ou totalement inoffensives, ou très utiles pour l'homme (Allouche, 2005).

Du fait de leur taille microscopique, il est apparu rapidement que les bactéries étaient non seulement particulièrement abondantes dans les eaux mais également quelles étaient capables de coloniser tous les biotopes aquatiques, de la microcouche de surface, aux fonds abyssaux, des zones polaires aux tropiques, s'adaptant à chaque fois aux contraintes environnementales, laissant supposer une grande diversité génétique et métabolique chez les bactéries (Woese et al., 1977).

Les bactéries peuvent être très utiles à l'humain lors des processus de traitement des eaux usées, dans l'agroalimentaire lors de la fabrication des yaourts ou du fromage et dans la production industrielle de nombreux composés chimiques (Ishige et al., 2005).

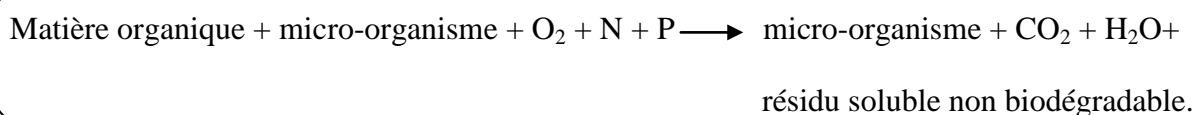
La mise en évidence du rôle des bactéries dans les plans d'eaux et sa conceptualisation, qui leur accorde une place clef au sein de la boucle microbienne, souligne l'importance de ces organismes dans les principaux cycles biogéochimiques, notamment les bactéries autotrophes. Bien que suggérée dès 1967 (Wauthy et *al.*, 1967, Jeffrey, 1976), l'importance des bactéries photoautotrophes n'a commencé à être véritablement reconnue qu'après la découverte de *Synechococcus*, une cyanobactérie coccoïde mise en évidence à l'aide de la microscopie à épifluorescence (Waterbury et *al.*, 1979) ; dont l'abondance moyenne varie autour de  $10^3$  à  $10^4$  cellules/ml d'eau (Not, 2004).

Les bactéries hétérotrophes quant à elles, dominent les milieux hydriques en termes d'abondance, de diversité et d'activité métabolique (Azam et Malfatti, 2007). Elles sont les acteurs centraux des processus de minéralisation de la matière organique dissoute, et de sa transformation en biomasse utilisable par les maillons supérieurs de la chaîne trophique. La respiration des composés organiques est un processus majoritairement microbien (Pomeroy et Johannes 1968, Pomeroy 1974). Les bactéries hétérotrophes sont les seuls consommateurs de carbone organique dissous (à l'exception de quelques Flagellés). Proies principales des protistes bactéricivores, les bactéries sont un maillon essentiel des transferts de carbone dans la boucle microbienne (Sherr et Sherr 1994).

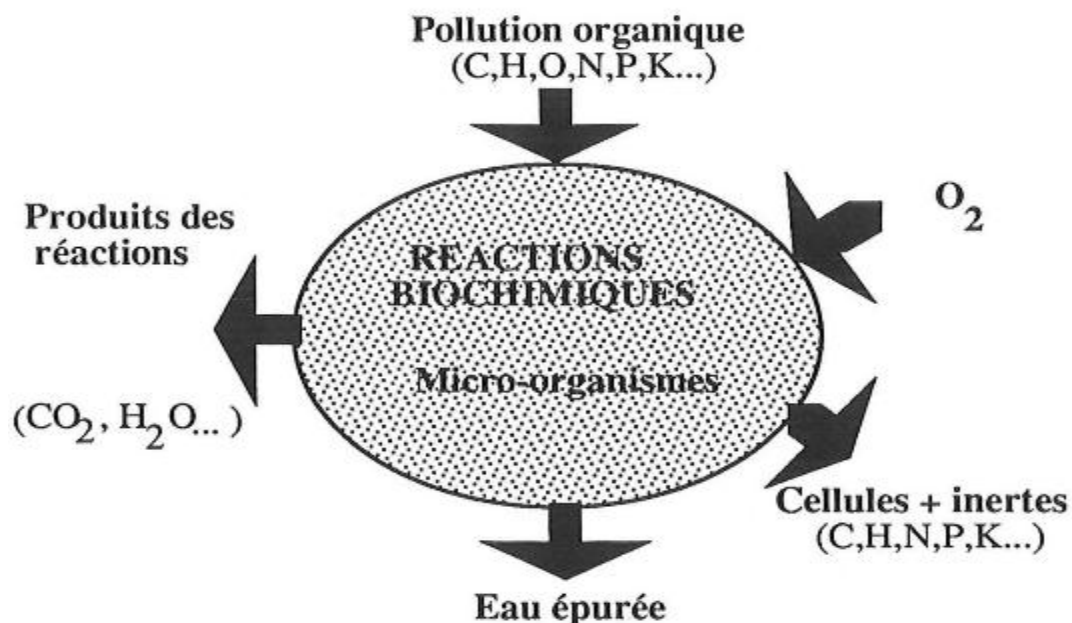
Selon Filloux et Vallet (2003), les bactéries du milieu aquatique, préfèrent une convenance de vie où la population est ancrée sur un support fixe, communément appelé état sessile, au lieu de l'état planctonique ; et développent une communauté organisée dite biofilm. Cinq étapes majeures ont lieu pour aboutir à la formation des biofilms (Watnick et Kolter, 2000). Premièrement, les bactéries prennent connaissance des facteurs environnementaux (osmolarité, pH, température, apport de fer,...), ce qui cause le rapprochement à une surface qui résulte à un ralentissement de leur mobilité (Davey et O'Toole, 2000). Normalement dans les milieux aqueux nutritifs, les bactéries vont s'attacher à n'importe quelle surface environnante et dans des milieux dépourvus de nutriments, les bactéries vont plutôt s'attacher à une surface nutritive (Watnick et Kolter, 2000). Par la suite, les bactéries forment une association transitoire avec la surface ou avec d'autres bactéries occupant la surface. Cette association permet à la nouvelle bactérie de se trouver un endroit idéal pour se loger. Enfin, les biofilms sont construits en formes de 3D par la colonisation des milieux environnants. A la suite de la formation des biofilms, les microcolonies sont séparées par des canaux aqueux formant un labyrinthe de circulation afin de permettre l'acheminement

d'oxygène et des nutriments dans les régions dormantes du biofilm et d'autres corridors servent à l'évacuation des déchets.

L'utilisation de la matière organique et inorganique par les communautés de bactéries leur confère la tâche la plus importante qui est l'autoépuration des eaux (Fig.26.). Son principe est de provoquer une prolifération de micro-organismes aux dépens des matières organiques apportées par l'effluent, en présence ou non d'oxygène. Il s'agit en fait d'un véritable transfert d'une forme non préhensible (matières colloïdales et dissoutes) en un élément manipulable (suspension de microorganismes). Le résultat de cette dégradation est un accroissement de la masse épuratrice, et le rejet de déchets dans l'eau, selon l'équation suivante :



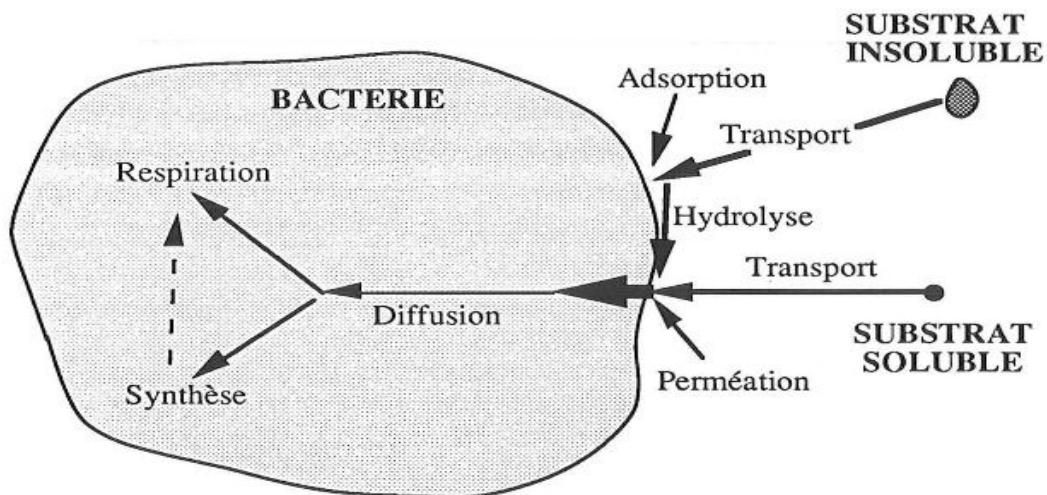
Selon que l'oxydation se produit grâce au gaz oxygène dissous dans l'eau (processus aérobie) ou qu'au contraire le processus se fasse sans oxygène (processus anaérobie), la nature des déchets sera différente :  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3$  ou  $\text{NO}_3$  en aérobie ;  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$  et acides gras en anaérobie.



**Figure.26.** Epuration biologique aérobie (Brouzes, 1973)

Les bactéries restent cependant les micro-organismes les plus impliqués dans le processus de biodégradation. Ce dernier peut être décomposé en plusieurs phases (fig.27.).

- ❖ Une phase de transport qui amène les polluants (solubles et insolubles) du sein du liquide vers la surface de la bactérie.
- ❖ Une phase de diffusion au cours de laquelle le substrat soluble diffuse facilement à travers la membrane, alors que les matières insolubles (particules, colloïdes et grosses molécules) sont d'abord adsorbées à la surface de la bactérie, puis hydrolysées par des exoenzymes, avant d'être à leurs tours assimilées.
- ❖ Enfin la phase de métabolisation des polluants qui s'effectue au sein de la cellule. Cette étape, beaucoup plus lente que les précédentes, se divise en trois parties:
  - ♣ l'assimilation (ou anabolisme) qui est l'utilisation des matières polluantes pour la synthèse de nouvelles cellules
  - ♣ la respiration (ou catabolisme) qui permet la combustion des substrats afin de libérer l'énergie nécessaire aux micro-organismes pour assumer leurs fonctions vitales
  - ♣ la respiration endogène où les micro-organismes utilisent leur propre matière en guise de substrat.



**Figure.27.** Schéma du principe de la nutrition bactérienne (Edeline, 1988).

En général, les bactéries dépolluent leurs milieux par voie biologique usant divers enzymes catalyseurs. On distingue :

- Les enzymes extracellulaires qui provoquent la destruction des structures moléculaires trop complexes pour pénétrer au sein de la cellule ;
- Les enzymes intracellulaires qui assurent l'assimilation et, par conséquent, sont à l'origine des phénomènes vitaux provoquant la prolifération des cellules.



Les traitements biologiques sont bien adaptés pour éliminer la pollution carbonée, mais également les pollutions azotées et phosphorées (Boeglin, 2010 ; Edeline, 1988).

### **7.1. Classification des bactéries**

Les bactéries peuvent être classées selon leurs caractères :

- biochimiques (classification en biotypes ou biovars) ;
- antigéniques (classification en sérotypes ou sérovars) ;
- pathogéniques (classification en pathotypes ou pathovars) ;
- enzymatiques (classification en zymotypes ou zymovars) ;
- de sensibilité aux antibiotiques (classification en antibiotypes) ;
- de sensibilité aux bactériophages (classification en lysotypes ou lysovars) ;
- moléculaires : identification de l'ADN par ribotypie, hybridation ADN-ADN, hybridation ADN-ARN, séquençage de l'ARN ribosomique, etc...

Les bactéries peuvent aussi être classées selon :

- la coloration de Gram (Gram positif, Gram négatif) ;
- la morphologie (bâtonnet, coque, spirale) ;
- la mobilité ;
- la capacité à sporuler ;
- la température de croissance ;
- les besoins nutritionnels ;
- le mode respiratoire ;
- la capacité de photosynthèse ;
- l'utilisation des différentes sources de carbone ou d'azote ;
- le G+C% du génome.

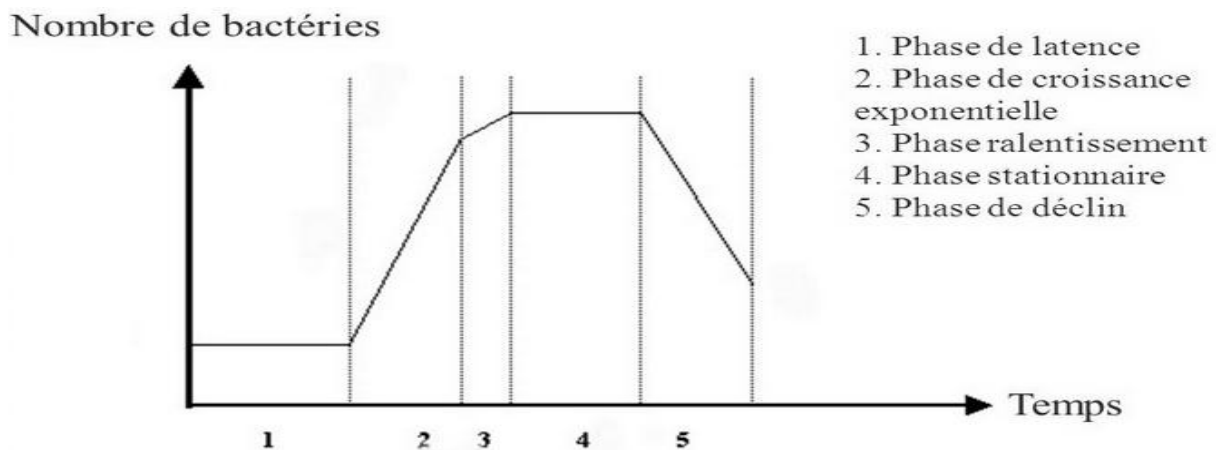
### **7.2. Evolution d'une culture bactérienne**

Chez les bactéries la croissance peut se traduire par une augmentation de volume des cellules, mais elle conduit principalement à une augmentation du nombre de cellules. L'état de repos est un état précaire qui nécessite l'absence de conditions létales et la présence d'un

minimum de substrats assimilables afin d'assurer le métabolisme de base de la cellule. Dans une population au repos, il existe toujours un taux de mortalité dont l'importance dépend des conditions ambiantes. Dans les conditions de conservation optimale (lyophilisation ou congélation à - 70 °C) le taux de mortalité est faible mais il n'est pas nul.

Après ensemencement, une culture bactérienne se développe jusqu'à épuisement du milieu nutritif si l'environnement est favorable (Degrémont, 1978). Si on suit l'évolution d'une culture bactérienne dans un milieu liquide, dont les constituants ne sont pas renouvelés, en fonction du temps ; la courbe de croissance suit une cinétique générale caractéristique de succession de plusieurs phases (Fig.28.):

- **Phase de latence ou d'acclimatation** des micro-organismes au milieu de culture;
- **Phase exponentielle de croissance** : cette phase est obtenue quand le taux de reproduction cellulaire atteint son maximum et reste constant ;
- **Phase de ralentissement** : elle correspond à l'épuisement du milieu de culture avec disparition de un ou plusieurs éléments nécessaires à la croissance bactérienne ;
- **Phase stationnaire** : la croissance s'arrête, même si les cellules conservent une certaine activité métabolique ;
- **Phase de décroissance**: pendant cette période les micro-organismes ne sont plus alimentés, une partie d'entre eux disparaît par auto-oxydation.



**Figure.28.** Courbe de croissance d'une population bactérienne dans un milieu confiné

### **7.3. Dynamique et fluctuation de la population bactérienne**

Les populations bactériennes aquatiques sont distribuées dans un environnement structuré à une échelle millimétrique. En moyenne, même si ces valeurs sont extrêmement

variables d'un environnement à l'autre, un millimètre cube d'eau de mer contient 10 000 virus, 1000 bactéries hétérotrophes, 100 *Prochlorococcus*, 10 *Synechococcus*, algues eucaryotes et protistes bactérivores (Azam et Malfatti, 2007). La proximité de ces organismes dans l'espace autorise l'existence d'interactions cellules-cellules : ces micro-organismes sont en compétition pour l'accès aux nutriments et à la matière organique dissoute. L'ensemble de ces facteurs influence la taille, l'activité, la structure et la diversité des populations bactériennes.

La photo-hétérotrophie bactérienne (capacité de combiner comme sources d'énergie la lumière et des molécules organiques) serait largement répandue dans les écosystèmes aquatiques (Kolber *et al.*, 2001). Enfin les adaptations récentes du réseau trophique microbien prennent en compte le compartiment viral, longtemps ignoré dans l'étude des transferts de matière en milieu marin (Wilhelm *et al.*, 1999).

Dans le réseau trophique microbien (boucle microbienne), les interactions entre les microorganismes sont plus complexes (Sherr et Sherr, 2009).

En fait, ils étaient appréhendés de façon simple, avant la découverte du rôle fonctionnel des micro-organismes, notamment hétérotrophes.

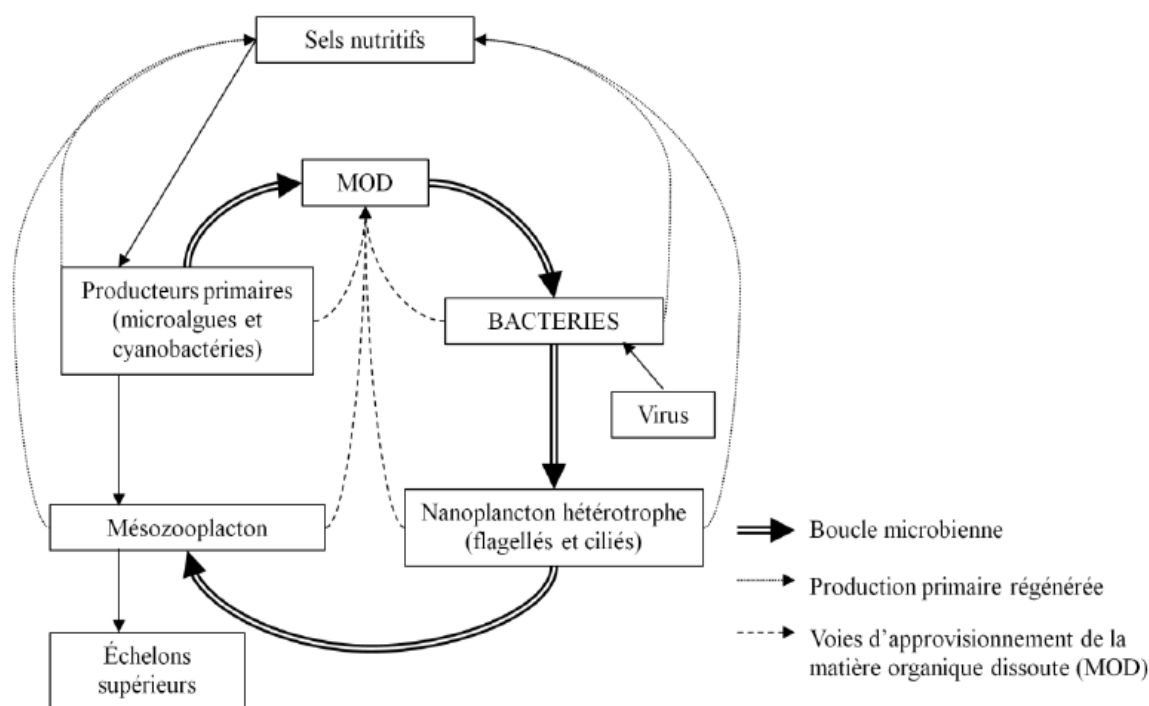
Des travaux ont permis de montrer que les flux d'énergies ne s'organisent pas seulement selon la voie trophique linéaire classique (la production de matière organique par le phytoplancton, sa consommation (broutage) par le zooplancton (métazoaire) et la prédation de celui-ci par les poissons) ; mais empruntent aussi la voie du réseau microbien formé de microorganismes de très petite taille (pico- et nanoplancton) (Carpenter, 1988) (Fig.29.). De ce fait, il est reconnu que les effets majeurs du fonctionnement de la boucle microbienne, est la régénération des éléments minéraux et la production de biomasse bactérienne (Ducklow et Carlson, 1992).

La structure de ce réseau microbien formant une boucle, dépend d'une part du type du milieu, et d'autre part, des forçages environnementaux qui s'exercent sur ces milieux.

La dynamique des populations bactériennes est dépendante d'une part, de facteurs abiotiques (température, salinité, disponibilité en matière organique, etc..). Ainsi une variation de température modifie l'importance de la production bactérienne (Kirchman, 2002). De telles variations au sein des communautés bactériennes ont aussi été montrées le long de gradients de salinité (Trousselier *et al.*, 2002). Une limitation de la croissance par le phosphate a été mise en évidence dans différents environnements aquatiques (Cotner *et al.*, 1997 ; Rivkin *et al.*, 1997). Les bactéries peuvent aussi être limitées par les concentrations en carbone

disponible dans l'eau, et en particulier par les teneurs en matière organique labile (Thingstad, 2002). La disponibilité, la quantité et la qualité de la matière organique dissoute influencent de façon importante les populations bactériennes (taille, activité, diversité) (Williams, 2002 ; Lamy, 2006).

De l'autre part, cette dynamique et fluctuation est régie par des relations positives ou négatives entre les différentes espèces. La prédation par les protistes bactéricivores, la lyse virale et la compétition constituent trois facteurs écologiques majeurs agissant sur la diversité des populations bactériennes (Fuhrman, 1999 ; Thingstad, 2002 ; Jürgens et Matz, 2002). Les bactéries hétérotrophes peuvent être en compétition avec le phytoplancton selon la concentration de la matière inorganique dissoute, notamment de l'azote inorganique dissous (Fouilland et *al.*, 2007).



**Figure.29.** Les réseaux trophiques microbiens dans les écosystèmes aquatiques (Bianchi et *al.*, 1988)

#### 7.4. Stratégies adaptatives des bactéries aquatiques

Les bactéries aquatiques vivent dans un environnement dilué par nature, où les ressources nutritives sont rares, les sources d'énergie et de nutriments souvent organisées en gradients. Elles sont contraintes d'ajuster leurs structures cellulaires et leurs fonctions

métaboliques pour répondre aux variations et aux contraintes de l'environnement (Dawes, 1985 ; Poindexter, 1987 ; Kovárová-Kovar et Egli, 1998).

Certaines espèces bactériennes ont développé des caractères de résistance aux stress du milieu (résistance aux antibiotiques, résistance au froid, ...etc). Citons le cas de la résistance aux Ultra violet (UV) chez certaines souches leur permettant de coloniser des niches écologiques très particulières, comme la microcouche de surface où ces radiations sont particulièrement intenses (Agogué, 2004 ; Agogué et *al.*, 2005).

D'autres, présentent des capacités de mobilité facilitant l'accès aux substrats (Grossart et Ploug, 2001). Cette mobilité peut s'exercer le long d'un gradient chimique que certaines espèces bactériennes sont capables de détecter (chimiotactisme), leur permettant d'atteindre des zones riches en substrats (Barbara et Mitchell, 2003). De même, les espèces bactériennes aquatiques ont développé des stratégies de défense en réponse à la pression de prédation. Par exemple, certaines bactéries sont capables de former des micro-colonies par la sécrétion de substances exopolymériques (Hahn et *al.*, 2004 ; Pernthaler et *al.*, 2004). La capacité à adopter une forme en filament est aussi interprétée comme une adaptation à la prédation.

Une autre forme d'adaptation, que les bactéries présentent, ce sont des exoenzymes particulières leur permettant de dégrader des molécules organiques complexes (Gonzales et *al.*, 1997, Andrady, 2011). Ainsi certaines souches isolées sont capables de dégrader des composés soufrés complexes (diméthylsulfonylpropionate) (Vilà et *al.*, 2004) et certains hydrocarbures (Margesin et Schinner, 1999 ; Yakimov et *al.*, 2007 ; Mahmoudi et *al.*, 2013 ; Sauret et *al.*, 2014).

La dégradation biologique est en majeure partie réalisée par les microorganismes, essentiellement des bactéries (Shah et *al.*, 2008). La dominance du monde bactérien peut ainsi être constatée en terme de durée, de diversité métabolique et génétique, d'ubiquité et enfin de biomasse. Qu'on le veuille ou non, nous vivons donc dans un monde bactérien...

## **8. Les techniques d'étude des microorganismes : de l'observation au MALDI-TOF (MatrixAssisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight)**

L'étude des microorganismes habitant les environnements naturels avait longtemps consisté en une approche culturale puis une caractérisation des isolats purs selon des critères définis par la taxonomie (Alain, 2003). Toutefois, les techniques d'analyse restent en

évolution permanente pour établir une classification stable et pallier les déficiences des voies classiques. La diversité des communautés microbiennes peut être estimée à différents niveaux de résolution selon les outils et les techniques utilisées.

Historiquement, une identification dépendait uniquement de tests conventionnels : aspect macroscopique et examen microscopique, conditions de culture et étude du métabolisme microbien grâce à des techniques biochimiques d'identification (Carbonnelle et *al.*, 1987).

L'apparition de milieux chromogènes a permis de révéler des activités enzymatiques spécifiques de genre ou d'espèce, se traduisant par la coloration des colonies (Perry et *al.*, 2003). Des galeries miniaturisées comportant différents tests pour permettre la standardisation de certains diagnostics d'espèces, sont à leur tour introduites (Butler et *al.*, 1975). Ces systèmes comparent le profil obtenu de la souche inconnue avec ceux de leur banque de données. Certains des automates commercialisés réalisent dans le même temps l'antibiogramme. Ces appareils sont très performants pour l'identification des entérobactéries mais certains tests traditionnels restent nécessaires, principalement pour l'identification des cocci à Gram positif (Gavin et *al.*, 2002).

Pour certaines espèces bactériennes, ont proposé des réactifs reposant sur un diagnostic immuno-bactériologique qui consiste en la caractérisation d'espèce au moyen d'anticorps spécifiques reconnaissant des épitopes de corps bactériens entiers (groupage de Lancefield pour les streptocoques, diagnostic des salmonelles ou des shigelles, recherche de l'antigène de *Clostridium difficile* (glutamate déshydrogénase: GDH), de *Mycobacterium tuberculosis* (Antigène MPT 64) (Hopprich et *al.*, 2012; Kawada et *al.*, 2011; Marcos et *al.*, 2003; Zheng et *al.*, 2004).

Les technologies d'identification de microorganismes reposant sur la biologie moléculaire sont apparues, telles que le séquençage de gènes (Clarridge, 2004; Petti et *al.*, 2005). Ce séquençage a remplacé l'hybridation ADN-ADN pour l'identification universelle des bactéries et champignons par l'ADN ribosomal 16S (ADNr 16S). L'amplification par PCR (Polymérase Chain Reaction), en est la méthode qui permet de dupliquer en grand nombre une séquence de l'ADNr 16S et de les analyser par comparaison avec ceux déposés dans les banques de données. L'émergence de la PCR a permis d'important progrès des techniques moléculaires. Les différentes méthodes proposées permettent d'étudier le polymorphisme génétique des différents champignons filamenteux et de les discriminer à différents niveaux taxonomiques par l'étude de l'ensemble du génome, d'un ou plusieurs

gènes ou d'un fragment d'ADN bien définis. Comme il s'est avéré par la suite que l'ADNr 16S ne permet pas l'identification précise de certains genres bactériens, comme les entérobactéries ou les streptocoques, dont les séquences de l'ADNr 16S sont très proches ; il est donc recommandé d'utiliser d'autres cibles plus spécifiques: par exemple la superoxydedismutase (SodA) pour les staphylocoques à coagulase négative (Poyart et *al.*, 2001), une région spécifique du gène de l'RN polymérase beta-sub unit (rpoB) pour les entérobactéries (Mollet et *al.*, 1997) ou pour les streptocoques (Drancourt et *al.*, 2004).

Plusieurs techniques sont par la suite appliquées : la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) est basée sur le polymorphisme de taille des fragments de restriction et a été utilisée pour la discrimination d'espèce d'*Aspergillus* (de Valk et *al.*, 2008), la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), basée sur le polymorphisme de l'ADN amplifié au hasard, a permis de mettre en évidence une différenciation des souches de *Penicillium roqueforti* (Geisen et *al.*, 2001), l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), qui est une combinaison de la PCR et de la RFLP, a permis de discriminer différentes espèces d'*Aspergillus* (Perrone et *al.*, 2006). Ces méthodes sont généralement assez coûteuses et longues à mettre en œuvre. De plus, certaines de ces méthodes présentent des limites dues au manque de sensibilité et de reproductibilité et à la nécessité d'une standardisation des protocoles, notamment lors de l'extraction de l'ADN.

L'apparition de kits miniaturisés de diagnostic par PCR en temps réel utilisés directement sur les prélèvements sans extraction d'ADN préalable ont permis de simplifier à l'extrême les différentes étapes de PCR, tout en gagnant 24 h par rapport à la culture, et rendant possible, pour certaines identifications ciblées et urgentes, leur utilisation dans les laboratoires de routine (Gaydos et *al.*, 2013 ; Wassenberg et *al.*, 2010).

Il existe aussi des systèmes d'identification, utilisés directement sur les colonies, basés sur l'utilisation de sondes nucléiques marquées (fragment d'ADN connu) sans PCR préalable, permettant de détecter une hybridation par mesure d'une réaction chimique ou enzymatique. Les techniques type FISH (fluorescence in situ hybridization), rapides et sensibles, sont onéreuses et encore très peu utilisées dans les laboratoires de routine (Almeida et *al.*, 2013; Forrest, 2007).

La spectrométrie de masse (MS : mass spectrometry), grâce à son pouvoir de résolution très élevé, a bientôt été considérée comme une technique pouvant être utile à l'identification microbienne, à la taxonomie, et à l'analyse de la composition de la cellule microbienne. C'est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt

par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. Historiquement, la MS était utilisée dans les laboratoires de biologie essentiellement en hématologie et en biochimie pour le diagnostic de cancers (Diamandis, 2004), de recherches d'anomalies génétiques (Chace et *al.*, 1993) ou de nouveaux biomarqueurs de pathologies (Ackermann et *al.*, 2006).

Les laboratoires de microbiologie sont actuellement en pleine mutation grâce à l'utilisation de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight). L'obtention d'un spectre caractéristique ou signature spectrale ou encore empreinte spectrale d'une espèce microbienne donnée est à la base de l'utilisation de la spectrométrie de masse dans l'identification, et constitue une véritable révolution au sein des laboratoires de microbiologie clinique. En quelques années, la spectrométrie de masse appliquée à la microbiologie s'est développée et améliorée dans le but d'obtenir des spectres de masses reproductibles, permettant d'identifier les microorganismes au niveau de la famille, du genre, de l'espèce, et parfois de la sous-espèce.

## **9. Matériel et méthodes**

Les eaux étudiées consistent en des microcosmes aquatiques soumises à des conditions particulières sous l'effet de la pollution par les hydrocarbures. L'objectif visé étant de rechercher la nature des populations microbiennes résistantes capables de s'adapter et de survivre dans des conditions difficiles d'une part, et de comprendre quels sont les paramètres environnementaux qui contrôlent la structure et la dynamique des communautés microbiennes d'autre part. Dans cette partie, nous aurons à utiliser plusieurs approches méthodologiques et diverses techniques d'analyses spécifiques en vue de mettre en valeur la nature du point de vue quantitatif et qualitatif de la microflore contaminée par les hydrocarbures et de dresser un inventaire.

### **9.1. Les eaux**

La préparation des échantillons pour l'analyse microbiologique comprend plusieurs étapes : la réception des échantillons, l'homogénéisation et la dilution. Les échantillons doivent être en tout temps minutieusement manipulés en respectant l'ensemble des règles d'asepsie de manière à éviter toute contamination. Les nombres et les techniques de prélèvement des eaux étudiées ont été mentionnés dans le chapitre 2



## 9.2. Dénombrement de la microflore totale

Cette approche nous permet de mettre en évidence la microflore existante dans les échantillons d'eau contaminés par les hydrocarbures, pris des 6 points de prélèvements. Pour ce faire, on a suivie les étapes suivantes :

### 9.2.1. Milieux de culture

Les milieux de culture choisis pour l'isolement des microorganismes sont purement synthétiques et favorables au développement des microorganismes. C'est un choix déterminant dans l'isolement et le dénombrement de la microflore Il s'agit du Potato Dextrose Agar (PDA), Extrait de Malt Agar (MEA) et Czapeck.

La composition chimique et le pH des milieux sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau. 6.** Composition des milieux de culture utilisés

<b>Milieu PDA (pomme de terre dextrosée ou Potato dextrose agar)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- pomme de terres épluchées.....200g.</li> <li>- Dextrose.....20g.</li> <li>- Eau distillée q.s.p.....1000ml.</li> </ul> <p align="center">pH 6,8</p>
<b>Milieu à l'extrait de malt- agar (MEA, d'après Blakeslee, 1915)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Extraitde malt.....20g</li> <li>- Peptone.....1g</li> <li>- Glucose.....20g</li> <li>- Agar.....15g</li> <li>- Eau distillée.....1000ml</li> </ul> <p align="center">pH : 5,6</p>
<b>Milieu Czapek Dox, 1909</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- NaNO<sub>3</sub>.....3,0g</li> <li>- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>..... 1,0g</li> <li>- MgSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O.....0,5g</li> <li>- Kcl.....0,5g</li> <li>- FeSO<sub>4</sub>,7H<sub>2</sub>O.....0,01g</li> <li>- Sucre (morceaux) .....30,0g</li> <li>- Eau de robinet q.s.p.....1000ml</li> </ul> <p align="center">pH : 6,8</p>

Les différents milieux de culture sont additionnés d'antibiotiques sélectifs antifongique (cycloheximide) ou antibactériens (Chloramphénicol) afin d'éviter le développement des souches indésirables.

### **9.2.2. Préparation des suspensions à partir des prélèvements**

La diminution de la charge microbienne par se fait par dilution de l'échantillon d'eau à analyser, cette dilution a pour but de faciliter le dénombrement et l'isolement des colonies en vue de leur purification. 10 ml de la solution mère de chaque prélèvement sont mélangés et agitées pendant quelques minutes dans un tampon phosphate PBS (*Phosphate - Buffered Saline*). À partir de la solution mère, une série de dilution au dixième ( $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ ) est réalisée. 1ml de la suspension mère est prélevé aseptiquement et versé dans 9ml d'eau distillée stérile ; la suspension obtenue correspond à la dilution  $10^{-1}$ . Cette dernière est agitée pendant deux minutes avant de prélever 1 ml que l'on ajoute à 9 ml d'eau distillée stérile donnant ainsi la dilution  $10^{-2}$ . On répète ainsi l'opération jusqu'à l'obtention d'une gamme de dilutions décimales appropriées.

### **9.2.3. Ensemencement et isolement**

La méthode utilisée est celle de l'ensemencement en surface par étalement d'une goutte de la suspension préparée sur le milieu de culture refroidi (Botton et al, 1990). Après agitation des tubes, 1 ml de chaque suspension-dilution est déposé dans une boîte contenant le milieu de culture stérile puis ensemencées selon la technique. L'expérimentation est réalisée en triplicata. Les boîtes ensemencées sont incubées dans une étuve à 37 °C. Les lectures sont faites après 5 à 7 jours.

### **9.2.4. Purification et conservation**

La purification des isolats est une étape très délicate qui joue un rôle important dans l'étape d'identification des isolats, puisqu'il s'agit d'un prélèvement qui abrite des milliers de microorganismes. La purification des souches se fait par une séries de repiquage sur qui consiste à transférer aseptiquement un microorganisme dans un milieu neuf et stérile pour le maintenir en culture pure (Botton et al., 1990).

Les différents isolats sont d'abord purifiés par plusieurs repiquages successifs monospore ou mono-colonie sur de nouveaux milieux de culture spécifiques ou non. Une fois purifié, chaque isolat est désigné par un numéro de code. La conservation des microorganismes ainsi désignés se fait soit à une température de 4°C soit au congélateur à

une température de -18°C. Dans les deux cas, aussi bien pour les bactéries que pour les champignons, des disques de gélose prélevés sur le pourtour de la culture purifiée, sont transférés dans des tubes Eppendorf stériles de 1,5 ml, contenant du glycérol à 50% (Kebe et *al.*, 2009).

### **9.3. Evaluation de la charge microbienne totale**

Nous avons adopté l'évaluation ou le dénombrement sur milieu solide (masse, surface). C'est une méthode qui s'appuie sur le fait qu'un micro-organisme présent dans un produit ou dans une suspension de ce produit, mis en culture dans des conditions optimales, en milieu solide convenable, s'y développe en formant une colonie.

Il s'agit de faire correspondre un micro-organisme à une UFC (Unité Formant Colonie) puisque, dans certains cas, le développement de plusieurs micro-organismes groupés peut conduire à une unique colonie.

La détermination de la charge microbienne est faite par comptage des colonies et les résultats sont exprimés en UFC (nombre d'Unités Formant Colonies) / ml d'eau selon la formule mathématique ci-dessous. Seules les boîtes contenant entre 15 et 150 colonies au niveau de deux dilutions successives sont retenues pour le dénombrement (Dutruc-Rosset, 2003).

$$N = \sum \text{colonies} / V_{\text{ml}} \times (n_1 \times 0,1n_2) \times d_1$$

Où

**N**: Nombre d'UFC par millilitre d'eau ;  $\sum \text{colonies}$ : somme des colonies des boîtes interprétables; **V**: Volume de solution déposée (1ml); **n<sub>1</sub>** : nombre de boîtes considéré à la première dilution retenue; **n<sub>2</sub>**: nombre de boîtes considéré à la seconde dilution retenue; **d<sub>1</sub>** : Facteur de la première dilution retenue.

### **9.4. Caractérisation phénotypique de la microflore isolée**

#### **9.4.1. Les bactéries**

En vue de leur identification, les bactéries sont soumises à un examen macroscopique et microscopique (Botton et *al.*, 1990), suivis de la détermination des caractéristiques physiologiques (Coloration de gram) et biochimiques (Galeries API).L'identification des bactéries reste l'opération la plus difficile dans le domaine de la microbiologie, elle a pour but de classer les souches par genres et espèces selon les critères d'identification.

#### **9.4.1.1. Examen macroscopique**

L'observation des colonies à l'œil nu permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification. Les différents éléments d'identification macroscopiques sont :

- **La taille** des colonies par la mesure du diamètre : punctiformes ou non. On distingue les petites colonies (< 1mm), les moyennes (1 à 3 mm) et les grandes colonies (> 3 mm) ;
- **La forme** des colonies : avec vue de profil (bombée, plate, ombiliquée, à bord soulevés ou en œuf en plat) et avec vue de dessus (rondes, irrégulière, ovoïde) ;
- **L'aspect de la surface** (lisse, rugueuse, brillante;) ;
- **L'opacité** (opaque, translucide ou transparente) ;
- **La consistance** : elle se juge au moment du prélèvement. On distingue des colonies crémeuses des sèches et des muqueuses ;
- **chromogénèse** : couleur ou pigmentation de la colonie.

Cette description aboutit à distinguer 3 types principaux de colonies :

- ♣ **Colonies S** (Smooth en anglais): colonies à surface lisse et bords réguliers, bombées de consistance crémeuse. Elles donnent des suspensions homogènes ;
- ♣ **Colonies R** (Rough en anglais): colonies à surface rugueuse et bords souvent dentelés, plates, de consistance sèche. Elles donnent des suspensions hétérogènes ;
- ♣ **Colonies M** (Muqueuse): colonies à surface lisse et bords réguliers, bombées mais filantes au prélèvement à l'anse. Elles donnent des suspensions hétérogènes ;
- ♣ Tous les intermédiaires sont possibles (ex. SR).

#### **9.4.1.2. Examen microscopique**

##### **❖ Observation à l'état frais**

Ce test permet de déterminer la forme, l'arrangement et la mobilité des bactéries. **Le frottis est obtenu** à partir d'une suspension bactérienne, agitée et homogénéisée tout en évitant la formation d'un culot au fond du tube. Quelques gouttes sont ensuite prélevées et étalées sur lame désinfectée. Après séchage, on effectue une coloration puis on recouvre la préparation d'une lamelle désinfectée. L'observation est réalisée au microscope à l'objectif 40.

❖ **Coloration de Gram**

La coloration de Gram est la base de l'identification d'une souche bactérienne. Elle doit être parfaitement maîtrisée car c'est le point de départ du choix des examens complémentaires à effectuer, des milieux à ensemencer etc... et teste son alcool- résistance. En effet, les différences de coloration des bactéries reposent sur des différences de constitution de la paroi.

Les bactéries Gram négatives ont une paroi plus fine que celles à Gram positives. De plus, cette paroi est très riche en lipides (membrane externe de la paroi) dans laquelle l'éthanol est fortement soluble.

Au terme du processus de coloration, les bactéries dites « Gram Négatives » apparaissent roses tandis que les bactéries dites « Gram Positives » sont colorés en bleu foncé/violet (rem : certaines bactéries telles que les Bacillus, apparaissent parfois roses et violettes sur le même frottis, on les dit « Gram labiles » et les différences de coloration sont dues à des différences d'âge des bactéries).

**9.4.1.3. Test oxydase**

Ce test est à la base de l'identification des bactéries. Il permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène-diamine-oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthyl-paraphénylène -diamine.

Il s'agit d'écraser avec une effilure de pipette Pasteur une colonie du germe à étudier sur le disque de papier pré-imprégné par le réactif. Si la colonie prend une teinte rose, violette ; le germe possède une oxydase : le test est positif, si la colonie reste incolore, le germe ne possède pas d'oxydase, le test est négatif.

**9.4.1.4. Test catalase**

Pendant leur respiration aérobie certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Celui-ci est très toxique et certaines bactéries sont capable de le dégrader grâce aux enzymes qu'elles synthétisent et notamment la catalase. Cette enzyme est capable de décomposer l'eau oxygénée selon la réaction :



Ce test a pour but de différencier les bactéries lactiques (catalase-) des Entérobactéries (catalase+). Une colonie est mise en suspension avec une ou deux gouttes de solution de peroxyde d'hydrogène (10 volumes) sur une lame. La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz (O<sub>2</sub>) (Marchal et *al.*, 1991).

**9.4.1.5. Systèmes d'identifications à l'aide de galeries API 20E et API 20NE**

Il est possible d'identifier les bactéries selon des caractères biochimiques liés à la production d'enzymes spécifiques de l'espèce. La galerie API 20E est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif. Elle se compose de 20 microtubes contenant un substrat déshydraté pour réaliser 21 tests biochimiques miniaturisés. On inocule chaque tube avec la suspension bactérienne à identifier, les réactions produites après la période d'incubation se traduisent par des virages colorés.

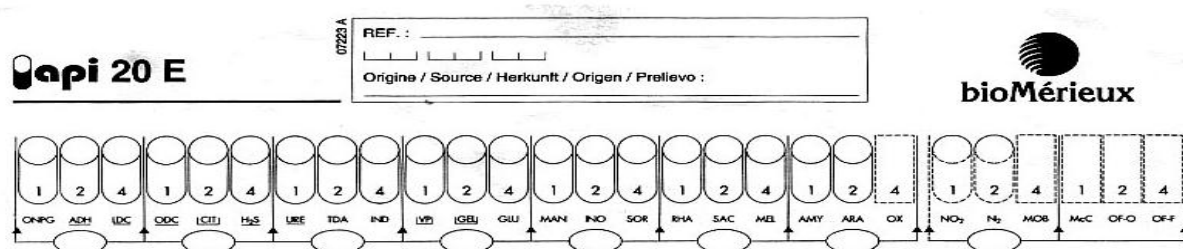
Au-delà des notions de classification, l'identification repose sur le profil biochimique de la bactérie. Cela permet d'aborder parallèlement des aspects du métabolisme bactérien (auxanogramme, fermentation des glucides).

La galerie API 20 NE est une série de test qui permet d'identifier les bacilles à gram négatif et oxydase positif non entérobactéries et non fastidieux (ex. Pseudomonas, Acinetobacter, Vibrio, Aeromonas, etc.). Elle comporte 20 microcupules contenant des substrats déshydratés, combinant 8 tests conventionnels et 12 tests d'assimilation.

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries se développent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

L'identification est obtenue à partir du profil numérique. Sur la fiche des résultats, les tests sont séparés par groupe de trois et une valeur (1, 2, 4) est indiquée pour chacun (Fig.30.). En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres ; la réaction de l'oxydase qui constitue le 21<sup>ème</sup> test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive.

Par le biais du profil numérique, l'identification de l'espèce bactérienne s'effectue à l'aide du Catalogue Analytique (tableau de lecture) et d'un logiciel d'identification.



**Figure.30. Profil d'une API test 20E**

### **9.4.2. Les champignons microscopiques**

Les champignons microscopiques présentent une grande variabilité d'ordre physiologique en fonction des conditions de culture (nature du milieu de culture utilisé et température d'incubation), mais aussi une grande variabilité génétique.

Conventionnellement, l'identification des espèces fongiques repose sur l'observation de critères morphologiques : d'une part l'observation macroscopique du mycélium (aspect, couleur et taille des colonies) et d'autre part, par une observation microscopique des structures reproductrices.

#### **5.4.2.1. Examen macroscopique**

L'examen des boîtes s'effectue à l'œil nu et avec la loupe binoculaire. On observe attentivement, dans un endroit bien éclairé, l'aspect du champignon, en vérifiant que toutes les colonies soient identiques, il faut noter :

- **La consistance de la colonie** : duveteuse, laineuse, cotonneuse, floconneuse, poudreuse,...etc.
- **La couleur** : du recto et du verso de la boîte de pétrie.
- **La taille** : en mesurant le diamètre de la colonie.
- **La pigmentation** : présence ou absence d'un pigment diffusible dans le milieu.
- **La forme du contour** : régulier, irrégulier, lobé, dentelé, filamenteux,...etc.
- **La surface** : plane, plissée, cérébriforme.
- **L'exsudat** : présence ou absence de gouttelettes

#### **9.4.2.2. Examen microscopique**

L'examen microscopique est basé sur les caractères morphologiques, on note : les organes de fructifications, types de spores, aspect du thalle, taille, couleur et disposition des pores. Les colorants utilisés sont le bleu coton et le rouge Congo, qui colorent le mycélium et les parois fongiques.

Dans des conditions d'hygiène et d'asepsie, la préparation du matériel fongique pour l'observation microscopique à l'état frais est réalisée en dilacérant un fragment mycélien dans une goutte d'eau physiologique sur une lame stérile. Recouvrir la préparation à l'aide d'une lamelle et la faire passer légèrement par-dessus la flamme pour éliminer les bulles d'air formées. L'observation est réalisée aux grossissements : ( $\times 10$ ), ( $\times 20$ ), ( $\times 40$ ). Celle des organes différenciés sera faite à immersion au grossissement ( $\times 100$ ).

Les lames préparées sont conservées par la méthode de Riddel (Botton et *al.*, 1990) qui consiste à appliquer une couche de vernie à ongle tout autour de la lamelle sur une zone stérile sèche dans le but de sceller la préparation et la protéger contre l'assèchement par l'évaporation du lactophénol.

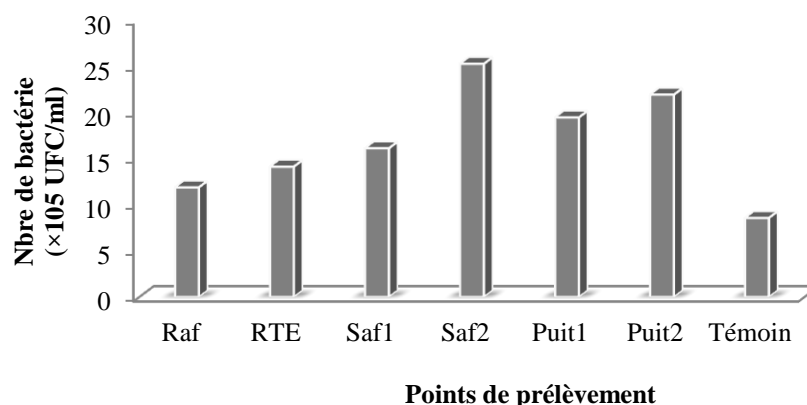
Les souches isolées ont été identifiées en se basant des clés de détermination complètes à partir des caractères cultureux et morphologiques (Botton et *al.*, 1990), (Domch et *al.*, 1980), (Kirk et *al.*, 2008), (Tabuc, 2007), (Wanatabe, 2002) et (Mueller et Schmit, 2007). La systématique adoptée est celle de Kirk et *al.* (2001).

## **10. Résultats**

### **10.1. Evaluation de la charge microbienne totale**

La microflore totale isolée est composée d'une population mixte et variée à dominance de bactéries et levures. Les champignons sont peu présents, vu qu'ils préfèrent des pH neutres mais supportent bien les pH acides.

#### **10.1.1. Les bactéries**



**Fig.31.** La microflore bactérienne totale des points échantillonnés

Les dynamiques microbiennes globales peuvent être caractérisées en quantifiant la biomasse ou en comptant les microorganismes. Or, la plupart des techniques actuellement disponibles ne peuvent donner des valeurs absolues et des résultats fiables.

L'évaluation quantitative de la microflore bactérienne totale isolée sur le milieu PDA, révèle un nombre important de colonies développées à température 35°C (Fig.31.). Le nombre estimé des bactéries des eaux de Saf 2, Puit 1 et Puit 2, est élevé. Il est respectivement de



$25,27 \times 10^5$  UFC/ml,  $19,48 \times 10^5$  UFC/ml et  $21,94 \times 10^5$  UFC/ml. Ces points se trouvent dans la partie amont d'oued Saf-Saf considérée comme la moins polluée par les hydrocarbures (ref .Chapitre.II). Au niveau des points de prélèvement Raf, RTE et Saf1, le nombre de bactéries est moins important. Il est respectivement de  $11,91 \times 10^5$ UFC/ml,  $14,16 \times 10^5$ UFC/ml et  $16,15 \times 10^5$  UFC/ml. Selon les résultats des analyses physicochimiques les points Raf, RTE et Saf1 se trouvent dans la partie aval d'oued Saf-Saf, considérée comme assez polluée avec une dominance de la pollution par les hydrocarbures.

La microflore totale du témoin est très faible par comparaison avec celle des autres points de prélèvement; elle est presque diminuée de moitié, on enregistre uniquement  $8,59 \times 10^5$  UFC/ml.

#### **10.1.1.1.Caractérisation des différents isolats bactériens**

Les divers paramètres physiologiques et biochimiques analysés nous ont permis d'identifier 11 espèces différentes représentées par huit genres appartenant à cinq familles (*Pseudomonadaceae*, *Xanthomonacadeae*, *Enterobacteriaceae*, *Aeromonadaceae* et *Vibrionaceae*), réparties d'une manière hétérogènes entre les différents sites étudiés Tab.(8).

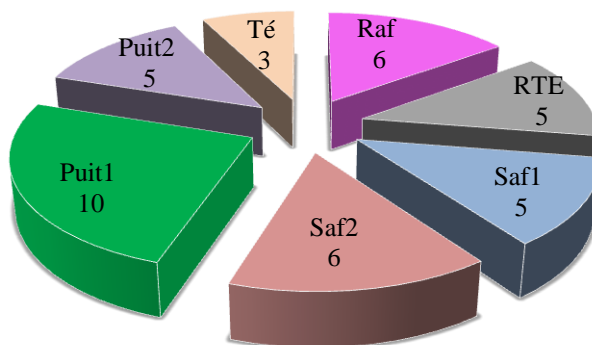
Du point de vue diversité, la famille des *Entérobactériacées* est la plus représentée avec cinq genres et quatre espèces suivie des *Pseudomonacées* et *Aeromonadacées* avec un seul genre et deux espèces chacune. L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* est la plus prépondérante puisqu'elle est présente au niveau de tous les sites. Les deuxième et troisième positions sont occupées respectivement par *Aeromonas hydrophila* et *Serratia marcescens*.

Parmi toute la liste, seules trois espèces sont détectées aussi bien dans le site témoin non pollué que dans les sites contaminés par les rejets d'hydrocarbures. Il s'agit de *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* et *Serratia liquefaciens*. Les autres espèces sont absentes au niveau des eaux du site témoin, leur croissance semble plutôt stimulée par la présence des hydrocarbures (Tab.7).

**Tableau.7.** Répartition des espèces bactériennes au niveau des sites étudiés

Points de prélèvement	Raf	RTE	Saf1	Saf2	Puit1	Puit2	Té
<i>Sténotrophomonas maltophilia</i>	+	+			+		
<i>Enterobacter cloacae</i>			+	+	+	+	
<i>Proteus mirabilis</i>	+	+			+		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+		+	+		
<i>Serratia marcescens</i>			+	+	+	+	+
<i>Serratia liquefaciens</i>			+	+			+
<i>Aeromonas hydrophila</i>	+		+	+	+	+	
<i>Aeromonas salmonicida</i>					+		
<i>Photobacterium damsela</i>	+	+			+		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>					+	+	

La liste inventoriée fait apparaître le point de prélèvement Puit1 comme le plus diversifié où toutes les espèces sont présentes à l'exception de *Serratia liquefaciens* (Fig.32.).



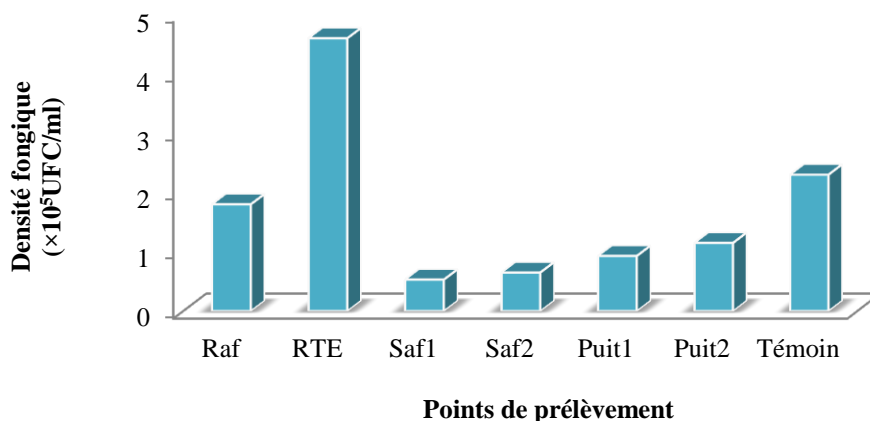
**Fig.32.** Distribution des souches bactériennes isolées par points de prélèvement

Les microorganismes isolés des eaux des sites étudiés sont diversifiés dans la majorité des prélèvements, avec une dominance de *Pseudomonas aeruginosa*. En effet cette dernière est isolée à partir de tous les sites. En dernier, l'inventaire de la microflore bactérienne isolée et identifiée des échantillons étudiés ; nous a permis de les classer suivant le tableau 8.

**Tableau.8.** Taxonomie bactérienne des souches inventoriées

Domaine	Division	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce	
Bacteria	Protéobactérie	Gamma protéobactérie	Pseusomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter, 1872)	
						<i>P. fluorescens</i> (Migula, 1895)	
			Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (Hugh, 1981)	
			Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Proteus</i>	<i>Proteus mirabilis</i> (Hauser, 1885)	
						<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> (Jordan, 1890)
						<i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens</i> (Bizio, 1823)
							<i>S. liquefaciens</i> (Grimes and Hennerty, 1931)
			Aeromonadales	Aeromonadaceae	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> (Chester, 1901)	
						<i>A. salmonicida</i> (Lehmann and Neumann, 1896)	
Vibrionales	Vibrionaceae	<i>Photobacterium</i>	<i>Photobacterium damsela</i> (Love et al. 1982)				

### 10.1.2. Les champignons microscopiques



**Figure.33.** La microflore fongique totale des eaux analysées

L'évaluation de la microflore fongique des eaux échantillonnées, indique la présence d'une population fongique variée, distribuée d'une manière hétérogène dans l'ensemble des sites de prélèvement.

La plus forte densité de la population fongique est enregistrée au niveau du point de prélèvement RTE ( $4,6 \times 10^5$  UFC/ml), suivie par celle de la Raf ( $2,8 \times 10^5$  UFC/ml). Les eaux des points Saf1, Saf2, Puit1 et Puit2 révèlent des taux de champignons relativement faibles de l'ordre de  $0,53 \times 10^5$  UFC/ml,  $0,65 \times 10^5$  UFC/ml,  $0,93 \times 10^5$  UFC/ml et  $1,15 \times 10^5$  UFC/ml. La mycoflore des eaux témoins est représentée également par un taux assez élevé égal à  $2,3 \times 10^5$  UFC/ml.

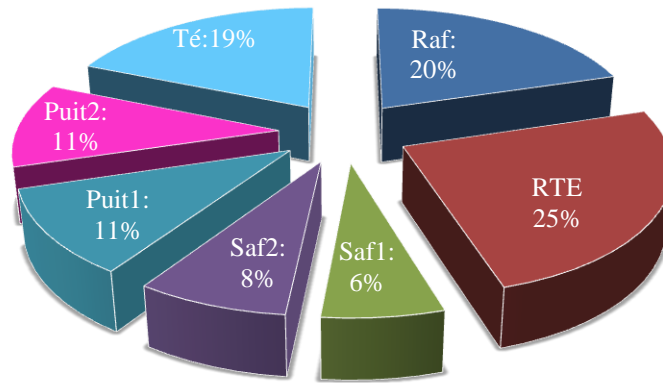
#### 10.1.2.1. Caractérisation des différents isolats fongiques

Les différents isolats purifiés et caractérisés ont donné un total de 21 espèces différentes de moisissures distribuées entre 13 genres (tab.9). Il s'agit de: *Aspergillus*, *Alternaria*, *Acremonium*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Humicola*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis* et *Trichoderma*. La plupart des espèces identifiées sont rencontrées à la fois au niveau des échantillons témoins et contaminés par les hydrocarbures. Ceci indique que ces souches sont résistantes ou capables de s'adapter et de survivre aux conditions difficiles (pollution) du biotope dans lequel elles se trouvent. Parmi les 21 souches de notre inventaire, deux d'entre elles semblent être les plus performantes, il s'agit d'*Aspergillus niger* et *A.fumigatus* puisqu'elles sont isolées à partir de toutes les eaux prélevées.

**Tableau.9.** Répartition des espèces fongiques au niveau des sites étudiés

Points de prélèvement	Raf	RTE	Saf1	Saf2	Puit1	Puit2	Té
<i>Aspergillus clavatus</i>						+	+
<i>A. flavus</i>		+		+	+		
<i>A. fumigatus</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. niger</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. terreus</i>	+	+			+	+	+
<i>Acremonium kiliense</i>	+	+					
<i>Acremonium butyri</i>	+	+					
<i>Acremonium fusidoides</i>	+			+			
<i>Alternaria alternata</i>	+	+			+	+	+
<i>Chaetomium tetrasporum</i>	+						+
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	+	+					+
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	+	+					
<i>Geotrichum candidum</i>	+	+					+
<i>Fusarium solani</i>	+	+			+		
<i>Humicola fuscoatra</i>							
<i>Mucor hiemalis</i>		+	+				+
<i>Penicillium citreonigrum</i>		+				+	+
<i>Penicillium notatum</i>					+	+	
<i>Rhizopus oryzae</i>		+					+
<i>Scopulariopsis fusca</i>		+	+	+	+		
<i>Trichoderma viride</i>	+	+					+

L'évaluation quantitative de la charge fongique des eaux échantillonnées, révèle que la RTE est le plus important en nombre d'espèces avec 25% de la population isolée (Fig.34.) ; viennent ensuite les sites Raf et le Témoin avec respectivement 20% et 19%. Apparemment, le Puit1 et Puit2 ont enregistré une valeur similaire (11%), tandis que Saf1 et Saf2 ont une charge fongique faible de l'ordre de 6% et 8%.



**Figure.34.** Pourcentage de distribution des espèces fongiques au niveau des différents sites d'étude

La mycoflore des eaux analysées est composée de 21 espèces appartenant à 5 classes réparties en 12 familles différentes (Trichocomaceae, Hypocreaceae, Chaetomiaceae, Nectriaceae, Chaetomiaceae, Hypocreaceae, Cladosporiaceae, Davidiellaceae, Endomycetaceae, Mucoraceae, Microascaceae et Pleosporaceae) (Tab.10.). Les principaux genres sont par ordre d'importance en terme de diversité des espèces : *Aspergillus*, *Penicillium* et *Acremonium*; Le mieux représenté est le genre *Aspergillus* avec 5 espèces différentes (*A.niger*, *A.fumigatus*, *A.flavus*, *A. clavatus* et *A.terreus*). La deuxième position est occupée par représentés par 3 espèces (*Acremonium kiliens*, *A.butyri* et *A.fusidoides*). *Penicillium* partage la troisième position avec *Cladosporium* avec 2 espèces pour chacun. Tous les autres genres répertoriés viennent en dernière position avec une seule espèce.

**Tableau.10.**Taxonomie fongique des souches inventoriées

Règne	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce
Fungi	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus niger</i> (Van Tieghem,1867)
					<i>A. flavus</i> (Link, 1809)
					<i>A. fumigatus</i> (Fresen, 1863)
					<i>A. terreus</i> (Charles Thom, 1918)
					<i>A. clavatus</i> (Desm, 1834)
				<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium citreonigrum</i> (Dierckx, R.P. 1901)
					<i>P. notatum</i> (Westling., 1911)
	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	<i>Acremonium</i>	<i>Acremonium kiliense</i> (Grütz., 1925)
					<i>A. butyri</i> (J.F.H. Beyma) W. Gams 1971
					<i>A. fusidoides</i> (Nicot) W. Gams 1971
		Sordariales	Chaetomiaceae	<i>Chaetomium</i>	<i>Chaetomium tetrasporum</i> (Hughes, S.J. 1946)
		Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.1881
		Sordariales	Chaetomiaceae	<i>Humicola</i>	<i>Humicola fuscoatra</i> (Traaen., 1914)
		Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>	<i>Scopulariopsis fusca</i> (Zach, 1934)
	Hypocreales	Hypocreaceae	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma viride</i> (Pers., 1794)	
	Dothidiomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria alternate</i> ( Keissi, 1912)
		Capnodiales	Cladosporiaceae	<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> (Link, 1816)
Davidiellaceae			<i>C.cladosporioides</i> (Frescen. G.A.deVries.,1952)		
Saccharomycetes	Saccharomycetales	Endomycetaceae	<i>Geotrichum</i>	<i>Geotrichum candidum</i> (Link, 1809).	
Zygomycetes	Mucorales	Mucoraceae	<i>Mucor</i>	<i>Mucor hiemalis</i> (Wehmer, 1903)	
			<i>Rhizopus</i>	<i>Rhizopus oryzae</i> (Went & Prins. Geerl., 1895)	

## 11. Discussion

Les microorganismes jouent un rôle important dans la bioremédiation des milieux pollués par les hydrocarbures. Plusieurs d'entre eux sont largement distribués dans la nature, et ont la capacité d'utiliser les hydrocarbures comme seule source d'énergie et de carbone pour leurs activités métaboliques (Jyothi et al., 2012).

De nombreuses études ont montré que des microorganismes hydrocarbonoclastes étaient sélectionnés suite à la contamination (Yakimov et al., 2005 ; Head et al., 2006). Les bactéries ont été depuis longtemps considérées comme agents prédominants dans les environnements pollués par des hydrocarbures, ceci pourrait être attribué à leur ubiquité, du fait qu'ils sont capables de coloniser des milieux différents.

Nos résultats nous ont permis de constater que les communautés bactériennes présentes dans les six points de prélèvement pollués étaient différentes de celles du témoin. Cette étude a montré la prédominance des Gram négatifs et en particulier du groupe phylogénique Proteobacteria dans les milieux pollués par les hydrocarbures, ce qui est en accord avec les résultats décrits dans la littérature Guermouche M'Rassi (2014) ; Gargouri et al. (2012); Chouari (2003) ; Margesin et al. (2003) ; Hagström et al. (2002) ; Juhasz et Naidu (2000) et (Röling et al. (2002).

Une liste de onze bactéries a été établie, appartenant toutes au rang gamma-protéobactéries et les a affilié aux genres : *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Proteus* et *Photobacterium*. Ces souches ont été adaptées à un environnement complexe, et pourraient être d'une grande utilité en bioremédiation dans les zones contaminées par les hydrocarbures (Kim et Picardal, 2000).

Par ailleurs, la plupart des souches bactériennes, caractérisées au cours de ce travail, avaient déjà été identifiées : c'est le cas du genre *Pseudomonas* qui est largement représenté dans l'étude de la biodégradation des hydrocarbures. Ainsi, on retrouve des travaux récents de Morlett-Chávez et al. (2010); Tarayre (2012) qui ont isolés et identifiés les genres *Pseudomonas*, *Aeromonas* et *Serratia* ; Guermouche M'Rassi (2014) a isolé du sol contaminé par les hydrocarbures *Pseudomonas*, *Enterobacter* et *Serratia* ; Gargouri et al. (2012), quand à eux, ont isolés des eaux contaminées par les hydrocarbures *Stenotrophomonas maltophilia* et *Aeromonas sp.*

*Pseudomonas* est l'un des genres bactériens les plus ubiquistes dans le monde, et différentes espèces ont été isolées de niches écologiques diverses. Il est très souvent dominant



dans les sites contaminés aux hydrocarbures (Evans et *al.*, 2004). Il semble être impliqué dans les premières phases des procédés de bioremédiation lorsque les polluants sont disponibles (Kaplan et Kitt, 2004).

L'évaluation quantitative de la microflore bactérienne a montré que les échantillons présentent une flore autochtone de  $10^5$  UFC/ml ; selon Riser-Robert, 1992, le taux de bactéries doit être égal ou supérieur à  $10^6$  germes.

Les résultats des paramètres environnementaux (pH, température, salinité, chlorures et sulfates) des échantillons, se sont avérés adéquats pour un bon développement d'une microflore. Les paramètres environnementaux jouent un rôle très important dans le contrôle de la croissance et de l'activité bactérienne durant la biodégradation des hydrocarbures (Patel, 2012), ils peuvent même inhiber la croissance bactérienne (Lin et *al.*, 2010).

Dans les milieux pollués, la diversité microbienne diminue et seule des souches capables d'utiliser les hydrocarbures survient et prédominent (Huang et *al.*, 2010). Ces données peuvent expliquer la prédominance des deux genres bactériens identifiés (*Pseudomonas* et *Serratia*) sur le reste des populations, mais sans pour autant négliger l'importance de chaque membre de la communauté microbienne qui fonctionne en consortium.

L'inventaire a mis en évidence 11 espèces bactériennes toute à Gram négatif. Selon Soltani (2004), des changements dans les paramètres de l'environnement (température, salinité, pH, source de carbone, ...) sont accompagnés par des modifications dans la composition membranaire, et en particulier les acides gras membranaires dans le but de protéger la bactérie. La complexité de la paroi cellulaire bactérienne Gram négatif, pourrait entraver la pénétration de certaines substances et de leur entrée dans le cytoplasme.

Les champignons microscopiques contribuent aussi à la décontamination de l'environnement pollué par les hydrocarbures. Cependant, rares sont les études qui se sont intéressées à l'inventaire de la mycoflore des eaux. Dans ce cadre, il importe de quantifier, puis de répertorier les champignons présents dans cet écosystème avant son utilisation dans les essais de biodégradation.

La population fongique isolée et identifiée des différents sites contaminés et non contaminés ; indique une présence variée et une distribution hétérogène sur les sites étudiés.

La plupart des souches de champignons appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* et *Acremonium*, mais des souches de *Chaetomium*, *Alternata*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Humicola*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Scopulariopsis* et *Trichoderma* sont aussi identifiées.

Parmi ces champignons isolés et identifiés, une attention particulière sera accordée à *Aspergillus fumigatus* et *A. niger*, qui sont les plus dominants, dans la mesure où ils sont capables de croître dans tout les sites d'échantillonnage. Cette dominance pourrait être attribuée à leur ubiquité.

Les études sur l'isolement des champignons filamenteux dans des environnements contenant du pétrole ou de ses sous-produits ont trouvé une diversité de genres très similaire à celle trouvée dans notre étude. Il s'agit d'études sur des sols contaminés par des hydrocarbures ; notamment ceux d'April et *al.* (2000), Gadd (2001), Okoh (2003), Lotfinasabasl (2012), Al Saeedi (2014), Al Jawahiri (2014).Egalement, d'autres études ont été menées sur le milieu marin ; il s'agit de da Silva et *al.* (2003), Hammadi et *al.* (2012), Sauret et *al.* (2015).

L'évaluation quantitative des mycètes isolés, indique une variabilité importante et complexe de champignons filamenteux au niveau des sites échantillonnés ; ou 13 genres sont recensés. L'*Aspergillus*, représenté par 5 espèces, est le plus fréquemment rapporté.

La distribution de la microflore bactérienne diffère de celle fongique, du fait que la première prolifère dans les sites les moins pollués (sites ; 4, 6 et 5) ; et la seconde préfère les sites les plus pollués (sites : 2 et 1). Ceci peut s'expliquer par la favorisation et l'utilisation préférentielle des hydrocarbures comme source de carbone (Harayama et *al.*, 2004 ; Kostka et *al.*, 2011).

Cette flore autochtone, contribue dans le pouvoir auto-épurateur des sites pollués et forme une collection de souches performantes adaptées à une classe particulière de polluant.

## 12.Conclusion

Les microorganismes sont très largement répandus dans la nature ; ou la tâche de biodégradation des polluants leur est confiée. L'objectif de notre travail était ambitieux puisqu'il visait à dresser un inventaire de la flore autochtone peuplant les eaux des sites contaminés par les hydrocarbures en comparaison avec un site témoin non pollué ; dans la région de Skikda, qui est connue par sa plate forme pétrochimique polluante.

Cette étape nous a permis d'explorer la diversité de la microflore capable de survivre dans un milieu pollué. D'un point de vue densité, il ressort une distribution hétérogène sur tous les sites échantillonnés. En totalité 11 genres bactériens et 21 genres fongiques ont été isolés et identifiés. Par ailleurs, des populations bactériennes affiliées aux Gamma-Protéobactéries sont abondantes. Etant donnée que leur dominance dans les sites contaminés est différente en comparaison avec ceux du témoin : deux hypothèses sont possibles :

- soit ces bactéries sont capables de se développer plus rapidement que celles des autres phylums
- soit les Gamma-Protéobactéries sont capables d'utiliser les hydrocarbures ajoutés dans les microcosmes et profitent de cet avantage pour se développer plus rapidement.

Le suivi quantitatif de la flore fongique, quand à elle, révèle une prolifération, une diversité et une distribution hétérogène sur les sites étudiés. On a mis en évidence des souches dites prometteuses dans la décontamination et la réhabilitation des sites afin de pouvoir explorer sa diversité et caractériser sa réponse à une contamination par le pétrole ou un de ses dérivés. La diversité est spécifiquement impliquée dans la dégradation.

A l'issue de cette étude nous avons élaboré une « banque bactérienne » et une « mycothèque » regroupant une flore susceptible de se développer dans un milieu pollué sous des conditions particulières.



**CHAPITRE.IV.  
BIODEGRADATION  
DES  
HYDROCARBURES**

## CHAPITRE.IV. BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES

### 1. Introduction

Le traitement biologique, consiste à utiliser des micro-organismes dans la défense de l'environnement. La bioremédiation implique la mise en œuvre, ou au moins la participation, de processus divers tels que la diffusion et l'advection, la sorption et la désorption, et la biodégradation (Vogel, 2001).

Parmi les démarches impliqués dans le devenir des hydrocarbures, la biodégradation est considérée comme un processus majeur (Leahy et Colwell, 1990 ; David, 2005), et avantageux pour éliminer les polluants industriels qui contaminent le cycle biogéochimique des substances naturelles, et diminuer la pression exercée sur l'environnement. Elle caractérise tous les systèmes environnementaux et a prouvé son efficacité pour les polluants organiques : dépollution biologique de l'air, des eaux usées, des milieux marins et des sites pollués par les hydrocarbures pétroliers, les composés chlorés ou les explosifs (Abdelly, 2007 ; Tarayre, 2012 ; Mi Jin et *al.*, 2013).

La biodégradation exploite la diversité génétique et le caractère versatile du métabolisme des micro-organismes pour la transformation des contaminants en produits moins dangereux, qui sont ensuite intégrés dans les cycles géochimiques naturels. Elle exploite le potentiel métabolique des micro-organismes existants par l'utilisation de nouvelles fonctions cataboliques issues soit de la sélection, soit de l'introduction de gènes codant pour ces fonctions (Van der Meer et *al.*, 1992 ; Gottschalk and Knackmuss, 1993).

La microbiologie de la dégradation des hydrocarbures est un domaine de recherche en plein développement. C'est à la fois le devenir dans l'environnement de ces composés ubiquistes, génotoxiques et persistants ; et l'utilisation de procédés microbiologiques de dépollution qui motivent cet intérêt.

### 3. Biodégradation : notions de base

❖ Le terme biodégradation désigne « tout processus à médiation biologique, qui entraîne la conversion d'une substance organique en dérivés ultimes organiques et inorganiques chimiquement distincts de la substance initiale » (Shimp et *al.*, 1990 *In* Forbes et Forbes, 1997).

Cependant, lorsqu'on dit qu'un composé est biodégradable, cela signifie habituellement qu'il peut être minéralisé (conversion en dioxyde de carbone, eau et différentes formes inorganiques) (Labreque, 2003 ; Pelmont, 1993 ; Atlas, 1988). La biodégradation primaire ou biotransformation a été définie comme « la perte de l'identité chimique du produit initial » et la biodégradation ultime (minéralisation) comme « la formation de biomasse microbienne et de produits finaux inorganiques à partir d'une substance chimique » (Forbes et Forbes, 1997). Les produits de dégradation primaire peuvent persister longtemps dans l'environnement. Ces derniers peuvent être inoffensifs ou parfois plus toxiques que le polluant initial (Kaufmann, 2004).

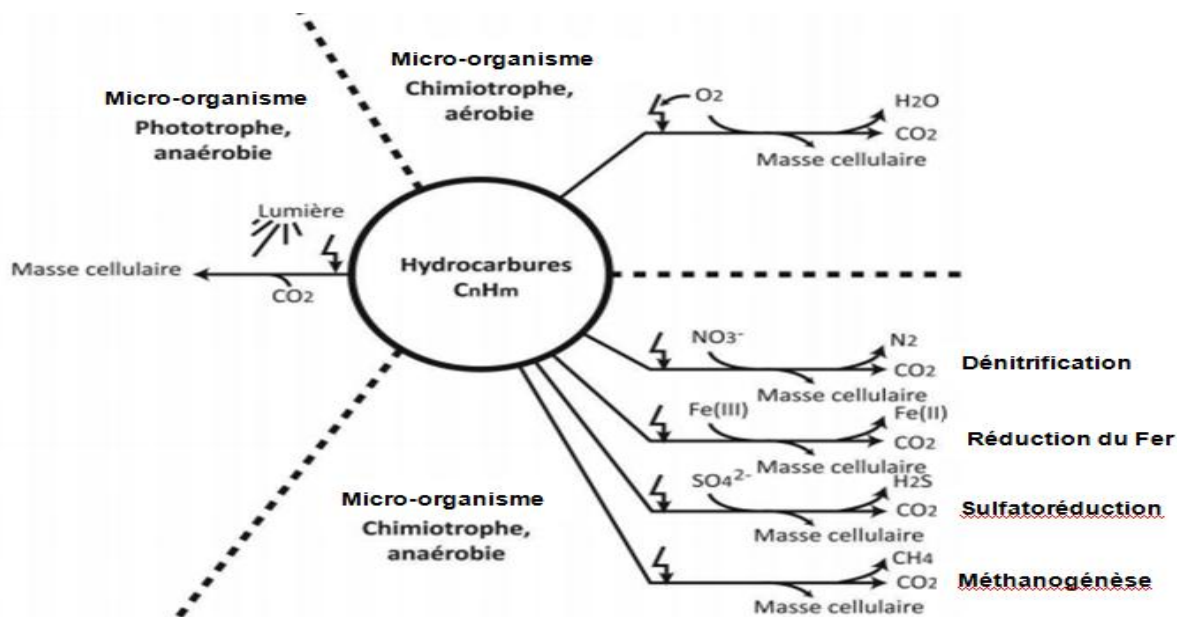
❖ La biodégradation est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement (Soltani, 2004 ; Leahy et Colwell, 1999). L'existence de ce phénomène dépend non seulement de la biodégradabilité intrinsèque du polluant mais aussi de la présence de microflore dégradatrices compétentes dans les sols et les eaux souterraines (Solano-Serena et *al.*, 2001). La biotransformation est réalisée par des organismes supérieurs (végétaux) ou des microorganismes pour dégrader les composés organiques, le plus souvent des bactéries (Vogel et Ballerini, 2001), des champignons (Yamada-Onodera et *al.*, 2002), mais les populations actinomycètes, et les algues sont aussi d'importance.

❖ La biodégradation exploite la diversité génétique et le caractère versatile du métabolisme des micro-organismes pour la transformation des contaminants en produits moins dangereux, qui sont ensuite intégrés dans les cycles géochimiques naturels. Elle tient compte du potentiel métabolique des micro-organismes existants par l'utilisation de nouvelles fonctions cataboliques issues soit de la sélection, soit de l'introduction de gènes codant pour ces fonctions (Van der Meer et *al.*, 1992 ; Gottschalk et Knackmuss, 1993). Les processus de biodégradation se développent en général spontanément (atténuation naturelle), mais certains nécessitent une phase plus ou moins longue d'adaptation à la dégradation de ces différents produits.

### **5. Principe de la biodégradation**

Le principe de la biodégradation se réfère au processus de dégradation des composés à base de carbone effectué par des microorganismes, dont la croissance s'effectue par l'oxydation du carbone qui est utilisé comme source d'énergie (Fig.35.). Ces organismes peuvent être indigènes (déjà présents dans la zone polluée), ou exogènes (ajoutées au milieu), ou encore être prélevés sur le site contaminé, cultivées au laboratoire puis réintroduites dans un écosystème pollué (bioaugmentation) (Abdelly, 2007).

La biodégradation met en jeu deux autres éléments, l'azote et le phosphore ; qui participent à la synthèse protéique. Elle se déroule généralement en aérobiose, cependant en anaérobiose, le processus est beaucoup plus lent et n'offre donc qu'un intérêt limité pour la biorestauration. Il permet la dégradation d'un certain nombre de molécules récalcitrantes (Vidali, 2001), et en anaérobiose, l'oxygène est remplacé par les nitrates, sulfates ou méthane (Jose, 1999 ; Widdel et Rabbus, 2001 ; Técher, 2011).



**Figure.35.** Principe générale de la dégradation des hydrocarbures (Widdel et Rabbus, 2001).

Généralement, la biodégradation peut s'effectuer directement dans l'environnement pollué (*in situ*) ou après transfert de l'agent polluant (*ex situ*).

- **La biodégradation *ex situ***

La mise en œuvre de cette technique passe par l'extraction soit du polluant, soit du polluant et du matériau contaminé, et leur traitement dans des dispositifs clos ou semi-clos. Les effluents liquides ou gazeux pollués sont traités dans des bioréacteurs (réacteurs, digesteurs, biofiltres, biolaveurs, ...etc.). Dans ces dispositifs, on fait intervenir une microflore sélectionnée ou adaptée au polluant.

- **La biodégradation *in situ***

Elle consiste à augmenter, dans le site contaminé, le niveau des populations microbiennes aptes à dégrader le xénobiotique, soit par renforcement des populations autochtones, soit par introduction de nouvelles populations (inoculation) et d'adapter certaines caractéristiques physico-chimiques du site pour optimiser ou faciliter l'activité microbienne dépolluante.

## **6. Mécanismes de biodégradation**

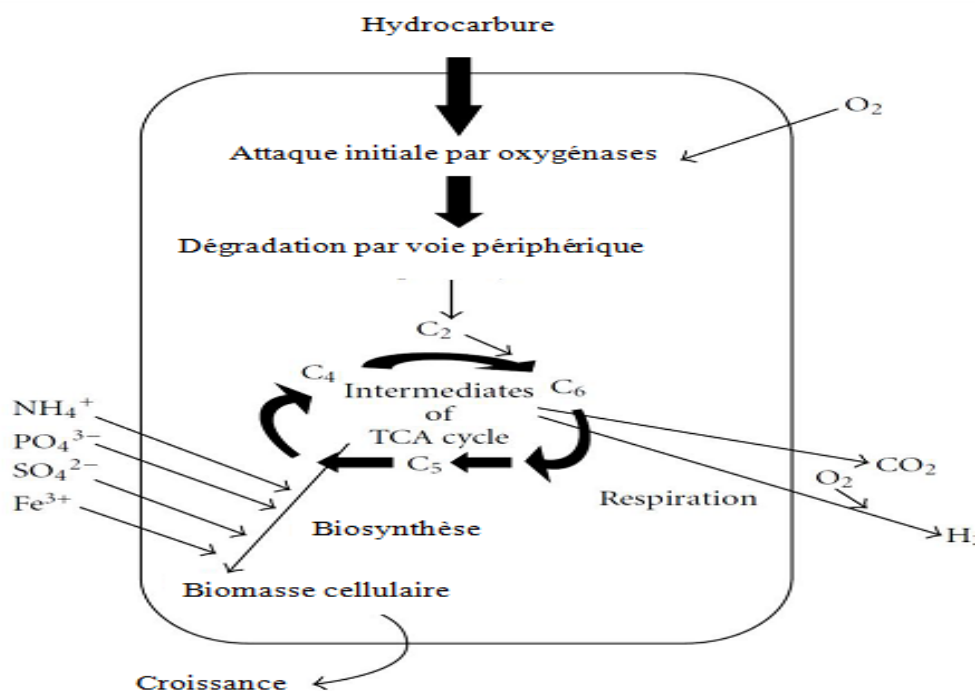
Les hydrocarbures sont des molécules inertes du point de vue chimique et doivent être activées par les bactéries en conditions oxygènes qu'anoxiques. Une grande variété de microorganismes qualifiés d'hydrocarbonoclastes, présente la capacité de dégrader les hydrocarbures (Berthe-Corti et Höpner, 2005).

Selon Labrecque (2003), les microorganismes peuvent seulement faire les choses pour lesquelles ils ont une «programmation» génétique. Les réactions initiales de transformation des hydrocarbures font intervenir une grande diversité d'enzymes spécifiques des bactéries hydrocarbonoclastes. Ces enzymes sont codés par différents gènes dont la localisation, l'organisation et la régulation apparaissent également diversifiées (Bertrand et *al.*, 2011 ; Wang et *al.*, 2010). De plus, les microorganismes ne peuvent pas tout faire et l'environnement demeure un facteur déterminant dans la réaction pouvant être effectuée par un organisme apte à le faire. Par conséquent, il n'est pas garanti qu'un composé soit dégradé dans un environnement particulier. D'abord, un organisme susceptible de dégrader doit être présent; ensuite une opportunité doit exister pour que les enzymes nécessaires soient synthétisées; enfin, les conditions environnementales doivent être appropriées pour que les réactions enzymatiques s'effectuent à une vitesse significative (Grady, 1985).

Toutefois, Das et *al.* (2011) ont proposé un schéma général de la dégradation des hydrocarbures par les microorganismes en conditions aérobies (Fig.36.). L'attaque initiale intracellulaire est un processus oxydatif et l'activation ainsi que l'incorporation d'oxygène est la clé de la réaction enzymatique catalysée par les oxygénases et les peroxydases. Les voies périphériques de dégradation convertissent les hydrocarbures étape par étape en intermédiaires du catabolisme, à l'aide par exemple du cycle des acides tricarboxyliques (TCA ou cycle de Krebs). La biosynthèse de molécules pour la biomasse de la cellule se fait à partir de métabolites précurseurs comme l'acétyl-CoA, le succinate ou le pyruvate.



Les molécules glucidiques nécessaires à de nombreuses biosynthèses et à la croissance sont produites par la glycolyse.



**Figure.36.** Mécanisme général de dégradation des hydrocarbures par les microorganismes (DAS et *al.*, 2011).

Les principaux processus de biotransformation sont la minéralisation, le cométabolisme, la polymérisation, l'accumulation et les effets secondaires de l'activité microbienne (Bollag et Liu, 1990). La biotransformation d'une molécule de polluant peut faire intervenir un ou plusieurs processus simultanément ou successivement et conduire à la formation de différents produits issus du métabolisme d'un ou plusieurs micro-organismes. L'amplitude de la transformation dépend de différents facteurs biotiques et abiotiques, comme la température, l'humidité, le pH, la pression partielle d'oxygène dans le sol, la concentration en polluant, etc.....

### 6.1.La minéralisation

C'est la conversion d'une molécule organique en ses constituants inorganiques (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O). C'est donc le processus le plus intéressant car il conduit à une épuration totale du milieu pollué. Le xénobiotique est utilisé comme source de carbone et d'énergie. La minéralisation a lieu lorsqu'un composé organique est attaqué par les mécanismes cellulaires cataboliques et anaboliques centraux (Madsen, 1991). Les organismes responsables tirent en général profit des réactions de minéralisation : une croissance microbienne est attendue et une partie du

carbone initialement dans la molécule organique est en général incorporée dans la biomasse (Alexander, 1981).

## 6.2. Le cométabolisme

C'est la modification fortuite d'une molécule par une enzyme qui agit sur une autre molécule (substrat primaire). Le substrat primaire est le support de la croissance de micro-organismes qui produisent une ou plusieurs enzymes de faible spécificité agissant aussi sur le substrat cométabolisé. Ce dernier est en général seulement faiblement altéré et n'entre pas dans les chemins cataboliques et anaboliques de la cellule microbienne (Madsen, 1991). La croissance microbienne n'est pas un corollaire et on n'attend pas d'accélération des réactions de cométabolisme (Alexander, 1981), donc il n'y a aucun avantage apparent aux micro-organismes impliqués (Hazen, 2010). Toutefois, d'autres organismes peuvent être capables de minéraliser les produits du cométabolisme.

Selon Vogel (2001), trois explications sont données pour expliquer l'origine du cométabolisme, en relation avec cette faible spécificité enzymatique :

- Le substrat entre dans la cellule en quantité trop faible pour déclencher la synthèse des enzymes aptes à le métaboliser. L'attaque est alors trop lente pour alimenter la machinerie cellulaire en carbone ou en énergie
- Le substrat xénobiotique est dégradé en composés inutilisables pour le métabolisme de synthèse (voie en impasse). Le deuxième substrat compense alors cette lacune, fournit l'énergie et la matière première dont la cellule a besoin pour se développer
- La dégradation du xénobiotique comporte une réduction et les électrons doivent provenir d'une autre source, nécessairement représentée par un second substrat; l'attaque de celui-ci rétablissant l'équilibre du budget.

Les microorganismes qui effectuent ces réactions *in vitro* comprennent des souches de *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Nocardia*, *Bacillus*, *Mycococcus*, *Achromobacter*, et *Arthrobacter* en ce qui concerne les bactéries, et de *Penicillium* et de *Rhizoctonia* en ce qui concerne les champignons.

Un certain nombre de conversions cométaboliques n'impliquent qu'une seule enzyme qui peut effectuer l'une des réactions suivantes : hydroxylation, oxydation, dénitratisation, déamination, hydrolyse, acylation, ou clivages d'une liaison éther. Toutefois de nombreuses conversions cométaboliques sont complexes et font intervenir plusieurs enzymes.

### **6.3. La polymérisation**

Les molécules xénobiotiques ne sont pas toujours dégradées directement mais polymérisées, ce qui les rend moins toxiques. Dans ce processus, les molécules de xénobiotiques s'associent avec elles-mêmes, ou d'autres composés xénobiotiques, ou des composés naturels (Bollag et Loll, 1983). Elles sont alors incorporées à la matière organique et peuvent être relarguées de manière incontrôlée suivant l'activité microbienne du sol.

### **6.4. L'accumulation cellulaire**

L'adsorption des molécules xénobiotiques est généralement attribuée à des processus passifs car, dans la plupart des cas, les cellules mortes présentent un taux d'adsorption supérieur ou égal à celui des cellules vivantes. Cette adsorption parfois élevée n'est pas nécessairement couplée à une biodégradation (Bidaud, 1998) ; mais réduisant la quantité de polluant directement disponibles aux agents microbiens (Alexander, 1994). Etant hydrophobes, liposolubles et généralement peu volatils, les hydrocarbures ont tendance à s'adsorber sur les matrices solides et notamment les matières organiques (Accardi-Dey, 2002 ; Zhou, 2004).

Alexander (1994) considère que six conditions doivent être réunies pour qu'un substrat soit biodégradable:

1. Un enzyme capable d'effectuer la dégradation existe (la non-spécificité des enzymes est la cause principale de biodégradation de xénobiotiques);
2. Le microorganisme possédant cet enzyme doit être présent dans le même environnement que le substrat;
3. La molécule à dégrader doit être sous une forme disponible pour son utilisation par le microorganisme (les molécules adsorbées ne sont pas biodégradées);
4. Si l'enzyme est intra-cellulaire, ce qui est le cas pour de nombreux substrats à faible poids moléculaire, le substrat doit pénétrer à l'intérieur de la cellule;
5. Dans le cas d'enzyme inductible, les conditions d'induction doivent être réunies (concentration suffisante de substrat ou présence d'un autre substrat permettant le cométabolisme);
6. les conditions de milieu doivent être favorables à la croissance du microorganisme (cas classique de l'aérobiose vs anaérobiose).

Malgré la diversité des hydrocarbures et par conséquent de leur biodégradabilité, cette dernière est soumise à quelques règles. Plus la chaîne d'un hydrocarbure aromatique sera longue, plus sa biodégradabilité sera difficile (Tarayre 2012).

L'effet des hydrocarbures sur les communautés microbiennes fait intervenir des mécanismes complexes dépendant de leurs capacités métaboliques, influencées par les paramètres environnementaux et la durée d'exposition aux polluants (Roling *et al.*, 2002; Yakimov *et al.*, 2004; Bordenave *et al.*, 2007).

Le devenir des hydrocarbures ne dépend pas uniquement des activités microbiennes, mais aussi des caractéristiques du sédiment, des facteurs physico-chimiques (accepteurs d'électrons, température, salinité,...etc), de la disponibilité des nutriments et des co-metabolites, et aussi de la bioturbation (Berthe-Corti et Hopner, 2005).

## **5. Facteurs influençant la dégradation des hydrocarbures**

Les facteurs physico-chimiques et/ou biologiques influencent directement l'évolution des hydrocarbures dans le milieu récepteur et les communautés bactériennes dans leur fonction de biodégradation des hydrocarbures.

Des travaux de recherche sur la biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes ont montré que ce processus dépend de la structure chimique des hydrocarbures (Atlas, 1981) et des conditions environnementales (Leahy et Colwell, 1990).

Les facteurs physico-chimiques influant sur la vitesse de biodégradation microbienne sont la température, l'oxygène disponible, le pH, la salinité, les éléments nutritifs, l'osmose et la pression hydrostatique (Leahy et Colwell, 1990; Atlas, 1981).

### **5.1. Structure et nature du milieu récepteur**

Les bioprocédés s'appliquent à une grande variété de sol. Pour cela, il est donc nécessaire de connaître la structure et la nature de sol pour prévoir le comportement des polluants et les conséquences possibles de la pollution (Lecomte, 1995 ; Lemiere *et al.*, 2001). La taille des pores et les propriétés de l'eau et de l'air dans ces pores sont des facteurs spécifiques de chaque sol (Girard *et al.*, 2005). NAM *et al.* (2003) ainsi que Girard *et al.* (2005), ont observé que les agrégats de sols réduisaient la biodégradation, par le ralentissement de la diffusion de l'oxygène et l'apport des nutriments à l'intérieur de l'unité structurale et par la protection mécanique des substrats qu'elle renferme.

## 7.2. Nature, composition chimique et concentration des hydrocarbures

La composition d'un hydrocarbure détermine sa toxicité et son potentiel de dégradation. Une fois déversé dans l'eau, ce dernier prend diverses formes qui conditionnent fortement le temps qu'il sera nécessaire pour l'éliminer. Selon sa consistance, il va former un film hydrophobe à l'interface eau-air, former des émulsions dans la colonne d'eau ou encore couler au fond des océans sous forme de goudron sous l'action de processus hydrodynamiques (Cooney 1984). La dispersion du pétrole et de manière générale tout processus tendant à augmenter la surface de contact eau-huile (émulsion huile-dans-eau) permet un meilleur accès à l'oxygène et aux ressources en azote et phosphore. Ce phénomène physique augmente largement la dégradation des hydrocarbures. A l'inverse la formation d'une mousse au chocolat (émulsion eau-dans-huile) freine le processus (Bianchi et *al.*, 1988).

Les conséquences d'un déversement pétrolier sont influencées par plusieurs facteurs comme la nature de l'hydrocarbure, sa quantité déversée, les conditions environnementales qui prévalent au moment du déversement, le type de substrat et la sensibilité des organismes du milieu atteint (Leiger et *al.*, 2012). La dégradation du pétrole dépend en grande partie de sa composition et de sa concentration. Elle dépend également de son comportement dans le milieu récepteur.

La figure 37 résume les principaux processus qui ont une influence sur le comportement d'un pétrole déversé en mer. On distingue généralement deux phases distinctes durant lesquelles certains processus ont une part active et prépondérante :

➤ Une phase d'évolution à court terme qui intervient dans les premiers jours qui suivent le déversement marqué par les processus suivants :

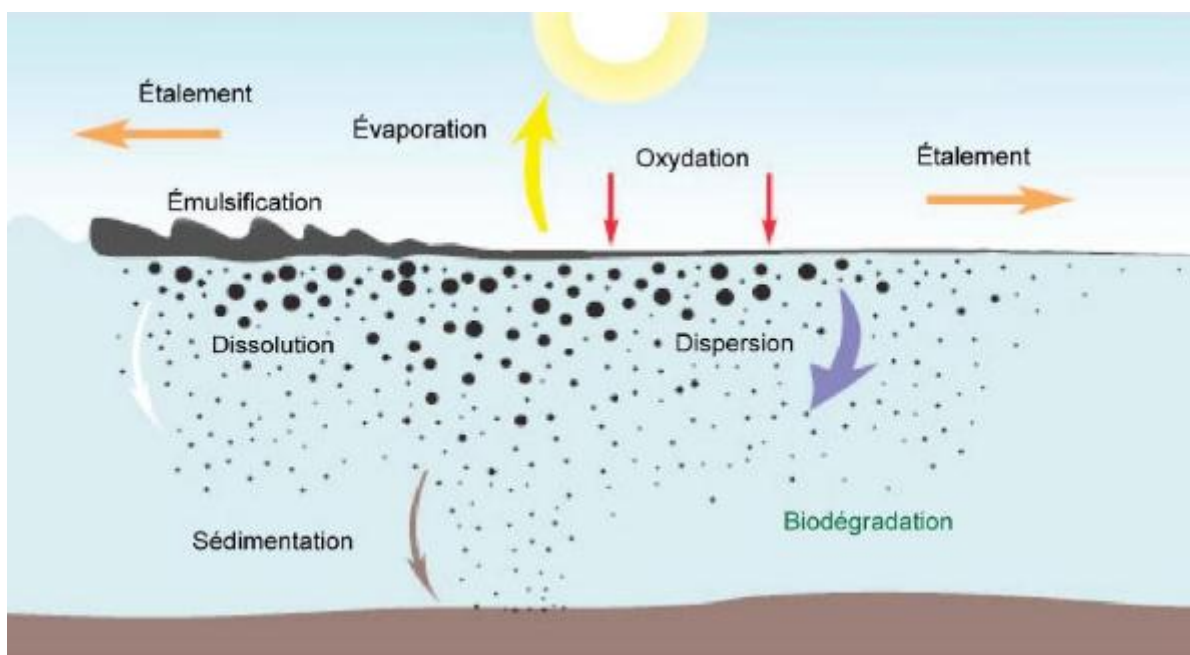
- L'étalement de la nappe,
- L'évaporation des fractions légères,
- La dissolution des composés les plus solubles,
- L'émulsification du produit sous l'effet de l'agitation,
- La sédimentation par fixation du produit sur les matières en suspension.

C'est durant cette phase d'évolution que plusieurs phénomènes majeurs sont observés: le déplacement des nappes d'hydrocarbures à la surface de l'eau sous l'effet des vents et des courants, la pollution éventuelle du littoral, la dispersion des hydrocarbures dans la masse

d'eau, la contamination des fonds marins, les effets écologiques immédiats par mortalités massives et fortes contaminations des espèces marines.

➤ Une phase d'évolution à long terme qui se déroule sur des semaines, des mois, voire plusieurs années. Cette seconde phase d'évolution est associée à la phase de décontamination de l'environnement sous l'effet du niveau d'énergie des sites contaminés : énergie solaire (photo-oxydation), énergie mécanique du milieu (dispersion naturelle), énergie biologique (biodégradation, métabolisation *in vivo*).

Selon Noemie *et al.* (2003), 15% du pétrole brut s'évapore dans l'atmosphère, 16% se dissout dans l'eau, 22% est biodégradé, 3% s'agglomère en haute mer, 15% s'échoue sur les côtes et 28% non dégradé pénètre dans le sédiment.



**Figure.37.** Comportement des hydrocarbures pétroliers lors d'un déversement en milieu aquatique (Genivar, 2013).

Malgré leur complexité, les composés hydrocarbonés ne sont pas dégradés équitablement (Saliot, 1981) et leur biodégradabilité est très fortement dépendante de leur composition. Notons qu'un hydrocarbure léger est plus susceptible d'être biodégradé qu'un hydrocarbure lourd (Soltani, 2004). En général, les hydrocarbures sont classés selon leur sensibilité aux attaques microbiennes de la manière suivante : *n*-alcanes > alcanes ramifiés > aromatiques à faible poids moléculaire > alcanes cycliques > aromatiques à haut poids

moléculaire > stéranes-hopanes (Van Hamme et *al.*, 2003). Plus les molécules d'un pétrole sont saturées mieux celui-ci est biodégradé.

Il est à noter que la composition et la concentration du pétrole déterminent la façon dont les communautés microbiennes s'adaptent à la pollution. Deux types de pétroles différents induisent des changements différents sur une même communauté (Rodríguez-Blanco et *al.*, 2010).

### 6.3. Facteurs microbiologiques

La diversité microbienne est un facteur déterminant pour la plasticité des communautés en milieu naturel comme pour faire face à un apport de pétrole (Sauret, 2011 ; Dash et *al.*, 2013). Les microorganismes, qui ont la faculté de métaboliser les hydrocarbures pétroliers sont essentiellement des bactéries et des champignons et sont les acteurs principaux de la biodégradation environnementale (Leahy et Colwell, 1990). Les bactéries hydrocarbonoclastes sont capables d'utiliser les hydrocarbures comme seule source de carbone et d'énergie. Elles sont ubiquistes, diversifiées, spécifiques de leur substrat et plus nombreuses dans les milieux pollués (Sauret, 2011 ; Floodgate, 1995; Leahy et Colwell, 1990). Ils représentent moins de 0,1% de la communauté microbienne indigène en milieu non pollué, mais peuvent représenter près de 100% dans les milieux pollués par des déversements d'hydrocarbures, que ces déversements soient d'origine naturelle ou anthropique (Atlas, 1981 ; Yakimov et *al.*, 2003 ; Yang et *al.*, 2009).

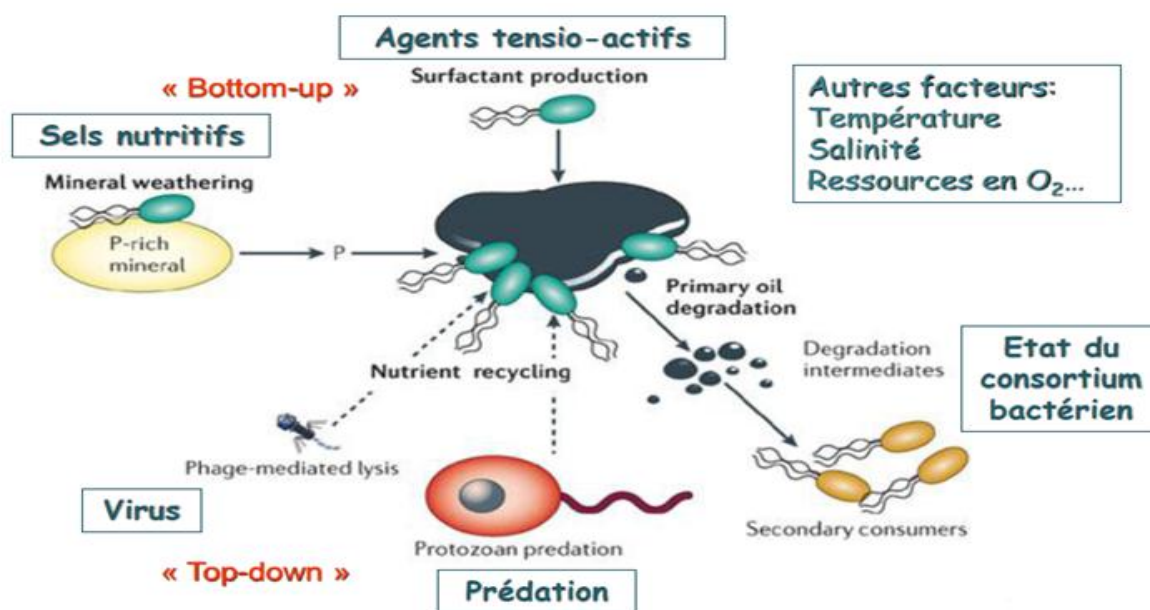
La fraction de la communauté microbienne totale représentée par les bactéries utilisant les hydrocarbures comme source de carbone est cependant fortement variable, avec des fréquences allant de 6% à 82% pour les champignons du sol, de 0,13% à 50% pour les bactéries du sol, et de 0,003% à 100% pour les bactéries marines dépendamment des conditions du milieu (Leahy et Colwell, 1990, Dash et *al.*, 2013).

Les hydrocarbures à faible poids moléculaire sont considérés comme des composés toxiques pour les microorganismes à cause de leur grande solubilité et par conséquent leur concentration très élevée dans les phases aqueuses (Zhang et *al.*, 2009). L'action toxique du polluant peut provoquer un ralentissement de l'activité de la microflore du sol (Vogel et Ballerni, 2001). Aucun microorganisme ne peut à lui seul dégrader tous les composants du pétrole brut, ou des carburants raffinés, qui sont déversés dans l'environnement.

Il est à noter qu'un bon nombre d'études a révélé que les ressources nutritives (Bottom up), pouvaient expliquer en partie la structuration des communautés bactériennes aquatiques

(Cho et *al.*, 2004 ; Pradeep Ram et *al.*, 2008). Selon Roling et *al.* (2002), une même communauté bactérienne ne s'adaptait pas de la même façon au pétrole selon les quantités d'azote et de phosphore disponibles.

Le pétrole induit la mise en place d'un consortium microbien de biodégradation des hydrocarbures avec une alternance de différents types de microorganismes comportant des capacités métaboliques complémentaires. D'après les travaux de Head et *al.*, 2006, des interactions complexes (Top down) ont lieu entre les microorganismes durant les processus de biodégradation du pétrole (Fig.38.). Des bactéries dégradant directement le pétrole brut, peuvent également subir des attaques de prédateurs comme des protozoaires ou être lysés par des bactériophages (virus) ; tandis que d'autres bactéries poursuivent la dégradation des composés intermédiaires.



**Fig.38.** Schéma conceptuel des facteurs affectant la biodégradation.  
(Head et *al.*, 2006 In Sauret, 2011)

De nombreux microorganismes producteurs de biosurfactants ont déjà été isolés, sécrétant diverses classes des molécules amphiphiles appelés aussi bio émulsifiants, telles que des glycolipides, des phospholipides, des acides gras ou des polysaccharides (Banat, 2000). Ces derniers permettent de réduire l'énergie nécessaires au transfert de matière entre la surface du pétrole et l'intérieur des cellules bactériennes (Ron et *al.*, 2002), et augmentent par



la suite sa dégradation (Nerurkar et *al.*, 2009; Satpute et *al.*, 2010). La production de bio émulsifiant est induite par des signaux moléculaires intervenant dans le « quorum sensing » (Ron et *al.*, 2002). Elle confère l'avantage sélectif aux bactéries qui les produisent et augmentent la dégradation du pétrole (Satpute et *al.*, 2010).

L'exposition antérieure d'une communauté microbienne aux hydrocarbures constitue un facteur important dans la détermination du potentiel de bioremédiation d'un écosystème. Ce phénomène connu sous le nom d'adaptation des communautés peut se traduire par :

1. la dominance d'espèces hydrocarbonoclastes dans la communauté microbienne indigène,
2. l'induction d'enzymes spécifiques à la dégradation des hydrocarbures,
3. l'apparition de modifications génétiques aboutissant à de nouvelles capacités métaboliques au sein de la communauté microbienne indigène.

L'initiation de la biodégradation lors d'un déversement accidentel sera donc plus rapide en milieu impacté qu'en milieu sain (Ortmann et Lu 2015).

#### **6.4. Facteurs environnementaux**

Plusieurs facteurs environnementaux peuvent affecter, positivement ou négativement, le métabolisme microbien. Il s'agit essentiellement de la température, salinité, ressources en oxygène, pression et des rayonnements UV. Ce sont des paramètres importants dans la réponse des communautés microbiennes aux hydrocarbures et ont une influence sur leur biodégradation (Sugai et *al.*, 1997). Ces facteurs, contribuent généralement de manière significative à la structuration des communautés microbiennes. D'autres tels que le pH, le vent,...etc, ont également leur importance.

La photodégradation des hydrocarbures est un processus qui peut rapidement altérer la composition initiale du pétrole, ce qui peut avoir une influence sur sa biodégradabilité par les microorganismes (Nicodem et *al.*, 1997). Ainsi, la photooxydation est plus importante avec les composés pétroliers de faibles poids moléculaire (Genivar, 2013). Parmi ces derniers, les composés ramifiés sont plus facilement photo-oxydés que les *n*-alcanes (Wilcke et *al.*, 2000).

D'une manière générale, la température influe sur la dégradation des hydrocarbures, en modifiant son état physique et sa composition chimique (Leahy et Colwell, 1990 ; Sauret, 2011). Lorsque les températures sont basses, la volatilisation des composés de faibles poids moléculaires, toxiques pour les microorganismes, ralentit ; la viscosité du pétrole augmente et l'émulsification est plus difficile. Ce phénomène diminue l'étalement des nappes et donc leur

dégradation (Bianchi et *al.*, 1988). Cependant une diminution de la température est accompagnée par une diminution de la vitesse de biodégradation qui peut être expliquée par une décroissance de l'activité enzymatique.

La température est le deuxième facteur qui peut limiter l'efficacité des microorganismes à l'œuvre (Genivar, 2013). Elle agit sur l'activité physiologique des microorganismes et influe profondément leur multiplication et métabolismes ; la vitesse de biodégradation ainsi que la nature et concentration des espèces microbiennes présentes (Leahy et Colwell, 1990). L'oxydation optimale des hydrocarbures a été observée en culture pure autour de 25 à 37°C, ce qui correspond à l'optimum de température de bon nombre d'enzymes bactériennes (Scriban, 1999). Des températures plus élevées ont pour effet d'augmenter la vitesse de biodégradation (Sikkema et *al.*, 1995). De ce fait, même si la biodégradation est un processus pouvant se faire toute l'année, certains auteurs proposent qu'elle soit plus efficace en été qu'en hiver (Atlas et *al.*, 1973).

Les ressources en oxygène sont un facteur important dans la biodégradation des hydrocarbures (Cerniglia, 1992) et ils peuvent devenir limitant en milieu froid (Yang et *al.*, 2009). En effet, en aérobie, la dégradation est initiée par une étape d'oxydation faisant intervenir des hydroxylases et des oxygénases à fortes dépendance en oxygène. En anaérobie, l'oxygène est remplacé par d'autres types d'accepteurs d'électrons mais la biodégradation est particulièrement lente (ex : sédiments) (Coates et *al.*, 1997). Marin et *al.* (2001), ont constaté une augmentation de la dégradation des hydrocarbures totaux de 10% par la bactérie *Acinetobacter calcoaceticus*, après un apport supplément d'oxygène par agitation. Théoriquement, 3,5 g d'oxygène sont nécessaires pour l'oxydation complète de 1 g de pétrole (Soltani, 2004). La dégradation des hydrocarbures pétroliers est beaucoup plus efficace en conditions oxiques qu'en anoxie (Widdel et Rabus, 2001).

Les fortes salinités constituent une barrière naturelle pour la biodégradation des hydrocarbures. La solubilité des alcanes et des hydrocarbures polyaromatiques, diminue avec la salinité du milieu, d'où une diminution de la biodisponibilité pour la biodégradation (Dupuis et Ucan-Marin, 2015). Le taux de dégradation pour les hydrocarbures aliphatiques et aromatiques atteint son maximum pour des concentrations de NaCl allant de 0 à 0,171 Moles, et diminue lorsque la salinité augmente (Thiele-Bruhn et Brummer, 2004 ; Haritash et Kaushik 2009).

Les nutriments peuvent influencer la biodégradation de composants pétroliers à divers niveaux. Un apport d'hydrocarbures contenant une faible concentration en nutriments et une

forte concentration en carbone en milieu aquatique produit souvent des ratios carbone/azote et carbone/phosphore élevés. Ces conditions sont globalement défavorables à la croissance microbienne (Leahy et Colwell, 1990). La disponibilité de l'azote et du phosphore dans le milieu récepteur est donc un élément limitant de la biodégradation des hydrocarbures (Leahy, 1990).

Des valeurs extrêmes de pH pourraient avoir une influence négative sur la capacité des microorganismes à dégrader les hydrocarbures. Straube et *al.* (2003), ont trouvé que la dégradation des hydrocarbures est plus élevée dans des conditions légèrement basiques.

Enfin, ces facteurs environnementaux (température, pression, ressources en oxygène, salinité, ...etc), peuvent jouer un rôle à la fois sur la transformation chimique du pétrole mais aussi sur sa biodégradation par les microorganismes.

## **7. Les agents de la biodégradation**

### **14.1. La communauté bactérienne**

Les bactéries utilisant les hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie ont été mises en évidence par Zobell en 1946. Depuis, de nombreuses souches ont été isolées et décrites et ont permis la caractérisation de voies de biodégradation. Ces micro-organismes appelés aussi « hydrocarbonoclastes », sont ubiquistes (Atlas, 1995 a, b; Olivera et *al.*, 1997), diversifiées, spécifiques de leur substrat et plus nombreuses dans les milieux pollués (Sauret, 2011). Ils se retrouvent dans différents environnements ayant habituellement connu un épisode de contamination : des eaux, des sols, des boues activées, des déchets industriels, etc ; ils ont même été rencontrés dans les écosystèmes extrêmes comme les régions polaires Arctique et Antarctique (Liu et *al.*, 2006 ; Zeng et *al.*, 2013 ; Piquet et *al.*, 2010) , ainsi que les régions tempérées (Whyte et *al.*, 1996; Aislabie et *al.*, 1998 ; Elshafie, 2007), les déserts (Abed et *al.*, 2010 ; Andrew et *al.*, 2012), environnements hypersalins (Schneider et *al.*, 2013) ou les sources chaudes (Zarilla et Perry, 1984).

Cependant les bactéries restent qualitativement et quantitativement prépondérantes pour métaboliser les hydrocarbures (Bertrand et Mille, 1989; MacNaughton et *al.*, 1999). On peut y trouver tous les types de bactéries, des autochtones, des hétérotrophes, des aérobies ; des mésophiles ; des psychrophiles et des thermophiles (Gabet et *al.*, 2004).Lorsque l'on nomme les bactéries hydrocarbonoclastes, presque tous les clades phylogénétiques sont représentés. Ainsi, on retrouve aussi bien des bactéries Gram négatives que des bactéries Gram positives (Techer, 2011) ; qui agissent en aérobiose et en anaérobiose (Roger et Jacq, 2000).

Bien que la dégradation anaérobie des hydrocarbures soit plus lente qu'en présence d'oxygène, des travaux ont mis en évidence des bactéries, parmi lesquelles des membres de la classe des Gammaprotéobactéries, capables de dégrader le naphthalène en conditions dénitrifiantes (Rockne et *al.*, 2000) ou des Deltaprotéobactéries sulfato-réductrices de la famille Desulfobacteraceae, dégradant le phénanthrène (Sufliata et *al.*, 2007).

La plupart des bactéries hydrocarbonoclastes appartiennent aux Gammaprotéobactéries (Sauret, 2011). Ceux des alphaprotéobactéries en sont sensibles (Harayama et *al.*, 2004).

Plusieurs souches capables de dégrader les hydrocarbures, ont été identifiées au cours des années ; appartenant aux genres : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacteria*, et *Nocardia* (Leahy et Colwell, 1990; Floodgate, 1995 ; Tarayre, 2012). L'activité humaine, au travers des multiples sources de pollution et par la mondialisation des déplacements, favorise l'apparition de nouvelles souches aptes à la dégradation des hydrocarbures (Van der Meer et *al.*, 1992). Ainsi, même si les conditions de température, aération, pH, toxicité ou nutriments sont défavorables, une dépollution intrinsèque reste possible avec une efficacité amoindrie (Leahy et Colwell, 1990; Delille et *al.*, 1998). Il a été clairement établi que le genre *Alcanivorax* est prépondérant dans la dégradation des alcanes (Yakimov et *al.*, 1998) alors que le genre *Cycloclasticus* est associé à la dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques n'excédant pas trois cycles benzéniques (Dyksterhouse et *al.*, 1995).

Nombreux micro-organismes sont également connus pour dégrader un large éventail de composés aromatiques (Cerniglia, 1984; Weissenfels et *al.*, 1990). Les hydrocarbures aromatiques polycycliques, composés extrêmement nocifs pour l'homme et son environnement en raison des pouvoirs toxiques, mutagènes et cancérogènes reconnus pour plusieurs d'entre eux, constituent une classe de polluants particulièrement répandus dans le sol. L'une des préoccupations qui a augmenté sur un certain nombre des études in vitro a été la production éventuelle de certains intermédiaires de la dégradation des HAP, en particulier les dihydrodiols, qui sont d'une grande toxicité que les composés parents (Cerniglia, 1984).

Si le pétrole peut être toxique pour bon nombre d'espèces marines, les bactéries hydrocarbonoclastes, sont, au contraire, favorisées par un apport d'hydrocarbures. *Alcanivorax*, *Cycloclasticus*, *Oleiphilus* et *Oleispira* sont par exemple quatre genres extrêmement compétitifs qui utilisent préférentiellement le pétrole plutôt que des sucres comme source de carbone (Harayama et *al.*, 2004 ; Kostka et *al.*, 2011).

La biodégradation totale d'un hydrocarbure pétrolier n'est donc possible que grâce à la mise en place d'un consortium bactérien (Mazzeo et *al.*, 2010), comprenant des groupes dont les équipements enzymatiques complémentaires permettent la dégradation quasi-totale de ces différents types d'hydrocarbures (Head et *al.*, 2006). Un consortium est constitué d'une collection de différentes populations occupant le même habitat et interagissant positivement ou négativement (Vandecasteele., 2008).

Dans un milieu pollué par de l'essence sans plomb, un consortium contenant des bactéries des genres *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Bulkholderia*, *Alcanivorax*, *Rhodococcus* et *Bacillus*, est capable de dégrader 95% des hydrocarbures BTEX présents dans le milieu (Morlett-Chavez et *al.*, 2010).

Il a été rapporté dans la littérature que plusieurs microorganismes (bactéries, levures et moisissures) ont le pouvoir de dégrader les hydrocarbures au sein d'un consortium où chaque membre contribuait selon ces capacités enzymatiques. Cependant l'action combinée de plusieurs souches peut arriver à dégrader presque tous les composants (Atlas et *al.*, 2011).

La souche FMB08 appartenant au genre *Pseudomonas* est pratiquement aussi efficace qu'un consortium bactérien. Lorsque ce dernier dégrade 90%, cette souche est en effet capable de biodégrader 85% des hydrocarbures BTEX dans les mêmes conditions (Morlett-Chavez et *al.*, 2010).

Il est à noter que l'utilisation de microorganismes autochtones évite les problèmes écologiques et éthiques associés à l'addition d'exogènes ou de microorganismes génétiquement modifiés (Pontes et *al.*, 2013).

La grande diversité bactérienne et la versatilité métabolique liée aux gènes de dégradation a permis à des microorganismes de coloniser l'ensemble des niches écologiques de la planète en s'adaptant aux changements environnementaux. Certaines bactéries possèdent par ailleurs la capacité d'adopter des formes de vie (spores, symbioses) tel *Bacillus sp.* (Dandie et *al.*, 2004) et des structures (biofilms, tapis microbiens) particulières leur permettant d'appréhender des contraintes environnementales plus ou moins extrêmes tel *Pseudomonas sp.* (Johnsen et *al.*, 2007).

Le recrutement des voies métaboliques, présentes dans le génome mais non exprimées, peut se faire par des événements de mutation ponctuelle, de réarrangement génétique ou de transposition (recrutement vertical) (Habe and Omori, 2003).

A partir des sols contaminés par les hydrocarbures, ont été identifiées des *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Sphingomonas*, *Acidovorax* et *Thiobacillus* (Popp et al., 2006).

Les *Pseudomonales* et surtout le genre *Pseudomonas*, sont très souvent dominants dans les sites contaminés aux hydrocarbures (Kaplan et Kitts, 2004 ; Evans et al., 2004). Ils ont servi de modèles pour étudier le métabolisme du naphthalène et du phénanthrène, car ils ont la capacité de dégrader de nombreux hydrocarbures aromatiques (Técher, 2011), les n-alcanes et les cycloalcanes (Vandecasteele, 2005a). Ils semblent, en effet, être impliqués dans les premières phases de procédés de bioremediation lorsque les polluants sont biodisponibles (Kaplan et Kitt, 2004).

La souche bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* est une espèce type (Singleton, 2008). Elle est capable de croître sur des composés organiques toxiques tels que les hydrocarbures aliphatiques et aromatiques (Kenneth, 2000). Outre son rôle dans l'environnement, elle suscite beaucoup d'intérêt en raison, de sa capacité à dégrader les hydrocarbures via les biosurfactants (rhamnolipides) qu'elle produit.

L'utilisation des biosurfactants, qui sont principalement produits par des micro-organismes se développant de manière aérobie (Mulligan et al., 2001), est une voie prometteuse pour la réhabilitation des sols pollués par les hydrocarbures aromatiques polycycliques.

*Pseudomonas putida* est décrite comme l'un des seuls microorganismes capable d'utiliser le benzène, le toluène, l'éthylbenzène, le phénol et d'autres composés aromatiques comme seule source de carbone et d'énergie (Mazzeo et al., 2010). D'autres *Pseudomonas* ont été détectées dans des sols contaminés par une pollution diffuse (Johnsen et al., 2002). *P. paucimobilis* est en effet capable de dégrader le phénanthrène. En plus de cette molécule, *Pseudomonas putida* dégrade le naphthalène (Seo et al., 2009). *P. putida* et *P. aeruginosa*, sont aussi connues pour leur faculté de chimiotactisme vis-à-vis des HAP (Grimm et Harwood, 1999). Enfin, *P. stutzeri* OX1 est l'une des rares souches capable d'effectuer sa croissance sur *o*-xylène, en plus du toluène (Vandecasteele, 2005).

Une autre Gammaprotéobactérie, *Stenotrophomonas*, est capable de dégrader le phénanthrène ainsi que des HAP de haut poids moléculaire comme le benzo[a]anthracène, le benzo[a]pyrène, le fluoranthène et le pyrène (Juhász et al., 2000).

En milieu marin, des bactéries du genre *Cycloclasticus*, ont été identifiées comme acteurs de la dégradation du naphthalène et du phénanthrène notamment (Geiselbrecht et al., 1996)

Des Alphaprotéobactéries : ce sont les Sphingomonades qui sont capables de dégrader un large spectre de composés aromatiques (Leys et al., 2004). Ils ont été isolés ou détectés dans des sols fortement contaminés aux hydrocarbures. Les Sphingomonadaceae comprennent plusieurs genres appelés *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium*, et *Sphingopyxis* (Bastiaens et al., 2000).

Le genre *Sphingomonas* est connu pour ses capacités à dégrader et à utiliser comme substrat de croissance des xénobiotiques récalcitrants comme le dibenzo-*p*-dioxine, le dibenzofurane, le diphénylether et ses dérivés halogénés (White et al., 1996).

Plusieurs espèces de Betaprotéobactéries sont aussi capables de se développer sur naphthalène ou phénanthrène (Johnsen et al., 2002). La famille des Burkholderiales est la plus représentée à ce jour.

Les bactéries Gram+, et plus particulièrement celles appartenant au phylum des Actinobactéries, sont aussi impliquées dans la dégradation des hydrocarbures. Les *mycobactéries*, genre le plus étudié, sont capables de se développer en utilisant le phénanthrène, l'anthracène ou le pyrène comme uniques sources de carbone et sont aussi impliquées dans la dégradation d'HAP de haut poids moléculaire, comme le fluoranthène et le benzo[a]pyrène. Ces microorganismes ont été détectés dans des environnements à pollution diffuse, avec une faible concentration et une faible biodisponibilité en HAP. Ils produisent dans leur paroi externe des acides mycoliques, acides gras alkylés et hydroxylés, qui forment une couche quasi cristalline protégeant la cellule de la toxicité des polluants. La présence de cette barrière de protection associée à la fluidité de leur bicouche lipidique sert aussi à l'internalisation des HAP (Jouanneau et al., 2011; Leys et al., 2005).

D'autres actinobactéries, du genre *Arthrobacter* ou *Nocardioides*, sont capables de dégrader les HAP de faible poids moléculaire tels que le naphthalène, le phénanthrène, l'anthracène, le fluorène. La souche *Rhodococcus sp.* UW1, isolée sur pyrène, utilise, quant à elle, le phénanthrène, l'anthracène, le fluoranthène et le chrysène comme sources uniques de carbone et d'énergie. Cette souche est aussi capable de co-métaboliser le naphthalène et le fluorène notamment (Walter et al., 1991).

Des bactéries inconnues jusque là et appartenant aux Alpha, aux Beta et aux Gamma protéobactéries sont impliquées dans le métabolisme du pyrène (Singleton et *al.*, 2006). Enfin, quand le pyrène et le phénanthrène sont simultanément présents, *Acidovorax* métabolise le phénanthrène, mais pas le pyrène.

Rappelons que certaines bactéries peuvent dégrader plusieurs fractions ou toute une classe des hydrocarbures. Cependant l'action combinée de plusieurs souches bactériennes peut arriver à dégrader presque tout les composants (Atlas et *al.*, 2011).

## **14.2. Les champignons microscopiques ou fungi**

Les champignons ont la double particularité de posséder une grande capacité à se propager et des équipements enzymatiques capables de dégrader un large spectre de molécules polluantes (Cerniglia, 1992). La capacité de se développer sur les hydrocarbures ne se limite pas uniquement aux bactéries, certains sites contaminés contiennent également de nombreux champignons et levures capables de les dégrader (Klug et Markovetz, 1971; Blasig et *al.*, 1984; Meulenberg et *al.*, 1997; Yamada-Onodera et *al.*, 2002).

Les champignons constituent une des lignées les plus diverses des Eukaryota (Blakwell, 2011) et sont perçus comme un des groupes les plus importants en raison de leurs fonctions vitales aux écosystèmes (Mueller et Schmidt, 2007). Parmi les micromycètes les plus actifs dans la dégradation des produits pétroliers, ceux appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Trichoderma*, *Gongronella* et *Fusarium* (Cao et *al.*, 2009; Chaineau et *al.*, 1995; Leahy et Colwell, 1990); *Mucor*, *Rhodotorula*, *Candida* et *Sporobolomyces* (Atlas et Bartha, 1992; Sarkhoh et *al.*, 1990), ainsi que *Absidia fusca* (Villemain et *al.*, 2006).

Le rejet des produits pétroliers dans les milieux marins ou terrestres entraîne une prolifération des microorganismes aptes à se développer sur les hydrocarbures et leurs produits de dégradation. Leur nombre est beaucoup plus important dans les zones polluées de façon chronique et s'accroît après un apport d'hydrocarbures dans les sites dépourvus de contamination (Atlas, 1981; Floodgate, 1984).

La majorité des champignons est capable d'attaquer les HAP de haut poids moléculaire produisant des intermédiaires plus solubles et plus réactifs, qui sont potentiellement métabolisables par certaines bactéries aérobies (Boonchan et *al.*, 2000). Ils préfèrent les environnements acides et leur activité enzymatique extracellulaire leur



confère un avantage indéniable sur les bactéries en ce qui concerne la dégradation des hydrocarbures peu ou pas bio-disponibles.

Les champignons non lignolytiques tels que *Cunninghamella elegans*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium janthinellum*, *Syncephalastrum sp* et *Saccharomyces cerevisiae* peuvent transformer une variété d'hydrocarbures polyaromatiques; y compris le pyrène, le chrysène, et le benzo[a]pyrène en métabolites polaires. En effet, une étude a montré la capacité de la souche *Aspergillus niger* à transformer le pyrène et le phénanthrène en 1-méthoxypyrène et 1-méthoxyphénanthrène. L'attaque initiale des HAP est catalysée par le biais d'une monooxygénase. (Boonchan et al., 2000).

Toutefois, Salicis et al., (1999) et Ravelet et al., (2000) ont récemment montré la capacité de certains Deutéromycètes tel que *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* et *Rhizopus sp.* à utiliser le fluoranthène et le pyrène comme seules sources de carbone et d'énergie. *Fusarium solani*, un champignon imparfait ou Deutéromycète, est capable de dégrader efficacement une large gamme d'HAP de 2 à 7 cycles. Les taux de dégradation sont respectivement de 84, 70, 58, 34 et 40 % pour l'anthracène, le pyrène, le benzo[a]pyrène, le benzo[ghi]pérylène et le coronène. Quand *Fusarium solani* est cultivé sur un milieu synthétique contenant un des HAP comme substrat, des vésicules fluorescentes sont observées à l'intérieur des hyphes indiquant le prélèvement et le stockage des HAP (ou l'un de leurs métabolites) par ce champignon.

Les champignons filamenteux lignolytiques représentent la première source du monde microbien d'enzymes performants. Lorsqu'ils sont cultivés en conditions limitées en carbone, en azote ou en soufre, les champignons lignolytiques produisent des enzymes extracellulaires. Parmi elles, il y a des lignines peroxydases [LiP] qui permettent l'attaque de la structure aromatique de la lignine et également le manganèse peroxydases [MnP]. Ces enzymes sont présumées être impliquées dans le processus de dégradation des HAP.

Certains champignons dits de la pourriture blanche (*Pycnoporus cinnabarinus*, *Bjerkandera adusta* et *Pleurotus ostreatus*) produisent, les laccases (protéines), (Mercier, 1998 ; Rama et al., 1998) pour faciliter la dégradation des produits pétroliers. Le mieux et plus étudié pour ses capacités de dégradation est *phanerochaete chrysosporium* (Boonchan et al., 2000). Ce basidiomycète de type pourriture blanche a la capacité de dégrader une grande variété de polluants persistants dans l'environnement comme les HAP, les biphényles

polychlorés ou les pesticides, qui peuvent être complètement éliminés. Cette capacité de dégradation serait reliée au système d'enzymes lignolitiques extracellulaires secrétées dans l'environnement (Kanaly et Hur, 2006).

L'espèce fongique *Dothideomycetespa* été observée dans des sédiments pollués par les HAP à une fréquence plus élevée, ce qui suggère que ce groupe a pu jouer un rôle dans la biodégradation (Mahmoudi et al., 2013).

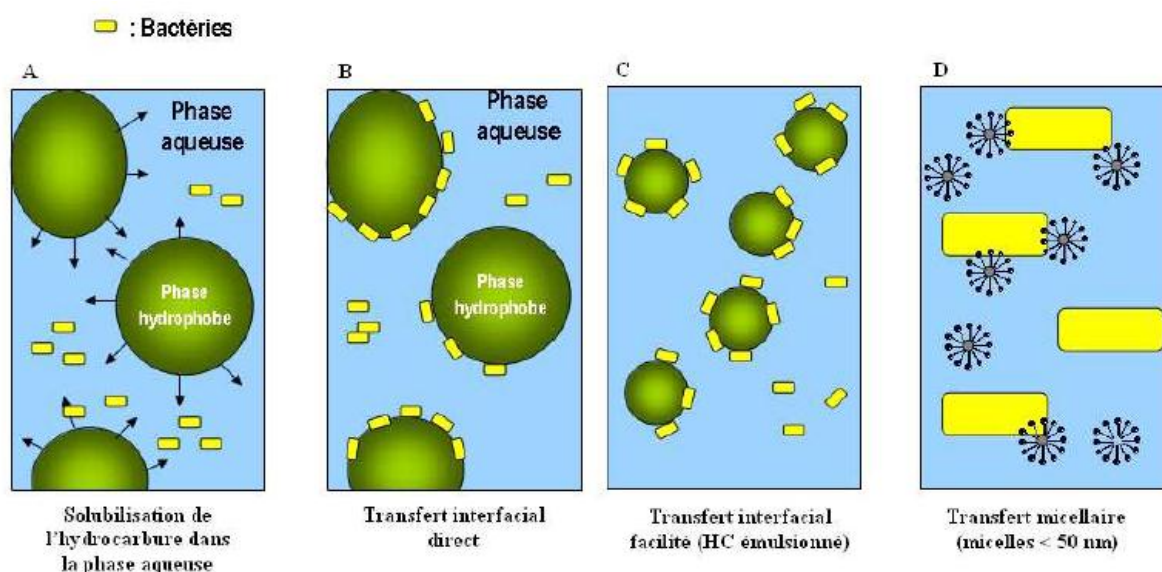
Le champignon *Cunninghamella elegans* a également été beaucoup étudié sur le naphtalène, le biphényle, le phénanthrène (Sutherland et al., 1993), car il oxyde ces HAP jusqu'aux métabolites formés chez les mammifères.

Malgré le fait que l'utilisation des levures dans le domaine de la biotechnologie environnementale est peu répandue, les premières études à s'intéresser à la capacité des levures à assimiler des hydrocarbures remontent au début des années quarante. En 1939, Tausson fut le premier à présenter des résultats sur l'utilisation des hydrocarbures par plusieurs espèces de levures telles que *Debaryomyces*, *Endomyces*, *Hansenula*, *Torulopsis* et *Monilia* (Komagata et al., 1964). Par la suite, *Torulopsis colliculosa*, *Candida tropicalis* et *lipolytica*, quelques *Saccharomyces* et certains *Trichosporon* ont montré une capacité d'assimiler les hydrocarbures. Une recherche préliminaire effectuée par Komagata et al. (1964) sur une grande variété de levures, soit 498 souches, souligna entre autre que presque toutes les levures du genre *Candida* sont en mesure d'utiliser le kérosène. Il est bien établi que les levures, incluant les espèces aquatiques, utilisent des hydrocarbures particulièrement les alcanes comme source de carbone pour la croissance (Phaff et al., 1978). À ce jour, la littérature ne regorge pas d'articles sur la contribution des levures dans la biodégradation des hydrocarbures dans l'environnement mais la diversité métabolique de ces organismes suggère un rôle plus important qu'on le croyait. Cela laisse donc une opportunité pour trouver des moyens simples et efficaces d'utiliser les levures comme agents de dépollution de divers effluents industriels.

## **15. Accession des microorganismes aux hydrocarbures**

Certains microorganismes utilisent les hydrocarbures comme source de carbone pour leur croissance. De ce fait, ils se sont adaptés en termes de résistance et d'équipement enzymatique pour utiliser ce type de substrat. Les hydrocarbures sont des composés hydrophobes dont la solubilité diminue à mesure que la masse moléculaire des composés augmente. Pour les hydrocarbures dont la solubilité est faible (< 0,1g/l), les microorganismes

ont développé des stratégies pour venir au contact du substrat. Quatre modes d'accession, illustrés dans la figure 39, ont été avancés pour expliquer l'assimilation des hydrocarbures par les microorganismes (Bouchez-Naitali *et al.*, 1999; Hommel, 1994).



**Figure.39.** Les mécanismes d'accession des microorganismes aux hydrocarbures (Vandecasteele, 2005)

### 15.1.L'assimilation des hydrocarbures solubles

L'assimilation en phase aqueuse a surtout été rapportée pour les hydrocarbures aromatiques suffisamment solubles et les alcanes légers (Bouchez *et al.*, 1995; Goswami et Singh, 1991). C'est sous forme solubilisée que le substrat pénètre dans la cellule.

### 15.2.L'accession interfaciale

Les micro-organismes utilisant les alcanes peu solubles possèdent fréquemment une membrane externe hydrophobe (Rosenberg, 1986). L'hydrophobicité élevée de cette enveloppe permet l'adhésion du microorganisme aux gouttelettes de substrat présentes dans le milieu aqueux, souvent de taille très supérieure à celle des bactéries. Le substrat pénètre directement dans la cellule par diffusion ou transport actif sans dissolution préalable dans la phase aqueuse. L'hydrophobicité des microorganismes concernés entraîne souvent une forte tendance à l'agrégation.

### 15.3.L'accession interfaciale facilitée (émulsification)

Dans ce cas, l'intervention de biosurfactants produits par les microorganismes accélère le transfert des hydrocarbures en augmentant l'aire interfaciale entre les phases hydrophobe et

hydrophile. On parle de transfert interfacial assisté. L'action des biosurfactants est souvent complexe. Ils participent au pseudo solubilisation des alcanes nécessaires à la croissance tout en restant associés aux cellules bactériennes pendant la croissance, puis sont libérés massivement lorsque le microorganisme a cessé toute croissance (Singer et Finnerty, 1984).

#### **15.4. Le transfert micellaire**

Différents auteurs ont montré que la solubilité apparente des *n*-alcanes était très largement supérieure à celle mesurée dans l'eau dans les cultures de levures sur *n*-alcanes (Roy *et al.*, 1978) ou sur HAP (Kim *et al.*, 2001). Cette augmentation de la solubilité apparente est liée à la formation d'une microémulsion résultant du pseudo solubilisation des hydrocarbures par des biosurfactants produits par le microorganisme. Les micelles ainsi formées, de taille très inférieure aux bactéries, entrent en contact avec la cellule. Le mécanisme de transfert à travers l'enveloppe cellulaire n'est en réalité pas connu. Une protéine de transport membranaire AlkL a été cependant mise en évidence (van Beilen *et al.*, 1992).

Hommel (1994) a formulé une hypothèse sur l'existence des pores hydrophobes au niveau de l'enveloppe bactérienne. Il faut noter que la surface externe d'une micelle est majoritairement hydrophile et le transfert micellaire apparaît privilégié chez les microorganismes dont l'hydrophobicité de l'enveloppe micellaire est faible (Bouchez-Naitali *et al.*, 1999). Les interactions hydrophobes entre substrat et cellule microbienne sont d'ailleurs complexes car les biosurfactants produits sont susceptibles d'affecter l'hydrophobicité cellulaire. En effet, le rôle physiologique des biosurfactants est multiple. Ils interviennent dans la formation de micro colonies, ils facilitent l'association en surface des bactéries et de part ce fait la formation d'agrégats, ils assurent la formation d'une structure de type filamenteuse et jouent un rôle dans la dispersion des biofilms (Pamp et Tolker-Nielsen, 2007).

#### **16. Les voies biologiques de dégradation des hydrocarbures**

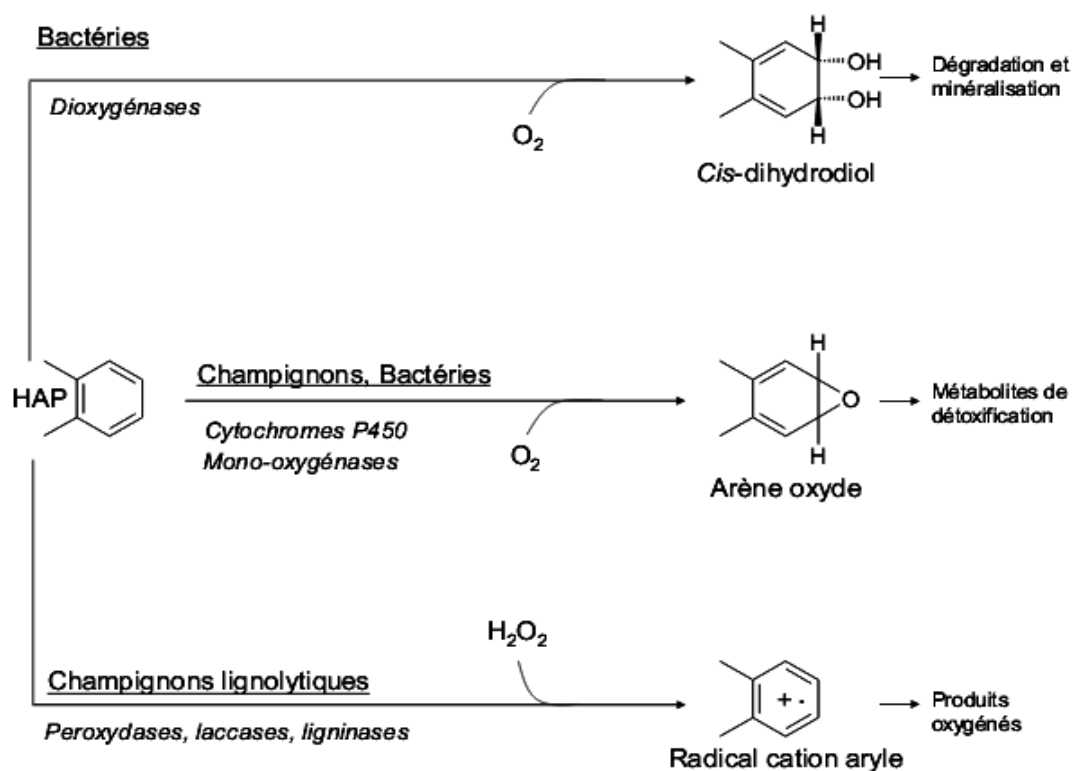
Plusieurs familles d'hydrocarbures regroupent des composés pétroliers, parmi lesquels, des alcanes linéaires, ramifiés, cycliques et des composés mono- et poly- aromatiques. D'un point de vue chimique, les hydrocarbures sont des molécules relativement stables. Cependant, ils sont énergétiquement riches et représentent des sources potentielles de carbone et d'énergie importantes pour les microorganismes, à condition qu'ils soient activés au préalable (Widdel et Musat, 2010). Cette étape initiale fait intervenir une grande diversité d'enzymes qui diminuent la barrière énergétique de la réaction. L'oxydation aérobie des hydrocarbures avec le dioxygène comme accepteur d'électron et co-substrat d'activation,

fournit la plus grande quantité d'énergie d'un point de vue biochimique (Widdel et Musat, 2010).

Suite à la pénétration des hydrocarbures au sein des cellules des microorganismes, la machinerie enzymatique dédiée à la dégradation de ces composés peut s'enclencher. Il existe ainsi une grande diversité de voies métaboliques aérobies et anaérobies des hydrocarbures. Cependant, l'attaque initiale est un indicateur précis de la voie métabolique mise en jeu (Cerniglia, 1992; Vandecasteele, 2005). Les principaux types d'attaque, au nombre de trois, impliquent soit des dioxygénases, soit des mono-oxygénases, soit des ligninases (Fig.40.).

Les réactions d'oxydation sont majoritairement représentées par les mécanismes d'hydroxylation, déalkylation, époxydation et sulfoxydation. Ces systèmes réactionnels sont généralement catalysés par les familles d'enzymes suivantes : les mono et di-oxygénases, les laccases et les peroxydases. La position des substituants a également un impact important sur la biodégradation de la molécule (Baker et Mayfield, 1980).

Généralement, les n-alcanes sont les plus rapidement biodégradés, puis suivent les alcanes ramifiés. Par contre, les cyclanes et les aromatiques sont plus résistants aux attaques bactériennes (Asia, 2012).



**Figure.40.** Etapes initiales des mécanismes de biodégradation des HAP (Haristah et Kaushik, 2009)

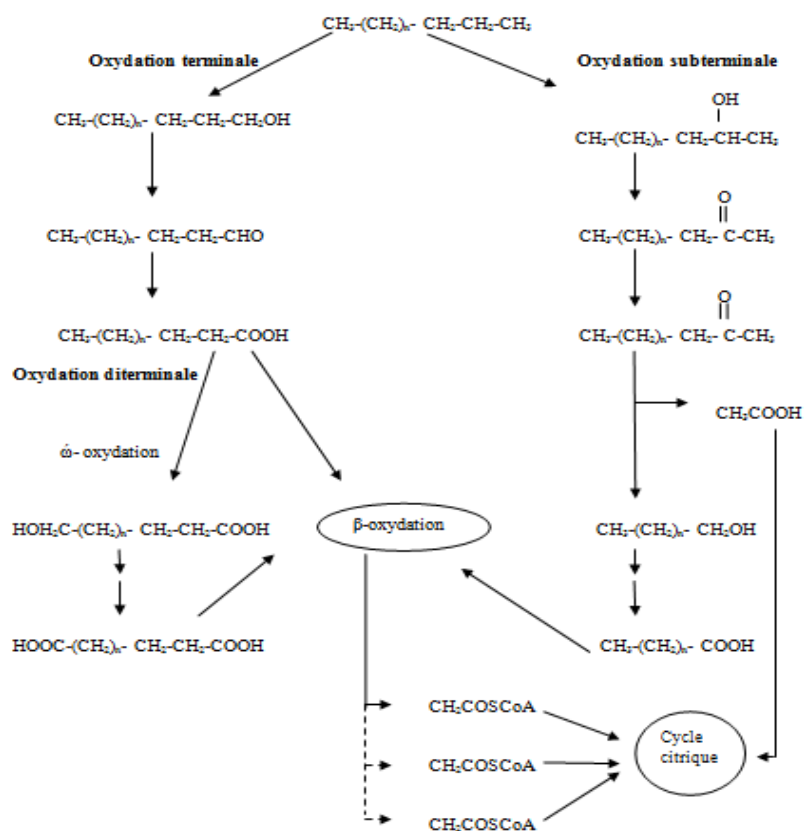
## 16.1. Voies biologiques aérobies

### 16.1.1. Les bactéries

#### 16.1.1.1. Biodégradation aérobie des hydrocarbures saturés

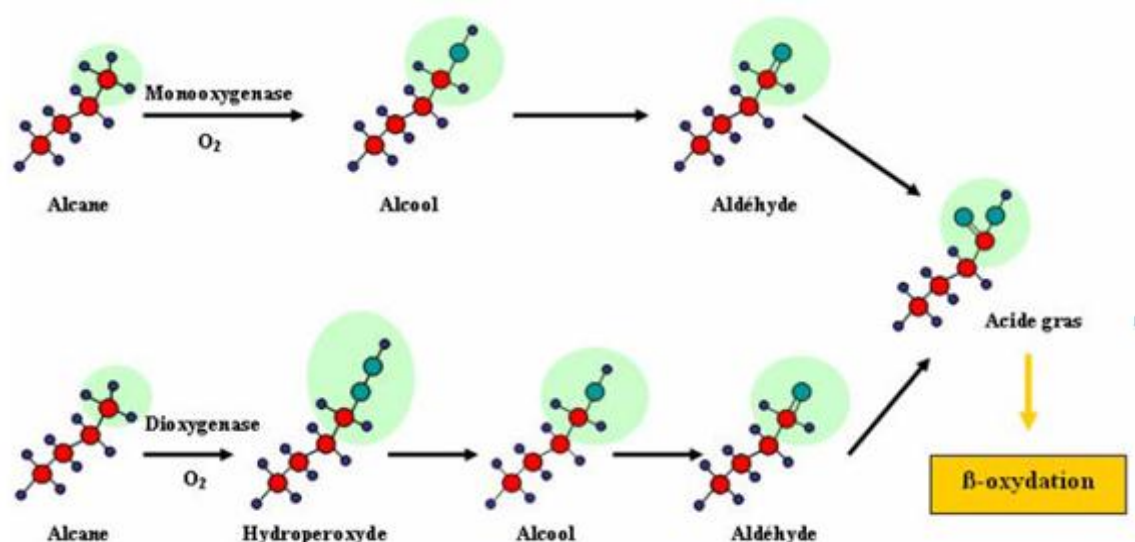
Selon Parales et *al.* (2000), la biodégradation des hydrocarbures saturés est essentiellement un processus aérobie réalisé par des bactéries. Les alcanes à chaîne moyenne (C5-C10) sont utilisés notamment par des espèces de bactéries du genre *Pseudomonas* comme *P.aeruginosa*, *P. putida* et *P. oleovorans* qui ont été particulièrement étudiées (Kaistner et *al.*, 1994 ; Vandecasteele, 2005). Les alcanes à chaîne longue (C10-C20) sont très bien utilisés par les microorganismes, plus rapidement que les alcanes moyens (Britton, 1984). Ils contribuent à la formation de films d'hydrocarbures (Leahy et Colwell, 1990). Les bactéries remplissant ce rôle appartiennent en particulier aux groupes des *Corynebacterium*, *Mycobacterium* et *Nocardia* (CMN); notamment au genre *Rhodococcus*, c'est le cas de la souche *Rhodococcus* Q15 capable d'utiliser une large gamme des alcanes (C10 à C21) et à des températures allant de 0°C à 30°C, (Whyte et *al.*, 1998). De plus, les alcanes à très longue chaîne (>C20) sont également dégradés par les microorganismes, mais l'utilisation de ces substrats solides à température ambiante a été moins étudiée (Ballerini et Vandecasteele, 1999). En revanche, les alcanes de plus courte chaîne sont toxiques et plus difficilement biodégradables, ils agissent comme des solvants vis-à-vis des membranes (Watkinson et Morgan, 1990).

Trois voies de dégradation des *n*-alcanes ont été clairement élucidées : il s'agit de l'oxydation monoternale, subterminale (Whyte et *al.*, 1998; McDonald et *al.*, 2006) ou diterminale (Bertrand et Mille, 1989) (fig.41.). Ces réactions sont réalisées par des cytochromes P<sub>450</sub>, des méthanes monooxygénases et des systèmes d'hydroxylases à fer non hémique dits alcane hydroxylase (Teramoto et *al.*, 2009; Obayori et *al.*, 2009 ; van Beilen et *al.*, 2001).



**Figure.41.** Les voies métaboliques de dégradation des *n*-alcane et *iso*-alcane (Ballerini et Vandecasteele, 1999 ; van Beilen et *al.*, 2003)

En général, la biodégradation est amorcée par l'introduction d'un atome d'oxygène sur la chaîne aliphatique via l'action d'une alcane-1-monooxygénase pour former un alcool primaire puis de l'aldéhyde par une alcool déshydrogénase et enfin de l'acide carboxylique par une aldéhyde déshydrogénase (Bianchi et *al.*, 1988). Il faut aussi noter que d'autres voies alternatives existent impliquant des enzymes telles la dioxygénase ou la cis-desaturase lors des premières étapes de la voie de dégradation (Van Hamme *et al.*, 2003) (Fig.42.). Lors de l'oxydation subterminale, l'alcane est oxydé en alcool secondaire puis en méthyl-cétone, elle-même dégradée en ester par une réaction de type « Baeyer-Villiger », impliquant une monooxygénase. L'ester s'hydrolyse ensuite en alcool, puis s'oxyde en aldéhyde, puis acide. L'acide carboxylique ainsi formé peut être oxydé par  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\omega$ -oxydation; les composés formés pourront par la suite être incorporés aux lipides cellulaires et une élongation de la chaîne carbonée est alors possible (van Beilen et *al.*, 2003).



**Figure.42.** Biodégradation aérobie des alcanes (Maier et *al.*, 2000)

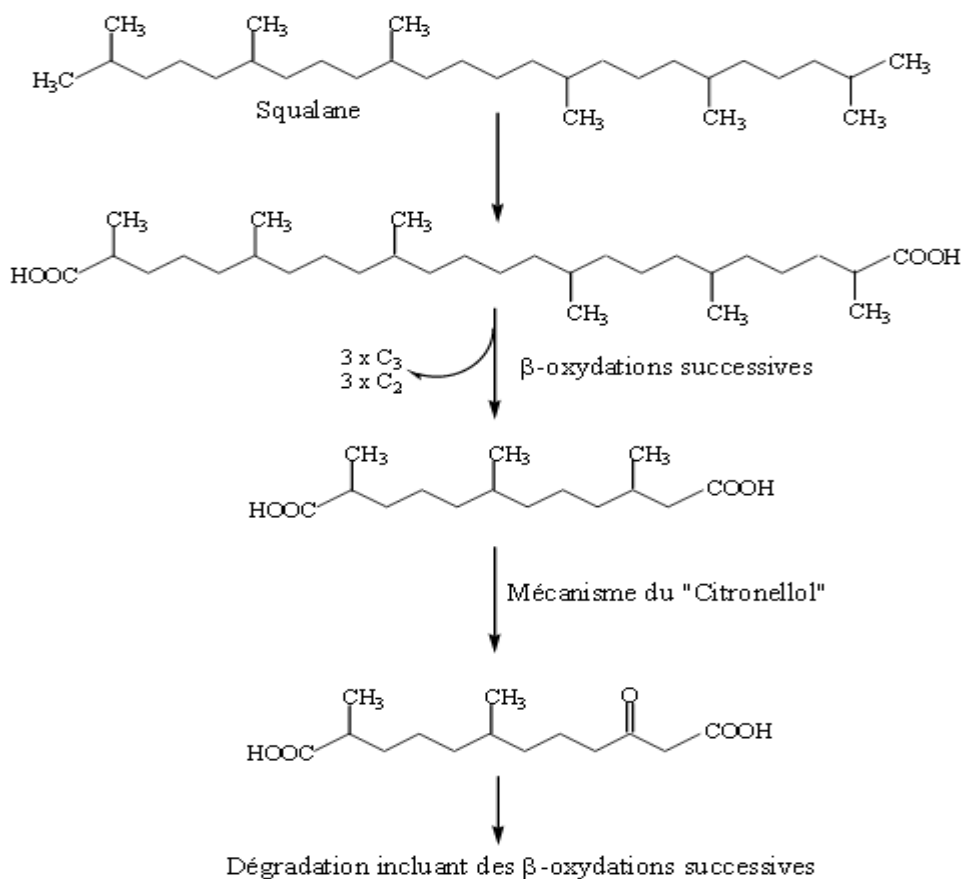
Les alcanes ramifiés sont généralement moins sensibles à la biodégradation, ce qui peut provoquer leur accumulation dans l'environnement.

L'oxydation des alcanes ramifiés commence généralement par le groupement méthyle terminal le plus éloigné de la ramification (Ballerini et Vandecasteele, 1999), et l'acide gras formé est ensuite incorporé dans les lipides cellulaires. Par  $\beta$ -oxydation, la dégradation peut se poursuivre jusqu'à la ramification où une  $\omega$ -oxydation sera alors nécessaire pour une minéralisation complète de l'alkane.

Les voies de dégradation semblent similaires à celles intervenant lors de la biodégradation des alcanes linéaires, si le substituant méthyle est présent sur un carbone en position paire. Des produits d'oxydation monoterminale (Nakamiya et *al.*, 1985), diterminale et subterminale (Alvarez et *al.*, 2001) de la dégradation du pristane ont été identifiés. L'acide ou le diacide, formé après activation en acyl-CoA, peut être dégradé par  $\beta$ -oxydation. Une autre voie de dégradation identifiée chez certaines bactéries, ou la voie métabolique passe alors par la voie dite de citronnelleol; c'est le cas de *Pseudomonas citronellois*.

Berekaa et Steinbüchel (2000) ont isolé deux souches *Mycobacterium*: *M. fortuitum* et *M. ratisbonense*, capables d'utiliser l'alkane ramifié le squalane (2,6,10,15,19,23-hexaméthyltétracosane) et son hydrocarbure parent insaturé le squalène comme source unique de carbone. Une partie du mécanisme de dégradation de ce composé correspond à celle du pristane et une autre partie correspond à la voie de Citronellool (Fig.43.).





**Figure.43.** Voie métabolique de la dégradation du squalane par *Mycobacterium fortuitum* et *M.ratisbonense* (Berekaa et Steinbüchel, 2000).

Plusieurs systèmes enzymatiques peuvent être impliqués dans l'étape initiale d'oxydation des alcanes. Les différentes classes d'enzymes impliquées dans la dégradation des *n*-alcanes sont présentées dans le tableau ci-dessous.

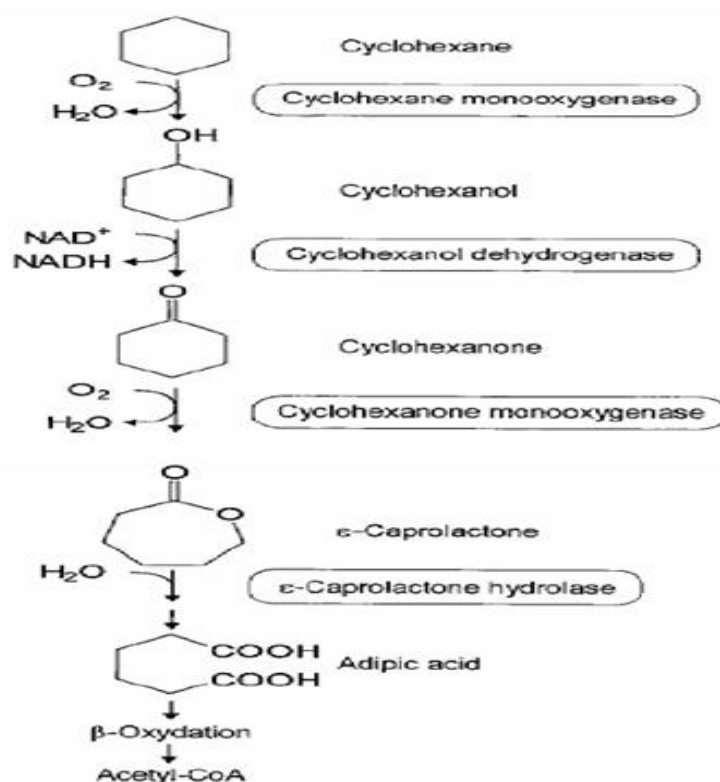
**Tableau.11.** Enzymes capables d'oxyder les alcanes (van Beilen et Funhoff, 2005).

Classe d'enzyme	Composition et cofacteurs	Présents chez	Substrats
Classe I P <sub>450</sub> (CYP 153)	P <sub>450</sub> oxygénase : P <sub>450</sub> Ferrodoxine : [2Fe-2S] Ferrodoxine réductase: FAD, NADH	<i>Sphingomonas sp. HXN-200</i> <i>Mycobacterium sp. HXN-1500</i> <i>Actinobacter sp EB104</i>	C4 - C16
Classe II P <sub>450</sub> (CYP 52)	Oxygénase: P <sub>450</sub> Réductase : FAD, NADH, NADPH	<i>Candida maltose</i> , <i>Candida iropicalis</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>	C10 - C16
Classe II P <sub>450</sub> (CYP2E,CYP4B )	Oxygénase: P <sub>450</sub> Réductase : FAD, NADH, NADPH	Les humains et les lapins	C6 - C16
Membrane alkane hydroxylase	Membrane hydroxylase : à fer non hémique Rubredoxine : iron Rubredoxine réductase: FAD, NADH	<i>Acinetobacter</i> , <i>Alcanivorex</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhodococcus</i>	C5 - C16
Soluble méthane monooxygénase	Hydroxylase : à fer non hémique Réductase : [2Fe-2S], FAD, NADH Sous unité de régulation	<i>Methylisinus trichosporium</i> OB3B <i>Methylococcus capsulatus</i> (Bath)	C1 - C16
méthane monooxygénase	Hydroxylase : à fer non hémique	Tous les méthanotrophes connus	C1 – C5
Propane monooxygénase	Réductase : NADH Regulatory subunit	<i>Gordonia sp</i> TY-5	C3, C13–C22
Butane monooxygénase	Hydroxylase : à fer non hémique Réductase : [2Fe-2S], FAD, NADH Sous unité de régulation	<i>Pseudomonas butanovora</i> ATCC43655	C2 – C8
P <sub>450</sub> cam	P <sub>450</sub> Oxygénase: P <sub>450</sub> Putidaredoxine: [2Fe-2S] Putidaredoxine réductase: FAD, NADH	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 29607	C3 - C10
P <sub>450</sub> BM-3	Polypeptide : FAD, FMN, NADPH	<i>Bacillus megaterium</i> ATCC14581	C3 – C8

A la différence des alcanes, les alcènes présentent une double liaison susceptible, comme les groupements méthyle et méthylène, d'attaque par une monooxygénase. L'oxygénation d'une double liaison conduit à la formation d'un époxyde. Cependant, différentes voies de biodégradation des alcènes terminaux (époxydation, hydroxylation terminale ou subterminale), ont été proposées.

De nombreuses études de biodégradation des cycloalcanes, utilisent le cyclohexane comme composé modèle. Sa dégradation nécessite une première étape d'hydroxylation du noyau et insertion d'oxygène par une réaction de type Baeyer-Villiger sur la cétone cyclique (McDonald et al., 2006). Le lactone formé à ce stade se clive spontanément ou est métabolisé enzymatiquement (fig.44.)

Plusieurs auteurs s'accordent pour avancer que l'on n'isole pas de souches pures utilisant le cyclohexane comme seule source de carbone et d'énergie mais de cultures mixtes. Certaines impliquant des relations de cométabolisme ou de mutualisme. Le point remarquable dans la voie de la dégradation suivie est l'étape d'oxygénation du cycle pour former le  $\epsilon$ -caprolactone. La monooxygénase impliquée est une simple flavoprotéine à FAD a été caractérisée chez *Acintobacter* et *Pseudomonas*.



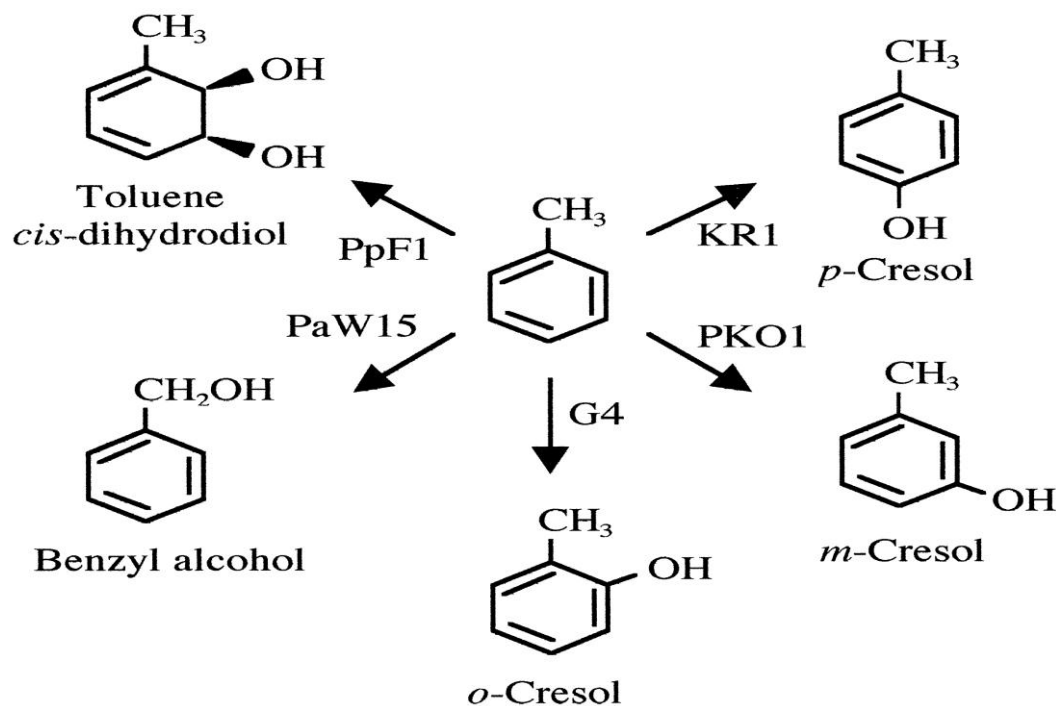
**Figure.44.** Voies métaboliques impliquées dans la dégradation du cyclohexane (Sayyed et Patel. 2011).

### 16.1.1.2. Biodégradation aérobie des hydrocarbures aromatiques

La dégradation des hydrocarbures monoaromatiques est essentiellement le fait de bactéries Gram-négatif (*Pseudomonas* et *Burkholderia*) et Gram-positif du groupe *Corynebacterium*, *Mycobacterium* et *Nocardia* (Parales et al., 2000 ; Chablain et al., 2001 ; Suenaga et al., 2001).

Les études portant sur la biodégradation des hydrocarbures monoaromatiques tels que les BTEX (benzène, toluène éthylbenzène et xylène), montrent que le toluène est l'hydrocarbure le plus facilement dégradé, suivi dans l'ordre par le *p*-xylène, le *m*-xylène, le benzène, l'éthylbenzène et le *o*-xylène (Cao *et al.*, 2009).

Plus précisément, cinq voies métaboliques ont été identifiées concernant la biodégradation du toluène en milieu aérobie. Toutes les voies démarrent avec une oxydation, mais cinq produits différents sont formés (Fig.45.).



**Figure.45.** Les différents produits issus de l'oxydation du toluène par *P. putida*, F1, *P. putida*, PAW15 (a leucine auxotrophe de la souche mt-2), *Burkholderia cepacia* G4, *Ralstonia pickettii*, PKO1 et *Pseudomonas mendocina* KR1. (Parales *et al.*, 2000)

La première voie de dégradation consiste en l'oxydation du substituant alkyle et la production d'un composé di-hydroxylé. Suite à une fission du cycle aromatique, on obtient des intermédiaires du cycle de Krebs (Harayama *et al.*, 1999). Les quatre autres voies débutent par l'hydroxylation du cycle aromatique. Les di-oxygénases (appelée généralement dans la littérature ring-hydroxylating dioxygenase), attaquent les cycles aromatiques et produisent des composés di-hydroxylés alors que les mono-oxygénases produisent des oxydes d'arène. Ceux-ci sont très instables et convertis en phénols. Parfois soumis à de nouvelles mono-oxygénations, ils peuvent être convertis en catéchols. La formation de catéchol permet alors l'ouverture d'un cycle. Les souches débutant la dégradation du toluène par une

hydroxylation ont une croissance plus rapide que les souches débutant par l'oxydation du groupe méthyle (Cao et *al.*, 2009).

Il est très difficile de traiter certains milieux très concentrés en hydrocarbures aromatiques polycycliques de haut poids moléculaires comme ceux possédant plus de 5 anneaux ; par exemple le benzo(a)pyrène, les hydrocarbures de haut poids moléculaires (>C40) et les polluants halogénés (Biphenylpolychloré, chlorodioxine, chlorofurane) ainsi que plusieurs composés chlorés comme les solvants. Tous ces produits sont encore considérés comme réfractaires à la biodégradation. Leur biotraitement nécessite des microorganismes spécifiquement adaptés à ce type de polluant et dans des conditions environnementales favorables à l'activité de ces derniers.

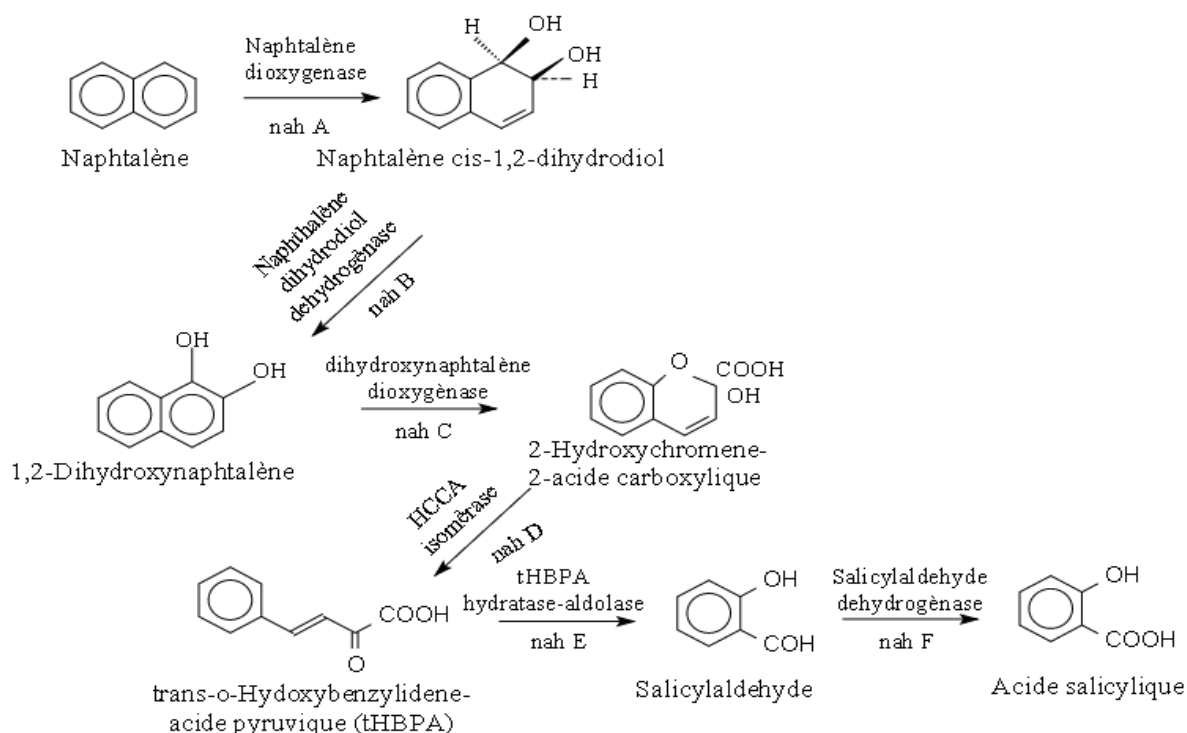
La plupart des voies cataboliques des hydrocarbures aromatiques convergent vers des intermédiaires hydroxylés tels que les catéchols ou leurs dérivés (protocatéchuate, gentisate). L'étape initiale d'attaque des hydrocarbures polyaromatique peut être réalisée via une monooxygénase, une dioxygénase, ou par oxydation du groupement substitué par l'action d'une monooxygénase (Gibson et Parales, 2000 ; Khan et *al.*, 2001).

Le métabolisme du naphthalène a été étudié de manière plus extensive que celui de n'importe quel autre hydrocarbure polyaromatique (Stolz, 2009). Utilisé comme source de carbone et d'énergie par de nombreux genres bactériens (*Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*,...etc.), le naphthalène est l'un des hydrocarbures polyaromatiques les plus simples et les plus solubles.

Ainsi, les voies métaboliques de dégradation par des souches de *Pseudomonas sp.* ont été les premières voies étudiées et sont très connues (Sutherland et *al.*, 1995). La figure 46 montre la voie métabolique de dégradation du naphthalène par *Pseudomonas sp.* et *Acinetobacter calcoaceticus*.

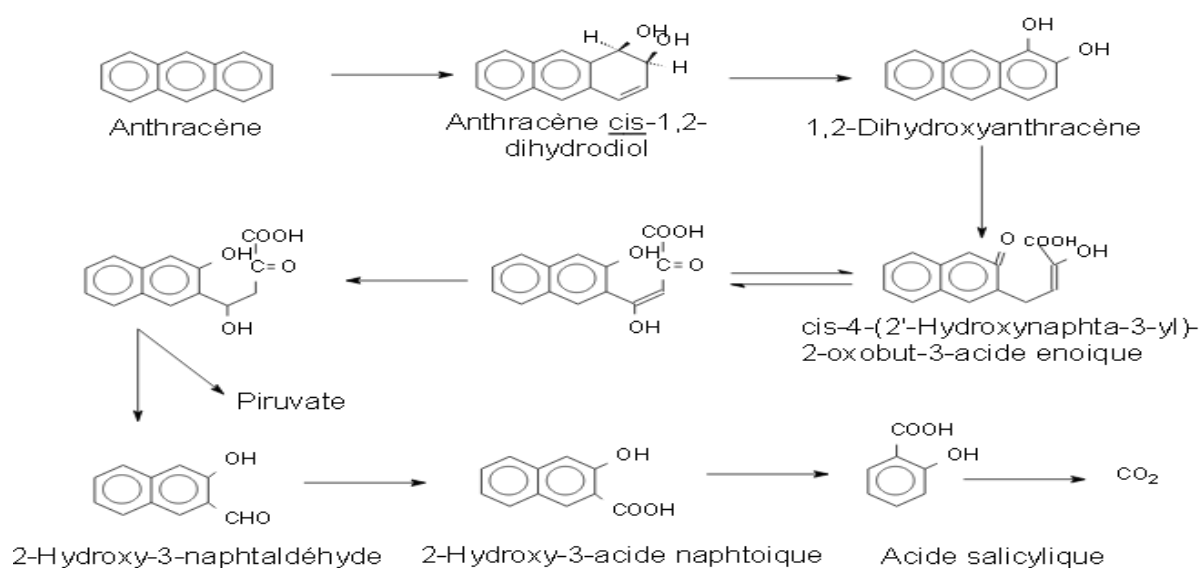
La première étape de la dégradation aérobie fait intervenir une dioxygénase qui oxyde l'un des cycles benzéniques pour former un cis-dihydrodiol (Cerniglia, 1992).

Les dihydrodiols sont ensuite transformés en biphenols, lesquels sont attaqués par d'autres dioxygénases. De la même manière, tous les cycles sont alors dissociés et dégradés les uns après les autres pour conduire à des intermédiaires à simple cycle, comme l'acide benzoïque, l'acide salicylique, l'acide phthalique ou le catéchol (Seo et *al.*, 2009).



**Figure.46.** La voie métabolique de dégradation du naphtalène par *Pseudomonas sp.* et *Acinetobacter calcoaceticus* (Sutherland et al., 1995).

Les voies de dégradation pour les hydrocarbures polyaromatiques avec trois cycles, comme l'acénaphthylène, le fluorène, l'anthracène et le phénanthrène suivent le même modèle avec action des dioxygénases pour former des dihydrodiols. L'anthracène est métabolisé par *Pseudomonas aeruginosa* selon le schéma illustré dans la figure.47.



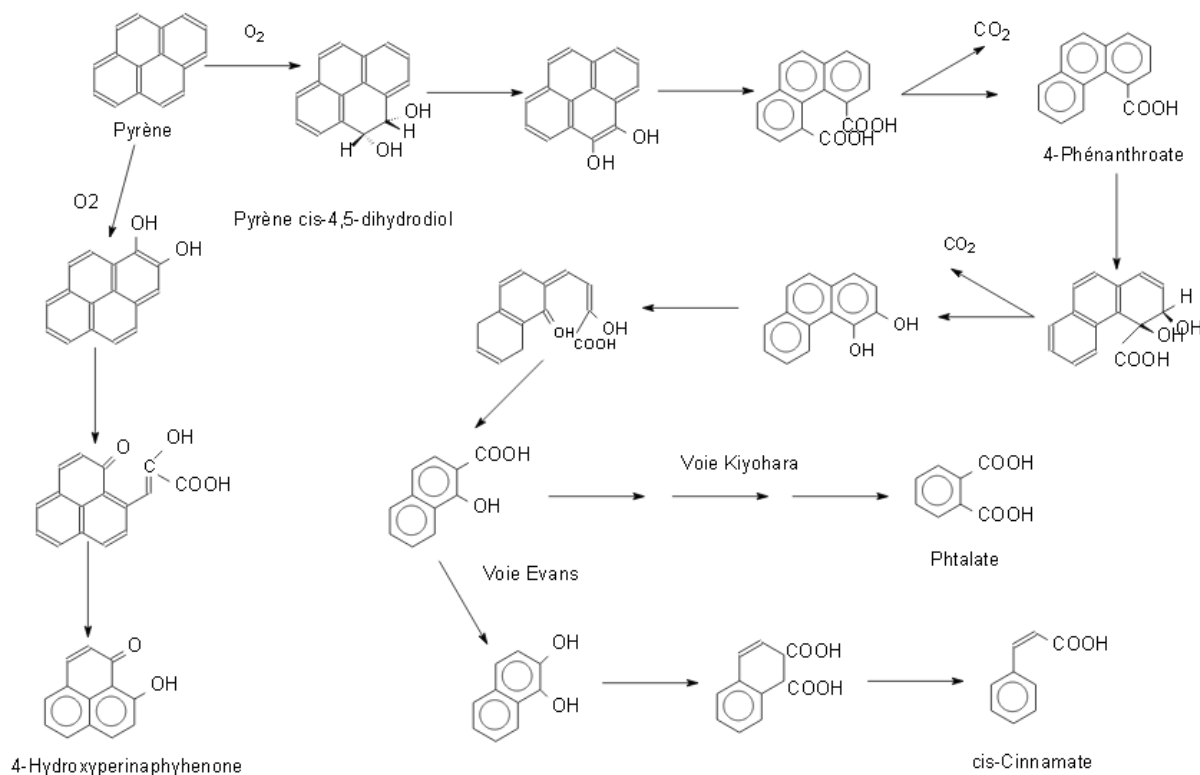
**Figure.47.** La voie aérobie de dégradation de l'anthracène par *Pseudomonas aeruginosa* (Sutherland et al., 1995).

Il arrive fréquemment qu'un produit de dégradation d'un HAP à grand nombre de cycles passe par la voie de dégradation d'un HAP à petit nombre de cycles. Ainsi certains produits de dégradation du phénanthrène vont pouvoir être dégradés via les enzymes de dégradation du naphthalène et donc, la voie du naphthalène. De plus, pour une grande majorité de bactéries, la dégradation du phénanthrène nécessite les mêmes étapes biochimiques, et souvent les mêmes enzymes que la dégradation du naphthalène (Mallick et al., 2007 ; Seo et al., 2009).

De nombreuses espèces Gram-positives et Gram-négatives ont été décrites pour leur aptitude à croître sur phénanthrène (Kang et al., 2003 ; Moody et al., 2001). Beaucoup de bactéries capables de dégrader le naphthalène ; sont également capables de dégrader le phénanthrène, et dans ce cas, les mêmes enzymes catalysent l'oxydation des deux substrats (Parales, 2003).

Actuellement, les voies de dégradation pour les hydrocarbures polycycliques de gros poids moléculaire tels que le fluoranthène, le pyrène, le benzo[a]anthracène, le chrysène, le benzo[a]pyrène ont été moins étudiées, relativement peu de données existent sur les bactéries qui sont capables de les dégrader (Juhász and Naidu, 2000 ; Rodriguez-Blanco et al., 2010), mais divers auteurs ont démontré que leurs voies métaboliques ressemblent à celles du naphthalène avec incorporation initiale d'une molécule de dioxygène par une dioxygénase suivie d'une dégradation en chaîne des cycles benzéniques (Pérez-Pantoja et al., 2010). La plupart des bactéries identifiées pour leur capacité de dégradation du pyrène sont des actinomycètes du genre *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Xanthomonas* ou *Stenotrophomonas*.

Les études les plus complètes ont été réalisées sur le genre *Mycobacterium* pour ces capacités à dégrader les HAP avec un grand nombre de cycles et donc les plus récalcitrants (Kim et al., 2006). La voie de dégradation du pyrène par *Mycobacterium spp* est similaire à celle du naphthalène et du phénanthrène (fig.48.), impliquant une dioxygénase. Cependant, beaucoup de métabolites intermédiaires ont pu être détectés, constituant parfois des impasses métaboliques.



**Figure.48.** La voie aérobie de dégradation bactérienne du pyrène par *Mycobacterium spp* (Sutherland et al., 1995).

Le benzo[a]pyrène est métabolisé avec difficulté, dû à sa faible solubilité dans l'eau, sa forte énergie de résonance et sa toxicité (Cerniglia, 1992). Kelley et al. (1993) ont montré que la dégradation du benzo[a]pyrène par *Mycobacterium sp*, en mélange avec six autres hydrocarbures polyaromatiques est insuffisante. *Sphingomonas paucimobilis* peut toutefois dégrader les hydrocarbures polyaromatiques de cinq cycles comme le dibenzo[a,h]anthracène et le benzo[b]fluoranthène avec des rendements respectifs de 7,5% à 33%. Selon, Lee et al. (2007), trois voies de dégradation du benzo[a]pyrène ont été mises en évidence.

### 16.1.2. Voies biologiques fongiques

Bien que moins étudiés que les bactéries dans le domaine de la biodégradation, les champignons apparaissent très intéressants pour la dégradation des HAP en particulier de hautes masses molaires (Cerniglia, 1992; Juhasz et Naidu, 2000; Zhang et al., 2006). Cette propriété est à mettre en lien avec les capacités métaboliques du règne fongique qui leur permettent de dégrader des molécules naturelles complexes (Bennett et al., 2002). En particulier, la faculté propre au règne fongique de dégrader la lignine, un polymère de structure complexe et aléatoire contenant des noyaux aromatiques, a orienté un grand nombre



de chercheurs vers l'étude des capacités des champignons lignolytiques à dégrader les HAP, on cite Mollea et *al.*, 2005; Hadibarata, 2009; Acevedo et *al.*, 2011).

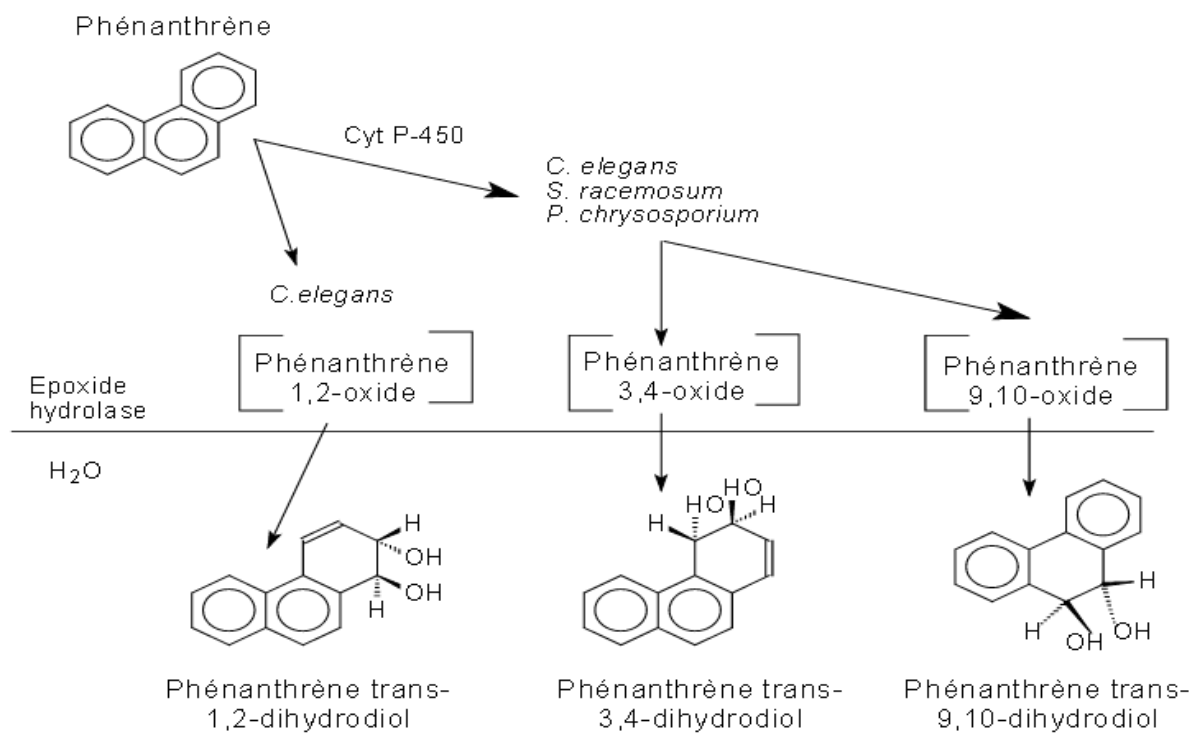
Les champignons peuvent transformer les hydrocarbures de façon cométabolique en métabolites moins toxiques par l'action de peroxydases et de monooxygénases (Boonchan et *al.*, 2000 ; Guermouche M'Rassi, 2014).

Parmi les voies d'attaque des HAP, il faut distinguer entre celles existant chez les champignons lignolytiques et celles des champignons non lignolytiques.

Deux voies d'attaques ont été décrites pour les champignons lignolytiques (comme *Phanerochaete chrysosporium* et *Pleurotus ostreatus*), l'une s'effectue par des monooxygénases qui forment des époxydes (souvent des cytochromes P<sub>450</sub>), l'autre par des enzymes lignolytiques, généralement extracellulaires : les lignines peroxydases (ou ligninases), et les peroxydases manganèse-dépendantes. En fait, il s'agit de cométabolisme, puisque les composés libérés ne peuvent pas servir de substrats de croissance aux champignons qui les produisent.

Chez les champignons non lignolytiques (*Cunninghamella elegans*, *Penicillium sp*, *Aspergillus sp*), l'attaque initiale des HAP, catalysée par une monooxygénase, se traduit par l'incorporation d'un atome d'oxygène dans un cycle aromatique de l'hydrocarbure, qui forme alors une arène oxyde. Cette action peut se faire en différentes positions, et à partir d'un même HAP, de très nombreux isomères peuvent ainsi être formés. Ce mécanisme est le même que celui utilisé par les organismes supérieurs pour la détoxification des molécules aromatiques (Cerniglia, 1992; Vandecasteele, 2005). La monooxygénase responsable de cette dégradation est le cytochrome P<sub>450</sub> (enzyme membranaire inductible) (Garon et *al.*, 2002 ; Potin et *al.*, 2004).

La figure 49, montre le métabolisme du phénanthrène par différentes espèces de champignons. Le phénanthrène est métabolisé via la production de trans-1,2-, trans-3,4-, et trans-9,10-dihydrodiols et d'un conjugué glucoside (Cerniglia and Yang, 1984 ; Cerniglia et *al.*, 1989 ; Sutherland et *al.*, 1995).



**Figure.49.** Métabolisme du phénanthrène par différentes espèces de champignons (Sutherland et *al.*, 1995).

La production d'enzymes extracellulaires à l'action peu spécifique permet de transformer aussi bien les plus gros hydrocarbures polyaromatiques que les plus légers, les différences de potentiel de dégradation étant fonction des activités métaboliques bactériennes (Gramms et *al.*, 1999). En effet, ces champignons ne se développent qu'en présence d'une source de carbone annexée et ne participent le plus souvent qu'à un cométabolisme des hydrocarbures polyaromatiques (Sutherland et *al.*, 1995).

Toutefois, Salicis et *al.* (1999) et Ravelet et *al.* (2000) ont récemment montré la capacité de certains Deutéromycètes des genres *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* et *Rhizopus sp.* d'utiliser le fluoranthène et le pyrène comme seules sources de carbone et d'énergie.

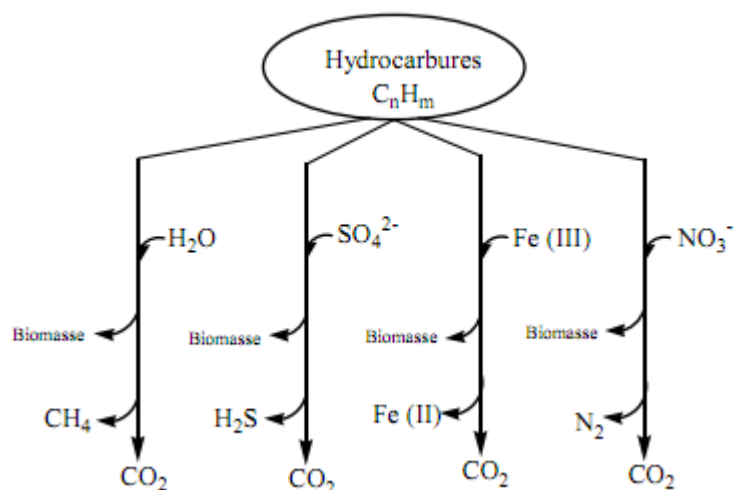
Une autre famille de champignons, dite de la pourriture blanche participent à la dégradation des hydrocarbures polyaromatiques en milieu naturel. Les principales espèces (*Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* et *Bjerkandera sp.*) excrètent les lignines peroxydases dans le milieu, lesquelles créent une double liaison entre un atome de carbone du cycle benzénique et un atome d'oxygène, formant une quinone (Harayama, 1997; Mercier, 1998 ; Rama-Mercier, 1998). Certains champignons dits de la pourriture blanche (*Pycnoporus cinnabarinus*, *Bjerkandera adusta* et *Pleurotus ostreatus*)

produisent, les laccases (Mercier, 1998 ; Rama et *al.*, 1998). Sous l'action de l'ensemble de ces enzymes, la transformation initiale des hydrocarbures polycycliques augmente significativement leur biodégradabilité, l'attaque du cycle par les systèmes enzymatiques bactériens étant facilitée par la présence d'un groupe réactif (quinone) (Gramms et *al.*, 1999 ; Kotterman et *al.*, 1998). De même, Romero et *al.* (1998) ont isolé des souches de levure (*Rhodotorula glutinis*) utilisant le phénanthrène comme seule source de carbone et d'énergie. Le rôle de ces microorganismes dans le catabolisme des hydrocarbures polycycliques au sein d'écosystèmes complexes reste encore mal connu (Kirso et Irha, 1998; Semple et *al.*, 1999).

## **16.2. Voies biologiques anaérobies**

### **16.2.1. Les bactéries**

Les environnements anoxiques sont répandus dans la nature. En effet, de tels environnements sont fréquents dans les sédiments et les eaux, et même dans les sols bien aérés où des micro-niches anaérobies sont présentes. En anaérobiose, les mécanismes d'activation doivent faire intervenir d'autres réactifs que le dioxygène afin d'introduire un groupement polaire. La biodégradation anaérobie des hydrocarbures a été très largement étudiée dans le cas du toluène (Chakraborty et Coates, 2004) puis des homologues ont été observées pour les autres types d'hydrocarbures. La biodégradation anaérobie des hydrocarbures est un domaine récent et en pleine expansion. Les capacités de microorganismes à dégrader des hydrocarbures dans des conditions strictement anaérobies sont très limitées. Elles sont pratiquement absentes pour des composés aliphatiques, mais cela n'empêche pas qu'il existe des exceptions extrêmement rares (Chayabutra et Ju, 2000). C'est le cas des bactéries sulfato-réductrices, des bactéries dénitrifiantes, des méthanogènes et des ferri-réductrices (So et Young, 2001 ; Zengler et *al.*, 1999). Dans les environnements anoxiques, l'absence d'oxygène implique une stratégie d'activation enzymatique spécifique. Ainsi, les bactéries anaérobies possèdent différentes voies biochimiques pour convertir les hydrocarbures, substrats apolaires en composés contenant un groupement polaire (Heider et *al.*, 1999). Les mécanismes d'activation de la biodégradation des hydrocarbures en anaérobiose peuvent varier.  $\text{NO}_3^-$ , Fe (III) et  $\text{SO}_4^{2-}$  sont ainsi différents accepteurs d'électrons utilisés pour la dégradation d'un hydrocarbure en anaérobiose (Widdel et Rabus, 2001 ; Gibson et Harwood, 2002; Meckenstock et *al.*, 2004), (fig.50.).



**Figure.50.** Les différentes voies métaboliques de la dégradation des hydrocarbures en fonction de l'accepteur d'électrons. (Widdel et Rabus, 2001)

#### 16.2.1.1. Biodégradation anaérobie des hydrocarbures saturés

La dégradation des alcanes est tout aussi pertinente, étant donné qu'ils sont quantitativement les plus importants composants d'hydrocarbures (Callaghan et *al.*, 2010). Plusieurs bactéries anaérobies capables de dégrader les n-alcanes avec 6 carbones ou plus, en particulier l'hexadécane ( $C_{16}$ ), en utilisant du sulfate ou du nitrate comme accepteurs d'électrons ont été isolés (Widdel et Grundmann, 2010 ; Grossi et *al.*, 2008 ).

Les deux principaux mécanismes de dégradation anaérobie des n-alcanes décrits, impliquent des réactions biochimiques qui diffèrent totalement de celles employées dans le métabolisme aérobie des hydrocarbures (Grossi et *al.*, 2008 ). La première implique l'activation au niveau du carbone subterminal de l'alcane par l'addition de fumarate, de manière analogue à la formation de benzyle succinate pendant la dégradation anaérobie du toluène (Callaghan et *al.*, 2006 ; Widdel and Rabus, 2001), mais d'autres réactions sont complètement différentes impliquant une déshydrogénation et hydratation (Widdel et Grundmann, 2010). Le deuxième mécanisme est la carboxylation (Callaghan et *al.*, 2009; Mbadinga et *al.*, 2011), principalement développé à partir de la souche sulfato-réductrices (*Desulfococcus oleovorans* Hxd3) (So et *al.*, 2003).

Autrement dit, le métabolisme de dégradation des alcanes est généralement activé par une addition carbone-carbone du fumarate dans une position dépendante de l'alcane mais généralement en position sub-terminale ou en position  $C_3$  (Rabus et *al.*, 2001; Widdel et

Rabus, 2001; Widdel et Grundmann, 2010), à l'origine d'un dérivé succinate. Les alcanes activés vont ensuite subir une dégradation plus poussée jusqu'à la formation d'acétyl-CoA via des étapes de deshydrogénation et d'hydratation. Les travaux de ces vingt dernières années basés sur des analyses biochimiques ont permis de mettre en évidence de nouveaux mécanismes d'activation des hydrocarbures : par hydroxylation (par une molécule d'eau), carboxylation (par des carbonates), ou par méthylation suivie d'une addition de fumarate (Boll et Heider, 2010; Tierney et Young, 2010).

Le mécanisme d'ajout de fumarate semble être le mécanisme le plus répandu, il a été mis en évidence chez la plupart des souches sulfato-réductrices, des souches dénitrifiantes et récemment, dans une culture d'enrichissement avec octacosane (C28) en condition de méthanogénèse (Callaghan et al., 2010).

D'autres mécanismes alternatifs, plutôt atypiques, ont également été proposés. Par exemple, la souche *Pseudomonas chloritidismutans* AW-1T est capable de produire de l'oxygène moléculaire, via la respiration de chlorate (dismutation), qui sera alors utilisé pour oxyder l'alcane à l'aide d'une oxygénase (Mehboob et al., 2009). Cette réaction est qualifiée d'oxygénation inhabituelle de l'alcane, car elle se déroule sous une atmosphère totalement anoxique.

Une stratégie similaire via la production d'oxygène intra-cellulaire est également possible avec des accepteurs d'électrons comme les nitrates ou les nitrites (Ettwig et al., 2010). Cependant, il a été récemment présumé que l'oxyde nitrique ou les nitrites générés lors de la réduction des nitrates peuvent être directement impliqués en tant que co-réactif dans l'activation des alcanes chez la souche HdN1 (Zedelius et al., 2011).

Enfin, une étude récente réalisée en condition de méthanogénèse suggère que les alcanes pourraient être activés via une hydroxylation (Head et al., 2010).

Au niveau des sols, la biodégradation des hydrocarbures aliphatiques la plus étudiée est celle des éthènes chlorés comme le tetrachloroéthène (PCE). Ceci est dû au fait que ces polluants sont largement répandus, cancérigènes et qu'ils ont longtemps été considérés comme résistants aux biodégradations aérobies. En anaérobiose, certains microorganismes peuvent déhalogéner ce PCE en trichloroéthène, dichloroéthène, chlorure de vinyle puis en éthène non toxique. Ce procédé respiratoire, nommé halorespiration, peut être réalisé par certaines espèces bactériennes du genre *Dehalospirillum*, *Dehalobacter*, *Desulfitobacterium*, *Dehalococcoides ethenogenes* et *Sulfurospirillum* (Zhang et Bennet, 2005).

### 16.2.1.2. Biodégradation anaérobie des hydrocarbures polyaomatiques

La biodégradation des HAP par voie anaérobie est moins étudiée. Longtemps considérée comme irréalisable, les récents résultats montrent qu'il y a un potentiel réel des flores anaérobies à dégrader ces composés. La digestion anaérobie des composés organiques complexes implique un large éventail de bactéries. Trois principaux groupes de bactéries sont en jeu, présentant chacun un rôle spécifique à jouer. Il y a les bactéries acidogènes responsable de l'hydrolyse (l'acidogénèse), les bactéries acétogènes impliquées dans l'acétogénèse et les bactéries méthanogènes responsables de la méthanogénèse.

L'activation des composés mono-aromatiques substitués est effectuée par des benzyl-succinates synthases qui ajoutent le co-substrat fumarate au groupement alkyl du noyau benzénique, ce qui résulte en la formation de benzyl-succinates (Tierney and Young, 2010). Ces hydrocarbures activés vont subir une métabolisation plus poussée en benzoyl-CoA. Enfin, ce dernier est clivé et subit à son tour des étapes de déshydrogénation et d'hydratation analogues à la  $\beta$ -oxydation des acides gras avant d'emprunter le cycle de Krebs. Des voies de dégradation ont été décrites en conditions de dénitrification, sulfato-réduction et méthanogénèse (Habe et Omori, 2003; Foght, 2008). Ces réactions conduisent à la formation de composés comprenant une fonction acide qui seront alors transformés en acétyls-CoA par la voie de la  $\beta$ -oxydation. Ces acétyls-CoA seront alors ensuite pris en charge par le cycle de Krebs (Mbadinga et al., 2011). Le cas des HAP avec trois ou plusieurs cycles est moins clair, soit ils sont utilisés comme seule source de croissance soit ils sont cométabolisés (Meckenstock et al., 2004).

Bien que la dégradation anaérobie des HAP soit plus lente qu'en présence d'oxygène, l'énergie produite par leur oxydation avec des nitrates, ou du fer ferrique comme accepteurs est proche de celle produite par oxydation en présence d' $O_2$ . En revanche, l'oxydation couplée à la réduction des sulfates est nettement moins favorable en termes de production d'énergie. (Diaz, 2004).

## 17. Matériel et Méthodes

### 17.1. Principe

Dans cette partie, il s'agit de déterminer les capacités cataboliques et de rechercher parmi les souches microbiennes autochtones isolées adaptées et non adaptées à la pollution par les hydrocarbures, des souches capables de dégrader efficacement le pétrole brut et le kérosène. Pour cela, deux objectifs ont été avancés :

- En premier lieu, il a été nécessaire de vérifier la tolérance des souches microbiennes sélectionnées en déterminant l'effet des deux hydrocarbures sur leur croissance en milieu liquide, au travers de certains paramètres tel que le pH, turbidité, O<sub>2</sub>C et poids sec de la charge microbienne.
- Le second objectif est de déterminer le taux de biodégradation des deux produits utilisés comme seule source de carbone et d'énergie.

## **17.2. Microorganismes**

Toutes les espèces testées sont supposées adaptées aux conditions du milieu pollué et ont acquis une certaine performance vis-à-vis des molécules hydrocarbonées. C'est ce que nous essayerons de vérifier dans cette partie, réservée à la biodégradation. Les souches isolées, purifiées et caractérisées sont entretenues sur milieu gélosé Czapeck et MEA et conservées à 4°C.

## **17.3. Les milieux de culture**

Les milieux nutritifs utilisés pour la culture des souches microbiennes sélectionnées pour le processus de dégradation sont :

➤ **Milieu à l'extrait de malt- agar (MEA, d'après Blakeslee, 1915)**

Extrait de malt	20 g
Peptone	1g
Glucose	20 g
Agar	15g
Eau distillée	1000 ml

pH : 5,6

➤ **Milieu liquide de Galzy et Slonimski (GS) 1957**

Solution de sels minéraux	100 ml
Solution d'oligo éléments	1 ml
Solution de FeCl <sub>3</sub> , 6H <sub>2</sub> O à 200 mg/l	1 ml
Solution de vitamines	5 ml
Solution de mesoinositol à 4 mg/l	5 ml
Glucose	5 g
Eau distillée q.s.p	1000 ml

pH 4.1

**A. Solution de sels minéraux**

(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60 g
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 g
NaCl	1 g
CaCl <sub>2</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	5 g
Eau distillée q.s.p	1000 ml
	1001

**B. Solution d'oligo éléments**

H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	0,5 g
MnSO <sub>4</sub>	0,4 g
ZnSO <sub>4</sub>	0,4 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,2 g
KI	0,1 g
CuSO <sub>4</sub>	0,04 g
Eau distillée q.s.p	1000 ml

**C. Solution de vitamines**

Pantothénate de calcium	0,4 g
Thiamine chlorhydrate	0,4 g
Inositol	0,4 g
Pyridoxyne	0,4 g
Acide nicotinique	0,1 g
Biotine	0,004 g
Eau distillée q.s.p	1000 ml

➤ **Milieu Czapek Dox, 1909**

NaNO <sub>3</sub>	3,0g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0g
MgSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	0,5g
Kcl	0,5g
FeSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	0,01g
Sucre (morceaux)	30,0g
Eau de robinet q.s.p	1000 ml

pH : 6,8

**17.4. Les produits chimiques utilisés**

Les molécules d'hydrocarbures utilisées sont le pétrole brut et le kérosène ; tous deux ont été fournis par Sonatrach de Hassi Messaoud.

**17.4.1. Le pétrole brut**

Le pétrole est un liquide visqueux, constitué principalement d'hydrocarbures, c'est-à-dire de combinaisons chimiques de carbone (C) et d'hydrogène (H). C'est en fait, un mélange



complexe d'hydrocarbures, ainsi que des traces de soufre, d'azote, d'oxygène, d'eau salée et de métaux (Fer, nickel) (Tab.12.).

Le pétrole brut provient directement de l'exploitation d'un puit de pétrole et son raffinage nous donne plusieurs produits tels que le gaz naturel, l'essence, le kérosène, le gazole et d'autres produits. Sa couleur va de l'ambre claire ou noir opaque (brut asphalténique), d'un vert fluorescent (paraffinique) ou bleu (naphténiques). La présence de composés sulfureux leur donne une odeur déplaisante.

Ce sont des liquides dont la couleur va de l'ombre clair au noir opaque (brut asphalténique). Ils peuvent être d'un vert fluorescent (paraffiniques) ou bleu (naphténique). La présence de composés sulfureux leur donne une odeur déplaisante. Leur viscosité varie en fonction de leur teneur en fractions légères. Ils sont hautement Inflammables (point d'éclair inférieur à 30°C).

La diversité de composition des bruts repose principalement sur leur provenance. Les bruts légers sont très riches en hydrocarbures saturés et très pauvres en asphaltènes (Arabian Light) (Syakti, 2004). Cette diversité dans la composition d'un brut est un aspect très important dans l'industrie du raffinage.

**Tableau.12.** Composition élémentaire d'un pétrole brut (Bocard, 2006)

<b>Composition</b>	<b>Poids (%)</b>
<b>Carbone</b>	84 à 87
<b>Hydrogène</b>	11 à 14
<b>Soufre</b>	0 à 6
<b>Azote</b>	0 à 1
<b>Oxygène</b>	0 à 8

#### **17.4.2.Le kérosène**

Le kérosène ou pétrole lampant, est un mélange d'hydrocarbures issu de la distillation et du raffinage du pétrole brut. De formule chimique allant de  $C_{10}H_{22}$  à  $C_{14}H_{30}$ ; le kérosène est constitué de plus de 80 % d'hydrocarbures aliphatiques et de 0 à 15 % d'hydrocarbures aromatiques en C8-C15. Sa teneur en soufre est négligeable.

Le kérosène (Jet A-1, Jet A, TR0, JP-8) est le carburéacteur utilisé dans le secteur aéronautique. Il existe plusieurs types de carburéacteur dans le monde. Le Jet A-1 est un carburant de type kérosène utilisé dans l'aviation civile internationale. Il présente des similitudes avec le Jet A utilisé aux Etats-Unis. En France le kérosène utilisé pour l'aviation militaire est appelé TR0 (JP-8 aux Etats-Unis et AVATUR au Royaume-Uni).

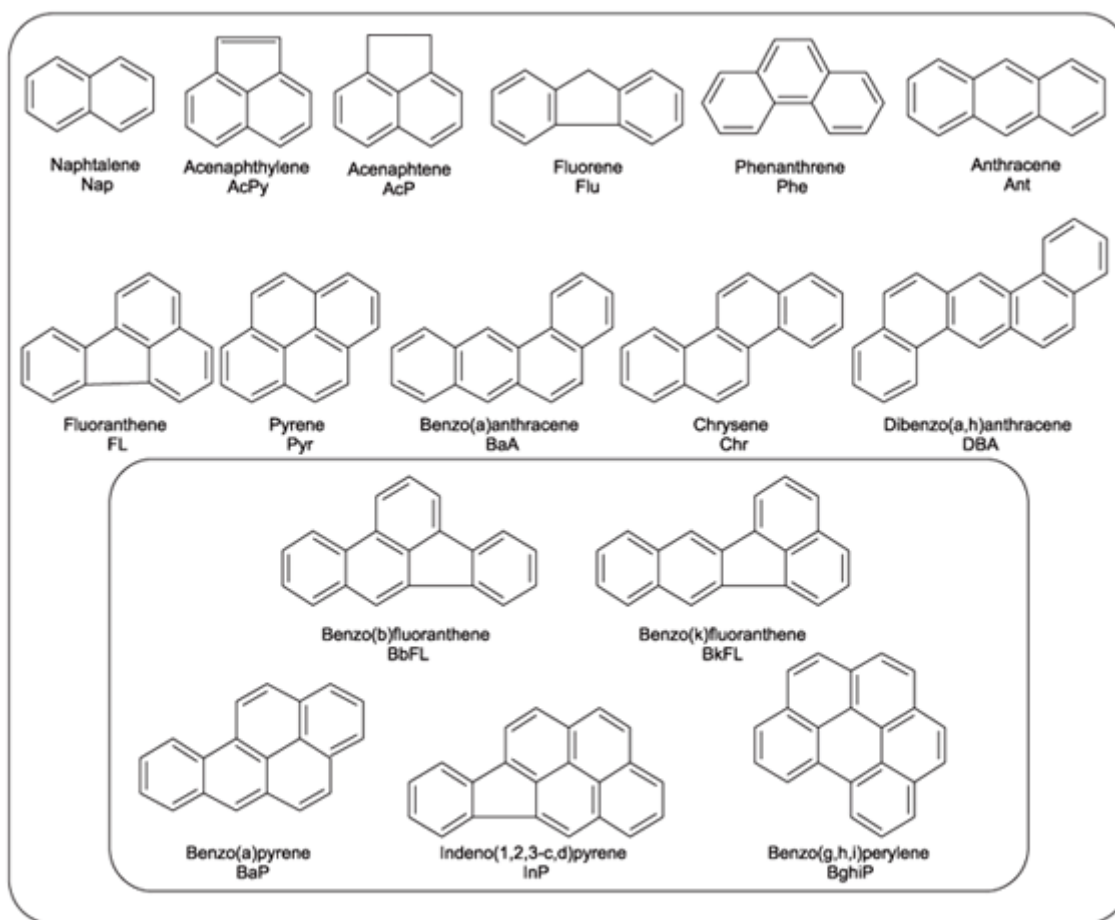
Le kérosène est un hydrocarbure saturé issu du raffinage du pétrole brut, dont les propriétés physiques sont résumées dans le tableau suivant.

**Tableau.13.** Quelques propriétés physiques du kérosène

Les paramètres	Les propriétés physiques
Température de fusion	- 48 à -26 °C
Température d'ébullition	150 à 300 °C
Solubilité	Pratiquement insoluble (eau)
Masse volumique	0.8g .cm <sup>3</sup> à 15°C
Température d'auto inflammation	220 °C
Point d'éclair	49 à 55 °C
Limites d'explosivité dans l'air	0.6-6.5% vol

### 17.4.3. Les molécules composant le pétrole brut et le kérosène

Ce sont des hydrocarbures aromatiques polycycliques ou des molécules organiques constituées de l'association d'au moins deux cycles benzéniques (fig.51). Les HAP constituent un groupe très varié de composés organiques persistants et ubiquistes, qui sont parmi les polluants auxquelles la Communauté Européenne et l'Agence pour la Protection de l'Environnement (Etats Unis) accordent une importance prioritaire. Ce groupe de composés a été retenu pour être étudié car ses molécules présentent des niveaux différents de dégradation. En effet, certains sont rapidement dégradés par des microorganismes comme source directe de carbone. D'autres composés sont hautement persistants et ne peuvent être dégradés que par co-métabolisme.



**Figure.51.** Structure des 16 HAP prioritaires composant le pétrole brut et le kérosène United States Environmental Protection Agency (US-EPA) (1985).

La conjugaison cyclique des hydrocarbures est à l'origine des propriétés communes de ces molécules comme le caractère aromatique des composés. Sur le plan énergétique, la conjugaison cyclique se manifeste par une stabilité remarquable du système aromatique. Blumer (1976) propose un classement des HAP par ordre de stabilité croissante selon l'arrangement des cycles:

- l'arrangement linéaire étant le plus instable (anthracène),
- l'arrangement en amas (pyrène, benzo[a]pyrène),
- l'arrangement angulaire étant la configuration la plus stable (chrysène, phénanthrène).

Cependant, la persistance des HAP est également fonction de leur temps de demi-vie, lequel est plus important pour les HAP les plus lourds donc les moins solubles.

**Tableau .14.** Propriétés chimiques et physiques des HAP  
Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (1995)

Nom	Nbre de cycle	Masse moléculaire	Log Kow	Solubilité dans l'eau (mg/l)	Demi-vie (jour ou an)
Naphtalène	2	128	3,37	31,7	16-48J
Anthracène	3	178	4,45	0,073	50j-1,3 a
Fluorène	3	166	4,18	1,98	32-60j
Phénanthrène	3	178	4,46	1,29	16-200j
Fluoranthrène	4	202	5,33	0,26	140j-1,2a
Pyrène	4	202	5,32	0,135	210j-5,2a
Chrysène	4	228	6,61	0,002	1-2,7a
Benzo[a]anthracène	4	228	6,61	0,014	120j-1,9a
Benzo[a]pyrène	5	252	6,04	0,0038	57j-1,5a
Benzo[b]fluoranthrène	5	252	6,57	0,0012	360j-1,7a
Benzo[k]fluoranthrène	5	252	6,84	0,00055	2,5-2,9a
Dibenzo[a,h]anthracène	5	278	5,97	0,0005	361j-2,6a
Andéno[1,2,3-cd]pyrène	6	276	7,23	0,062	1,6-2a
Benzo[g,h,i]pérylène	6	276	7,66	0,00026	0,25-1,8a

Les risques les plus importants liés aux HAP sont leur effet mutagène et cancérigène. En effet, certains d'entre eux ont été classés comme cancérigènes probables ou possibles chez l'humain par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC), l'US EPA (United States Environmental Protection Agency), et l'Union européenne (Tab.15.).

**Tableau. 15.** Potentiel cancérigène des HAP (IARC, 1987)

Nom	Classement UE	Classement CIRC/IARC	Classement UE EPA
Naphtalène	nc	2B	C
Acénaphtylène	nc	/	D
Acénaphtène	nc	/	/
Fluorène	nc	3	D
Phénanthrène	nc	3	D
Anthracène	nc	3	D
Fluoranthrène	nc	3	D
Pyrène	nc	3	D
Benzo[a]anthracène	2	2A	2B
Chrycène	2	3	2B
Benzo[b]fluoranthrène	2	2B	2B
Benzo[k]fluoranthrène	nc	2B	2B
Benzo[a]pyrène	2	2A	2B
Dibenzo[a,h]anthracène	nc	2B	2B
Andéno[c,d]pyrène	2	2A	2B
Benzo[g,h,i]pérylène	nc	3	D

nc: non cancérigène, 2:substances devant être assimilés à des substances mutagènes pour l'homme; 2A: probablement cancérigène pour l'homme; 2B: peut être cancérigène pour l'homme; 3: ne peut être classé cancérigène (possible mais insuffisamment étudié); B1 et B2: cancérigène probable pour l'homme; C:cancérigène possible pour l'homme; D: inclassable.

### **17.5. Préparation des précultures**

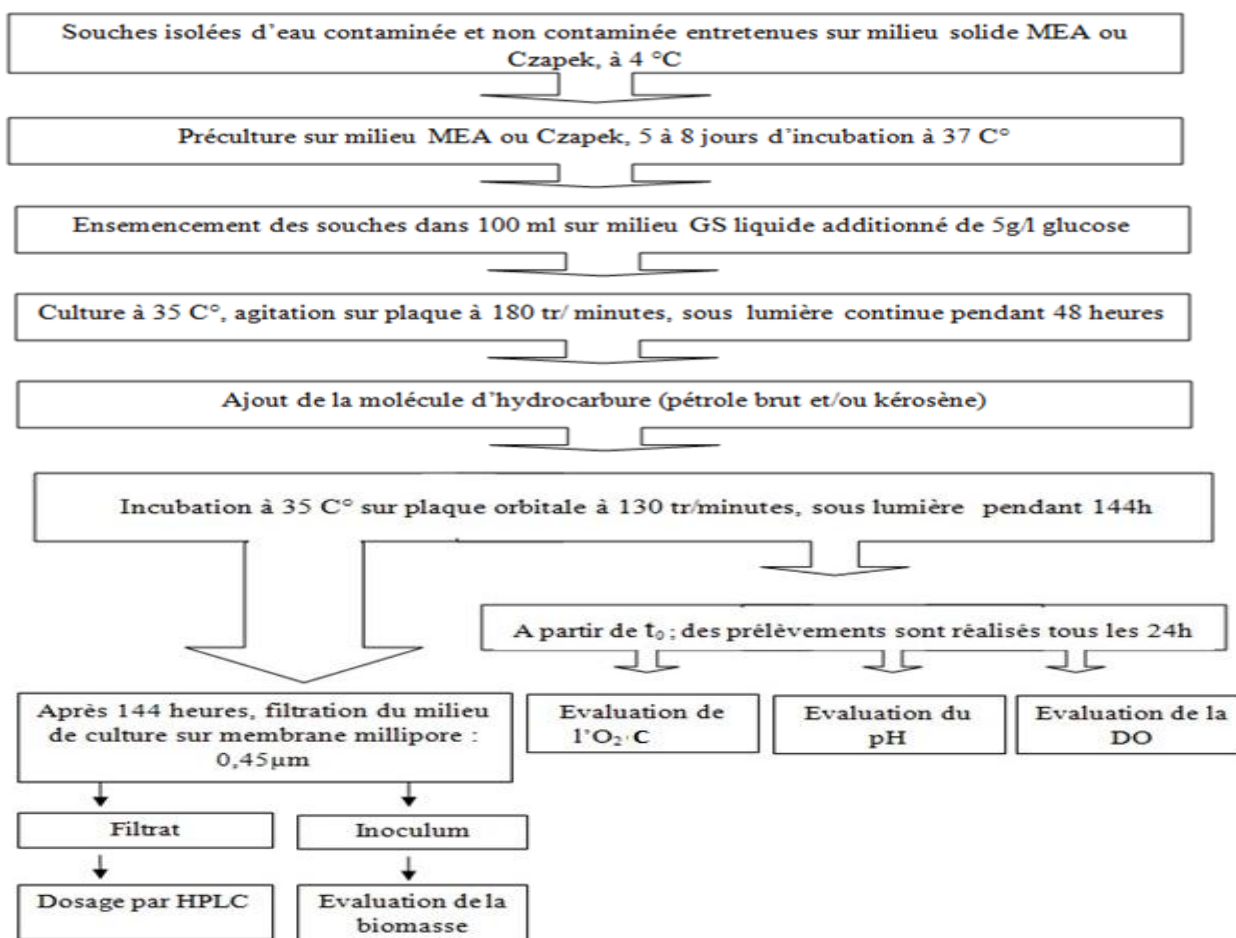
La réactivation des souches est effectuée sur boîtes de pétri sur un milieu de culture gélosé, extrait de malt agar. Les boîtesensemencées sont ensuite mises en incubation pendant une période de cinq à huit jours à la température de 37°C.

### **17.6. Etude de la biodégradation**

Les cultures sont conduites en mode batch sur milieu synthétique Galzy et Solninski (GS), additionné de glucose (5g/l) à pH 4,5 dans des fioles d'Erlenmeyer de 250 ml à raison de 100 ml par fiole, l'ensemble est alors stérilisé sous pression vapeur saturante (20 mn à 120°C).

Chaque essai est réalisé en triplicata (trois répétitions pour chaque souche et trois répétitions pour le consortium bactérien constitué par la population mixte). L'incubation se fait à une température 35°C sous éclairage de 1200Lux (12H/24H) et en condition agitée (sur plaque orbitale à une vitesse de rotation de 180 tr/mn) pendant deux jours. 2% d'hydrocarbures (pétrole brut, kérosène), est ajoutée dans les cultures d'une façon aseptique, après stérilisation par filtration à travers une membrane de 0,22 µm Millipore (Bedford, MA). Des témoins de dégradation abiotique (milieu et hydrocarbures sans inoculum) sont inclus dans les essais. Les valeurs sont exprimées en moyennes.

Les différentes phases de la méthodologie utilisée sont schématisées dans la figure suivante :



**Figure.52.** Phases de la méthodologie utilisée pour l'évaluation de la biodégradation des molécules d'hydrocarbures

### 17.6.1. Etude de la croissance microbienne en présence des produits hydrocarbonés

Cinq agents microbiens (bactérie ou fungi) ont été testés individuellement ou en population mixte (consortium) en présence du pétrole brut et/ou le kérosène. Plusieurs paramètres ont été pris en considération, il s'agit notamment de la DO ou la turbidité, pH, oxygène consommé (O<sub>2</sub>C) nécessaire à la dégradation des molécules d'hydrocarbures et le poids sec de l'inoculum microbien. Les cinétiques ont été déterminées à partir d'aliquot de cultures prélevées au temps t<sub>0</sub> min et à tous les 120 min pendant 6 jours.


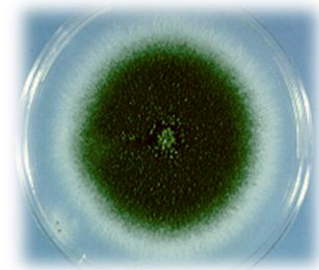

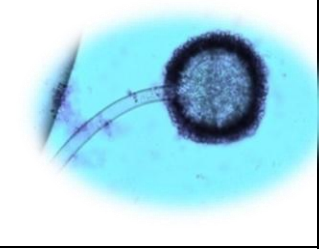


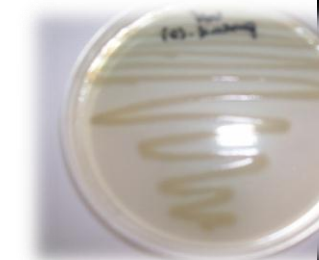
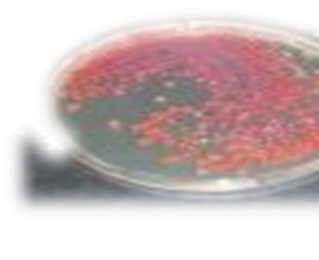


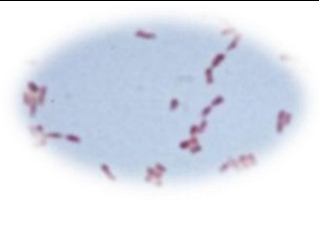

Les souches sélectionnées sont mentionnées dans le tableau suivant :

**Tableau.16.** Les souches microbiennes utilisées

Souches fongiques	Souches bactériennes
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1
<i>A. fumigatus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3
	<i>Serratia marcescens</i>
	<i>Aeromonas hydrophila</i>

La morphologie macroscopique et microscopique, des souches bactériennes et fongiques utilisées dans nos tests sont indiquées dans le tableau qui suit :

**Tableau.17.** Caractéristiques des souches étudiées

Souches fongiques	<i>Aspergillus niger</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>Alternaria alternata</i>
Aspect macroscopique			
Aspect microscopique (G×100)			
Souches bactériennes	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
Aspect macroscopique			
Aspect microscopique (G×100)			

#### **17.6.1.1. Détermination de la densité optique**

Dans une population microbienne en croissance, la biomasse peut être évaluée par sa densité optique. Dans notre travail, la densité optique est déterminée pendant la période d'incubation à des intervalles de temps de 24 h. Elle est mesurée à une longueur d'onde de 625 nm pour les bactéries et 550 nm pour les champignons sur un spectrophotomètre (Jenway-6300). La courbe d'étalonnage réalisée séparément permet de relier la densité optique obtenue au nombre réel de microorganismes.

#### **17.6.1.2. Mesure du pH**

Le pH est l'un des facteurs les plus importants qui influe sur l'activité biologique microbienne. Cependant les souches seront différentes suivant que le milieu est acide (levures, champignons) ou neutre ou basique (bactéries). Les valeurs extrêmes de pH pourraient avoir une influence négative sur la capacité des microorganismes à dégrader des polluants.

Le pH initial du milieu des cultures fongiques est maintenu à 4,1 ; tandis que celui des cultures bactériennes est de 6,5.

#### **17.6.1.3. Evaluation de la consommation d'oxygène (O<sub>2</sub>C)**

La consommation en oxygène correspond à la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder les matières oxydables dans certaines conditions fixées par la norme. Ces matières oxydables sont en très grande majorité des matières organiques. La technique s'effectue sur liquide brut homogénéisé suivant la norme NF EN ISO 8467, selon la méthode d'oxydation au permanganate de potassium (Rodier, 2009). Le résultat est exprimé en mg /l d'O<sub>2</sub>

#### **17.6.1.4. Le poids sec de l'inoculum microbien**

Après 144 heures, le contenu des erlenmeyer est récupéré puis filtré à travers une membrane de 0,45 µm Millipore. Le filtrat est récupéré dans un tube en vue des dosages chromatographiques pour la détermination du pourcentage de biodégradation de l'hydrocarbure. Le contenu de la membrane est mis à sécher à une température de 105 °C pendant 24 heures puis pesé afin de déterminer son poids en mg/ml.

Le poids sec est calculé selon l'équation suivante :  $P_s = (M - M_0)$

**M** : poids de la membrane après séchage et **M<sub>0</sub>** : poids de la membrane



## **17.7. Evaluation des taux de biodégradation des hydrocarbures**

Le suivi de la biodégradation des hydrocarbures a été réalisé par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), méthode NF EN ISO 17993. Des prélèvements (1ml) sont effectués après 144h, sont filtrés sur membrane millipore (0,45µm) et injectés directement sans extraction (trois injections pour chaque échantillon).

### **17.7.1. Conditions chromatographiques**

Colonne YMC 5mm dim : 100×3mm ;

Phase éluant : méthanol/eau : 60/40 ;

Pas volumétrique : 0,7ml/min ;

Détecteur : UV à 254 nm ;

Vol injection : 10µl ;

Température : 32°C ;

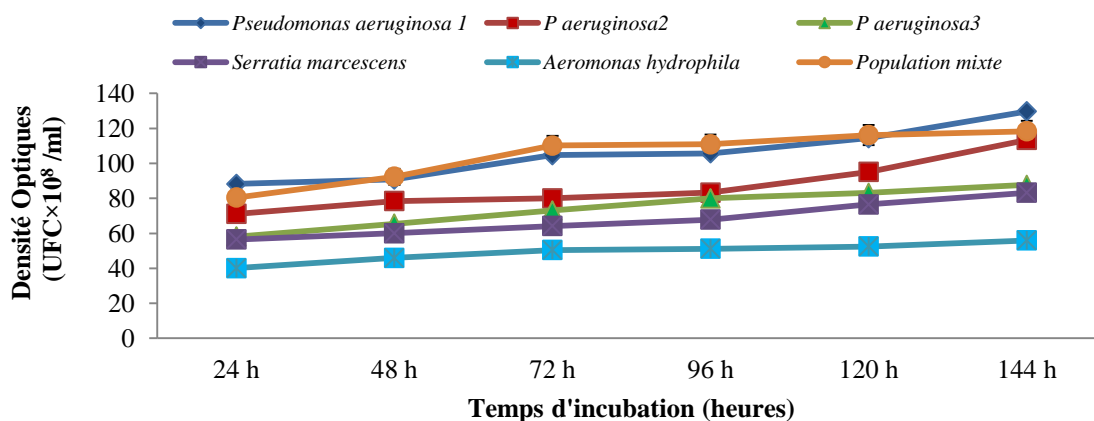
La quantification des HAP est réalisée par la méthode de l'étalonnage externe.

## **18. Résultats et discussion**

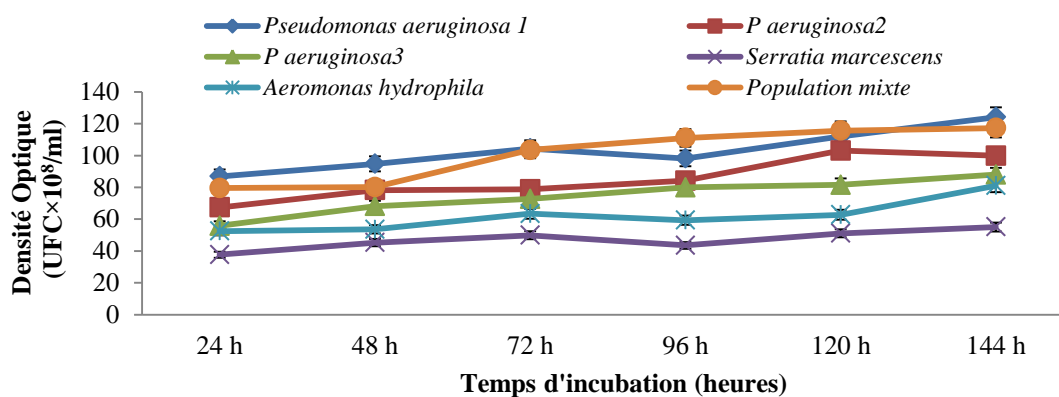
### **18.1. Etude de la croissance microbienne en présence des produits hydrocarbonés**

#### **12.1.1 Détermination de la densité optique**

Pour toutes les souches étudiées, nous remarquons, d'une part, que la concentration microbienne augmente dès la 1<sup>ère</sup> heure de l'essai jusqu'à atteindre des valeurs maximales cette augmentation correspond à la phase exponentielle, phase durant laquelle la dissolution du substrat (pétrole brut et/ou kérosène) suffit aux besoins métaboliques de la biomasse microbienne. D'autre part, au delà de 48 heures, lorsque la concentration microbienne augmente, le niveau des exigences nutritionnelles surpasse la vitesse de dissolution du substrat, la biodisponibilité deviendra alors limitée, on enregistre une croissance linéaire (48 - 144 heures). Ceci nous laisse penser que les fractions dégradées durant cette phase sont complexes. Cette phase pourrait être caractéristique de la dégradation des hydrocarbures complexes, permettant ainsi des nouvelles cinétiques de croissance successives qui se traduisent par des diauxies alternées.



**Figure.53.** Cinétique de croissance des souches bactériennes sans hydrocarbure



**Figure.54.** Cinétique de croissance des souches bactériennes en présence du pétrole brut.

D'après la figure 54 en la comparant avec la figure 53, la densité optique des souches bactériennes en présence du pétrole brut la plus élevée est enregistrée avec *P.aeruginosa1* avec  $124.13 \times 10^8$  UFC/ml en 144 heures. Ceci traduit une tolérance de la molécule d'hydrocarbure, avec cependant l'apparition d'une diminution après 96 heures.

Les mêmes variations sont notées en présence du consortium bactérien, après 48 heures d'incubation. Les cinétiques de croissance des autres espèces bactériennes sont quelques peu différentes des deux précédentes mais qui présentent d'importantes similitudes quant à leur allure générale.

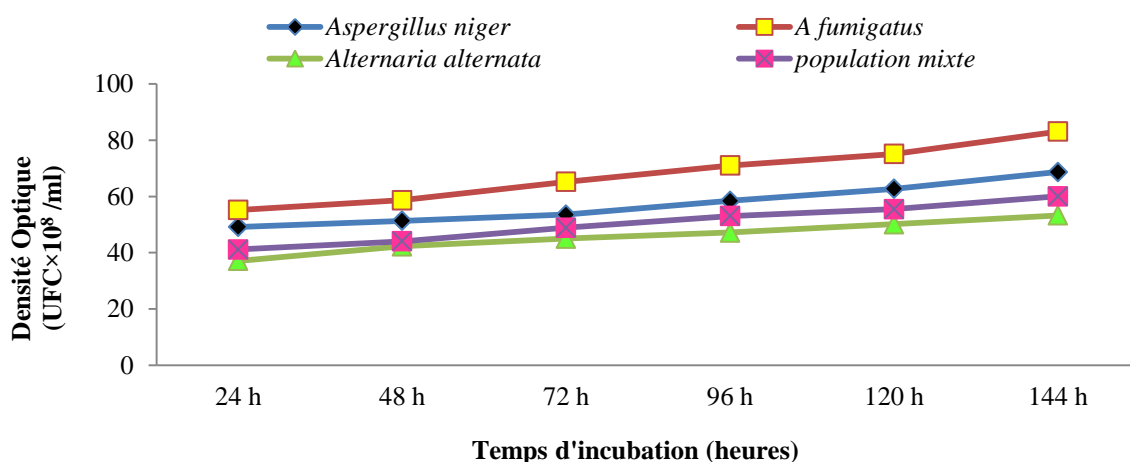


Figure.55. Cinétique de croissance des souches fongiques sans hydrocarbure

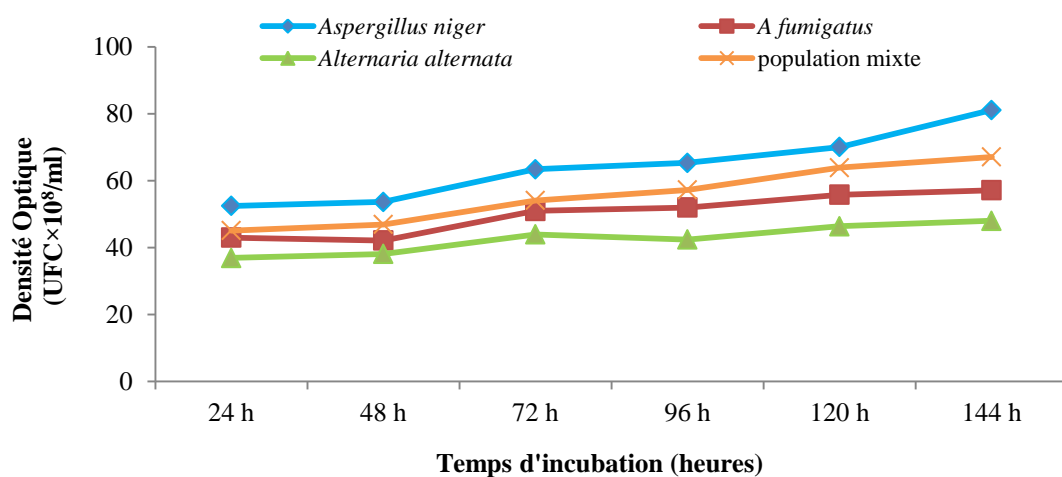
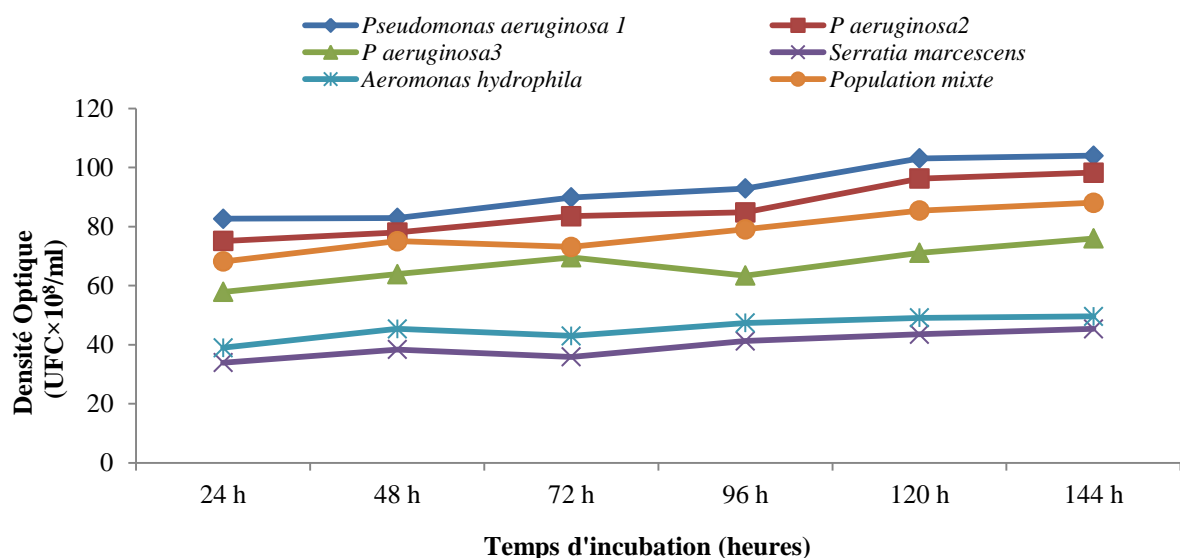
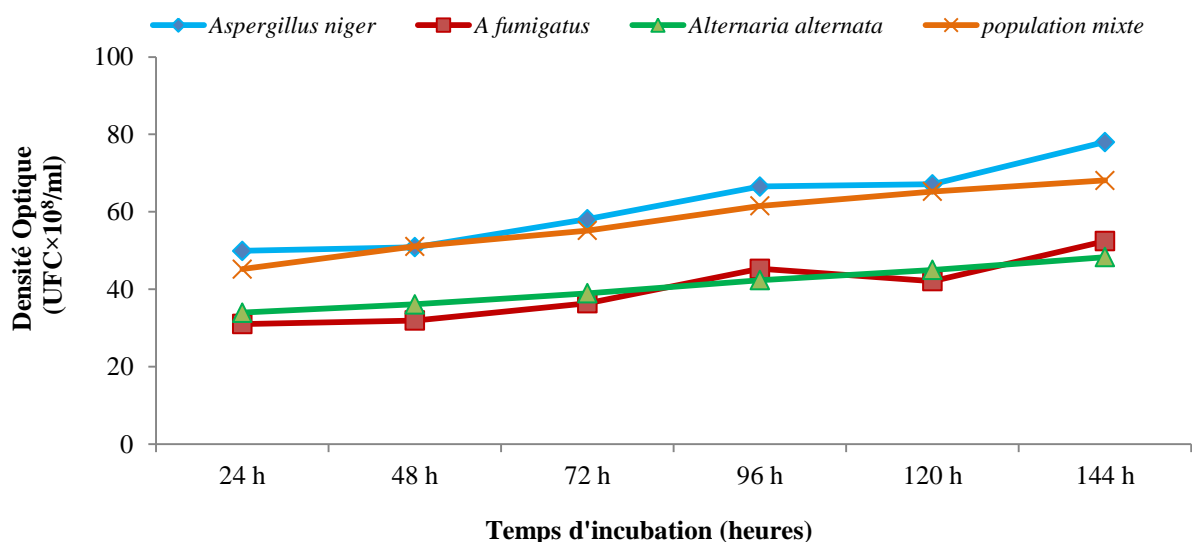


Figure.56. Cinétique de croissance des souches fongiques en présence du pétrole brut

La variation de la biomasse fongique en culture additionnée par le pétrole brut (Fig 55) en comparaison avec celle sans hydrocarbure (Fig.56), affiche une croissance proportionnelle temporelle, qui témoigne d'un bon développement des souches en présence du pétrole brut. La cinétique de la courbe de croissance d'*Aspergillus niger* traduit la meilleure croissance avec un maximum de  $81,08 \times 10^8$  UFC /ml, après 144 heures d'incubation; suivie de celle de la population mixte avec  $67,09 \times 10^8$  UFC /ml. Les courbes d'*Alternaria alternata* et d'*Aspergillus fumigatus* sont à allure similaire avec des densités optiques moins importantes.



**Figure.57.** Cinétique de croissance des souches bactériennes en présence du kérosène



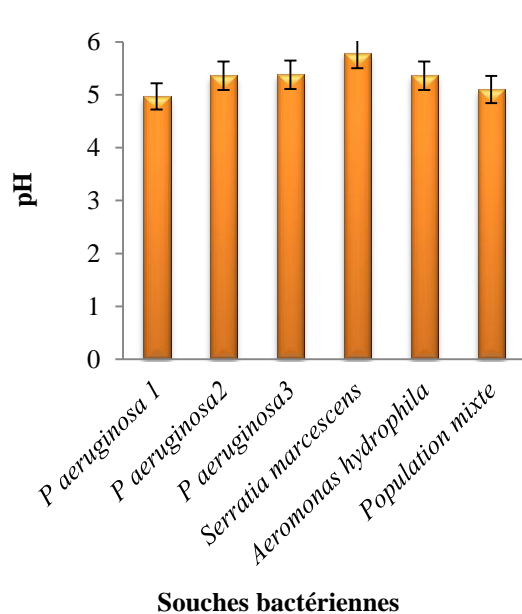
**Figure.58.** Cinétique de croissance des souches fongiques en présence du kérosène

Les courbes de croissance obtenues en présence du kérosène des souches bactériennes (Fig.57) ou fongiques (Fig.58), indiquent une bonne tolérance de la molécule hydrocarbonée et une croissance normale.

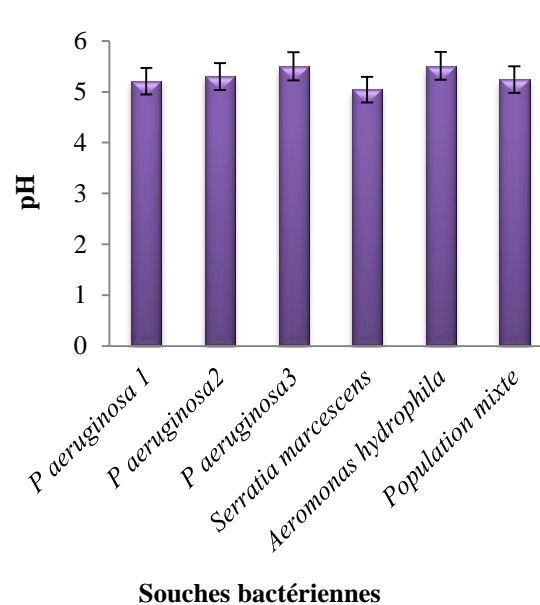
Les souches *Pseudomonas aeruginosa 1*, *P.aeruginosa 2* et la population mixte ont atteint des maxima en 144 heures d'incubation. Leurs concentrations dans le milieu sont respectivement de l'ordre de  $104,05 \times 10^8$  UFC/ml,  $103,28 \times 10^8$  UFC/ml et  $100,51 \times 10^8$  UFC/ml.

De même allure est le consortium fongique, l'*Aspergillus niger* et l'*A. fumigatus* avec des concentrations maximales respectives enregistrées pendant un temps de 144 heures de  $92,47 \times 10^8$  UFC/ml,  $91,02 \times 10^8$  UFC/ml et  $80,64 \times 10^8$  UFC/ml.

### 12.1.2. Mesure du pH

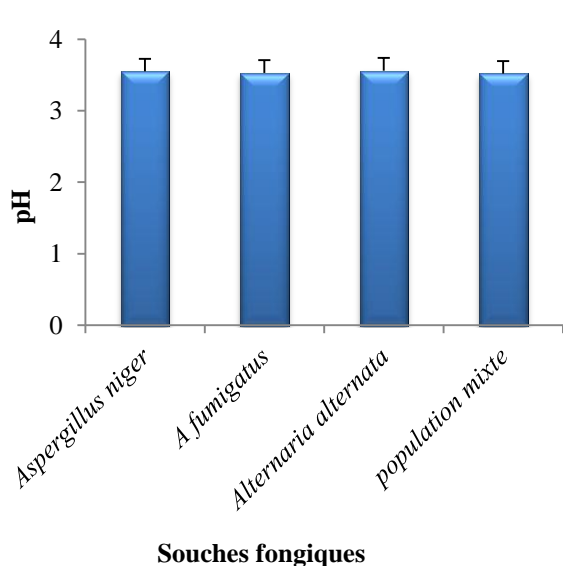


**Figure.59.** pH final des cultures bactériennes en présence du pétrole brut

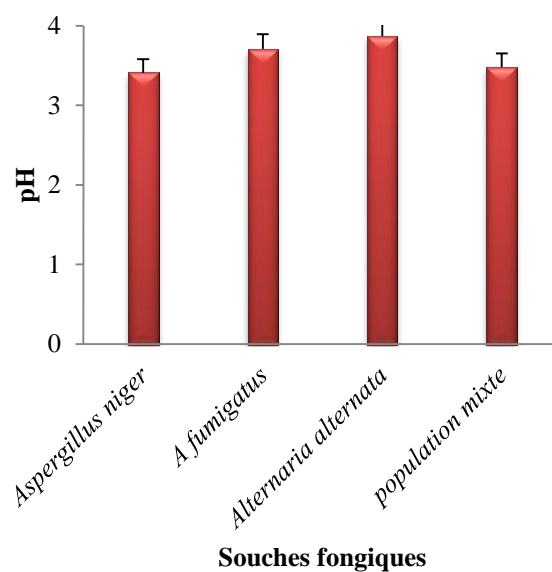


**Figure.60.** pH final des cultures bactériennes en présence du kérosène

Les résultats présentés dans les figures (59 et 60) montrent que l'ensemble des souches bactériennes entraîne une acidification du milieu et ce, pour les deux molécules d'hydrocarbures, sachant que le pH initial était de 6,5. Les valeurs indiquent une baisse de pH pour tous les échantillons. Après 144 heures et en présence de la population mixte, un pH de 5,1 est obtenu au niveau du milieu additionné de pétrole brut et de 5,24 dans celui contenant le kérosène. Une acidification nette du milieu de culture est signalée en présence de la souche *P.aeruginosa*1, avec une valeur de pH de 4,97 pour le pétrole brut et de 5,21 pour le kérosène.



**Figure.61.**pH final des cultures fongiques en présence du pétrole brut



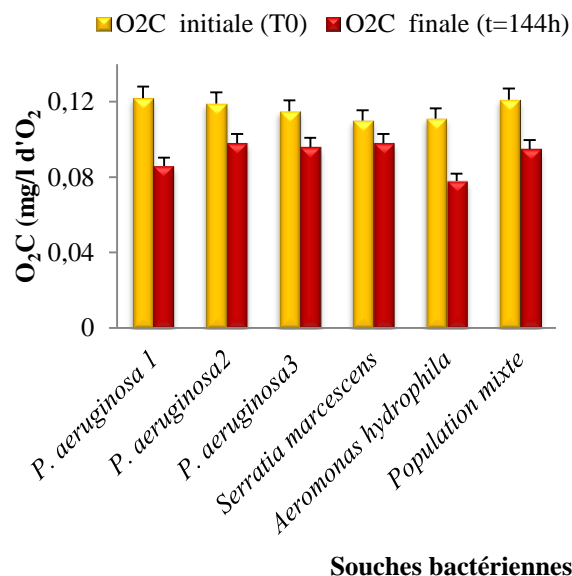
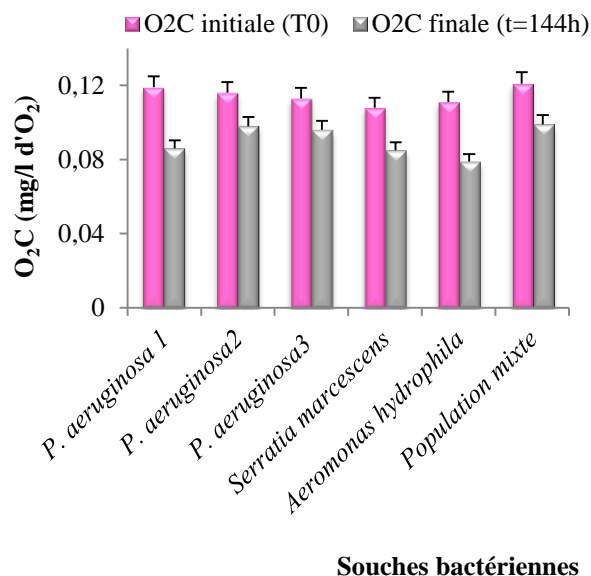
**Figure.62.**pH final des cultures fongiques en présence du kérosène

Pour ce qui est des souches fongiques, le pH de départ au temps initial  $t_0$ , du milieu de culture était de 4,1 pour toutes les souches testées, nous observons également une baisse des valeurs (Fig 61 et 62).

Par ailleurs, si l'on se réfère aux différents histogrammes obtenus avec les deux types de molécules d'hydrocarbures testées, nous constatons que l'acidification du milieu en présence du pétrole brut est moins accrue à celle enregistrée en présence du kérosène. Les valeurs ont atteints des minimas de 3,41 (*A. niger*) et de 3,48 (population fongique).

### 12.1.3.Evaluation de la consommation d'oxygène ( $O_2C$ )

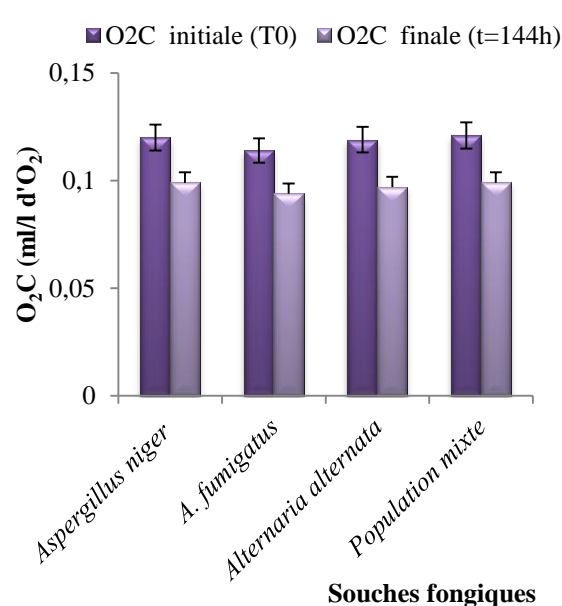
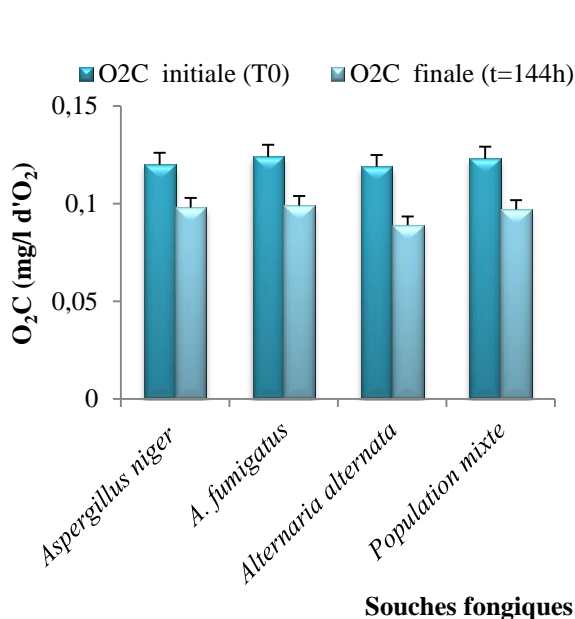
L'estimation de taux de biodégradation de l'hydrocarbure par les souches bactériennes, correspond à l'oxygène consommé lors de la réaction. La différence entre la consommation d'oxygène finale ( $t=144$  heures) et l'initiale du 1<sup>er</sup> jour ( $t_0$ ), correspond à l'oxygène utilisé pour la biodégradation. Plus la valeur est basse plus la quantité restante de ces composés n'ayant pas subis de dégradation est faible. Autrement dit, plus la valeur détectée dans le milieu est faible, plus les taux de dégradation de matières organiques y compris le pétrole et le kérosène sont élevés.



**Figure.63.** Evaluation de l'O<sub>2</sub>C des bactéries en présence du pétrole brut

**Figure.64.** Evaluation de l'O<sub>2</sub>C des bactéries en présence du kérosène

Après 6 jours d'incubation (figures 63 et 64), on note une oxydation non négligeable des matières organiques présentes. La teneur en oxygène détectées dans les milieux de culture contenant l'inoculum bactérien ou fongique et supplémentés de kérosène ou de pétrole brut diminuent en fonction du temps. Les taux d'oxygène déterminés après 144heures sont inférieurs aux valeurs initiales au début de l'expérimentation et ce, pour toutes les souches étudiées. Les taux les plus bas ont été atteints avec *Serratia marcescens* pour les deux molécules utilisées.

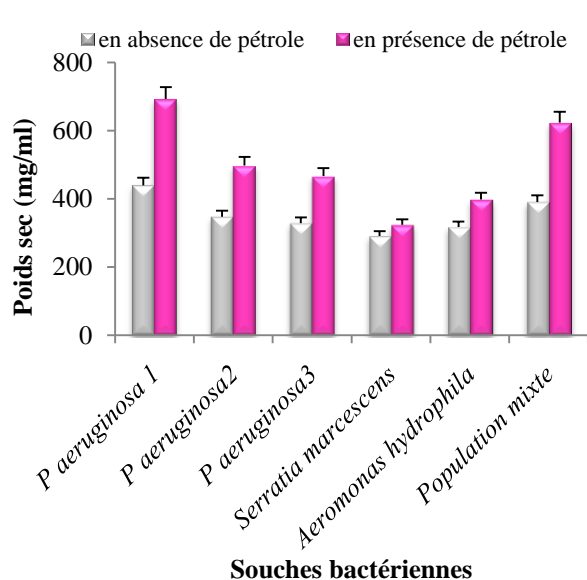


**Figure.65.** Evaluation de l'O<sub>2</sub>C des fungi en présence du pétrole brut

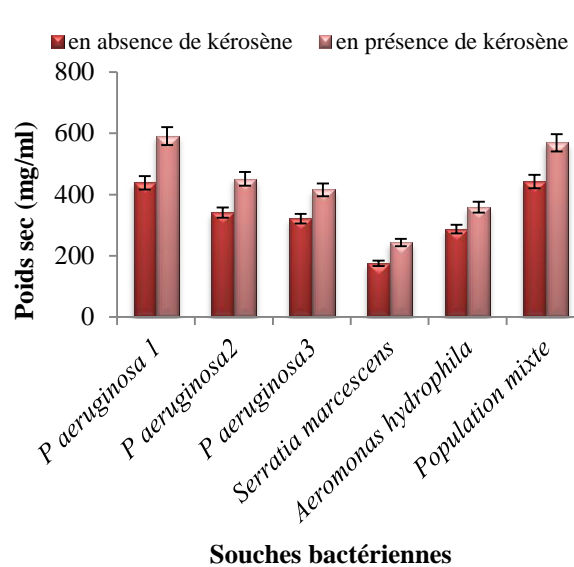
**Figure.66.** Evaluation de l'O<sub>2</sub>C des fungi en présence du Kérosène

Les figures 65 et 66 concernant le taux d'oxygène nécessaire aux souches fongiques à la dégradation du pétrole brut et/ou au kérosène, démontrent des valeurs importantes pour toutes les souches y compris la population fongique.

#### 12.1.4. Le poids sec de l'inoculum microbien



**Figure.67.** Poids sec de l'inoculum bactérien en présence du pétrole brut

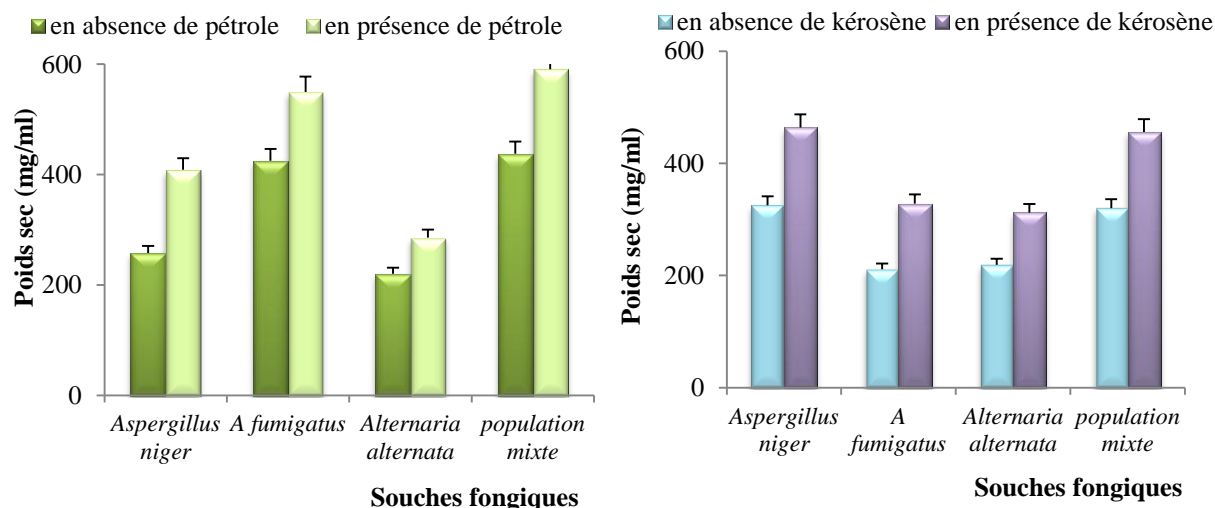


**Figure.68.** Poids sec l'inoculum bactérien en présence du kérosène

Les figures 67 et 68, présentent le poids sec de l'inoculum bactérien, obtenu à partir des cultures après 144 heures d'incubation. Il s'est avéré que le poids sec des cultures contenant les molécules d'hydrocarbures est nettement supérieur à celui enregistré à partir des cultures sans hydrocarbures. Ceci témoigne d'un bon développement des souches testées, sachant que la biomasse bactérienne la plus élevée est celle de *P.aeruginosa1* (693 mg/ml) avec le pétrole brut, suivi par celle de la population mixte (624 mg/ml) valeur atteinte avec le pétrole brut et (669 mg/ml) avec le kérosène.

Les résultats présentés dans les figures (69 et 70) montrent que le poids sec de l'ensemble des souches fongiques est plus important en présences de l'hydrocarbure qu'en son absence. Les souches fongiques inoculées semblent tolérer la présence des deux molécules utilisées et ce avec des maximas enregistrés par *Aspergillus fumigatus* (601 mg/ml) en présence du pétrole brut et par la population mixte (746 mg/ml) mais cette fois ci avec le kérosène. Les valeurs minimales ont été obtenues avec *Alternaria alternata* dans les milieux contenant chacune des deux molécules (286 mg/ml et 298/ml mg).

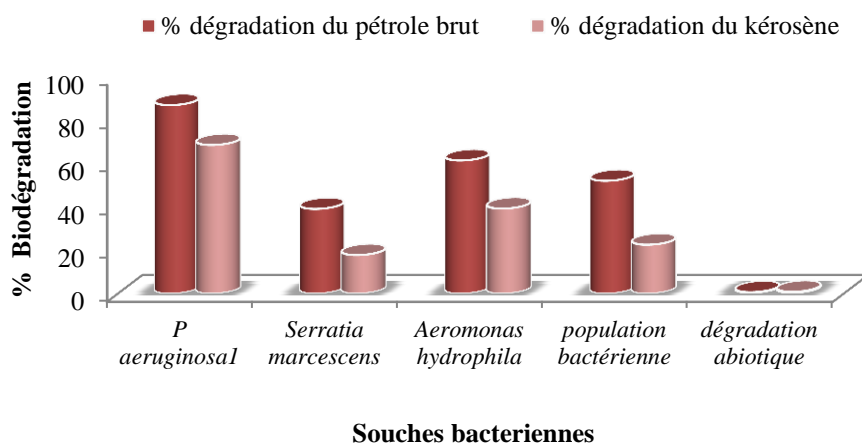




**Fig.69.**Poids sec de la biomasse fongique total de l'inoculum en présence du pétrole

**Fig.70.**Poids sec de la biomasse fongique total de l'inoculum en présence du kérosène

## 12.2. Evaluation des taux de biodégradation des hydrocarbures



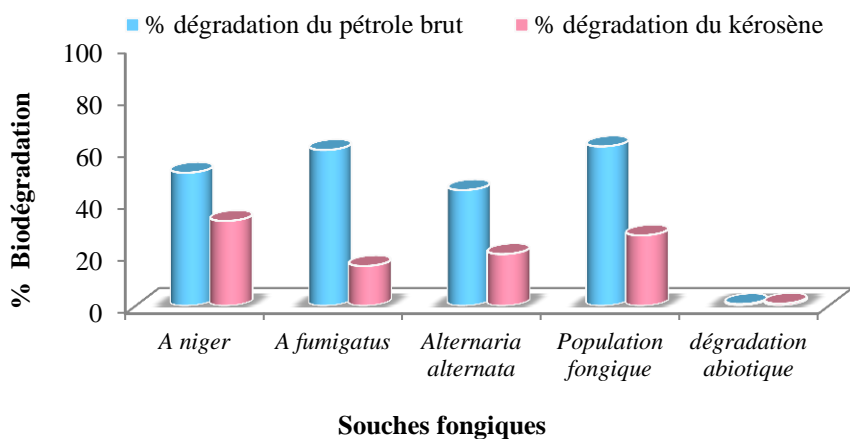
**Figure.71.** Taux de biodégradation des hydrocarbures par les bactéries

Les taux de biodégradation des deux molécules d'hydrocarbures, ont été déterminés à partir des cultures in vitro sur une période de 144 heures. Le dosage a été réalisé par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) sous des conditions bien déterminées et les concentrations calculées ont été converties en pourcentage de biodégradation

En effet, le pétrole brut semble être le composé le plus facilement biodégradable par les bactéries (Fig.71). Les taux les plus élevés sont enregistrés par *Pseudomonas aeruginosa* avec un pourcentage important de 86,87% pour le pétrole brut et de 68,49% pour le kérosène ; suivi par *Aeromonas hydrophila* puis *Serratia marcescens* ; avec respectivement (61,38%, 39,2%) et (39,06%, 17,78%).

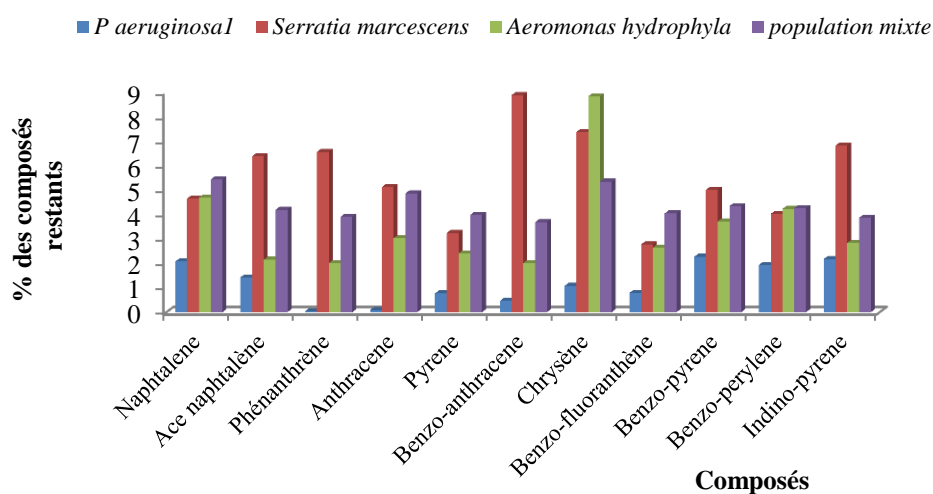
Le consortium bactérien ou la population mixte bactérienne a provoqué la biodégradation de plus de la moitié du pétrole brut du milieu (52,01%). Cependant, ce même consortium n'arrive à biodégrader que les 22% du kérosène.

Une dégradation abiotique est également observée durant la même période d'incubation avec 0,7% pour le pétrole brut et de 0,89% pour le kérosène.



**Figure.72.** Taux de biodégradation des hydrocarbures par les champignons microscopiques

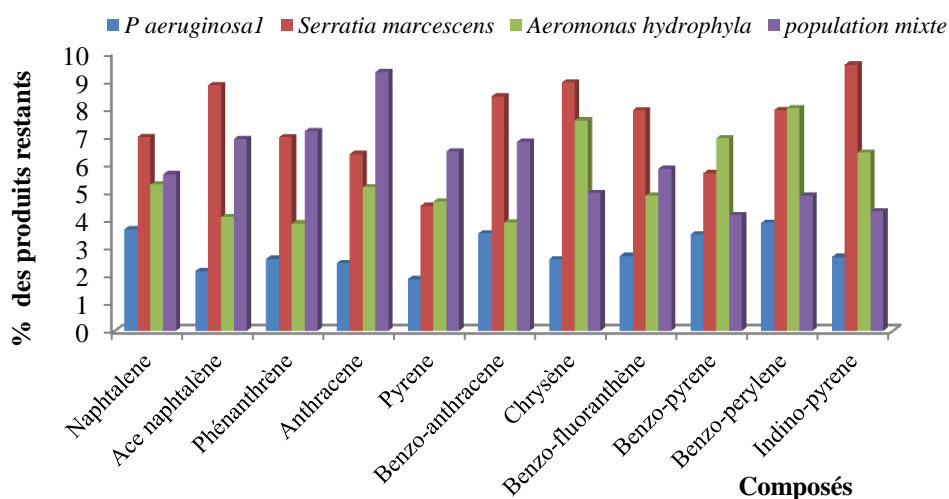
Pour leur part, les champignons microscopiques semblent posséder des potentialités métaboliques de biodégradation importantes vis à vis des deux molécules, le pétrole et le kérosène (Fig72). Les taux les plus élevés ont été notés pour le pétrole brut par la population mixte (61,32%) et le kérosène par l'espèce *Aspergillus niger* (32,67%).



**Figure.73.** Pourcentage des composés restants de la biodégradation du pétrole brut par les bactéries

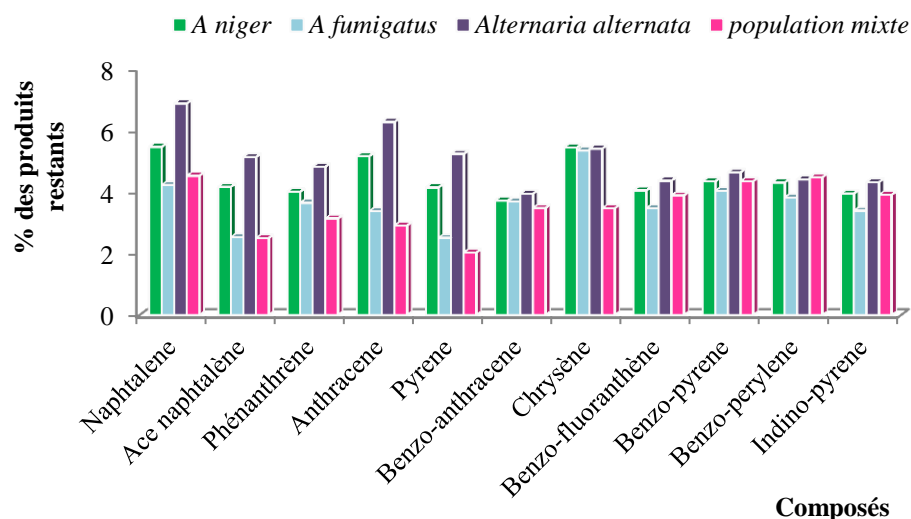
La biodégradation des deux molécules se réalise avec des affinités envers le composé le plus facilement dégradé. Malgré que le kérosène, compte parmi les divers produits du pétrole brut, sa biodégradation est moindre par rapport à celle du pétrole brut. La figure 73 illustre les composés restants de l'utilisation des produits du pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie par les bactéries. Cependant les HAP du pétrole brut semblent être facilement dégradés par toutes les souches. *Pseudomonas aeruginosa* est de loin la souche qui dégrade facilement les composés pétroliers en 3,4 et 5 cycles benzéniques, suivie par *Aeromonas hydrophila*, espèce ubiquiste qui paraît efficace envers les composés aromatiques ayant 3 cycles, exception faite pour l'anthracène. Elle possède des capacités métaboliques non négligeables face à des composés à 4 cycles benzéniques sauf le chrysène. En outre cette souche d'*Aeromonas hydrophila* excelle dans la biodégradation des hydrocarbures polycycliques à titre d'exemple ceux à 5 cycles benzéniques.

De son côté, la population mixte bactérienne possède un fort pouvoir de dégradation pour toutes les substances composant le pétrole brut. Seuls, le naphthalène et le chrysène sont exclus de la liste des produits à 2 et 4 cycles aromatiques. L'espèce *Serratia marcescens* quant à elle, semble avoir des capacités contre les substances ayant 4 cycles benzéniques dans leur structure chimique et une efficacité moindre vis à vis des produits contenant 5 cycles aromatiques.

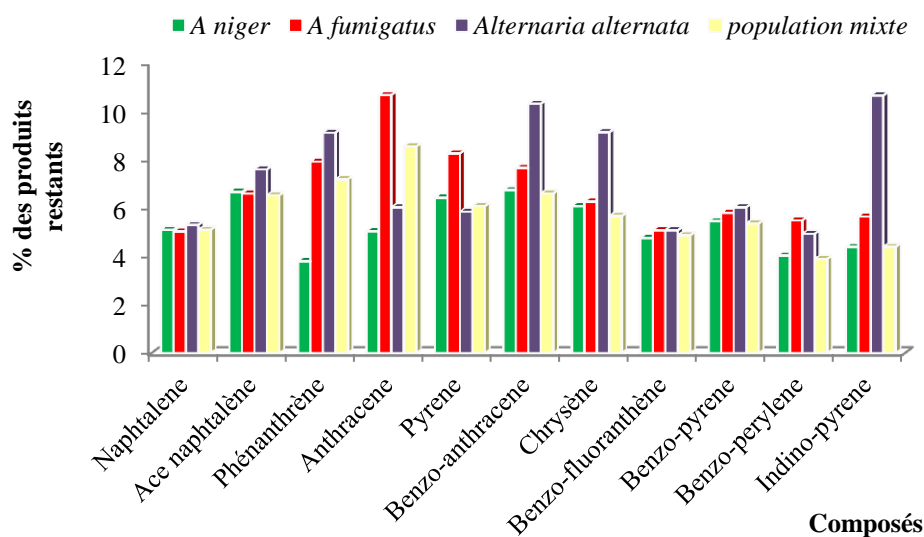


**Figure.74.** Pourcentage des composés restants de la biodégradation du kérosène par les bactéries

Les composés restants de la biodégradation du kérosène sont par contre difficilement biodégradables par presque toutes les souches bactériennes à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* qui semble avoir des capacités contre les composés contenant 3 et 4 cycles aromatiques et une efficacité moindre vis à vis des produits contenant 2,5 et 6 cycles aromatiques(Fig74).



**Figure.75.** Pourcentage des composés restants de la biodégradation du pétrole brut par les champignons microscopiques



**Figure.76.** Pourcentage des composés restants de la biodégradation du kérosène par les champignons microscopiques

La même chose a été notée pour les champignons microscopiques envers les composés constituant le pétrole brut (Fig 75) et le kérosène, qui s'avèrent plus résistants (Fig 76). Les HAP semblent inaccessibles aux souches fongiques agissant individuellement puisqu'elles n'arrivent pas à les éliminer du milieu. Tout de même, ils sont accessibles, mais difficilement à l'effet de groupe de la population mixte qui réussit à les biodégrader avec des taux assez faibles.

Les chromatogrammes de l'analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) présentent des pics qui renseignent sur les HAP restants de la biodégradation du pétrole brut et/ou le kérosène. Les figures 77 et 78 illustrent les pertes abiotiques par les différents pics majeurs apparents.

Les profils de l'HPLC montrent les temps de rétention des différents sous produits détectés après 144 heures. De ceci, il apparaît que la souche 1 de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* est la souche la plus performante de l'inventaire, car elle biodégrade avec succès le pétrole brut, et d'un degré moindre le kérosène. Les pics formés lors de la biodégradation sont tous des pics mineurs et ne sont pas abondants, alors que d'autres pics ont disparu (Fig 79 et 80).

*Aeromonas hydrophila* semble avoir un fort pouvoir de dégradation pour le pétrole brut (Fig 81). La plupart des pics apparus sont des pics mineurs (6) et un seul pic majeur dont le temps de rétention est de 12,5 min. Pour ce qui est du kérosène (Fig 82), le profil de l'HPLC présente des pics majeurs dont les plus importants sont apparus à 2,5 min et à 12,5 min.

Les chromatogrammes de la biodégradation des deux produits par *Serratia marcescens* comprennent un nombre de 11 pics majeurs représentant les 11 HAP restants. Toutefois, les temps de rétention du kérosène sont plus importants (Fig 83 et 84).

Les figures 85 et 86, illustrant la biodégradation du consortium bactérien des deux produits hydrocarbonés, présentent des pics plus importants et nombreux pour les produits du kérosène par rapport à ceux du pétrole brut.

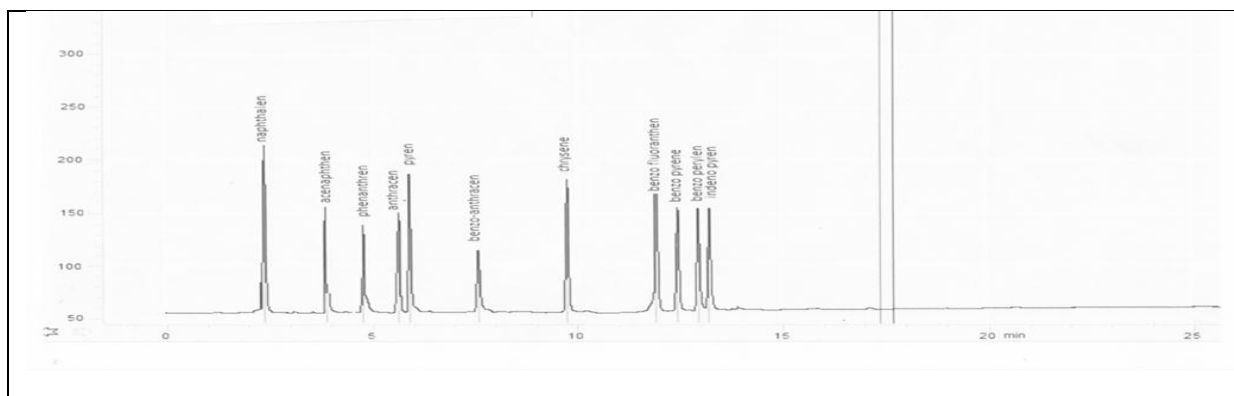


Figure.77. Chromatogramme des taux de dégradation abiotique du pétrole brut

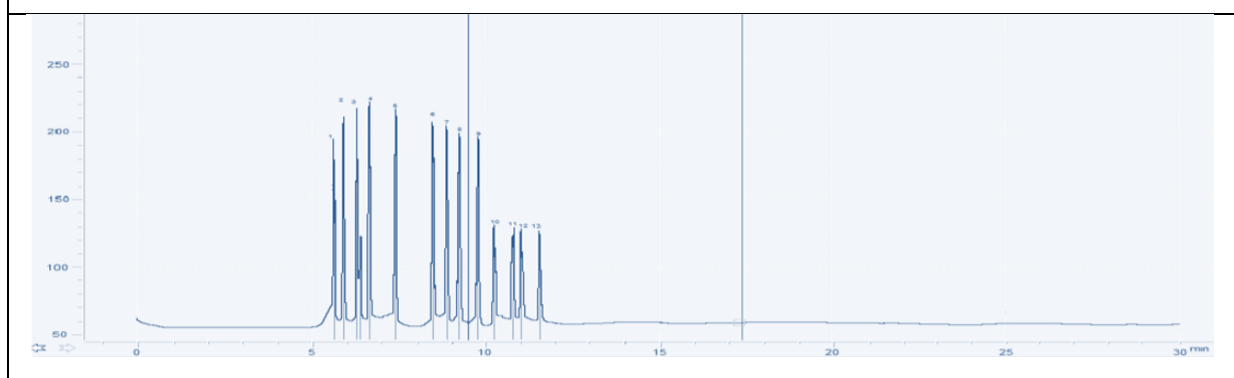


Figure.78. Chromatogramme des taux de dégradation abiotique du kérosène

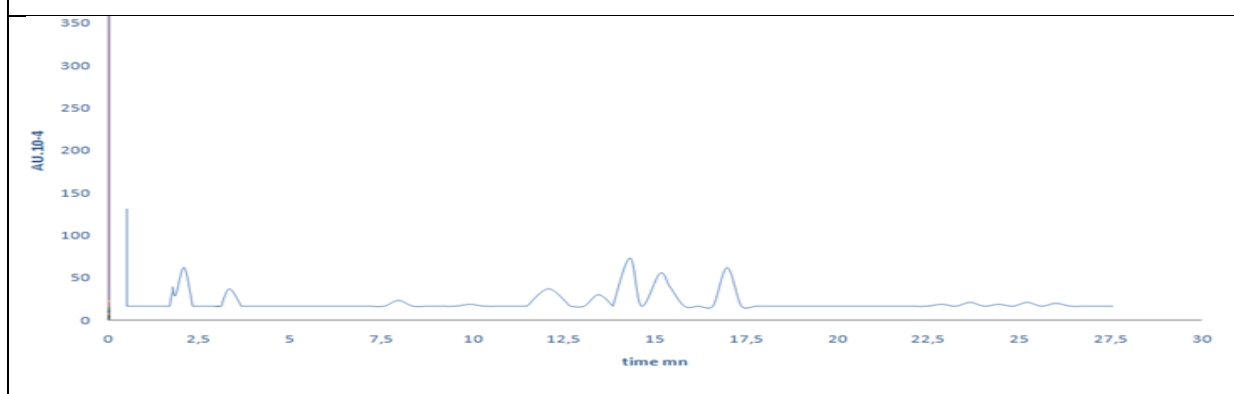


Figure.79. Chromatogramme des taux de biodégradation du pétrole brut par *P. aeruginosa 1*

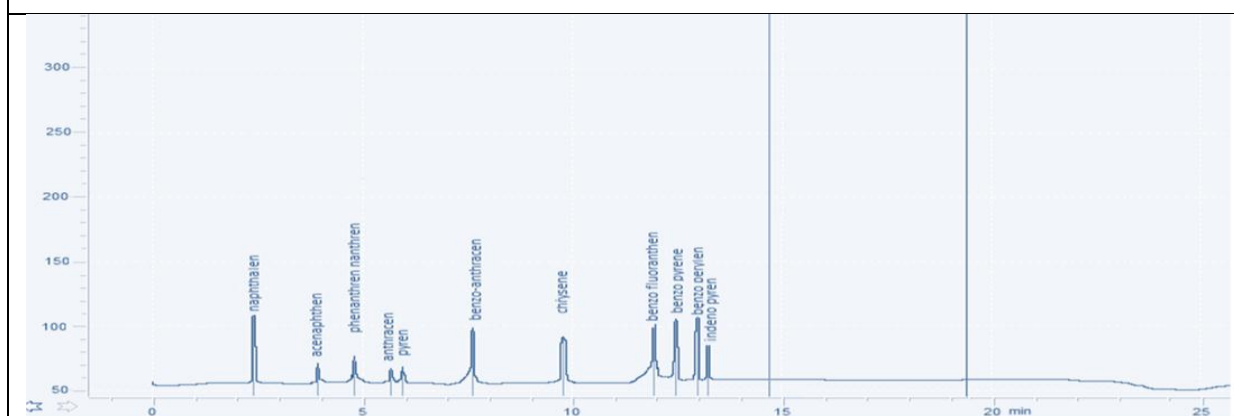
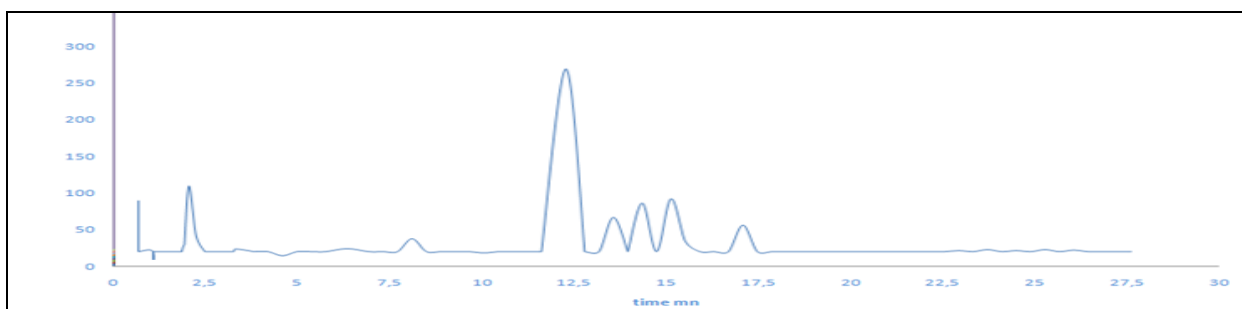
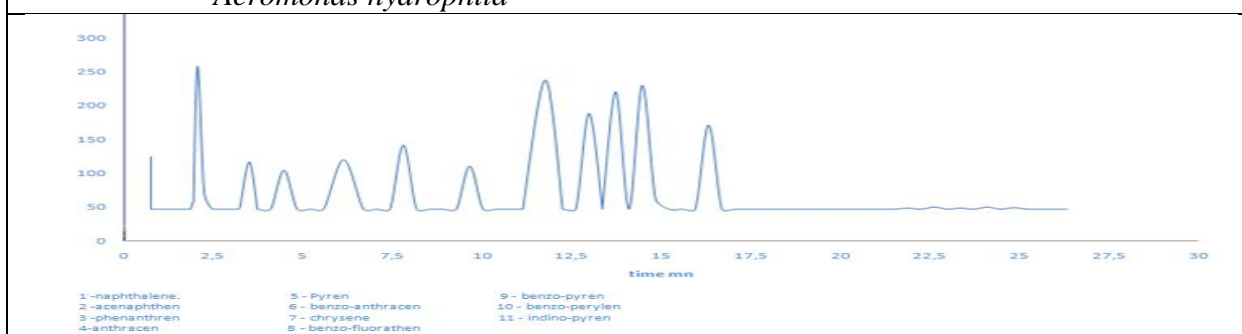


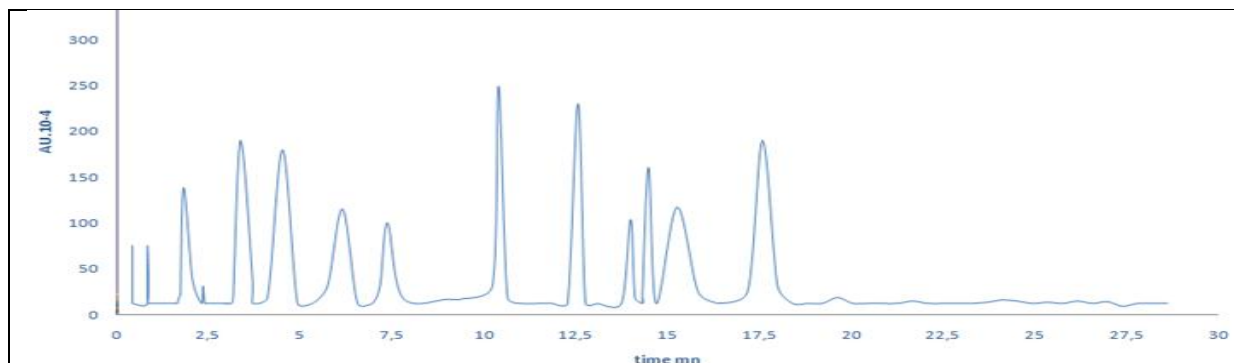
Figure.80. Chromatogramme des taux de biodégradation du kérosène par *P. aeruginosa 1*



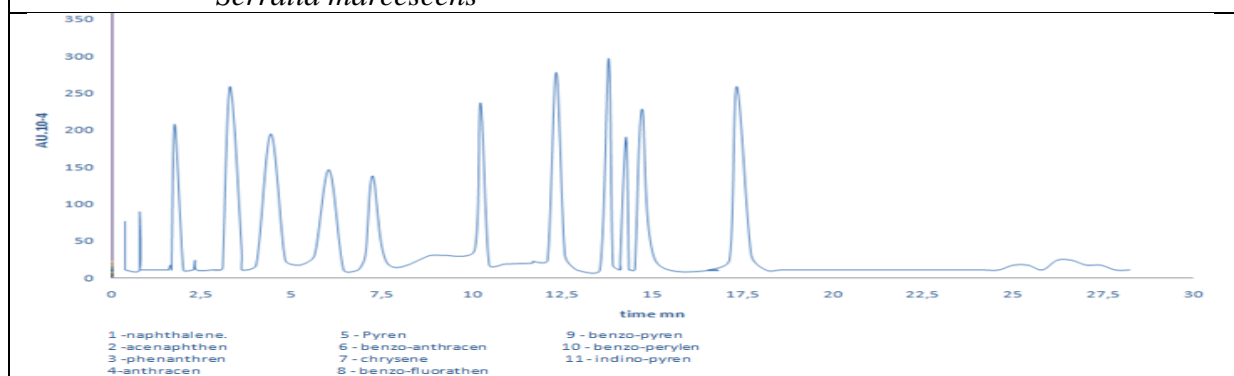
**Figure.81.** Chromatogramme des taux de biodégradation du pétrole brut par *Aeromonas hydrophila*



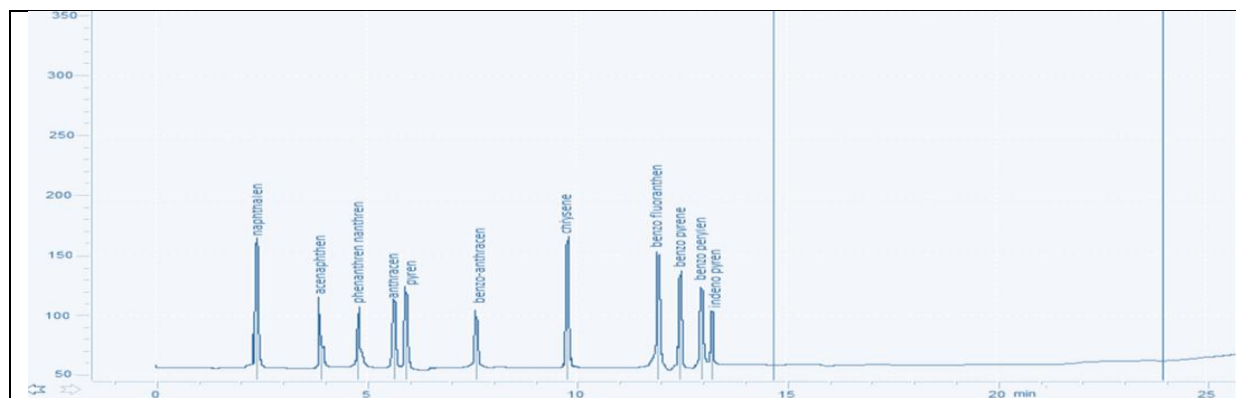
**Figure.82.** Chromatogramme des taux de biodégradation du kérosène par *Aeromonas hydrophila*



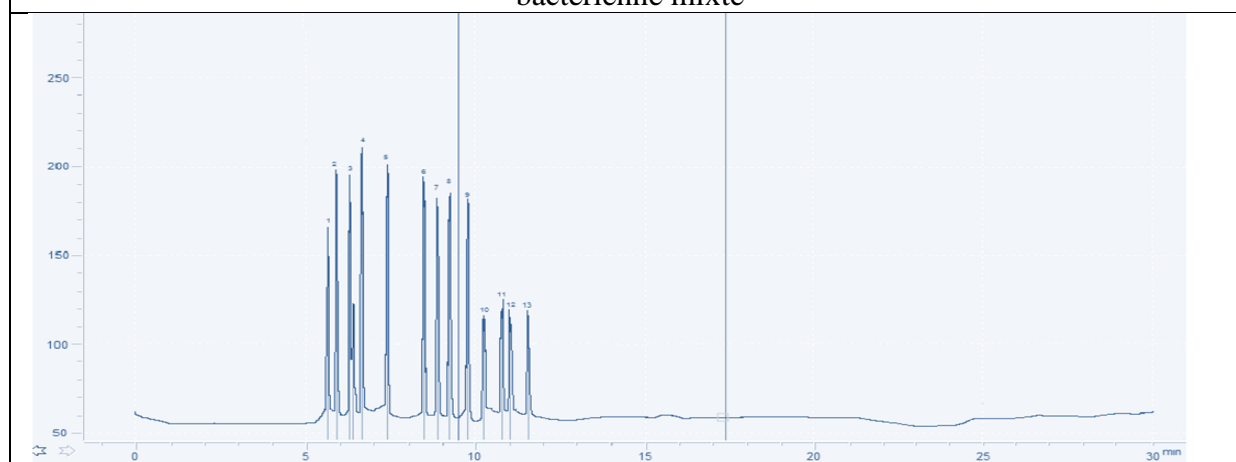
**Figure.83.** Chromatogramme des taux de biodégradation du pétrole brut par *Serratia marcescens*



**Figure.84.** Chromatogramme des taux de biodégradation du kérosène par *Serratia marcescens*



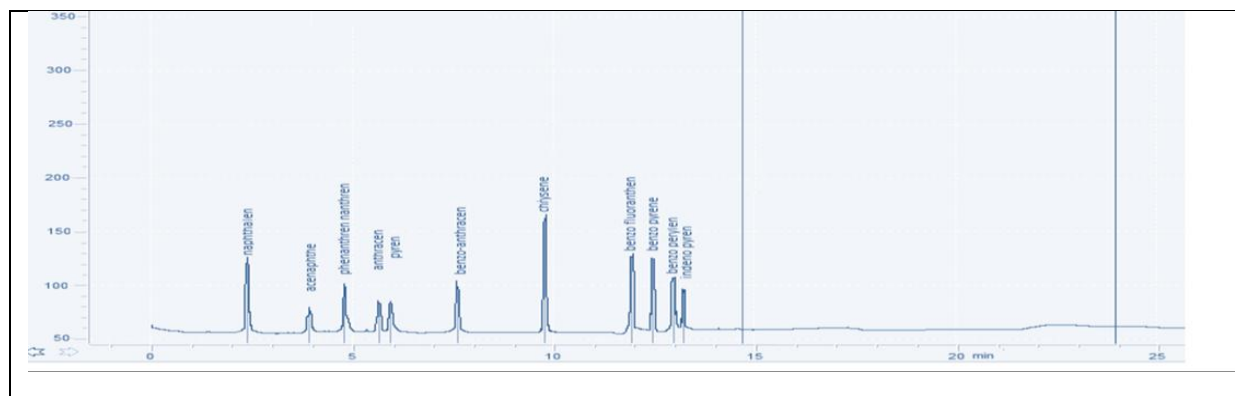
**Figure.85.** Chromatogramme des taux de biodégradation du pétrole brut par la population bactérienne mixte



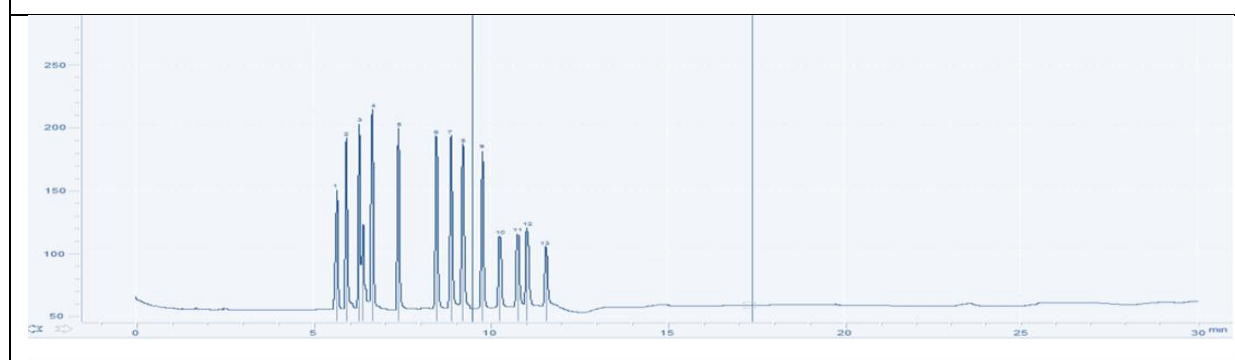
**Figure.86.** Chromatogramme des taux de biodégradation du kérosène par la population bactérienne mixte

Les profils de l'analyse par HPLC des champignons microscopiques, sont illustrés dans les figures ci-dessous. La biodégradation du pétrole brut est meilleure par le consortium fongique suivie par celle de l'*Aspergillus fumigatus*. Les chromatogrammes présentent 11 pics mineurs (Fig 93 et 87), ceux d'*Alternaria alternata* et *A. niger* sont tous des pics majeurs et abondants (Fig 89, 91). En ce qui concerne la biodégradation du kérosène, les pics formés sont alors plus importants que ceux du pétrole brut (Fig 90, 88 et 94). Les temps de rétention sont de 5 min pour toutes les souches fongiques, exception faite pour *Alternaria alternata* dont les pics sont apparus à 2,5 min (Fig 92).

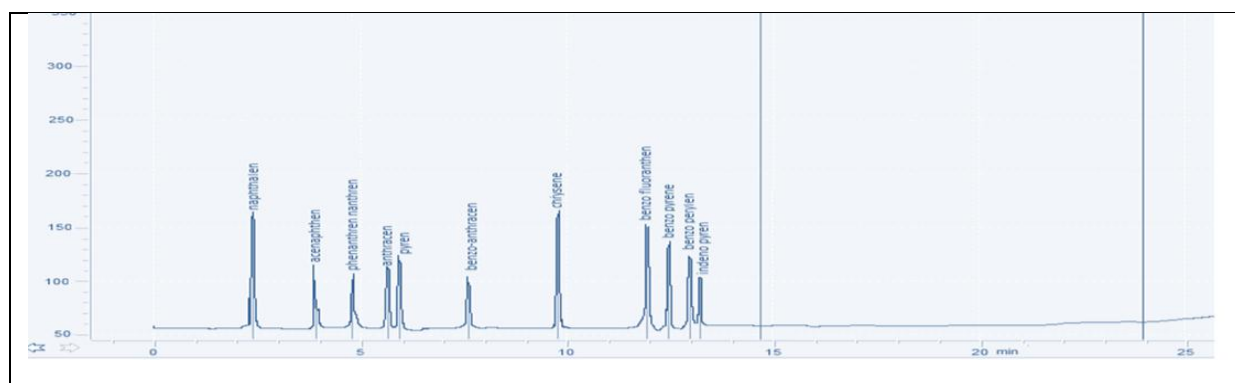




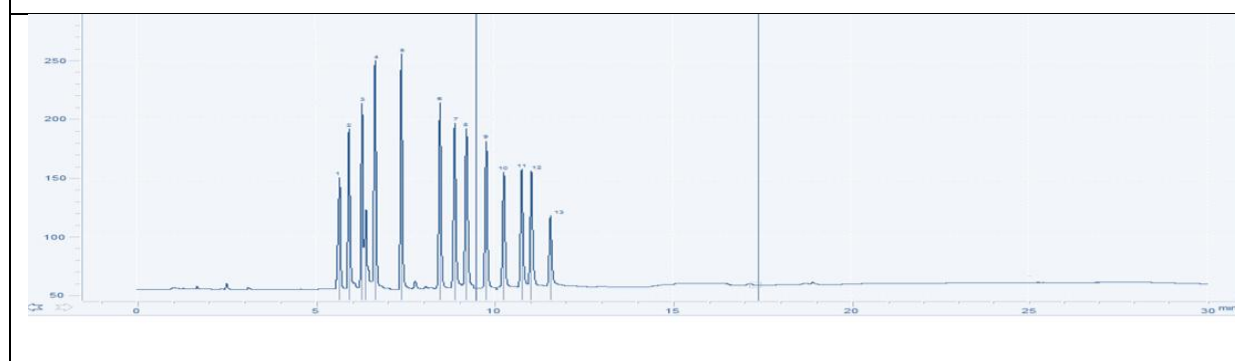
**Figure.87.** Chromatogramme des taux de biodégradation du pétrole brut par *A. fumigatus*



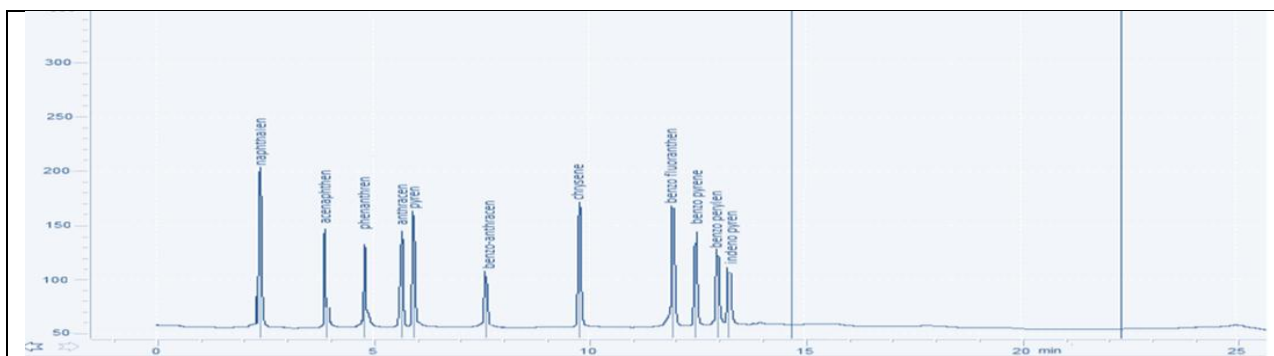
**Figure.88.** Chromatogramme des taux de biodégradation du kérosène par *A. fumigatus*



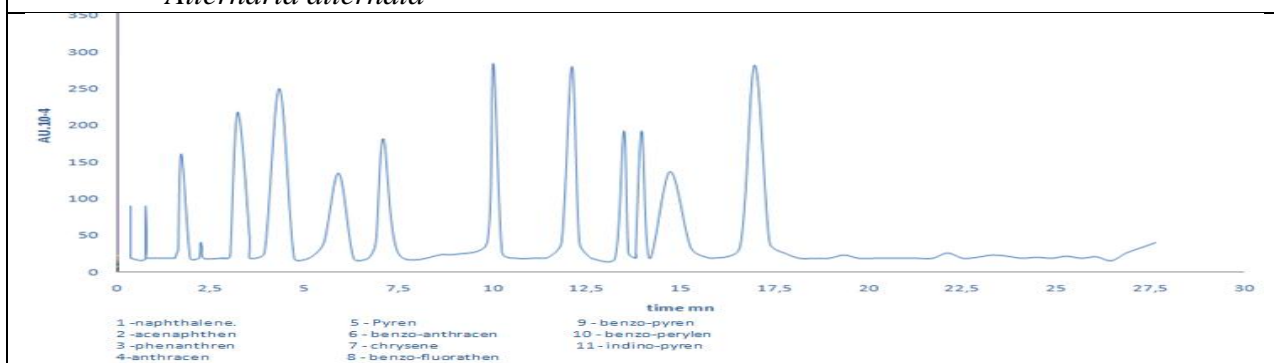
**Figure.89.** Chromatogramme des taux de biodégradation du pétrole brut par *A. niger*



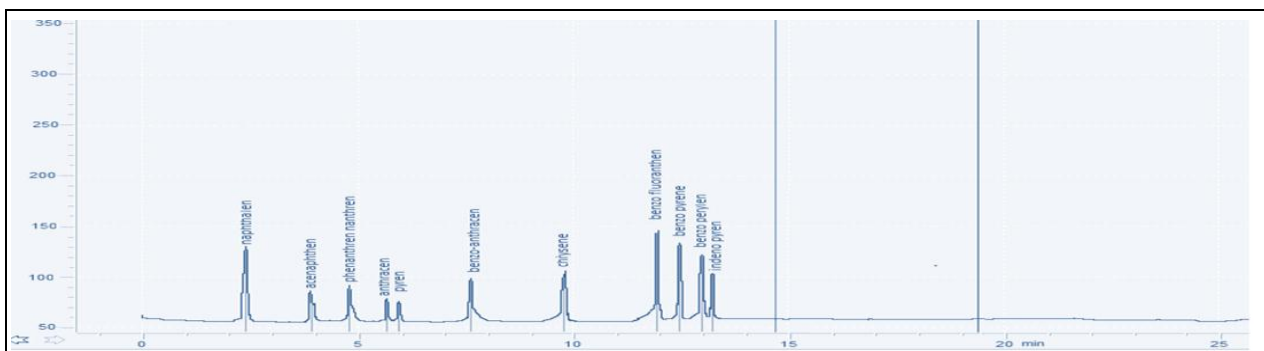
**Figure.90.** Chromatogramme des taux de biodégradation du kérosène par *A. niger*



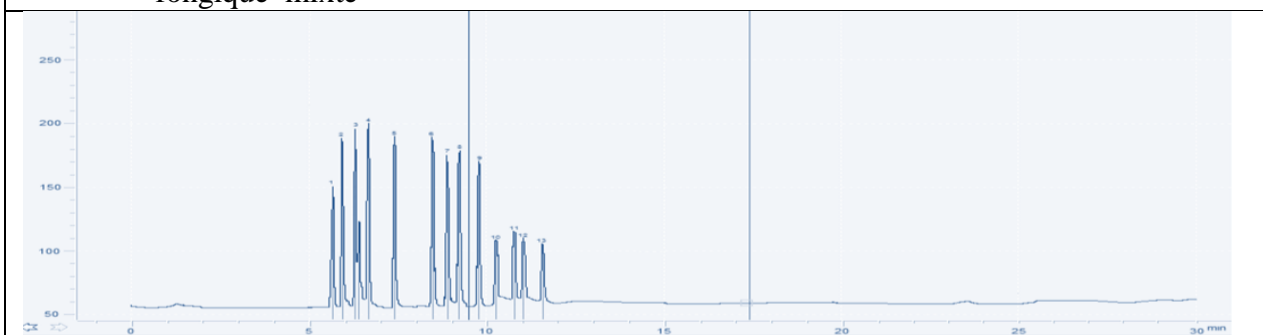
**Figure.91.** Chromatogramme des taux de biodégradation du pétrole brut par *Alternaria alternata*



**Figure.92.** Chromatogramme des taux de biodégradation du kérosène par *Alternaria alternata*



**Figure.93.** Chromatogramme des taux de biodégradation du pétrole brut par la population fongique mixte



**Figure.94.** Chromatogramme des taux de biodégradation du kérosène par la population fongique mixte

### **13. Discussion**

Afin de vérifier la capacité des souches bactériennes et fongiques étudiées à dégrader le pétrole brut et le kérosène, l'étude de l'évolution de certains paramètres comme la concentration et la biomasse microbienne, le pH, la concentration de l'oxygène et le taux de biodégradation a été réalisée. Notons aussi que les essais avec les populations mixtes bactérienne et fongique ont soutenu nos investigations.

Les analyses de ces paramètres font ressortir qu'il y a un bon développement de toutes les souches testées avec une biomasse qui augmente d'une manière assez importante et ce, en présence des deux molécules étudiées. Cette augmentation est plus accentuée pour les souches bactériennes et fongiques pour le pétrole brut que le kérosène. Cette croissance ainsi observée, est accompagnée d'une acidification du milieu et d'une consommation de l'oxygène; traduisant ainsi une activité microbienne par utilisation du pétrole brut et du kérosène comme source de carbone. L'augmentation de la biomasse qui est accompagnée par une diminution de pH est conforme à la présence d'une activité microbienne (Leahy et Colwell, 1990).

Le pH est un facteur important de la croissance et de l'activité enzymatique des microorganismes (Sherwood et *al.*, 2010 ; Ballerini, 1999). Il doit être situé pour les bactéries, entre 5 et 9 avec un optimum aux alentours de 7 (Gabet, 2004). Les micromycètes peuvent se développer dans une large gamme de pH ; elles se développent normalement pour des pH compris entre 3 et 8 (Tabuc, 2007). Plusieurs champignons poussent bien à pH entre 4 et 5 (Singh, 2006). Les valeurs de pH que nous avons relevé restent bien incluses dans ces intervalles donnés.

La réduction du pH des milieux de culture lors de la période d'incubation des différentes espèces microbiennes est certainement due aux différentes réactions biochimiques qui entraînent l'assimilation des composés du pétrole brut et/ou kérosène d'une part, avec synthèse des acides gras porteurs de groupements « COOH » d'autre part, causant ainsi leur acidité. Habituellement, l'utilisation microbienne des hydrocarbures conduit souvent à la production d'acides organiques et d'autres produits métaboliques (Amund et Adebisi, 1991; (Nwachukwu et Ugoji, 1995; Okpokwasili et James, 1995 ; Oboh et *al.*, 2006). Cette activité provoque le principe de la biodégradation basé sur l'utilisation des hydrocarbures comme substrat de croissance où le carbone est converti en CO<sub>2</sub> et biomasse (Scriban, 1999; Bordjiba et *al.*, 2001; Bordjiba, 2003). Nos résultats concordent avec ceux de Nwachukwu et Ugoji, (1995) ; Margesin et Schinner (2001) ; Hussien et Hassan (2008) ; Vanishree et *al.* (2014) et Al Jawahiri et *al.*, (2014). En effet, il a été observé que durant la dégradation, par exemple,

du xylène (Labrecque, 2003), de l'anthracène (Wong et *al.*, 2002) et du fluoranthène (Villemain et *al.*, 2006), il y a production d'acides intermédiaires qui acidifient ainsi le milieu. Il faut signaler aussi que *Pseudomonas aeruginosa* est connue par son acidification du milieu. En plus, la métabolisation des hydrocarbures par les champignons exige généralement un pH acide (entre 3,5 à 6) (Bocard, 2006).

L'oxygène constitue un facteur particulièrement important pour le métabolisme des microorganismes et la biodégradation des hydrocarbures (Cerniglia, 1992 ; Chukwura et *al.*, 2005). Les micromycètes prennent plus de temps pour se multiplier par rapport à leurs homologues bactériens (Prenafeta - Boldu et *al.*, 2001). Ahmad et *al.* (2009) suggèrent qu'une concentration minimale des cellules de  $10^5$  CFU ml<sup>-1</sup> est nécessaire pour l'efficacité du processus de bioremediation : ce qui est en accord avec nos résultats. Al-Jawahiri (2014) a rapporté un gain significatif de poids d' *A. niger* en présence de 10% de kérosène.

La dynamique des communautés microbiennes dépend des hydrocarbures présents et de leurs concentrations (Head et *al.*, 2006). L'aptitude à métaboliser le pétrole est donnée à de nombreux types de microbes, mais certains sont plus polyvalents que d'autres. Les cinétiques de croissances obtenues sont très variables car les vitesses de dégradation des hydrocarbures sont très différentes selon que les composés soient fournis individuellement ou en mélange (Solano-Serena et *al.*, 2001). Ce type de comportement pourrait s'expliquer d'un côté, par les travaux de Bordenave et *al.* (2007) et Al-Saleh et *al.* (2009), qui ont montré qu'un micro-organisme individuel métabolise une gamme limitée de substrats d'hydrocarbures. Une souche unique ne peut pas métaboliser tous les composants trouvés dans le pétrole brut, et la biodégradation inclut des réactions successives (Bordenave et *al.* 2007 ; Stauffert et *al.*, 2011 ; Greene et *al.*, 2000; Kaplan et *al.*, 2004). Il n'y a non seulement des effets synergiques mais aussi des effets antagonistes qui existent entre les différents microorganismes. Certains composés intermédiaires générés au cours de l'attaque initiale peuvent facilement être utilisés par d'autres micro-organismes (Venosa et Zhu, 2003). Par conséquent, il est important d'utiliser un consortium microbien apte à utiliser le plus efficacement le processus de biodégradation (Yakimov et *al.*, 2007) . Ce consortium est une collection d'une variété de capacités enzymatiques et pourrait former un système de dégradation complet. D'un autre côté, ceci peut être même attribué à la composition complexe de l'hydrocarbure utilisé (Adebusoye et *al.*, 2006). La très faible biodégradabilité du pétrole brut s'explique par sa composition chimique. Il s'agit d'un produit riche en composés résistants ou réfractaires à l'activité microbienne de biodégradation (Oudot, 2000). Il est toutefois important de rappeler

que la multiplicité et la complexité des molécules qui composent le pétrole brut est telle que sa composition réelle est inconnue (Adebusoye et *al.*, 2006). Le kérosène n'est qu'un produit du pétrole brut, et contient une certaine proportion d'azote (Akpoveta et *al.*, 2011).

Des études de biodégradation pour vérifier la capacité des populations microbiennes mixtes (consortium) à utiliser le pétrole brut et/ou le kérosène, comme seule source de carbone a été rapporté par de nombreux auteurs : Ghazali et *al.*, 2004; Yakimov et *al.*, 2007 ; Adebusoye et *al.*, 2007; Vandecasteele, 2008 ; Das et Chandran ; 2011 ; Patil et *al.*, 2012 et Al-Jawhari et *al.*, 2014. Nos résultats coïncident avec ceux de d'Okpokwasili et James (1995), qui ont observé une utilisation meilleur du kérosène par les cultures pures que les cultures mixtes. Sunita et *al.* (2013) ; Ghazali et *al.*( 2004), de leur part confirment une meilleure dégradation de la part du consortium microbien, par rapport à celle des souches individuelles.

La littérature scientifique révèle que les bactéries et les champignons sont des agents actifs dans la dégradation du pétrole brut et du kérosène (Rahman et *al.*, 2003 ; Leahy et *al.*, 2003 ; Adekunle et Adebambo, 2007 ; Vanishree et *al.*, 2014 ; Al- Jawhari et *al.*, 2014). Plusieurs bactéries sont même connus pour se développer exclusivement sur les hydrocarbures (Yakimov et *al.*, 2007). Il a aussi été établi que les bactéries étaient qualitativement et quantitativement les plus efficaces dans cette fonction (Prince, 2005). L'utilisation de micro-organismes pour la biodégradation a été largement acceptée comme une formidable approche en raison du succès enregistré par divers chercheurs. Les souches bactériennes utilisées dans nos tests appartiennent au groupe *Gamma-Protéobacteria*, principal acteur de la biodégradation. Selon Roling et *al.* (2002), ce groupe devenait dominant après une contamination pétrolière. La souche *Pseudomonas aeruginosa* est toujours sollicité non pas pour son affinité envers les différentes classes d'hydrocarbures (Obayori, 2008), mais aussi pour un ensemble de produits xénobiotiques (Habe et *al.*, 2003 ; Wackett et Hershberger, 2001). Elle est aussi identifiée comme un agent dégradant le kérosène (Akpor et *al.*, 2007 ; Makut et *al.*, 2010 ; Khan et *al.*, 2011 ; Kim et Lee, 2008). Les deux autres souches *Serratia marcescens* et *Aeromonas hydrophila*, ont été cité dans des travaux antérieurs pour leur habilité à biodégrader le pétrole brut ou le kérosène (Ajisebutu, 1988 ; De la Fuente, 1999 ; Wongsu et *al.*, 2004; Rajasekar et *al.*, 2010 ; Kaczorek et *al.*, 2010). La production des biosurfactants (agents tensio-actifs) pour la solubilisation des hydrocarbures aliphatiques ou aromatiques par ces souches utilisées est rapporté par plusieurs auteurs (Mittal et Singh, 2009; Das et Mukherjee, 2005; Deziel et *al.*, 1996 ; Affandi et *al.*, 2014).

De nombreuses études ont conclu que la plupart des espèces fongiques sont d'excellents dégradeurs d'hydrocarbures (Gadd, 2001 ; Okoh, 2003 ; Sutherland, 2004). La croissance des champignons conduit au processus de dégradation, qui est révélé par la formation de nouveaux composés et la disparition d'autres composés. Ce qui fait référence à la capacité des champignons en raison de cassure des liaisons de carbone dans les hydrocarbures, puis modifier les longues chaînes en courtes puis en gaz méthane et de CO<sub>2</sub> (Walworth, 2003 ; Daniel et *al.*, 2007). Du fait de leur caractère hydrophobe, les molécules constituant le pétrole brut ou le kérosène ont tendance, comme certains pesticides, à interagir avec différents colloïdes du sol, plus particulièrement les régions hydrophobes de la matière organique avec lesquelles ils peuvent former des liaisons plus au moins stables et ainsi persister dans l'environnement (Hartmann, 1996). La biodégradation du pétrole brut et du kérosène s'accompagne de l'apparition de métabolites, avec un changement de la structure chimique, ce qui provoque des modifications de leurs comportements dans l'environnement. La biodégradation est liée aussi à divers facteurs, notamment le nombre de noyaux aromatiques et le type de structure cyclique condensée (Wild et *al.*, 1991). De nombreux HAP à deux ou à trois noyaux, comme le naphthalène, le phénanthrène et l'anthracène, sont rapidement décomposés et peuvent être utilisés comme substrat primaire par les organismes qui dégradent les HAP (Uthe, 1991). Les composés de haut poids moléculaire, comme le pyrène et le benzo(a)pyrène, se décomposent plus lentement. Certains HAP résistants à la dégradation ne constituent pas des sources adéquates de carbone et se décomposeraient surtout par cométabolisation (Neff, 1979).

Les champignons filamenteux *Aspergillus niger* et *A. fumigatus* sont connus à ce jour pour être capables de dégrader les hydrocarbures (Saratale et *al.*, 2007 ; Chaillan et *al.*, 2004 ; Al-Jawhari, 2014 et Jung Tae Kim, 2014). *Alternaria alternata* est à son tour rapportée par Alsulami et *al.* (2014).

Les taux de dégradation du pétrole brut sont généralement meilleurs par rapport à ceux du kérosène, que ce soit pour les souches pures ou en cultures mixte. *P. aeruginosa* est de loin la souche la plus performante pour le pétrole brut que pour le kérosène. Parmi les champignons filamenteux testés, *Aspergillus fumigatus* et *A. niger* ont réalisé un taux plus de 50% du pétrole brut.

Nos résultats indiquent que tous les organismes bactériens et fongiques utilisent au maximum le substrat d'hydrocarbure (pétrole brut et kérosène) fourni comme seule source de carbone et d'énergie, même si le niveau d'utilisation diffère d'une souche à une autre (en

raison des conflits dans leur croissance) et d'un substrat hydrocarboné aux autres, en raison des écarts évidents dans leurs tailles moléculaires.

En revanche, l'introduction de cultures mixtes de bactéries et de champignons pour la dégradation du pétrole brut ou du kérosène a été trouvée pour être efficace (Yuan *et al.*, 2000). Seulement, la population fongique utilise au mieux les produits hydrocarbonés. Cependant, les cultures de souches pures ont donné des résultats meilleurs que ceux des cultures mixtes. Le même constat a été signalé par Okerentugba et Ezeronye (2003), qui ont démontré que les *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.* et *Rhizopus spp.* étaient capables de dégrader les hydrocarbures en particulier lorsqu'ils sont utilisés en pure culture. Cette performance des cultures pures des champignons employés individuellement a été élucidée par Villemain *et al.*, (2006) dans la biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques et notamment l'anthracène et le fluoranthène par *Absidia fusca*.

Selon Al Jawahiri (2014), le plus haut taux de biodégradation de pétrole brut par *Aspergillus niger* est de 95% au bout de 28 jours de traitement, mais en culture mixte d'*A. niger* et *A. fumigatus*, le taux est à 90%. Ce taux a diminué en présence de culture fongique mixte composée d'*A. niger*, *A. fumigatus*, *Penicillium funiculosum* et *Fusarium solani*, pour atteindre 70%. On peut déduire que la croissance de la culture mixte a été le plus abondamment soutenue par le pétrole brut que le kérosène. Préférence pour les hydrocarbures de poids moléculaire élevé a été rapporté précédemment (Amanchukwu *et al.*, 1989; Okpokwasili et James, 1995). Ces auteurs ont observé une meilleure utilisation du kérosène par les cultures bactériennes pures que les cultures mixtes, ce qui est en accord avec nos résultats. L'une des raisons possibles données par les auteurs était des propriétés antagonistes des organismes individuels dans le consortium. La résistance du kérosène à la biodégradation pourrait être attribuée en partie à la composition chimique plus complexe du pétrole et du kérosène. Un produit pétrolier raffiné, comme le kérosène contient de courtes chaînes hydrocarbonées de 5 - 14 atomes de carbone en longueur, et est moins susceptible de soutenir la croissance que le pétrole brut (Adebusoye *et al.*, 2007).

L'accessibilité difficile des substrats complexes pour les microorganismes apparaît comme un facteur limitant important à prendre en compte pour expliquer ce phénomène. En effet, ce sont les hydrocarbures les plus lourds et complexes qui résistent le plus à la biodégradation. Les résultats de Solano-Serena *et al.* (2001), montrent que les mono aromatiques se dégradent plus rapidement que les composés linéaires, branchés ou cycliques. Malik et Ahmed (2012) et (Heath *et al.*, 1997), ont trouvé que les bactéries dégradent au

début, les chaînes hydrocarbonées de faible poids moléculaire puis se retournent vers ceux de haut poids moléculaire. Si les bactéries dégradant les composés les plus simples (comme les alcanes linéaires à courte chaîne) sont abondantes dans l'environnement, celles qui possèdent les machineries enzymatiques pour dégrader les composés les plus complexes (comme par exemple les composés aromatiques de plus de quatre cycles) sont beaucoup moins répandues (Rodriguez-Blanco et al. 2010).

L'évolution des populations dégradantes suggère une évolution au cours du temps des voies métaboliques de biodégradation. La diminution du taux de dégradation du kérosène au cours de la culture est un phénomène qui est difficile à expliquer du fait du nombre de facteur influençant une culture. Mirpuri et al. (1997) ont étudié l'inhibition de culture de *Pseudomonas* provoquée par le temps d'exposition au toluène. Ils ont ainsi montré que les bactéries perdaient leur capacité à dégrader le solvant et le nombre de ces bactéries inefficaces augmentait au cours de la culture. Cela pourrait être dû aussi à une toxicité à long terme due au temps de contact entre les microorganismes et le kérosène. Le pétrole brut a été le meilleur substrat pour soutenir la croissance microbienne.

Plusieurs études ont montré que l'élimination des hydrocarbures dépend des conditions environnementales comme le pH, la salinité et la température. Ces derniers peuvent influencer par l'inhibition de la croissance microbienne (LIN et al, 2010).

Maki et al (2005) ont rapporté que la photo-oxydation augmente la biodégradabilité des hydrocarbures de pétrole en augmentant sa biodisponibilité et donc renforcer les activités microbiennes. Les cinétiques de dégradation ont montré que la disparition des HAP se répartit entre une phase abiotique suivie d'une phase biotique. Lors de nos essais, les pertes abiotiques du kérosène sont de 0,89% et ceux du pétrole brut sont 0,7%.



## 14. Conclusion

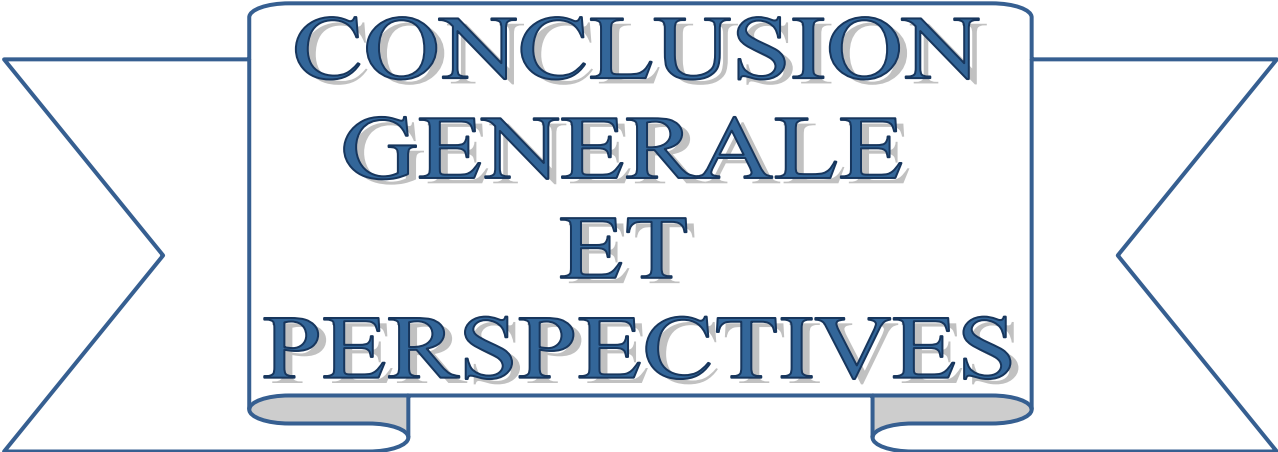
A travers ce modeste travail, deux approches ont été ciblées : la première consiste à suivre la cinétique de la biodégradation au travers de quelques paramètres, la seconde concerne la quantification du taux de biodégradation des deux produits utilisés pétrole brut et kérosène par le biais de trois souches bactériennes (*Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* et *Aeromonas hydrophila*), et trois souches fongiques (*Aspergillus fumigatus*, *A.niger* et *Alternaria alternata*). Les biotests sont effectués en cultures pures ou en cultures mixtes.

Une meilleure tolérance et une grande affinité de *P.aeruginosa* pour les deux molécules ajoutées dans le milieu durant le début de la phase exponentielle de croissance. Un taux de disparition qui arrive à atteindre les 86,87 % pour le pétrole brut et 68,49% pour le kérosène. Des capacités cataboliques non négligeables ont été également notées de la part de *Serratia marcescens* et *Aeromonas hydrophila* face aux deux composés. Les trois espèces bactériennes possèdent un large spectre d'action avec un système enzymatique actif vis-à-vis de ces deux produits hydrocarbonés. Elles pourraient devenir potentiellement intéressantes dans des conditions optimum favorables à leur croissance pour qu'il y ait une induction de leur système enzymatique de biotransformation pour un large panel de produits. Les souches fongiques *A.fumigatus* et *A.niger* sont aussi très performantes, elles possèdent des capacités métaboliques intéressantes car elles sont capables de survivre et de s'adapter dans des conditions difficiles du milieu (milieu pollué) et induire des enzymes intervenant dans les réactions de biotransformation.

Les résultats des cultures mixtes se sont avérés prometteuses malgré que les populations bactériennes aient montré une efficacité moindre par opposition aux populations fongiques. Notons que nos résultats sur cultures pures sont meilleurs.

Les bactéries et les champignons filamenteux, de part leur richesse spécifique et métabolique constituent des systèmes de choix pour étudier les processus métaboliques et la modification de structure des communautés en réponse à une contamination pétrolière. Ils seraient donc des candidates potentiellement importantes afin de sélectionner un consortium en biodégradation.

L'idée du traitement biologique des hydrocarbures fait aujourd'hui son chemin...



**CONCLUSION  
GENERALE  
ET  
PERSPECTIVES**

## **CONCLUSION GENERALE**

**Et**

## **PERSPECTIVES**

L'objectif de notre travail était ambitieux, puisqu'il visait à établir une relation entre la qualité des eaux d'oued Saf Saf dans sa partie amont et aval, les microorganismes isolés et identifiés de ces eaux et la capacité de quelques souches à biodégrader le pétrole brut et/ou le kérosène.

Dans ce contexte et à partir des analyses physico chimiques (température, pH, conductivité...) et organique (hydrocarbures totaux), nous avons distingué que l'état de la qualité des eaux de l'Oued Saf-Saf se présente assez bonne sur une bonne partie de son parcours (amont), à l'exception du tronçon situé en aval des rejets industriels, qui dégradent de façon notable la qualité des eaux par une pollution accentuée des hydrocarbures. Ce paramètre a tendance à diminuer en s'éloignant de l'enceinte pétrochimique représentée par les deux points de prélèvement de la raffinerie (Raf) et la RTE (complexe de transport des hydrocarbures par canalisation). Le site Saf1 est le seul point de déversement des effluents pollués dans les eaux de l'oued : c'est ce qui explique sa forte charge en hydrocarbures dissous. Les résultats des points Saf2 (coté de Hamadi Krouma), puit1 (El Hadaik) et puit2 (Béni Béchir), présentent des valeurs en hydrocarbures en-dessous de la valeur limite fixée dans le (JORA, 2009), les qualifiant ainsi de bonne qualité. Le site témoin, situé à oued Guebli ; est quasi dépourvu d'hydrocarbures.

Les résultats physicochimiques des sites étudiés ont un retentissement important sur la composition de la microflore aussi bien quantitativement que qualitativement. L'isolement et l'identification des microorganismes des eaux étudiées, nous a permis de dresser un inventaire d'une flore microbienne variée distribuée de façon hétérogène sur tout les sites (pollués et non pollués), indiquant leur bonne adaptation aux conditions difficiles.

Les bactéries sont considérées comme agents prédominants dans les environnements pollués par des hydrocarbures. On en a isolées et identifiées 11 bactéries toutes des bacilles à Gram négatif, appartenant au phylum gamma protéobactérie, avec une dominance de *Pseudomonas aeruginosa*, ainsi que 21 souches fongiques réparties en 13 genres ; avec une

attention particulière à *Aspergillus fumigatus* et *A. niger*, qui sont les plus dominants, dans la mesure où ils sont capables de croître dans tous les sites étudiés.

L'inventaire microbien dressé, est constitué de souches dites prometteuses dans la décontamination et la réhabilitation des sites pollués par les hydrocarbures, car il est connu que les conditions écologiques des eaux résiduaires ont certainement imposé une sélection des microorganismes et certains paramètres du milieu permettent à un nombre d'espèces relativement variées de croître dans un biotope pareil. La diversité est maintenue avec seulement restructuration des communautés microbiennes.

De ce fait, il est impératif de promouvoir l'habileté de quelques souches bactériennes et fongiques à utiliser le pétrole brut et/ou le kérosène, comme seule source de carbone et d'énergie. Il s'agit de *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila* et *Serratia marcescens* ; ainsi qu'*Aspergillus niger*, *A.fumigatus* et *Alternaria alternata*. Les tests de biodégradabilité sont faits pour chaque souche individuelle ou en consortium pendant 144h.

Notre étude montre que ces souches sont un modèle intéressant pour l'étude de la biodégradation des hydrocarbures. Jusqu'à présent, elles ont démontré de fortes capacités dégradatives envers le pétrole brut que le kérosène avec une faible différence de comportement entre les souches pures individuelles. Nos résultats soutiennent l'idée que la biodégradation la plus importante est enregistrée avec des cultures pures qui sont plus meilleurs que les cultures mixtes. Aussi, la tolérance est bien marquée pour le pétrole brut que le kérosène. Produit constitué d'une mixture d'hydrocarbures, dont la dégradation passe par des étapes de rupture des chaînes et de clivage d'anneaux.

C'est ainsi que ces souches utilisées y compris *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger* et *A.fumigatus* semblent jouer un rôle prépondérant dans la détoxification des milieux naturels pollués et leur pouvoir dégradateur pourrait être exploré dans les procédés de bioremédiation.

En guise de conclusion, ce travail a permis de faire évoluer les connaissances du métabolisme des hydrocarbures de façon conséquente mais de nombreuses questions restent à résoudre. Pour cela il faudra mettre en œuvre une politique de sécurité et de protection de l'environnement notamment par la mise en place:

- d'un système de révision et d'évaluation des risques ;
- de personnel qualifié, maîtrisant les données environnementales ;
- de station d'épuration pour contrôler les rejets.

- d'un organisme responsable de l'aménagement de périmètres de protection.
- Normalisation d'une procédure d'analyse des hydrocarbures dans les denrées alimentaires.

Notre travail de recherche est en progrès du fait que d'autres techniques complémentaires peuvent être impliqués, telles que :

- ❖ Identification moléculaire des espèces microbiennes peuplant un site pollué par les hydrocarbures :
- ❖ Etude de la structure microbienne ;
- ❖ Etude de la diversité génétique par l'empreinte moléculaire ;
- ❖ Etude de l'historique de la pollution pétrolière du site à étudier.
- ❖ Recherche de biomarqueurs de pétrole ou de ses dérivés, pour une éventuelle biosurveillance de la pollution par les hydrocarbures.

Cependant, il serait pertinent de faire des études pour améliorer les méthodes et conditions des biotests, voire en proposer d'autres. Il serait intéressant d'améliorer les connaissances sur :

- L'identification des souches responsables de la biodégradation des hydrocarbures parmi les communautés naturelles totales et y identifier les enzymes impliqués ;
- Découvrir un consortium adéquat prêt à une biodégradation complète et efficace ;
- Avec les méthodes de biologie moléculaire, il serait souhaitable de déterminer les gènes codant pour cette action ;
- Identifier les métabolites de dégradation et évaluer leur degré de toxicité ;
- Optimiser les conditions des cultures.



REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A**.....
1. **Abed R.M.M. 2010.** Interaction between cyanobacteria and aerobic heterotrophic bacteria in the degradation of hydrocarbons. *Int Biodeterior Biodegrad* 2010;64:58–64.
  2. **Abedelly C. 2007.** Bioremédiation/Phytoremédiation. Thèse. Département des sciences naturelles. Institute supérieur de l'éducation et de la formation continue. Université de Tunis.
  3. **Abdullah, S.K. et Taj-Aldeen, S.J. 1989.** Extracellular enzymatic activity of aquatic and aero-aquatic conidial fungi. *Hydrobiologia*, 174: 217-223.
  4. **Accardi-Dey A. et Gschwend P.M. 2002.** Assessing the combined roles of natural organic matter and black carbon as sorbents in sediments. *Environmental Science & Technology*, 36(1), 21-29.
  5. **Acevedo F., Pizzul L., Castillo M. d. P., Cuevas R. and Diez M. C. 2011.** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the Chilean white-rot fungus *Anthracophyllum discolor*. *Journal of Hazardous Materials* 185(1): 212-219
  6. **Ackermann, B.L., Hale, J.E., Duffin, K.L. 2006.** The role of mass spectrometry in biomarker discovery and measurement. *Current drug metabolism*. 7, 525-539.
  7. **Adebusoye, S.A., Ilori, M.O., Amund, O.O., Teniola, O.D. et Olatope, S.O. 2006.** Microbial degradation of petroleum hydrocarbons in a polluted tropical stream. *Journal of American Science* 2(3): 48-56.
  8. **Adebusoye, S.A., Ilori, M.O. Amund, O.O. Teniola O.D. et. Olatope, S.O. 2007.** Microbial degradation of petroleum in a polluted tropical stream. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 23: 1149–1159.
  9. **Adekunle, A.A. et Adebambo, O. A. 2007.** Petroleum hydrocarbon utilization by fungi isolated from *Detarium senegalens* (J.F. Gmelin seeds. *Journal of American Science*, 3 (1): 69-76.).
  10. **Affandi, I.E., Suratman, N.H., Abdullah, S., Ahmad, W.A., Zakaria, Z.K. 2014.** Degradation of oil and grease from high-strength industrial effluents using locally isolated aerobic biosurfactant-producing bacteria. *International Biodeterioration and Biodegradation*. Volume 95, pages 33-40.
  11. **Agence internationale de l'énergie (AIE). 2012.** World Energy Outlook 2012. OECD/IEA, Paris.
  12. **Agogué, H. 2004.** Diversité des bactéries de la microcouche de surface de l'eau de mer: spécificité, adaptation et résistance aux radiations solaires. Thèse de l'Université Lyon1 Claude Bernard, France.
  13. **Agogué, H, Joux F, Obernosterer, I, Lebaron, P. 2005.** Resistance of marine bacterioneuston to solar radiations. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5282-5289.
  14. **Ahmad, W.A., Zakaria, Z.A., Zakaria, Z., Surif, S., 2009.** Hexavalent chromium reduction at different growth phases of *Acinetobacter haemolyticus* . *Environ.Eng. Sci.* 26 (7), 1275-1278.
  15. **Aislabie, J., McLeod, M. and Fraser, M., 1998.** Potential for biodegradation of hydrocarbons in soil from the Ross Dependency, Antarctica. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49, 210-214.
  16. **Ajisebutu, S.O. 1988.** Effects of sodium chloride on biodegradation of crude oils by two species of *Aeromonas*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 28(2): 203-208.

17. Akpor, O. B., Igbinsosa, O. E. and Igbinsosa, O. O. 2007. Studies on the effect of petroleum hydrocarbon on the microbial and physico-chemicals characteristics of soil. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 6 (16), Pg: 1939-1943.
18. Akpoveta, O. V., Egharevba, F. and Medjor, O. W. 2011. A pilot study on the biodegradation of hydrocarbon and its kinetics on kerosene simulated soil. *International Journal of Environmental Sciences*, Vol. 2(1), Pg: 54-67.
19. Alain, K., 2003. Approches Culturelles et Moléculaires des Assemblages Microbiens Associés aux Polychètes Hydrothermaux de la Famille *Alvinellidae*, Thèse de doctorat en microbiologie, Université de Bretagne Occidentale, 197p.
20. Allouche, F.N. 2005. Bioépuration : des bactéries à notre service. *Bulletin des énergies renouvelables* ; N°7.
21. Almeida, C., Sousa, J.M., Rocha, R., Cerqueira, L., Fanning, S., Azevedo, N.F., Vieira, M.J. 2013. Detection of *Escherichia coli* O157 using PNA-FISH: comparison to a standard culture method. *Applied and environmental microbiology*.
22. Allison, S. D., et Martin, Y. J.B.H. 2008. *PNAS* 105 (Suppl. 1):11512-11519.
23. Al-Jawhari I.F.H. 2014. Ability of some soil fungi in biodegradation of petroleum hydrocarbon. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, vol. 2, no.2: 46-52.
24. Al-Saeed, S.S., Al-Ani, B.M. 2014. Study of antagonistic capability of *Trichoderma harzianum* isolate against some pathogenic soil borne fungi. *Agric. Biol. J.N.Am.* Vol(5) n°1 : 15-23.
25. Al-Saleh E., Drobiova H., Obuekwe C. 2009. Predominant culturable crude oil-degrading bacteria in the coast of Kuwait. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 63(4):400–406.
26. Al-Sulami A., Al-Tae A.M.R., Yehyazarian A.Y. 2014. Isolation and identification of *Aeromonas spp.* from drinking water in basrah governorate. *International Journal of Development Research* Vol. 4, Issue, 8, pp. 1692-1697.
27. Alexander M. 1981. Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science*, Vol.211, 132-138.
28. Alexander M. 1994. *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press, New York (USA).
29. Alvarez M.H., Souto M.F., Viale A., Pucci O.H. 2001. Biosynthesis of fatty acids and Triacylglycerols by 2,6,10,14-Tetramethyl pentadecane-grown cells of *Nocardia globberula* 432. *FEMS. Microbiol. Lett.*200: 195-200.
30. Amanchukwu S. C., Obafemi A. and Okpokwasili G. C. 1989. Hydrocarbon degradation and utilization by a palm-wine yeast isolate. *FEMS Microbiol. Lett.* (57): 151-154.
31. Amblard, C. 2001. Les micro-organismes : principaux acteurs des écosystèmes aquatiques. *L'eau de tous les enjeux*. N° 390. Centre National de la Recherche Scientifique.
32. Amund O.O., Adebisi A.G. 1991. Effect of viscosity on the biodegradability of automotive lubricating oils. *Tribol Intern*; 24: 235-237.
33. Andrady, A.L. 2011. Microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 62: 1596-1605.
34. Andrew D.R., Fitak R.R., Munguia-Vega A., Racolta A., Martinson V.G., Dontsova K. 2012. Abiotic Factors Shape Microbial Diversity in Sonoran Desert Soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 78: 7527-37.
35. April, T.M., Foght, J.M., Currah, R.S. 2000. Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Can J Microbiol* 46: 38-49



36. **Arai, H., Akahira, S., Ohishi, T., Maeda, M., et Kudo, T. 1998.** Adaptation of *Comamonas testosteroni* TA441 to utilize phenol: organization and regulation of the genes involved in phenol degradation. *Microbiol.* 144, 2895-2903.
37. **Asia, L. 2012.** Analyse des hydrocarbures dans des sédiments superficiels de zones côtières Méditerranéennes (Golfe de Fos, Rade de Marseille et Massif des Calanques). Thèse de Doctorat en Sciences de l'Université d'Aix-Marseille en Chimie Analytique. 175p.
38. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (1995).** Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Atlanta, GA:U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
39. **Attar M. et Hammat M. 2000.** Le Potentiel en Hydrocarbures de l'Algérie' Contribution de Sonatrach, Division Exploration.
40. **Atlas R.M., Bartha R. 1973.** Abundance, distribution and oil degradation potential of microorganisms in Raritan Bay. *Environ Pollut.* 4: 291-300.
41. **Atlas R.M. 1981.** Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological Reviews* 45:180-209
42. **Atlas R.M. 1988.** Principles of microbiology, Ed. Mosby, 1994.
43. **Atlas, R. M., Horowitz, A. et al. 1991.** Response of microbial populations to environmental disturbance. *Microbial Ecology* 22(1): 249-256.
44. **Atlas R. M. and Bartha R. 1992.** Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. *Adv. Microb. Ecol.* 12:287-338.
45. **Atlas, R.M., 1995a.** Bioremediation of petroleum pollutants. *International Biodeterioration and Biodegradation* 35, 1-3.
46. **Atlas, R.M., 1995b.** Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin* 31, 4-12.
47. **Atlas R. M., Grimes D. J., Hazen T. C., Spain J., Sulfito J. M., Reid A. 2011.** Microbes et déversements de pétrole. Rapport de l'American Academy of Microbiology.
48. **Azam, F., Malfatti, F. 2007.** Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology* 5:782-791.

## **B**.....

49. **Badly, V., Chauvet, E. et Gessner, M.O. 1995.** Bacteria, fungi and the breakdown of leaf litter in a large river. *Oikos*, 74: 93-102.
50. **Baker M. D., et Mayfield C. I. 1980.** Microbial and non-biological decomposition of chlorophenols and phenol in soil. *Water Air Soil Pollution.* 13: 411-424.
51. **Ballerini D. 1999.** Traitements biologiques des sols. Tech. Ing., 1-2.
52. **Ballerini D. et Vandecasteele J. P. 1999.** La restauration par voie microbiologique des sols contaminés par les polluants organiques. In : Biotechnologie, coordinateur R. Scriban, 5ème édition, *Edition Tech et Doc*, pp. 835- 865.
53. **Banat M., Makkar R.S. et Cameotra S.S., 2000.** Potential commercial applications of microbial surfactants, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 495-508.
54. **Barbara, G.M., Mitchell, J.G. 2003.** Marine bacterial organisation around point-like sources of amino acids. *FEMS Microb. Ecol.* 43:99-109.
55. **Bärlocher, F. 1992.** The ecology of aquatic hyphomycetes. Springer-Verlag, New York.
56. **Bärlocher, F., Stewart, M., Ryder, D.S. 2012.** Processing of *Eucalyptus viminalis* leaves in Australian streams – importance of aquatic hyphomycetes and zoospore fungi. *Fund. Appl. Limnol.* 179/4, 305-319
57. **Barron, G. L. 1980.** Fungal parasites of rotifers: a new *Tolypocladium* with underwater conidiation. *Canadian Journal of Botany*, 58(4), 439-442.

58. **Barranco A., Alonso-Salces R. M., Crespo I., Berrueta L. A., Gallo B., Vicente F. et Sarobe M. 2004.** Polycyclic aromatic hydrocarbon content in commercial Spanish fatty foods. *Journal of Food Protection* 67 (12) :2786 – 2791.
59. **Bastiaens, L., Springael, D., Wattiau, P., Harms, H., deWachter, R., Verachtert, H. et al. 2000.** Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAHsorbing carriers. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1834-1843.
60. **Bastien Ventura C., Girin M., Raoul-Duval, J., 2005.** *Marées noires et environnement.* Collection Propos, Institut Océanographique Paris, 407 p.
61. **Baudouin C., Charveron M., Tarroux R., Gall Y. 2002.** Environmental pollutants and skin cancer. *Cell. Biol. Toxicol.* 18 :341 – 348.
62. **Bendjemila I. 2011.** De la prudence à la prévention vers une éthique du risque-cas de Skikda. Magistère option villes et risques urbains. Université de Constantine.
63. **Bennett J. W., Wunch K. G. and Faison B. D. 2002.** Use of fungi biodegradation. In: Hurst, C.J. (ed.). *Manual of Environmental Microbiology, Second Edition*, ASM Press, Washington, United States of America: 960-971.
64. **Berekaa M.M. and Steinbüchel A. 2000.** Microbial degradation of the multiply branched alkane 2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracosane (squalane) by *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium ratisbonense*. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4462-4467.
65. **Berthe-Corti L., Hopner T. 2005.** Geo-biological aspects of coastal oil pollution. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 219, 171-189.
66. **Bertrand J.C., Doumenq P., Guyoneaud R., Benoît Marrot B., Laurent F.M., Matheron R., Moulin Ph., Soulas G., 2011.** ÉCOLOGIE MICROBIENNE APPLIQUÉE ET DÉPOLLUTION LES MICRO-ORGANISMES ACTEURS MAJEURS DE L'ÉLIMINATION DES POLLUTIONS QUI AFFECTENT L'ENVIRONNEMENT. Chapitre 16. Écologie des milieux naturels anthropisés. Bertrand J.C., Caumette P., Leberon Ph., Matheron R., Normand Ph., 2011. 981 P.
67. **Bertrand, J.C. et Mille, G., 1989.** Devenir de la matière organique exogène. Un modèle: les hydrocarbures. In: **Bianchi, M., Marty, D., Bertrand, J.C., Caumette, P. et Gauthier, M.J.** (Eds.), *Microorganismes dans les écosystèmes océaniques.* Masson (Paris), Chapitre 13, pp. 343-385.
68. **Bianchi M. D. Marty et al. 1988.** *Micro-organismes dans les écosystèmes océaniques.* Paris.
69. **Bidaud C., Tran-Minh C. 1998.** Polycyclic aromatic hydrocarbons (PARs) biodegradation in the soil of a former gasworkssite: selection and study of PAHs-degrading microorganisms. *J. Mol. Cat. B : Enzymatic*, Vol.5, n°I-4, 377-381.
70. **Bills, G.F., Polishook, J.D. 1991.** Microfungi from *Carpinus caroliniana* . *Can. J. Bot.* Vol (69): 1477-1482.
71. **Blackwell, M. 2011.** The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 millions species?. *American Journal of Botany.* Vol (98) : 426-438.
72. **Blasig R., Schunck W.H., Jockisch W., Franke P. and Müller H.G., 1984.** Degradation of long-chain n-alkanes by the yeast *Ledderomyces elongisporus*. I. Products of alkane oxidation in whole cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 19, 241-246.
73. **Blumer M. 1976.** Polycyclic aromatic compounds in nature, *Sei. Am.*, 234, pp. 34-46,
74. **Bocard C., 2006.** *Marées noires et sols pollués par les hydrocarbures, enjeux environnementaux et traitement des pollutions.* IFP publication.
75. **Boeglin, J.C. 2010.** *Traitements biologiques des eaux résiduaires.* 28 p.
76. **Boll M. and Heider J. 2010.** Anaerobic degradation of hydrocarbons: mechanisms of C–H bond activation in the absence of oxygen," in *Handbook of Hydrocarbon and Lipid*

- Microbiology*, eds. K. Timmis, T. Mcgenity, J. Van Der Meer & V. De Lorenzo. (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag), 1011-1024.
77. **Bollag J.M., Liu S.Y. 1990.** H.H. Cheng (ed.), Soil Sci. Soc. Am. Inc. Madison, USA, In "Pesticides in the soil environment: processes, impact and modelling»: Biological transformation processes of pesticides.
78. **Bollag J.M. et Loll M.J. 1983.** Incorporation of xenobiotics into soil humus. *Experientia* 39, 1221-1231.
79. **Bonnieux F. et Rainelli R. 2002.** Évaluation des dommages des marées noires : une illustration à partir du cas de l'Erika et des pertes d'agrément des résidents, *Économie et statistique*, n° 357-358, pp. 173-187.
80. **Boonchan, S., Britz, M.L., Stanley, G.A. 2000.** Degradation and mineralization of highmolecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1007-1019.
81. **Bordenave S., Goñi-Urriza M. S., Caumette P. and Duran R. 2007.** Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 73, n° 19, pp. 6089–6097.
82. **Bordjiba O., Steiman R., Kadri M., Semadi, A et Guiraud P. 2001.** Removal of herbicides from liquid media by fungi isolated from a contaminated soil. *Journal of Environmental Quality*, vol. 30, no. 2, p. 418-426.
83. **Bordjiba O. 2003.** Effets des pesticides sur la microflore fongique du sol: biodégradation des herbicides par les souches isolées. Thèse d'Université : Méthode de recherche sur l'environnement et la santé: Grenoble1.
84. **Botton, B ; Breton , A ; Fevre, M ;Gauthier, S ; Gury P Larpent, P ; Reymondj, P ; Sanglier, J J ; Vayssier, Y et Veau, P ., 1990 .** Moisissures utiles et nuisible importance industrielle .Ed . MASSON 2<sup>ème</sup> édition, Paris.
85. **Britton L. N. 1984.** Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons, In *Microbial Degradation of Organic Compounds*, D. T. Gibson, Ed., pp. 89–129, Marcel Dekker, New York, NY, USA.
86. **Brouzes, P. 1973.** Précis d'épuration biologique par boues activées", *Technique et Documentation*, Lavoisier.
87. **Bryselbout C., Henner P., Carsignol J., Lichtfouse E. 2000.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in highway plants and soil. Evidence for a local distillation effect. *Analisis* 28, 32-35.
88. **Bouchez M., Blanchet D., Vandecasteele J. P. 1995.** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 156-164.
89. **Bouchez-Naitali M., Rakatozafi H., Marchal R., Leveau J.Y., Vandecasteele J.J. 1999.** Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *J. Appl. Microbiol.* 86: 421-428.
90. **Bouwer E.J et Zehnder A.J.B. 1993.** Bioremediation of organic compound-putting microbial metabolism to work. *Trends in Biotechnology*, 11, 360-367.
91. **Buscail R., Foudil-Bouras A.E., Panc H. 1999.** Matière organique et pollution par les hydrocarbures dans les sédiments superficiels du golf d'Arzew (Mer Méditerranée, Algérie). *Oceanologica Acta.* 22, 3, 303-317.
92. **Butler, D.A., Lobregat, C.M., Gavan, T.L. 1975.** Reproducibility of the analytab (API 20E) system. *Journal of clinical microbiology.* 2, 322-326.
- C**.....
93. **Cabane F. 2012.** Lexique d'écologie, d'environnement et d'aménagement du littoral. Version 24. Ifremer : 342 p.

94. Callaghan A.V., Gieg L.M., Kropp K.G., Suflita J.M., and Young L.Y. 2006. Comparison of mechanisms of alkane metabolism under sulfate-reducing conditions among two bacterial isolates and a bacterial consortium. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 4274-4282.
95. Callaghan A.V., Tierney M., Phelps C.D., and Young L.Y. 2009. Anaerobic biodegradation of n-hexadecane by a nitrate-reducing consortium. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 1339-1344.
96. Callaghan A.V., Davidova I.A., Savage-Ashlock K., Parisi V.A., Gieg L.M., Suflita J.M. et al. 2010. Diversity of benzyl- and alkylsuccinate synthase genes in hydrocarbon-impacted environments and enrichment cultures. *Environmental Science and Technology* 44: 7287-7294.
97. Cao B., Nagarajan K., Loh K.C. 2009. Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. *Appl Microbiol Biotechnol.* 85:207–2282.
98. Carlile, M.J., Watkinson, S.C. 1994. *The Fungi*. (Academic Press eds).
99. Carbonnelle, B., Denis, F., Marmonier, A., Pinon, G., Vargues, R. 1987. *Bactériologie médicale Techniques Usuelles*, SIMEP-MASSON Paris.
100. Carpenter, S.R., Kitchell, J.F., 1988. Consumer control of lake productivity. *Bioscience*. 38:764-769.
101. Chace, D.H., Millington, D.S., Terada, N., Kahler, S.G., Roe, C.R., Hofman, L.F. 1993. Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry. *Clinical chemistry*. 39, 66-71.
102. Chouari, R., Le Paslier, D., Daegelen, P., Ginestet, P., Weissenbach, J., Sghir, A. 2003. Molecular evidence for novel planctomycete diversity in a municipal wastewater treatment plant. *Appl Environ Microbiol*, 69: 7354–7363.
103. Clarridge, J.E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*. 17, 840-862, table of contents.
104. Cerniglia, C.E. 1984. Microbial transformation of aromatic hydrocarbons. In: Atlas, R.M. (Ed.), *Petroleum Microbiology*. Macmillan Publishing Company, New York. p 99-128.
105. Cerniglia C.E. and Yang S.K. 1984. Stereoselective metabolism of anthracene and phenanthrene by fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:119-124.
106. Cerniglia, C.E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3, 351-368.
107. Cerniglia C.E., Campbell W.I., Freeman J.P. and Evans F.E. 1989. Identification of a novel metabolite in phenanthrene metabolism by fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2275-2279.
108. Chablain P. A., Zgoda, A. L. Sarde, C.O. et Truffaut, N., 2001. Genetic and Molecular Organization of the Alkylbenzene Catabolism Operon in the Psychrotrophic Strain *Pseudomonas putida* 01G3. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1) : 453 – 458.
109. Chafai D., 1996. Mycromycètes des sédiments d'Oueds et effluents industriels de l'Est Algérien. Thèse de Doctorat. Université Joseph Fourier Grenoble I.
110. Chafai H., Laouar R., Djabri L et Hani A. 2006. Etude de la vulnérabilité à la pollution de la nappe alluviale de Skikda ; Application de la méthode DRASTIC. *Bulletin du Service Géologique National*. Vol 17. n°1. Pp 63-74.
111. Chakraborty R, Coates J. D. 2004. Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol.* 64: 437–446.

112. Chaillan F., Le Flèche A., Bury E., Phantavong Y. H., Grimont P., Saliot A. and Oudot J. 2004. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Research in Microbiology* 155(7): 587-59.
113. Chaineau C. H., Morel, J. L. et Oudot, J. 1995. Microbial degradation in soil microcosms of fuel oil hydrocarbons from drilling cuttings, ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY, Vol 29, , 1615-1621.
114. Chaineau C.H., Morel J. L., et Oudot J. 1996. Land treatment of oil based drill cuttings in an agricultural soil,. *Journal of Environmental Quality*. 4, 858-867.
115. Chayabutra C., Ju L.-K. 2000. Degradation of n-hexadecane and its metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* under microaerobic and anaerobic denitrifying conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 493-498.
116. Chukwura E.I., Nwokolo C.I. and Nwachukwu S.C.U. 2005. Bioremediation of crude oil-polluted Escravos River Using *Candida utilis*. *Nig. J. Microbiol.*, 19: 623-630.
117. Cho J. C. and. Giovannoni S. J. 2004. *Oceanicola granulosa* gen. nov., sp. nov. and *Oceanicola batsensis* sp. nov., poly-hydroxybutyrate-producing marine bacteria in the order Rhodobacterales. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 54(4): 1129-1139.
118. Coates J.D., Woodward J., Allen J., Philp P., and Lovley D.R. 1997. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3589-3593.
119. Cooney J.J. 1984. The fate of petroleum pollutants in freshwater ecosystems. K 03099 Pollution; J 02905 Water; P 2000 Freshwater Pollut.
120. Cordier, T. 2012. Structure des assemblages fongiques de la phyllosphère des arbres forestiers et effet potentiel du changement climatique. Thèse de Doctorat. Ecole doctorale: Sciences et Environnements. Spécialité : Ecologie évolutive, fonctionnelle et des communautés. Université Bordeaux 1. Pp: 3-16.
121. Cotner, J., Ammerman, J., Peele, E., Bentzen, E. 1997. Phosphorus-limited bacterioplankton growth in the Sargasso Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 13:141-149.
122. Coulibaly, L., Gourène, G., et Agathos, S. N. 2003. Utilization of fungus for biotreatment of raw wastewaters. A review. *African J. Biotechnol.* 2,620-630.
123. Crépineau C., Rychen G., Feidt C., Le Roux Y., Lichtfouse E., Laurent F. 2003. Contamination of pastures by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the vicinity of a highway. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4841-4845.

## D.....

124. da Silva, M.; Cerniglia, C. E., Pothuluri, J. V.; Canhos, V. P. and Esposito, E. 2003. Screening filamentous fungi isolated from estuarine sediments for the ability to oxidize polycyclic aromatic hydrocarbons. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19(4): 399-405.
125. Dandie C.E., Thomas S.M., Bentham R.H., McClure N.C. 2004. Physiological characterization of *Mycobacterium sp.* strain 1B isolated from a bacterial culture able to degrade high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Appl. Microbiol.* 97:246-255.
126. Daniel D., Emilien P., Frederic C. 2007. The influence of temperature on bacterial assemblages during bioremediation of a diesel fuel contaminated sub Antarctic soil. *Cold Regions Science and Technology*, 48, ( 2 ) :74-83.
127. Das, K. et Mukherjee, A. K. 2005. Characterization of biochemical properties and biological activities of biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid and non-mucoid strains isolated from hydrocarbon-contaminated soil samples, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 69 (2), pp.192-199.

- 128.Das, N. et Chandran, P. 2011.** Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview”, *Biotechnol. Res. Int.*, Vol. 2011, pp.1-13.
- 129.Dash H.R., Mangwani N., Chakraborty J., Kumari S., Das S.2013.** Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:561-571.
- 130.Davey, M. E. et O’Toole, G.A. 2000.** Microbial films: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 847-867.
- 131.David C.2005.** HST, Risque biologique et biodepollution des sols.
- 132.Dawes, E.A. 1985.** Starvation, survival and energy reserves. In Fletcher M. (ed) *Bacteria in their natural environment*. Academic Press, New York.
- 133.De la fuente G., Perestelo F., Rodriguez Perez A., Falcon M.A. 1990.** Oxidation of aromatic aldehydes by *Serratia marcescens*. *Appl Environ Microbiol.* 57: 1275-1276.
- 134.Degremont, S. 1978.** Mémento technique de l'eau : 8<sup>ème</sup> édition. Edition Technique et Documentation Lavoisier, 1200p.
- 135.Delille D., Basserres A. and Dessommes A. 1998.** Effectiveness of bioremediation for oil-polluted Antarctic seawater. *Polar Biology* 19, 237-241.
- 136.de Valk, H.A., Klaassen, C.H., Meis, J.F. 2008.** Molecular typing of *Aspergillus* species. *Mycoses.* 51(6):463-76.
- 137.Deziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lepine, F. et Bisallon, J. 1996.** Biosurfactant Production by soil *Pseudomonas* Strain Growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *App. and Env. Microbiol.*, Vol. 62 (6), pp. 1908-1912.
- 138.Diamandis, E.P. 2004.** Mass spectrometry as a diagnostic and a cancer biomarker discovery tool: opportunities and potential limitations. *Molecular & cellular proteomics: MCP.* 3, 367-378.
- 139.Diaz E. 2004.** Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *Int. Microbiol.* 7:173-180.
- 140.Domsch, K.H., Gams, W. et Traute-Heidi, A. 1980.** Compendium of soil fungi. Academic Press, London. vol 1 et 2.
- 141.Doyle E., Muckian L., Hickey A.M., Clipson N. 2008.** Microbial PAH degradation. *Adv.Appl.Microbiol.* 65 : 27-66.
- 142.Drancourt, M., Roux, V., Fournier, P.E., Raoult, D. 2004.** rpoB gene sequence-based identification of aerobic Gram-positive cocci of the genera *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Abiotrophia*, and *Granulicatella*. *Journal of clinical microbiology.* 42, 497-504.
- 143.Duarte, S., Pascoal, C., Garabétian, F., Cássio, F. et Charcosset, J.-Y. 2009.** Microbial decomposer communities are mainly structured by trophic status in circumneutral and alkaline streams. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(19), 6211-6221.
- 144.Ducklow, H.W. et Carlson, C.A. 1992.** Oceanic bacterial production. *Advances in Microbial Ecology*, 12: 113-181.
- 145. Dubois S. 2007.** Les hydrocarbures dans le monde. État des lieux et perspectives. Ellipses, coll. transversale, 432 p.
- 146.Dupuis A., Ucan-Marin F.2015.** A literature review on the aquatic toxicology of petroleum oil:An overview of oil properties and effects to aquatic biota. *DFO Can Sci Advis Sec Res Doc*, 52 p.
- 147.Dutruc-Rosset, G. 2003.** Techniques analytiques et de contrôle (Codex œnologique). Partie microbiologique. Office International de la Vigne et du Vin. 23 pp.
- 148.Durousset M., 1999.** Le marché du pétrole. Paris : Collection HISTEGE.
- 149.Dyksterhouse S.E., Gray J.P et al. 1995.** *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. Nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediment. *International Journal of Systematic bacteriology* 485(1): 116-127.

**E**.....

- 150. Edeline, F. 1988.** L'épuration biologique des eaux résiduaires. Technique et documentation. Paris. Editions Cebedoc. Liège. 304 p.
- 151. Elshafie A., Al Kindi A Y., Al Busaidi S., Bakheit C., Albahry S N. 2007.** Biodegradation of crude oil and n-alkanes by fungi isolated from Oman. *Marine Pollution Bulletin* 54:1693.
- 152. Errard G. 2014.** Le monde du pétrole expliqué en trois graphiques. Le Figaro.
- 153. Eriksson M., Sodersten E., Yu Z., Dalhammar G., Mohn W.W. 2003.** Degradation of Polycyclic Aromatic at low temperature under aerobic and nitrate-reducing conditions in enrichment cultures from Northern soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(1):275-284.
- 154. Ettwig K.F., Butler M.K., Le Paslier D., Pelletier E., Mangenot S., Kuypers M.M.M. et al. 2010.** Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature* 464:543-548.
- 155. Evans, F.F., Seldin, L., Sebastin, G.V., Kjelleberg, S., Holmstrom, C., Rosado A.S. 2004.** Influence of petroleum contamination and Biostimulation treatment on the biodiversity of *Pseudomonas spp.* In soil microcosms as evaluated by 16S rRNA based - PCR and DGGE. *Lett. Appl. Microbiol.* 38: 93-8.
- F** .....
- 156. Fattal P. 2006.** *Sensibilité et vulnérabilité des côtes aux pollutions par hydrocarbures.* Université de Nantes, IGARUN, 480 p.
- 157. Feidt C., GROVA N., LAURENT C., RYCHEN G., LAURENT F. 2000.** Le transfert des micropolluants organiques dans la chaîne alimentaire Etat et perspectives de recherche. Dossier : Sécurité sanitaire des aliments et industrie. Volume 7, Numéro 5, 431-5.
- 158. Fent K., 2004.** Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology*, 205: 223–240.
- 159. Fernandes M.B., Sicre M.A., et al. 1997.** Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) distributions in the Seine River and its estuary. *Marine Pollution Bulletin* 34(11): 857-867.
- 160. Filloux, A. et Vallet, I. 2003.** Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *Med Sci (Pris)* 19, 77-83.
- 161. Fingas M., 2001.** *The basics of oil spill cleanup, second edition.* Lewis Publishers. 233p.
- 162. Fingas M., 2013.** *The basic of oil spill cleanup.* Troisième édition, Boca Raton. CRC Press, 266p.
- 163. Floodgate, G.D. 1995.** Some environmental aspects of marine hydrocarbon bacteriology. *Aquatic Microbial Ecology* 9: 3-11.
- 164. Forbes V.E., Forbes T.L. 1997.** *Écotoxicologie : théorie et application.* Institut national de la recherche agronomique, Paris, France, 256 p.
- 165. Foght J. 2008.** Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: Pathways and prospects. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 15:93-120.
- 166. Fredrickson, J., Zachara, J., Balkwill, D., et al., 2004.** *Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the Hanford site, Washington State.* *Appl Environ Microbiol*, vol. 70, n° 7, p. 4230–41 .
- 167. Forrest, G.N. 2007.** PNA FISH: present and future impact on patient management. Expert review of molecular diagnostics. 7, 231-236.
- 168. Fouilland, É., Gosselin, M., Rivkin, R.B., Vasseur, C., et Mostajir, B. 2007.** Nitrogen uptake by heterotrophic bacteria and phytoplankton in Arctic surface waters. *J. of Plankton Res* 29:369-376.
- 169. Fuhrmann, J.A. 1999.** Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* 399:541-548.
- 170. Fu G., Kan A.A. et Tomson M. 1994.** Adsorption and desorption hysteresis of PAHs in surface sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13, 1559-1567.

**G**.....

- 171. Gabet S. 2004.** Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) presents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. Thèse de doctorat de l'Université de Limoges, spécialité Chimie et Microbiologie de l'Eau.
- 172. Gadd G.M. 2001.** Fungi In Bioremediation, Cambridge university, (1<sup>st</sup> ed), press, 472 pp.
- 173. Gargouri, B., Aloui, F., Sayadi, S. 2012.** Reduction of petroleum hydrocarbons content from an engine oil refinery wastewater using a continuous stirred tank reactor monitored by spectrometry tools. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 87 (2): 238-243.
- 174. Gao, D., Du, L., Yang, J., Wu, W. M. et Liang, H. 2010.** A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control . *Critical Reviews in Biotechnology* 30(1): 70-77.
- 175. Garon D., Krivobok S., Wouessidjewe D., Siegle-Murandi F. 2002.** Influence of surfactans on solubilization and fungal degradation of fluorine. *Chemosphere*, 47(3):303-309.
- 176. Gavin, P.J., Warren, J.R., Obias, A.A., Collins, S.M., Peterson, L.R. 2002.** Evaluation of the Vitek 2 system for rapid identification of clinical isolates of gram-negative bacilli and members of the family Streptococcaceae. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 21, 869-874.
- 177. Gaydos, C.A., Van Der Pol, B., Jett-Goheen, M., Barnes, M., Quinn, N., Clark, C., Daniel, G.E., Dixon, P.B., Hook, E.W. 2013.** Performance of the Cepheid CT/NG Xpert Rapid PCR Test for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of clinical microbiology*. 51, 1666-1672.
- 178. Geiselbrecht A.D., Herwig R.P., Deming J.W., Staley J.T. 1996.** Enumeration and phylogenetic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading marine bacteria from Puget Sound sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3344-3349.
- 179. Geisen, R, Cantor, MD, Hansen, TK, Holzapfel, WH, Jakobsen, M. 2001.** Characterization of *Penicillium roqueforti* strains used as cheese starter cultures by RAPD typing. *Int J Food Microbiol.* May 10;65(3):183-91.
- 180. Genivar. 2013.** *Évaluation environnementale stratégique sur la mise en valeur des hydrocarbures dans les bassins d'Anticosti, de Madeleine et de la baie des Chaleurs.* Rapport de GENIVAR au ministère des Ressources naturelles, 660 p.
- 181. Ghazali F. M., Rahman R. N. Z., Salleh A. B., and Basri M. 2004.** Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *Int. Biodeterio. & Biodeg*, Vol. 54, pp. 61 – 67.
- 182. GIBSON J, HARWOOD CS. 2002.** Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 345-369.
- 183. Gibson D.T., Parales R.E. 2002.** Aromatic hydrocarbon dihydrogenases in environmental biotechnology. *Current. Opinion in Biotechnology.* 11:236-243.
- 184. Girard M., Walter C., Remy C., Berthelin N., More L. 2005.** Sol et environnement, exercices et études de cas. *Dunod.* P.799.
- 185. Girvan, M. S., Campbell, C. D., Killham, K., Prosser, J. I. et Glover, L. A. 2005.** Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environ Microbiol* 7, 301–313.
- 186. Gomez D., 2010.** Etude approfondie de l'influence de la nature chimique fine des polluants hydrocarbures sur le calcul du risque sanitaire." Technical report, AXE environnement, Ecole de Hautes Etudes En Sante Publique: 74.



- 187. González, J.M., Mayer, F., Moran, M.A., Hodson, R.E., Whitman, W.B. 1997.** *Sagittula stellata* gen. nov., sp., a lignin-transforming bacterium from a coastal environment. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:773-780.
- 188. Gottschalk G., Knackmuss H.J. 1993.** Bacteria and the biodegradation of chemicals achieved naturally, by combination or by construction. *Angewandte Chemie International Edition in English*, Vol.32, n°10, 1398-1408.
- 189. Goswami P. et Singh H.D. 1991.** Different modes of hydrocarbons uptake by two *Pseudomonas* species. *Biotechnology and Bioengineering.* 37:1-11.
- 190. Grady C. P. L. Jr. 1985.** Biodegradation: Its measurement and microbiological basis. *Biotechnol. Bioeng.* 27, 660-674.
- 191. Gramms G.; Kirsche B.; Voigt K. D.; Günther T. and Fritsche W. 1999.** Conversion rates of five polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid cultures of fifty-eight fungi and the concomitant production of oxidative enzymes. *Mycological Research* 103(8): 1009-1018.
- 192. Greene E.A., Kay J.G., Jaber K., Stehmeier L.G., and Voordouw G. 2000.** Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5282-5289.
- 193. Grimm A.C., Harwood C.S. 1999.** Nah Y, a catabolic plasmid-encoded receptor required for chemotaxis of *Pseudomonas putida* to the aromatic hydrocarbon naphthalene. *J. Bacteriol.* 181, 3310-3316.
- 194. Grossart, HP, Ploug, H. 2001.** Microbial degradation of organic carbon and nitrogen on diatom aggregates. *Limnol. Oceanogr.* 46:267-277
- 195. Grossi V., Cravo-Laureau C., Guyoneaud R., Ranchou-Peyruse A., and Hirschler-Réa A. 2008.** Metabolism of n-alkanes and n-alkenes by anaerobic bacteria: A summary. *Organic Geochemistry* 39: 1197-1203.
- 196. Grova N., Feidt C., Crépineau C., Laurent C., Rychen G., Laurent F. 2000.** Gas chromatography-mass spectroscopy study of polycyclic aromatic hydrocarbons in grass and milk from urban and rural farms. *Eur. J. Mass Spectrom.* 6, 457-460.
- 197. Grova N., Laurent C., Feidt C., Lafargue P.E., Hachimi A., Rychen G. 2002.** Detection of polycyclic aromatic hydrocarbons levels in milk collected near potential contamination sources. *J. Agric. Food Chem.* 500, 4640-4642.
- 198. Grova N., Monteau F., Le Bizec B., Feidt C., Andre F., Rychen G. 2005.** Determination of Phenanthrene and Hydroxyphenanthrenes in Various Biological Matrices at Trace Levels using Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 29, 175-181.
- 199. Grynkiewich M., Polkowska Z et Namiesnik J. 2002.** Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in bulk precipitation and runoff waters in an urban region (Poland). *Atmospheric Environment* 36(2): 361 – 369.
- 200. Guermouche M'Rassi A. 2014.** Caractérisation moléculaire des bactéries impliquées dans la biodegradation des hydrocarbures. Thèse de doctorat en microbiologie. Université d'Oran.
- 201. Guerrero, R., et Berlanga, M. 2006.** Life's unity and flexibility: the ecological link. *Int Microbiol* 9:225-235.
- 202. Gulis, V. et Suberkropp, K. 2003.** Leaf litter decomposition and microbial activity in nutrient-enriched and unaltered reaches of a headwater stream. *Freshwater Biol.* 48: 123-134.

**H**.....

- 203. Habe H., Chung J.S., Lee J.H., Kasuga K., Yoshida T., Nojiri H. and Omori T. 2001.** Degradation of chlorinated dibenzofurans and dibenzo-p-dioxins by two types of bacteria

- having angular dioxygenases with different features. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 3610–3617
- 204.Habe H., Omori T. 2003.** Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Biosci Biotech Biochem* 67: 225-243.
- 205.Hadef R. 2008.** Quel projet urbain pour un retour de la ville à la mer? Cas d'étude ; Skikda. Magistère option ville et projet urbain. Université de Constantine
- 206.Hadibarata T. 2009.** Oxidative Degradation of Benzo[a]pyrene by the Ligninolytic Fungi.*Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry - Environmental Research in Asia*: 309-316.
- 207.Hähn M.W., Lunsdorf H., Janke L. 2004.** Exopolymer production and microcolony formation by planktonic freshwater bacteria: defence against protistan grazing. *Aquat. Microb. Ecol.* 35:297-308.
- 208.Hagström Å., Pommier T., Rohwer F., Simu K., Svensson D., Zweifel U.L. 2002.** Bio-informatics reveal surprisingly low species richness in marine bacterioplankton. *Appl Environ Microbiol*, 67:3628 –3633
- 209.Hammadi K., Aznouz M., Halbouche M. 2012.** Biodegradation of Hydrocarbons (Oil Fuels) by *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida sp* and *Aspergillus terreus* by Isolated from the Coast Line of Arzew – Oran-Algeria. International Conference on Applied Life Sciences
- 210.Haramaya S, Sugiura K, Ishihara M, Shimauchi T .1997.** Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environ. Sci. Technol.* 31: 45-51.
- 211.Harayama S., Kishira H., Kasai Y., Shutsubo K. 1999.** Petroleum biodegradation in marine environments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology.* 1:63-70.
- 212.Harayama S., Kasai Y et al. 2004.** Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Current Opinion in Biotechnology* 15(3): 205-214.
- 213.Haritash A.K., Kaushik C.P. 2009.** Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *J Hazard Mater* 169:1-15.
- 214.Hartmann R. 1996.** Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) in forest soils: critical evaluation of a new analytical procedure. *Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 62,161-173.
- 215.Hawksworth D.L. 2004.** Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *Studies in Mycology.* Vol (50) : 9-18.
- 216.Hazen T.C., Dubinsky E.A., Desantis T.Z., Andersen G.L., Piceno Y.M., Singh N., Jansson J.K., Probst A., Borglin S.E. et al. 2010 .** Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria. *Science* 330, 204-615 208.
- 217.Head I.M., Jones D.M et al., 2006.** Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology* 4: 173-182.
- 218.Head I., Gray N., Aitken C., Sherry A., Jones M., and Larter S. 2010.** Hydrocarbon activation under sulfate reducing and methanogenic conditions proceeds by different mechanisms. *Geophysical Research Abstracts* 12.
- 219.Heath D.J., Lewis C.A., Rowland S.J.1997.** The use of high temperature gas chromatography to study the biodegradation of high molecular weight hydrocarbons *Org. Geochem.* 26: 769-785
- 220.Heider J., Spormann A.M., Beller H.R., Widdel F. 1999.** Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS. Microbiology. Reviews.* 22:459-473.
- 221.Hibbett D.S., Binder M., Bischoff J.F., Blackwell M., Cannon P.F., Eriksson O.E., Huhndorf S., James T., Kirk P.M., Lücking R. et al. 2007 .** A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research.* 111: 509-547.

- 222.HOGAN J.S., GONZAIES R.N., OLIVIERS S.P., PANKEY J.W., SMITH K. L., 1999.** Laboratory hand book on bovine mastitis, 2<sup>nd</sup> édition, National mastitis council, Madison, USA: 222p.
- 223.Hommel R.K., Stegner S., Weber L. et Kleber H.P.1994.** Effect of ammonium ions on glycolipid production by *Candida (Torulopsis) apicola*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **42**, 192-197.
- 224.Hopprich R., Shephard L., Taing B., Kralj S., Smith A., Lumb R. 2012.** Evaluation of (SD) MPT64 antigen rapid test, for fast and accurate identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Pathology*. 44, 642-643.
- 225.Huang X. F., Guan W., Liu J., Lu L. J., Xu J. C., Zhou Q. 2010.** Characterization And Phylogenetic Analysis Of Biodemulsifier-Producing Bacteria, *Bioresource Technology*, Vol.101, p.317–323.
- 226.Hussien, A.A., Hassan, S. S. 2008.** Efficiency of local isolates bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia ficaria* in petroleum wastewater treatment .Iraqi , *Biotechnology Journal*,. 7(1), 96 –109.

**I**.....

- 227.International Agency for Research on Cancer (LARC). 1987.** Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of LARC Monographs Volumes 1 to 42 Lyon: World Health Organization.
- 228.Ishige T., Honda K., Shimizu S. 2005.** *Whole organism biocatalysis*. *Curr Opin Chem Biol*, vol. 9, n° 2, p. 174–80 .

**J**.....

- 229.James T.Y., Kauff F., Schoch C.L., Matheny P.B., Hofstetter V., Cox C.J., Celio G. et al. 2006.** Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* . 443: 818-822.
- 230.Jeffrey S.W. 1976.** A report of green algal pigments in the central North Pacific Ocean. *Mar. Biol.* 37:33-37.
- 231.Jennings D.H., Lysek G. 1996.** *Fungal biology: understanding the fungal lifestyle.* (Bios Scientific publishers eds).
- 232.Johnsen A.R., Winding, A., Karlson, U., Roslev, P. 2002.** Linking of microorganisms to phenanthrene metabolism in soil by analysis of C-13-labeled cell lipids. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 6106-6113.
- 233.Johnsen A.R., Schmidt S., Hybholt T., Henriksen S., Jacobsen C.S., Andersen O. 2007.** Strong impact on the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degrading community of a PAH- polluted soil but marginal effect on PAH degradation when priming with bioremediated soil dominated by mycobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 73 no. 5, 1474-1480.
- 234.Jones M.D.M., Forn I., Gadelha C., Egan M.J., Bass D., Massana R., Richards T.A. 2011.** Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life. *Nature*. Vol (474) : 200-203.
- 235. JORA (Journal Officiel de la République Algérienne). 2009.** Décret exécutif définissant les valeurs limites maximales des paramètres de rejets d’effluents liquides industriels. Num 26.
- 236.Jose F. 1999.** Essai de biodégradabilité sur les sols contaminés par les hydrocarbures, 3<sup>ème</sup> édition. *Dunad*. Paris.
- 237.Jouanneau Y., Martin, F., Krivobok, S., Willison, J.C. 2011.** Ring-hydroxylating dioxygenases involved in PAH degradation : structure, function and biodiversity. In: Koukkou AI (ed). In *Microbial biodegradation of non metals: current approaches*. Horizon Scientific Press.

238. **Juhasz A.L., Naidu R. 2000.** Bioremediation of high weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & biodegradation*. 45, 57-88.
239. **Jung Tae Kim. 2014.** Isolement et Charaterization de colorant dégradantes micro-organismes pour le traitement de la chromaticité contenues dans les eaux usées industrielles de teinture, *Journal of Environmental Science International*, 23 , 1, 129.
240. **Jürgens K., Matz C. 2002.** Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:413-434.
241. **Jyothi K., Surendra B., Nancy C.K., Kashyap A. 2012.** Identification and isolation of hydrocarbon degrading bacteria by molecular characterization, *Helix* 2 105-111.

**K**.....

242. **Kabzinski A.K.M., Cyran J., et al. 2002.** Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water (including drinking water) of Lodź. *Polish journal of environmental studies* 11(6): 695-706.
243. **Kaczorek E., Urbanowics M., Olszanowski A. 2010.** The influence of surfactants on cell surface properties of *Aeromonas hydrophila* during diesel oil biodegradation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Volume 81, Issue 1, Pages 363–368.
244. **Kaistner M., Breueur-Jammali M., Mahro B. 1994.** Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAR). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41, 267-273.
245. **Kanally R.A. et Hur G. 2006.** Growth of *Phanerochaete chrysosporium* on diesel fuel hydrocarbon at neutral Ph. *Chemosphere*. 63(2): 202-211.
246. **Kang H., Hwang S. Y., Kim Y. M., Kim E., Kim Y.S., Kim S. K., Kim S. W., Cerniglia C. E, Shuttleworth K. L. et Zylstra G.J. 2003.** Degradation of phenanthrene and naphthalene by a *Burkholderia species* strain. *Can J Microbiol*. 49(2): 139-144.
247. **Kaplan, C.W et Kitts, C.L. 2004.** Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Appl Environ Microbiol*, 70. 1777-1786.
248. **Kaufmann k.2004.** Assessment of microbial community changes and limiting factors during bioremediation of hydrocarbon-polluted soil with new miniaturized physiological methods. *Ecole polytechnique fédérale de Lausanne(France)*.
249. **Kawada M., Annaka M., Kato H., Shibasaki S., Hikosaka K., Mizuno H., Masuda Y., Inamatsu T.2011.** Evaluation of a simultaneous detection kit for the glutamate dehydrogenase antigen and toxin A/B in feces for diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 17, 807-811.
250. **Kebe I.B., Mpika J., N'Guessan F.K., Hebbar P K., Samuels G.S. et AKE S. 2009.** Isolement et identification de microorganismes indigènes de cacaoyères en Côte d'Ivoire et mise en évidence de leurs effets antagonistes vis-à vis de *Phytophthora palmivora*, agent de la pourriture brune des cabosses. *Sciences & Nature*, Vol.6 N°1: 71 – 82.
251. **Kelley I; Freeman J.P. and Cerniglia C.E. 1993.** Identification of metabolites from degradation of naphthalene by a *Mycobacterium sp.* *Biodeg*. 1:283-290.
252. **Kenneth, N.T.2000.** *Pseudomonas putida* : un opportuniste comestible par excellence, *Microbiol. Environ.* p779.
253. **Khan A.A., Wang R.F., Cao W.W., Doerge D.R., Wennerstrom D., Cerniglia C.E. 2001.** Mollecular cloning nucleotide sequence and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium sp.* Strain PYR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(8): 3577-3585.
254. **Khan M.A. and Ghouri A.M. 2011.** Environmental pollution: its effects on life and its remedies. *J. Art. Sci.Comme.2*: 276–285.

255. **Khelfaoui F., Zouini D. 2010.** Gestion et qualité des eaux dans le bassin versant du Saf-Saf (Wilaya de Skikda, nord-est algérien). *Nature & Technologie*. Vol 3.
256. **Kim S., Picardal F., 2000.** A novel bacterium that utilizes monochloro-biphenyls and 4-chlorobenzoate as growth substrates. *FEMS Micro-biol. Lett.* 185, 225–229
257. **Kim S., Picardal F.W. 2001.** Enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons using nonionic surfactants in soil slurry. *Applied Geochemistry*. 16: 1419-1425.
258. **Kim S.J., Kweon O., Freeman J.P., Jones R.C., Adjei M.D., Jhoo J.W., Edmondson R.D., Cerniglia C.E. 2006.** Molecular Cloning and Expression of Genes Encoding a Novel Dioxygenase Involved in Low-and High-Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(2): 1045-1054.
259. **Kim J. Y. and Lee S. S. 2008.** Biodegradation of Kerosene by *Pseudomonas aeruginosa* K14. *Kor. J. Microbiol.* 44:159-163.
260. **Kinzig A.P., Pacala S.W., et Tilman, D. 2002.** The Functional Consequences of Biodiversity: Empirical Progress and Theoretical Extensions. Princeton University Press, Princeton, NJ.
261. **Kirchman D.L. (ed) .2002.** Microbial ecology of the oceans. Wiley Liss, New York, 543p.
262. **Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C., Stalpers J.A. (eds). 2001.** Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, ninth ed. CABI Publishing, Wallingford.
263. **Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W. et Stalpers J.A. 2008.** Dictionary of the Mycota. 10<sup>th</sup> Edition. Cromwell Press, Trowbridge.
264. **Kirso U. and Irha N. 1998.** Role of algae in fate of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 41 :83-89.
265. **Klug M.J., Markovetz K., 1971.** Utilization of aliphatic hydro-carbons by microorganisms. *Adv. Microbial Physiol.* 5, 1–39.
266. **Kolber Z. S et Gerald F. 2001.** Contribution of aerobic photoheterotrophic bacteria to the carbon cycle in the ocean. *Science* 292(5526): 2492-2502.
267. **Komagata K., Nakase T. et Katsuya N. 1964.** Assimilation of hydrocarbons by yeasts: I. Preliminary screening. *J. Gen. Appl. Microbiol.* , 10 : 313-321
268. **Kostka J. E., Prakash O et al., 2011.** Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by the deepwater Horizon oil spill. *Applied and environmental microbiology*.
269. **Kotterman, M.J; Rietberg H.J. et Field J.A., 1998.** Polycyclic aromatic hydrocarbon oxidation by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. Strain BOS55 in the presence of nonionic surfactants. *Biotech. Bioeng.* 57(2):220-227.
270. **Kovárová-Kovar K., Egli T. 1998.** Growth kinetics of suspended microbial cells: from single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:646-666.
271. **Kuony S. 2005.** Caractérisation d'arene dioxygenases impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques chez *mycobacterium* SP. 6PY1. Thèse de doctorat.

**L**.....

272. **Labrecque, M. H. 2003.** Etude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène. Maîtrise en microbiologie agricole, Université de Laval. Canada.
273. **Lacaze J.C. 1980.** La pollution pétrolière en milieu marin. Extraits du livre publié aux éditions Masson. 30p.

- 274.Lamy D. 2006.** Dynamique bactérienne en Manche orientale – Relation avec les poussées de *Phaeocystis globosa*. Thèse de doctorat de l'Université du littoral côte d'Opale. France.
- 275.Lapeyrie F., Ranger J., Vairalles D. 1991.** Phosphate solubilizing activities of ectomycorrhizal fungi in vitro.—Canadian Journal of Botany, vol.69, pp. 342-346.
- 276.Leahy J.G et Colwell R.R. 1990.** Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews* 54: 305-315.
- 277.Leahy J.G., Tracy K.D. and Eeley M.H. 2003.** Degradation of mixtures of aromatics and chloroaliphatic hydrocarbons by aromatic hydrocarbon degrading bacteria. *FEMS Microbiol. Eco.* 43 (2), 271-276.
- 278.Lecomte P. 1995.** Les sites pollués, traitement des sols et des eaux souterraines. *Edition Lavoisier, TEC& DOC.* P.198.
- 279.Lee R. F., Page D. S., 1997.** Petroleum hydrocarbons and their effects in subtidal regions after major oil spills. *Marine Pollution Bulletin*, vol. 34, no. 11, pp. 928-940
- 280.Lee S.E., Seo J.S., Keum Y.S., Lee J.H., Li C.H. 2007.** Fluoranthene metabolism and associated proteins in *Mycobacterium sp.* JS14. *Proteomics* 7(12): 2059-2069.
- 281.Lee S.S., Alias S.A., Jones E.G.B., Zainuddin N., Chan H.T. 2012.** Checklist of Fungi of Malaysia. Research Pamphlet. N°132.
- 282.Lefebvre G. 1986.** Notions de chimie du pétrole. Editions TECHNIP, 1232 pages.
- 283.Le Gentil E. 2009.** Pollution par les hydrocarbures en Manche et golfe de Gascogne. Risques et prévention entre 1960 et 2004. Thèse de doctorat. Université de Brest.
- 284.Leiger R., Aps R., Kotta J., Orviku Ü.K., Pärnoja M., Tõnisson H. 2012.** *Relationship between shoreline substrate type and sensitivity of seafloor habitats at risk to oil pollution.* *Ocean & Coastal Management*, vol. 66, pp. 12-18
- 285.Lemiere B., Seguin JJ., Le Guern C., Guyonnet D., Baranger PH . 2001.** Guide sur le comportement des polluants dans les sols et les nappes. Ed BRGM. France.
- 286.Le Tacon F., Selosse M. A. 1997.** Le rôle des mycorhizes dans la colonisation des continents et la diversification des écosystèmes terrestres. *Rev.For.Fr.* XLIX-n°sp.
- 287.Leys, N.M.E.J., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Verstraete, W., Top, E.M., Springael, D. 2004.** Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* 70: 1944-1955.
- 288.Leys, N.M., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Wattiau, P., Top, E.M., Verstraete, W et al. 2005.** Occurrence and community composition of fast-growing *Mycobacterium* in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol Ecol* 51: 375-88.
- 289.Lin C., Gan L. et Chen Z.L. 2010.** Biodégradation de naphthalène by strain *Bacillus fusiformis* (BFN). *Journal of Hazardous Materials.* 182. Pp 771 – 777.
- 290.Liu Y.J., Hodson M.C., Hall B.D. 2006.** Loss of the flagellum happened only once in the fungal lineage: phylogenetic structure of Kingdom Fungi inferred from RNA polymerase II subunit genes. *BMC Evolutionary Biology.* 6: 74-87.
- 291.Lotfinasbasl S., Gunale V.R., Rajurkar N.S. 2012.** Assessment of petroleum hydrocarbon degradation from soil and tarball by fungi. *Biosci. Disc.*3:186–192.

**M**.....

- 292. Mackay D., Shiu W.Y. et Ma K.C. 1992.** Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals. Volume I. Lewis Publishers. Chelsea, 697 p.
- 293.MacNaughton S.J., Stephen J.R., Venosa A.D., Davis G.A., Chang Y.J. and White D.C., 1999.** Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3566-3574.

294. Madrid H., Cano J., Gené J., Bonifaz A., Toriello C. ET Guarro J. 2009. \_ Revista ibero americana de micología, 26(3), 218-222.
295. Madsen S.D., Forbes T.L., and Forbes V.E. 1997. Particle mixing by the polychaete *Capitella* species 1: Coupling fate and effect of a particle-bound organic contaminant (fluoranthene) in a marine sediment. *Marine Ecology Progress Series* 147: 129- 42.
296. Mahmoudi N., Porter T.M., Zimmerman A. R., Fulthorpe R., Kasozi G.N., Silliman B. R., Slater G.F. 2013. *Rapid degradation of Deepwater Horizon spilled oil by indigenous microbial communities in Louisiana saltmarsh sediment*. Environ. Sci. Technol., Vol 47, pp. 13303-13312.
297. Maier R.M., Pepper I.L. and Gerba C.P. 2000. Environmental microbiology. San Diego: Academic Press.
298. Maki H, Sasaki T, Haramaya S. 2005. Photooxidation of biodegradable crude oil and toxicity of the photooxidized products. *Chemosph.* 44:1145-1151.
299. Makut M.D. and Ishaya P. 2010. Bacterial species associated with soils contaminated with used petroleum products in Keffi town, Nigeria. *African Journal of Microbiology Research*, 4 (16); pp. 1698-1702.
300. Malik, Z. A. et Ahmed, S. 2012. Degradation of petroleum hydrocarbons by oil field isolated bacterial consortium, *Afr. J. of Biotechnol.*, Vol. 11 (3), pp. 650-658.
301. Mallick S., Chatterjee S., Dutta T.K. 2007. A novel degradation pathway in the assimilation of phenanthrene by *Staphylococcus* sp. Strain PN/Y via meta-cleavage of 2-hydroxyl-1-naphthoic acid: formation of trans-2,3-dioxo-5-(2'-hydroxyphenyl)-pent-4-enoic acid. *Microbiology*. 153(7): 2104-2115.
302. Marchal N., Bourdon J.L. et Richard CL. 1991. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3<sup>ème</sup> Ed. , Doin éditeurs, Paris.
303. Marcos M.A., Jimenez de Anta M.T., de la Bellacasa J.P., Gonzalez J., Martinez E., Garcia E., Mensa J., de Roux A., Torres A. 2003. Rapid urinary antigen test for diagnosis of pneumococcal community-acquired pneumonia in adults. *The European respiratory journal*. 21, 209-214.
304. Margesin R., Schinner F. 1999. Biological decontamination of oil spills in cold environments. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol 74, pp. 381-389.
305. Margesin, R. et Schinner, F. 2001. Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel -Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (7): 3127-3133.
306. Margesin R., Zacke G. et Schinner F. 2003. *Pedobacter cryocanitis* sp nov., a facultative psychrophile from alpine glacier cryoconite. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1291-1296.
307. Martinez F. 2008. Rapport de stage société pétrolière SONATRACH. Ingénieur d'état en RO. USTHB, Alger.
308. Mathieu Y. 2011. Le dernier siècle du pétrole ? La vérité sur les réserves mondiales. Editions TECHNIP, Paris, 138 pages.
309. Mazzeo D.E.C., Levy C.E., de Angelis D., Marin-Morales M.A. 2010. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. *Science of the Total Environment* 408. 4334-4340.
310. Mazurkiewicz-Zapałowicz K., Silicki A., Gregorczyk A., Biedunkiewicz A., et Wolska M. 2012. Effects of some abiotic factors on the occurrence of aquatic mycobiota in lakes of the Drawa National Park . *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 41(4), 8-16.
311. Mbadinga S.M., Wang L.Y., Zhou L., Liu J.F., Gu J.D., et Mu B.Z. 2011. Microbial communities involved in anaerobic degradation of alkanes. *International Biodeterioration and Biodegradation* 65: 1-13.

312. McDonald I. R., Miguez C. B., Rogge G. et al. 2006. Diversity of soluble methane monooxygenase-containing methanotrophs isolated from polluted environments,” *FEMS Microbiology Letters*, vol. 255, no. 2, pp. 225–232.
313. McLaughlin D.J., Hibbett D.S., Lutzoni F., Spatafora J.W., Vilgalys R. 2009. The search for the fungal tree of life. *Trends in Microbiology*. Vol (17) n°11 : 488-497.
314. Meckenstock. R.U., Saffinowski M. et Griebler C. 2004. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol Ecol* 49: 27-36.
315. Mecibah I .2008. Les ressources en eau et gestion intégrée du bassin versant d’Oued Guebli (Nord-Est Algérien). Magister en Hydrogéologie. Université d’Annaba.
316. Mehboob F., Junca H., Schraa G., and Stams A.J.M. 2009. Growth of *Pseudomonas chloritidismutans* AW-1T on *n*-alkanes with chlorate as electron acceptor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 83: 739-747.
317. Mer G.S., Sati S.C., Khulbe R.D. 1981. Occurrence, distribution and seasonal periodicity of some aquatic fungi of Sat-Tal (Nainital), India ; *Hydrobiologia*.
318. Mercier R. 1998. Traitement par des champignons filamenteux de sols contaminés par des composés organiques persistantes: applications aux hydrocarbures aromatiques polycycliques. Thèse de l’université Aix-Marseille I. Spécialité Biologie Cellulaire et Microbiologie.
319. Meulenberg, R., Rijnaarts, H. H. M., Doddema, H. J. et Field, J. A. 1997. Partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons show an increased bioavailability and biodegradability. *FEMS Microbiology letters*, volume 152, p. 45-49.
320. Mezedjri L 2008. Modélisation de l’Impact de la Pollution Industrielle Hydrique dans le golfe de Skikda (Littoral Est algérien). Thèse de Doctorat. Université d’Annaba.
321. Mi Jin H., Choi E.J., Jeon C.O. 2013. Isolation of a BTEX-degrading bacterium, *Janibacter* sp. SB2, from a sea-tidal flat and optimization of biodegradation conditions. *Bioresource Technology*. 145: 57–64.
322. Mille-Lindblom, C. et Tranvik, L.J. 2003. Antagonism between bacteria and fungi on decomposing aquatic plant litter. *Microbial Ecology*, 45: 173-182.
323. Mirpuri R., Jones W. and Bryers J.D. 1997. Toluene degrading kinetics for planktonic and biofilm grown cells of *Pseudomonas putida* 54G. *Biotechnol. Bioeng.* 53: 535-46
324. Mittal A. and Singh A. 2009. Isolation of Hydrocarbon Degrading Bacteria from Soil Contaminated with Crude Oil Spills. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47, 760-765.
325. Mitra S. and Bianchi T.S. 2003. A preliminary assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon distributions in the lower Mississippi River and Gulf of Mexico. *Marine Chemistry* 82(3-4): 273-288.
326. Mohamed ben Ali R. 2014. Evaluation de la pollution des eaux issue de la zone industrielle de Skikda. Magister en Ecologie et Environnement. Université Constantine1.
327. Mollea C., Bosco F. and Ruggeri B. 2005. Fungal biodegradation of naphthalene: microcosms studies. *Chemosphere* 60(5): 636-643.
328. Mollet C., Drancourt M., Raoult D. 1997. rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Molecular microbiology*. 26, 1005-1011.
329. Morales-Caselles, C., Riba, I., Sarasquete, C. and Del Valls, A. 2008. Using a classical weight-of-evidence approach for 4-years monitoring of the impact of an accidental oil spill on sediment quality. *Environment International*, vol. 34. p. 514- 523.
330. Morlett-Chávez J.A, Ascacio-Martínez J.A, Rivas-Estilla A.M, Velázquez-Vadillo J.F, Haskins W, Barrera-Saldaña H.A, Acuña-Askar K. 2010. Kinetics of BTEX biodegradation by a microbial consortium acclimatized to unleaded gasoline and bacterial strains isolated from it. *International Biodeterioration & Biodegradation* 64.581-587.



- 331. Moody J.D., Freeman J.P., Doerge D.R., Cerniglia C.E. 2001.** Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium sp* strain PYR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1476-1483.
- 332. Morlett-Chávez J.A, Ascacio-Martínez J.A, Rivas-Estilla A.M, Velázquez-Vadillo J.F, Haskins W, Barrera-Saldaña H.A, Acuña-Askar K. 2010.** Kinetics of BTEX biodegradation by a microbial consortium acclimatized to unleaded gasoline and bacterial strains isolated from it. *International Biodeterioration & Biodegradation* 64:581-587.
- 333. Mueller GM, Schmit JP. 2007.** Fungal biodiversity: What do we know? What can we predict? *Biodivers Conserv.* 16(1):1-5.
- 334. Mulligan C.N., Yong R.N., Gibbs B.F. 2001.** Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Eng. Geol.* 60, 371-380.
- 335. Musavi S.F., Balakrishnan R.M. 2014.** A Study on the Antimicrobial Potentials of an Endophytic Fungus *Fusarium oxysporum* NFX 06. *Journal of Medical and Bioengineering* Vol(3) n°3 : 162-166.

**N**.....

- 336. NAM K., KIM J.Y. et OH D.I. 2003.** Effect of soil aggregation on the biodegradation of phenanthrene aged in soil, *Environ. Pollut.*, **121**, 147-51.
- 337. Nakamiya K., Sato A., Takahara Y. & Iida T. 1985.** Microbial oxidation of isoterpenoid alkanes, phytane, norpristane and farsnesane. *Agric Biol Chem* 49, 1993-2002.
- 338. Neff J.M. 1979.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment, sources, fates and biological effects. Applied Science Publishers Ltd., Essex, Angleterre
- 339. Nerurkar A. S., Hingurao K. S., et al. 2009.** Bioemulsifiers from marine microorganisms. *J Sci Ind Res* 68: 273-277.
- 340. Nicodem D. E., Guedes C. L. B., et al. 1997.** Photochemical processes and the environmental impact of petroleum spills. *Biogeochemistry* 39(2): 121-138.
- 341. Noemie E., Castallenet F., Debas L., 2003.** 20 Prestiges souilleront la méditerranée cette année !. Rapport sur la pollution marine par hydrocarbures et les dégazages sauvages en méditerranée. WWF. France.
- 342. Not F. 2004.** Structure et diversité des communautés de picoeucaryotes en milieu marin. Thèse de doctorat de l'Université Paris VI.
- 343. Nwachukwu S.U., Ugoji E.O. 1995.** Impact of crude petroleum spills on microbial communities of tropical soils. *International Journal of Environment. Science*, 21(1), 169 – 175.

**O**.....

- 344. Obayori O.S., Ilori M.O., Adebuseye S.A., Oyetibo G.O., Amund O.O. 2008.** Pyrene-degradation potentials of *Pseudomonas* species isolated from polluted tropical soils. *World J Microbiol Biotechnol* 24:2639-2646.
- 345. Obayori O.S., Adebuseye S.A., Adewale A.O., Oyetibo G.O., Oluyemi O.O., Amokun R.A. and Ilori M.O., 2009.** Differential degradation of crude oil (Bonny light) by four *Pseudomonas* strains. *J. Environ. Sci.*, 21: 243-248.
- 346. Oboh O.B., Ilori M.O., Akinyemi J.O., Adebuseye S.A. 2006.** Hydrocarbon degrading potential of Bacteria isolated from a Nigerian Bitumen (Tarsand) Deposit. *Nature Sci.*, 4(3): 51-57.
- 347. Okerentugba P.O. and Ezeronye O.U. 2003.** Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluent in Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 2(9): 288 – 292.
- 348. Okoh A.I. 2003.** Biodegradation of Bonny Light Crude Oil in Soil Microcosm by Some Bacterial Strains Isolated from Crude Oil Flow Stations Saver Pits in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*. 2, 104 – 108.

- 349. Okpokwasili GC, James WA .1995.** Microbial contamination of kerosene, gasoline and crude oil and their spillage potentials. *Materials u Organismen*, 29: 147-156.
- 350. Olivella M.A. 2006.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in rainwater and surface waters of Lake Maggiore, a subalpine lake in Northern Italy. *Chemosphere* 63(1): 116-131.
- 351. Olivera, N.L., Esteves, J.L. et Commendatore, M.G., 1997.** Alkane biodegradation by a microbial community from contaminated sediment in Patagonia, Argentina. *International Biodeterioration Biodegradation* 40, 75-79.
- 352.OMS. 2000.** Air Quality Guidelines for Europe. World Health Organization. Copenhagen 2<sup>nd</sup>
- 353.Ortmann A.C., Lu Y. 2015.** Initial community and environment determine the response of bacterial communities to dispersant and oil contamination. *Marine Pollution Bulletin* 90:106-114
- 354.Oudot J. 2000.** Biodégradation du fuel de l'Erika. *Life Science*, 323, 945-950
- P** .....
- 355.Pamp S. J. et Tolker-Nielsen T. 2007.** Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 189, 2531-2539.
- 356.Parales R.E., Lee K., Resnick S.M., Jiang H.Y., Lessner D.J., Gibson D.T.2000.** Substrate specificity of naphthalene dioxygenase: Effect of specific amino acids at the active site of the enzyme. *J. Bacteriol.*182:1641-1649.
- 357.Parales R. E. 2003.** The role of active-site residues in naphthalene dioxygenase. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30, 271–278.
- 358.Patel V., Jain S et Madawar D. 2012.** Naphtalene degradation by bacterial consortium (DV- AL) developed from Alang-Sosiya ship breaking yard, Gujarat, India *Bioresource Technology*. 107, 122 – 130.
- 359.Patil T. D., Pawar S., Kamble P. N., and Thakare S. V. 2012.** Bioremediation of complex hydrocarbons using microbial consortium isolated from diesel oil polluted soil. *Der Chemica Sinica*, Vol. 3 (4), pp.953-958.
- 360.Pelmont J. 1993.** Bactéries et environnement : adaptations physiologiques. Collection Grenoble sciences. 899p.
- 361.Pelmont J. 2005.** Biodégradations et métabolismes, les bactéries pour les technologies de l'environnement. Collection Grenoble Sciences 798. Les Ulis, France : EDP Sciences.
- 362.Pernthaler A., Pernthaler J., Amann R., 2004.** Sensitive multi-color fluorescence in situ hybridization for the identification of environmental microorganisms. In: **Akkermans, A.D.L., van Elsas,J.D., de Bruijn, F.J. (Eds.)**, *Molecular Microbial Ecology Manual*.Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 711–726.
- 363.Pérez-Pantoja D., González B., Pieper D.H. 2010.** Aerobic degradation of aromatic hydrocarbons. In: *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, Springer, pp 799–837.
- 364.Perrone G, Susca A, Epifani F, Mule G. 2006.** AFLP characterization of Southern Europe population of *Aspergillus* Section *Nigri* from grapes. *Int J Food Microbiol.* 1;111 Suppl 1:S22-7.
- 365.Perry J.D., Rennison C., Butterworth L.A., Hopley A.L., Gould F.K. 2003.** Evaluation of *S. aureus* ID, a new chromogenic agar medium for detection of *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology.* 41, 5695-5698.
- 366. Petti C. A., C. R. Polage, and P. Schreckenberger. 2005.** The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. *J. Clin. Microbiol.* 43:6123-6125.
- 367.Phaff H.J., Miller M.W. et Mrak E.M. 1978.** The life of yeasts. 2nd ed., Cambridge: Harvard University Press, 341p.

- 368. Piquet A., Scheepens J., Bolhuis H., Wiencke C., Buma A. 2010.** Variability of protistan and bacterial communities in two Arctic fjords (Spitsbergen). *Polar Biol.* 33, 1521–153610.
- 369. Pitt J.I., Hocking A.D. 1997.** Fungi and food spoilage. Eds Springer.
- 370. Poindexter J.S. 1987.** Bacterial responses to nutrient limitation. In Fletcher M et al. *Ecology of microbial communities.* University Press, Cambridge.
- 371. Pomeroy 1974. L.R.** The ocean's food web: a changing paradigm. *BioSci* 24:499-504.
- 372. Pomeroy L.R., Johannes R.E. 1968.** Occurrence and respiration of the ultraplankton in the upper 500 meters of the oceans. *Deep-Sea Res.* 15:381-391.
- 373. Pontes J., Mucha A. P., Santos H., Reis I., Bordalo A., Basto M. C., Bernabeu A., Almeida C. M. R. 2013.** Potential of bioremediation for buried oil removal in beaches after an oil spill. *Marine Pollution Bulletin*, vol 76, pp. 258 – 265.
- 374. Popp N., Schlomann M et Mau M. 2006.** Bacterial diversity in the active stage of a bioremediation system for mineral oil hydrocarbons-contaminated soils. *Microbiology*, 152, 3291-3304.
- 375. Potin O, Rafin C, Veignie E .2004.** Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs)- contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 54: 45-52.
- 376. Poyart C., Quesne G., Boumaila C., Trieu-Cuot P. 2001.** Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the *sodA* gene as a target. *Journal of clinical microbiology.* 39, 4296-4301.
- 377. Prenafeta Boldú FX, Kuhn A., Luykx D., Anke H., van Groenestijn J.W. & de Bont J.A.M. 2001.** Isolation and characterisation of fungi growing on volatile aromatic hydrocarbons as their sole carbon and energy source. *Mycol. Res.* 105: 477–484
- 378. Prince R.C. 2005.** The microbiology of marine oil spill bioremediation. *Petroleum microbiology:* 317-336.
- 379. Pusch M., Fiebig D., Brettar I., Eisenmann H., Ellis B.K., Kaplan L.A., Lock M.A., Naegeli M.W. et Traunspurger W. 1998.** The role of micro-organisms in the ecological connectivity of waters. *Freshwater Biology*, **40**: 453-495.

**R**.....

- 380. Rabus R., Wilkes H., Behrends A., Armstroff A., Fischer T., Pierik A.J., and Widdel F. 2001.** Anaerobic initial reaction of *n*-alkanes in a denitrifying bacterium: evidence for (1-methylpentyl) succinate as initial product and for involvement of an organic radical in *n*-hexane metabolism. *J Bacteriol* 183:1707–1715.
- 381. Rahman K. S. M., Rahman T. J., Kourkoutas Y., Petsas I., Marchant R. and Banat I.M. 2003.** Enhanced bioremediation of *n*-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients,” *Bioresource Technology*, vol. 90, no. 2, pp. 159–168, 2003.
- 382. Rajasekar A., Anandkumar B., Maruthamuthu S., Ting Y.P., Rahman P.K.S.M. 2010.** Characterization of corrosive bacterial consortia isolated from petroleum-product-transporting pipelines. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1175–1185
- 383. Rama R., Mougín C., Boyer F.D., Kollmann A., Malosse C. et Sigoillot J.C., 1998.** Biotransformation of Benzo[a]pyrene in bench-scale reactor using laccase of *Pycnoporus cinnabarinus*. *Biotechnol. Lett.* 20(12):1101-1104.
- 384. Ravelet C., Krivobok S., Sage L. and Steiman R. 2000.** Biodegradation of pyrene by sediment fungi. *Chemosphere* 40(5): 557-563.
- 385. Redecker D. 2002.** New views on fungal evolution based on DNA markers and the fossil. *Research in Microbiology.* 153: 125-130.

- 386.Reilley K.A., Legube B., Merlet N. et Brunet R. 1996.** Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rizhosphere. *Journal of Environment Quality*, vol. 25, p. 212-219.
- 387.Riser-Roberts E. 1992.** Bioremediation of Petroleum Contaminated Sites, CRC Press, Boca Raton, FL.
- 388.Rivkin R.B., Anderson M. 1997.** Inorganic nutrient limitation of oceanic bacterioplankton. *Limnol. Oceanogr.* 42:730-740.
- 389.Rockne K.J., Chee-Sanford J.C., Sanford R.A., Hedlund B.P., Staley J.T., Strand S.E. 2000.** Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1595-1601.
- 390.Rodier J., Legube B., Merlet N. et al., 2009.** L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer. 9<sup>ème</sup> Edition, *DUNOD*, Paris.
- 391.Rodriguez-Blanco A.G. Vetion et al. 2010.** *Gallaecimonas pentaromativorans gen.nov.,sp.nov.*, a bacterium carrying 16S RNA gene heterogeneity and able to degrade high-molecular-mass polycyclic aromatic hydrocarbons. *International Journal of Systematic and Revolutionary Microbiology* 60(3): 504-509.
- 392.Rodriguez R.J., Henson J., Van Volkenburgh E., Hoy M., Wright L., Beckwith F., Kim Y.O., Redman R.S. 2008.** Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *International Society for Microbial Ecology*. Vol (2): 404-416.
- 393.Roger et Jacq, 2000.** Introduction à la bioremédiation des sols, des eaux et de l'air. Université de Provence Aix-Marseille1. 99p.
- 394.Roling W. F., Milner M. G., Jones D. M., Lee K., Daniel F., Swannell R. J. & Head I. M. 2002.** Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Appl Environ Microbiol* 68, 5537–5548.
- 395.Romero M.C., Casau M.C., Giorgieri S., Arambarri A.M. 1998.** Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream. *Environ. Pollut.* 101: 355-359.
- 396.Ron E.Z. et Rosenberg E. 2002.** Biosurfactants and oil remediation, *Current Opinion in Biotechnology*, 3: 249-252.
- 397.Rosenberg E. 1986** Microbial surfactants. *Crit Rev Biotechnol* 3 :109-132.
- 398.Rouidi S., 2014.** Evaluation de la contamination par les hydrocarbures des sédiments superficiels (fluviaux et marins) de la région de Skikda (nord-est algérien). Analyse statistique. Thèse de Doctorat. Université d'Annaba.
- 399.Roy P. K., Singh H. D. et Baruah J. N. 1978.** Metabolism of *n*-alkane in *Endomycopsis lipolytica* (*Saccharomycopsis lipolytica*): Part IV--Characteristics of lipid formation from *n*-alkanes by non-proliferating cells. *Indian J Biochem Biophys*15, 456-461.

**S**.....

- 400.Saihi, N., 2005.** Quantification de la pollution par les hydrocarbures totaux dans l'air et dans l'eau de la ville de Skikda et sa périphérique. Université d'Annaba.
- 401.Salicis F, Krivobok S, Jack M, Benoit-Guyod JL .1999.** Biodegradation of fluoranthenes by soil fungi. *Chemosphere*, 38: 3031-3039.
- 402.Saliot A.1981.** Natural hydrocarbons in sea water. *Marine organic chemistry*: 327-374.
- 403. Sarais M. 2008.** Rapport: analyse hystorique des accidents dans les depots d'hydrocarbures. Université Polytechnique de Catalunya. Certec.
- 404.Saratale G., Kalme S., Bhosale S. and Govindwar S.2007.** Biodegradation of kerosene by *Aspergillus sochraceus* NCIM-1146. *Journal of Basic Microbiol.* 47. P. 400-405.
- 405.Sarkhoh N.A., Ghannoum M.A., Ibrahim A.S., Stretton R.J. Radwan, S.S.1990.** Crude oil and hydrocarbon degrading strains of *Rhodococcus*: *Rhodococcus* strains isolated from soil and marine environments in Kuwait. *Environ. Pollut.* 65, 1–18.

406. Satpute S. K., Banat I. M. et al. 2010. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnology Advances* 28(4): 436-450.
407. Sauret C. 2011. Ecologie des communautés bactériennes marines soumises à une pollution pétrolière. Influence des facteurs environnementaux, de la prédation et de la récurrence des polluants. Thèse de Doctorat. Université Pierre et Marie Curie.
408. Sauret C., Böttjer D., Talarmin A., Guigue C., Conan P., Pujon-Pay M., Ghiglione J.F. 2015. Top-Down Control of Diesel-Degrading Prokaryotic Communities. *Microb Ecol.* 70(2):445-58.
409. Sayyed R.Z., Patel P.R. 2011. Biocontrol potential of siderophore producing heavy metal resistant *Alcaligenes* sp. and *Acinetobacter* sp. vis-à-vis organophosphorus fungicide. *Indian J Microbiol*, 51 (3), pp. 266–272.
410. Schmidt T.M. 2006. The maturing of microbial ecology. *Int Microbiol.* 9(3):217-23.
411. Schmit J.P., Mueller G.M. 2007. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodiversity and Conservation.* 16: 99-111.
412. Schneider D., Arp G., Reimer A., Reitner J. et Daniel R. 2013. Phylogenetic Analysis of a Microbialite-Forming Microbial Mat from a Hypersaline Lake of the Kiritimati Atoll, Central Pacific.
413. Scriban R. 1999. Biotechnologie. 5<sup>ème</sup> édition, *Tech et doc.* Lavoisier, Paris, France.
414. Semple K.T., Cain R.B. and Schmidt S. 1999. Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. *FEMS Microbiol. Lett.* 170:291-300.
415. Seo J., Keum Y., Li Q.X. 2009. Bacterial degradation of Aromatic Compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 6, 278-309.
416. Shah V. et Nerud F. 2002. Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. *Canadian Journal of Microbiology* 48(10): 857-870.
417. Shah A.A., Hasan F., Hameed A. et Ahmed S. 2008. Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnology advances*, 26(3): 246-265.
418. Shearer C.A., Descals E., Kohlmeyer B., Kohlmeyer J., Marvanová L., Padgett D. et Voglymayr H. 2007. *Fungal biodiversity in aquatic habitats.* *Biodiversity and Conservation*, 16(1), 49-67.
419. Sherr E.B., Sherr B.F. 1994. Bacterivory and herbivory: key roles of phagotrophic protists in pelagic food webs. *FEMS Microb. Ecol.* 28:233-235.
420. Sherr, E. and B. Sherr. 2009. Understanding roles of microbes in marine pelagic food webs: a brief history, *Wiley Online Library*: 27-44.
421. Sherwood L.M., Willey J.M., Woolverton C.J. 2010. *Microbiologie.* De Boeck Supérieur, 1216 pages.
422. Sigeo D.C. 2005. *Freshwater Microbiology - Biodiversity and dynamic interactions of Microorganisms in the aquatic environments.* Wiley, Chichester (UK). 524p.
423. Sikkema J., De Bonte J.A.M., Poolman B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews.* 59:201-222.
424. Simon L., Bousquet J., Levesque R.C., Lalonde M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature.* 363: 67-69.
425. Singer M.E. et Finnerty W.R. 1884. *Microbial metabolism of straight-chain and branched alkanes.* New York: Macmillan Publisher.
426. Singh H. 2006. *Mycoremediation: Fungal Bioremediation,* John Wiley & Sons, 11-17-608 pages
427. Singleton D.R., Sangaiah R., Gold A., Ball L.M., Aitken M.D. 2006. Identification and quantification of uncultivated Proteobacteria associated with pyrene degradation in a bioreactor treating PAH-contaminated soil. *Environ Microbiol* 8: 1736-1745.

- 428.Singleton, P. 2008.** Bactériologie: pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. Edition Dunod. p 414.
- 429.Smith S.E., Read D.J. 1997.** Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, Cambridge.
- 430.Smith K.E.C., Thomas G.O., Jones K.C. 2001.** Seasonal and species differences in the air-pasture transfer of PAHs. *Environ.Sci.Technol.* 35, 2156-2165.
- 431.So C. M., and Young L. Y. 2001.** Anaerobic biodegradation of alkanes by enriched consortia under four different reducing conditions. *Environ. Toxicol. Chem.* 20:473-478.
- 432.So C., Phelps C., et Young L. 2003.** Anaerobic transformation of alkanes to fatty acids by a sulfate-reducing bacterium, strain Hxd3. *Appl Environ.* 69(7), 3892-3900.
- 433.Solano-Serena F., Marchal R. et Vandecasteele J.P. 2001.** Biodégradabilité de l'essence dans l'environnement : de l'évaluation globale au cas des hydrocarbures récalcitrants *Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP*, Vol. 56 (5): 479-498.
- 434.Soltani M., 2004.** Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. P 23. Thèse de Doctorat en Chimie analytique. Université Pierre et Marie Curie.
- 435. Spencer P.S., Kim M.I. 2002.** Aromatic as well as aliphatic hydrocarbon solvent axonopathy. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 205 :131-136.
- 436.Stauffert M., Huang L., Vitte I., Jezequel R., Cravo-Laureau C., Stora G., Pecheyran C., Cagnon C., Gilbert F., Goni Urriza M.S., Merlin F.X., Amouroux D., Cuny P., Duran R.2011.** Hydrocarbon degradation in coastal muddy areas and anoxic ecosystems (DHYVA project): Role of bacterial mechanisms and bioturbation effects on the bioavailability of organic pollutants.
- 437.Stolz A. 2009.** Molecular characteristics of xenobiotic-degrading sphingomonads. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 81(5):793-811.
- 438.Straube W.L., Nestler C.C., Hansen L.D., Ringleberg D., Pritchard P.H. et Jones-Meehan J. 2003.** Remediation of polycyclic hydrocarbons (PAHs) through Landfarming with Biostimulation and Bioaugmentation, *Acta Biotechnol.*, 23, (2-3), 179-196.
- 439.Suberkropp K. et Weyers H. 1996.** Application of fungal and bacterial production methodologies to decomposing leaves in streams. *Appl. Environ. Microbiol.* vol.62, n°5, 1610-1615.
- 440.Suenaga H., Mitsuoka M., Ura Y., Watanabe T. et Furukawa K. 2001.** Directed evolution of Biphenyl dioxygenase: Emergence of enhanced degradation capacity for benzene, toluene and alkylbenzenes. *Journal of Bacteriology*, 183(18):5441-5444.
- 441.Suflita J.M., Davidova I.A., Gieg L.M., Duncan K.E. 2007.** Anaerobic phenanthrene mineralization by a carboxylating sulfate-reducing bacterial enrichment. *ISME J.* 1: 436-442.
- 442.Sugai S. F., Lindstrom J. E. et al. 1997.** Environmental influences on the microbial degradation of Exxon Valdez oil on the shorelines of Prince William Sound, Alaska. *Environ Sci Technol* 31(5): 1564-1572.
- 443.Sunita J. Varjani1 and Vivek N. Upasani. 2013.** Comparative Studies on Bacterial Consortia for Hydrocarbon Degradation. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology.* Vol. 2, Issue 10.
- 444.Sutherland J.B., Fu P.P., Yang S.K., Von Tungeln L.S., Casillas R.P., Crow S.A., Cerniglia C.E.1993.** *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.59, 2145-2149 : Enantiomeric composition of the trans-dihydrodiols produced from phenanthrene by fungi.
- 445.Sutherland J.B., Raffi F., Khan A. A. et Cerniglia C.E. 1995.** Mechanisms of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation. In *Microbial Transformation and degradation of toxic organic chemicals.* Edited by Young, L.L and C.E. Cerniglia. Wiley-Liss. New York.

- 446. Sutherland JB. 2004.** Degradation of hydrocarbons by yeasts and filamentous fungi. In: *Fungi Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications*. Arora, D.K (ed.). Marcel Dekker Inc., USA. 324.
- 447. Syakti A.D. 2004.** Biotransformation des hydrocarbures pétroliers et effets sur les acides gras phospholipides de bactéries hydrocarbonoclastes marines. Thèse de doctorat, Université de Droit, d'Economie et des Sciences (Aix Marseille III), Marseilles, France.

**T**.....

- 448. Tabuc C. 2007.** Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de l'Institut National de Polytechnique de Toulouse et de l'Université de Bucarest.
- 449. Tarayre C. 2012.** Bioremédiation de sols pollués aux hydrocarbures. Editions Universitaires Européennes. 116p.
- 450. Tarantini A., 2009.** Modulation de la génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en mélanges. Thèse de Doctorat. Ecole doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement (ED-ISCE).
- 451. Tausson T.A. 1939.** Oxidation of paraffin by yeasts and yeast-like organisms. *Mikrobiologiia*, 8,828-33.
- 452. Techer D. 2011.** Réhabilitation de sols pollués par des HAP grâce aux bactéries associées à la rhizosphère de *Miscanthus x giganteus*. Université Paul Verlaine de Metz. 307p.
- 453. Teramoto Maki, Masahito Suzuki, Fumiyoshi Okazaki, Ariani Hatmanti, and Shigeaki Harayama. 2009.** *Oceanobacter*-related Bacteria Are Important for the Degradation of Petroleum Aliphatic Hydrocarbons in the Tropical Marine Environment. *Microbiology (Reading, England)* 155 (Pt 10): 3362–3370.
- 454. Terekhova V.A. 2007.** Micromycetes in ecological evaluation of aquatic and terrestrial ecosystems. M.: Nauka, 215 p.
- 455. Tierney M., and Young L. Y. 2010.** Anaerobic Degradation of Aromatic Hydrocarbons. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, edited by Kenneth N. Timmis, 925–934. Springer Berlin Heidelberg.
- 456. Thiele-Bruhn S. Brummer G. W. 2004.** Fractionated extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from polluted soils: estimation of PAH fraction degradable through bioremediation. *Eur. J. Soil Sci.*, 55, 567-578.
- 457. Thingstad T.F. 2002.** Control of bacterial growth in idealized food webs. In *Microbial ecology of the oceans*, ed. Kirchman, DL. Wiley Liss, New York, 543p.
- 458. Tissot B.P., Welt D. H. 1984.** **Petroleum formation and occurrence.** *Berlin, Heidelberg, New York.*
- 459. Troussellier M., Schäfer H., Batailler N., Bernard L., Courties C., Lebaron P., Muyzer G., Servais P., Vives-Rego J. 2002.** Bacterial activity and genetic richness along an estuarine gradient (Rhône river plume, France). *Aquat. Microb. Ecol.* 28:13-24.
- 460. Tuhackova J., Cajthaml T., Novac K., Novotny C., Mertelik J., Sasek V. 2001.** Hydrocarbon deposition and soil microflora as affected by highway traffic. *Environ Poll.* 113, 255-262.

461.

**U**.....

- 462. United States Environmental Protection Agency (US-EPA) (1985).** Evaluation and estimation of potential carcinogenic risks of polynuclear aromatic hydrocarbons: carcinogen assessment group. Office and Health and Environmental Assessment.
- 463. Uthe J.F. 1991.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment. *Can. Chem. News* 43(7):25–27.

**V** .....

- 464. van Beilen J.B., Penninga D., Witholt B. 1992.** Topology of the membrane-bound alkane hydroxylase of *Pseudomonas olveovorans*. *J. Biol. Chem.* 267: 9194-9201.
- 465. van Beilen J.B., Li Z., Duetz W.A., Smits T.H.M. and Witholt B. 2003.** Diversity of Alkane Hydroxylase Systems in the Environment. *Oil & Gas Science and Technology—Rev. IFP*, 58(4):427-440.
- 466. van Beilen J.B., Funhoff E.G. 2005.** Expanding the alkane oxygenase toolbox: new enzymes and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16 : 308-314.
- 467. Vandecasteele, J. P. 2005a.** Biodegradation des hydrocarbures aliphatiques et alicycliques. In *Microbiologie Pétrolière*, pp. 173-239. Edited by E. Technip. Paris.
- 468. Vandecasteele J.P. 2005b.** Les hydrocarbures naturels dans l'environnement. In *Microbiologie pétrolière*. Technip (ed). Paris : IFP publications, pp.44-73.
- 469. Vandecasteele J. P. 2008.** *Petroleum Microbiology*, Editions TECHNIP, Paris, 816 p
- 470. Van der Meer J.R., W.M. de Vos, S. Harayama et A.J. Zehnder. 1992.** Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol Rev.* 56(4): 677-694.
- 471. Van Hamme J.D., Singh A., Ward O. 2003.** Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67:503-549.
- 472. Vanishree M., Thatheyus A.J. and Ramya D. 2014.** Biodegradation of Petrol Using the Fungus *Penicillium* sp. *Science International 2* (1): 26-31.
- 473. Venosa A.D., Zhu X. 2003.** Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands. *Spill. Sci. Technol. Bull.* 8, 163–178.
- 474. Vidali M. 2001.** Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.*, 73: 1163–1172.
- 475. Vilà M., Simó R., Kiene R.P., Pinhassi J., Gonzalez J.A., Moran M.A., Pedrós-Alió C. 2004.** Use of microautoradiography combined with fluorescence in situ hybridization to determine dimethylsulfoniopropionate incorporation by marine bacterioplankton taxa. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4648-4657.
- 476. Villemain D., Guiraud P., Bordjiba O., Steiman R. 2006.** Biotransformation of anthracene and fluoranthene by *Absidia fusca* Linnemann. *Electronic Journal of Biotechnology I*, Vol. 9 No. 2.
- 477. Vogel T.M., 2001.** Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Current Opinion in Biotechnology*.
- 478. Vogel T. et Ballerini D. 2001.** Biorestauration des sols et des aquifères contaminés par des hydrocarbures et des composés halogénés. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, 16(3) :204-209.

**W** .....

- 479. Wackett L.P. and Hershberger L.C.D. 2001.** *Biocatalysis and Biodegradation: Microbial Transformation of Organic Compounds*. ASM Press, Washington
- 480. Walter U., Beyer M., Klein J., Rehm H.J. 1991.** Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp Uw1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 671-676.
- 481. Walworth J. L., Woolard C. R., Harris K.C. 2003.** Nutrient amendments for contaminated peri-glacial soils: Use of cod bone meal as a controlled release nutrient source, *Cold Regions Science and Technology*, 37 (2) , 81–88.
- 482. Wang W., Wang L., Shao Z. 2010.** Diversity and abundance of oil-degrading bacteria and alkane hydroxylase (alkB) genes in the subtropical seawater of Wiamen Island. *Microbiol. Ecol.* 60:429-439.
- 483. Wassenberg M.W., Kluytmans J.A., Box A.T., Bosboom R.W., Buiting A.G., van Elzakker E.P., Melchers W.J., van Rijen M.M., Thijsen S.F., Troelstra A., Vandenbroucke-Grauls C.M., Visser C.E., Voss A., Wolffs P.F., Wulf M.W., van**



- Zwet A.A., de Wit G.A., Bonten M.J. 2010. Rapid screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using PCR and chromogenic agar: a prospective study to evaluate costs and effects. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 16, 1754-1761.
484. Watanabe T. 2002. Pictorial atlas of soil and seed fungi -morphologies of cultured fungi and key to species. 2<sup>nd</sup> ed. Boca Raton: CRC Press.
485. Waterbury J.B., Watson S.W., Guillard R.R.L., Brand L.E. 1979. Widespread occurrence of a unicellular, marine planktonic, cyanobacterium. *Nature* 77:293-294.
486. Watnick, P, Kotler, R. 2000. Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* 182:2675–2679.
487. Wauthy, B., Desrosières, R., Le Bourhis, J. 1967. Importance présumée de l'ultraplancton dans les eaux tropicales oligotrophes du Pacifique Central Sud. *Cahier O.R.S.T.O.M Série Océanographique* 5:109-116.
488. Watkinson R.J., Morgan P. 1990. Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Biodegradation*. 1:79-92.
489. Wauquier J.P. 1994. Le raffinage du pétrole : Pétrole brut, produits pétroliers, schémas de fabrication. Publication de l'Institut Français du Pétrole. Edition OPHRYSS, 478 P.
490. Webster, J. 1977. Seasonal observations on aquatic hyphomycetes on oak leaves on the ground. *Transactions of the British Mycological Society* 68: 108-111.
491. Webster, J. et Davey, R.A. 1984. Sigmoid conidial shape in aquatic fungi. *Transactions of British Mycological Society* 83: 43-52.
492. Weissenfels W.D., Beyer M., Klein J., 1990. Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthene by pure bacterial cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol.32, 479-484.
493. Wesenberg, D., Kyriakides, I. et Agathos, S. N. 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances* 22(1-2): 161-187.
494. White D.C., Sutton S.D., Ringelberg D.B. 1996. The genus *Shingomonas*: physiology and ecology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7, 301-306.
495. Whyte, L.G., Geer, C.W. and Innis, W.E., 1996. Assessment of biodegradation potential of psychrotrophic microorganisms. *Can. J. Microbiol.*, 42: 99-106.
496. Whyte L. G., Hawari J., Zhou E., Bourbonnière L., Inniss W. E., Greer C. W. 1998. Biodegradation of Variable -Chain-Length Alkanes at Low Temperatures by a Psychrotrophic *Rhodococcus sp.* *Applied and Environmental Microbiology*, 64(7): 2578–2584.
497. Widdel F. and Grundmann O. 2010. Biochemistry of the anerobic degradation of nonmetal alkanes. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Timmis, K.N. (ed.). Berlin, Germany: Springer-Verlag: pp. 910-924.
498. Widdel F. et Musat F. 2010. Energetic and Other Quantitative Aspects of Microbial Hydrocarbon Utilization. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Timmis, K. (ed): Springer Berlin Heidelberg, pp. 729-763.
499. Widdel F. et Rabus R. 2001. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr Opin Biotechnol* 12: 259–276.
500. Wilcke W. 2000. Polycyclic Hydrocarbons (PAHs) in soil- a Review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163:p.229-248.
501. Wild S. R., Obbard J. P., Munn C. I., Berrow M. L, Jones K.C. 1991. The long-term persistence of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in an agricultural soil amended with metal-contaminated sewage sludges, *The Science of the Total Environment*, 101 , 235-253.
502. Wilhelm, S. W. et Suttle, C. A. 1999. Viruses and nutrient cycles in the sea. *Bioscience* 9(10):781-788.

- 503. Williams, P.J.I.B. 2002.** Heterotrophic bacteria and the dynamics of dissolved organic material. In *Microbial ecology of the oceans*, ed. Kirchman, DL. Wiley Liss, New York, 543p.
- 504. Woese, C. R. et Fox, G. E. 1977.** Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74(11): 5088-5099.
- 505. Wong J. W. C., Lai K. M., Wan C.K., Ma K.K., Fang M. 2002.** Isolation and optimization of PAH-degradative bacteria from contaminated soil for PAHs bioremediation. *Water, Air and soil Pollution*, 139: 1-13.
- 506. Wongsu P., Tanaka M., Ueno A., Hasanuzzaman M., Yumoto I. and Okuyama H. 2004.** Isolation and Characterization of Novel Strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* Possessing High Efficiency to Degrade Gasoline, Kerosene, Diesel Oil, and Lubricating Oil. *Current Microbiology*, 49, 415- 422

**Y**.....

- 507. Yamada-Onodera, K., Mukumoto, H., Katsuyama, Y. and Tani, Y., 2002.** Degradation of long-chain alkanes by a polyethylene-degrading fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. *Enzyme and Microbial Technology* 30, 828-831.
- 508. Yakimov M.M., Golyshin P.N. et al. 1998.** *Alcanivorax borkumensis* gen.nov., sp.nov., a new hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *International Journal of Systematic bacteriology* 48(2): 339-349.
- 509. Yakimov M.M., Giuliano L., Gentile G., Crisafi E., Chernikova T.N., Abraham W.R. et al. 2003.** *Oleispira antarctica* gen. nov., sp. nov., a novel hydrocarbonoclastic marine bacterium isolated from Antarctic coastal sea water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 779-785.
- 510. Yakimov M.M., Giuliano L. et Denaro R. 2004.** *Thalassolituus oleivorans* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 141-148.
- 511. Yakimov M.M., Denaro R., Genovese M., Cappello S., D'Auria G., Chernikova T.N., Timmis K.N., Golyshin P.N., Giuliano L. 2005.** Natural microbial diversity in superficial sediments of Milazzo Harbor (Sicily) and community successions during microcosm enrichment with various hydrocarbons. *Environmental Microbiology* 7, 1426-1441
- 512. Yakimov M. M., Timmis K. N., and Golyshin P. N. 2007.** Obligate oil-degrading marine bacteria. *Curr. Opinion in Biotechnol.*, Vol. 18 (3), pp. 257-266.
- 513. Yang S-Z, Jin H-J, Wei Z, He R-X, Ji Y-J, Li X-M, Yu S-P .2009.** Bioremediation of Oil Spills in Cold Environments: A Review. *Pedosphere* 19:371-381
- 514. Yuan S.Y., Wei S.H and Chang B.V. 2000.** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture. *Chemosphere* 41(9): 1463 – 1468.

**Z**.....

- 515. Zarilla, K.L. and Perry, J.J., 1984.** *Thermoleophilum album* gen. nov and sp. nov, a bacterium obligate for thermophily and *n*-alkane substrates. *Archives of Microbiology* 137, 286-290.
- 516. Zedelius J., Rabus R., Grundmann O., Werner I., Brodkorb D., Schreiber F. et al. 2011.** Alkane degradation under anoxic conditions by a nitrate-reducing bacterium with possible involvement of the electron acceptor in substrate activation. *Environmental Microbiology Reports* 3: 125-135.
- 517. Zeng G., Chen M., Zeng Z. 2013.** Shale gas: surface water also at risk. *Nature* 499, 154.
- 518. Zengler K, Richnow HH, Rossello-Mora R, Michaelis W, Widdel F. 1999.** Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms: *Natr.* (401):266-269.

519. Zhang C. and Bennett G.N. 2005. Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria, *Appl Microbiol Biotechnol*, 67, 600-618.
520. Zhang X. X., Cheng S. P., Zhu C. J. and Sun S. L. 2006. Microbial PAH-degradation in soil: degradation pathways and contributing factors. *Pedosphere* 16(5): 555-565.
521. Zhang Z., Lei X., Zhan Z., Yang Y., Sugiura N. 2009. Nitrate removal by *Thiobacillus denitrificans* immobilized on poly(vinyl alcohol) carriers. *Journal of Hazardous Materials*. 163:1090-1095.
522. Zheng L., Keller S.F., Lyerly D.M., Carman R.J., Genheimer C.W., Gleaves C.A., Kohlhepp S.J., Young S., Perez S., Ye K. 2004. Multicenter evaluation of a new screening test that detects *Clostridium difficile* in fecal specimens. *Journal of clinical microbiology*. 42, 3837-3840.
523. Zhou J., Xia B., Huang H., Palumbo A. and Tiedge J. 2004. Microbial diversity and heterogeneity in sandy subsurface soils. *Applied and Environmental Microbiology*; 70(3): 1723-1734.
524. Zobell, C.E., 1946. Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriol. Rev.* 10, 1-49.