

UNIVERSITE SAAD DAHLAB BLIDA
Faculté de Technologie
Département de Chimie Industrielle



MEMOIRE DE MASTER

Option : procédés de traitement des effluents et protection de l'environnement

**Biodégradation d'un hydrocarbure aromatique
polycyclique «pyrène» par des souches
thermophiles isolées à partir d'un sol
contaminé par le pétrole**

Par

SELMANI Roumaïssa

Encadré par :
BADIS.A : promoteur.
MESBAIAH.F.Z :co-promotrice.

Décembre 2013

Résumé

La pollution de l'environnement par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) représente un défi majeur auquel doivent inéluctablement faire face les scientifiques et les gestionnaires de l'environnement. Ces composés sont des polluants persistants dans l'environnement, associés à un caractère toxique et cancérigène voire tératogènes. L'objectif de ce travail est d'évaluer l'efficacité d'élimination du pyrène par voie biologique en utilisant des souches thermophiles isolées localement.

Les résultats obtenus révèlent que : **a)** Les deux souches performantes ont montré une capacité de croissance élevée sur le pyrène (25 mg/l), **b)** L'ajout du tween 80 augmente le taux de biodégradation du pyrène par les deux souches, **c)** Les deux souches tolèrent une large gamme du pH [5,5- 8,5] et de salinité [0-6%] ce qui permet leur utilisation dans les milieux extrêmes.

Mots clés: HAP, Pyrène, Biodégradation, Souches bactériennes, Thermophiles

Abstract

The environmental pollution by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) is a major challenge that must inevitably face scientists and environmental managers. These compounds are persistent environmental pollutants associated with a toxic or teratogenic and carcinogenic. The objective of this study was to evaluate the removal efficiency of pyrene biologically using thermophilic strains isolated locally.

The results show that: a) The two powerful strains showed a high capacity for growth on pyrene, b) The addition of Tween 80 increases the rate of biodegradation of pyrene by the two strains, c) Both strains tolerate wide range of pH and salinity which allows their use in extreme environments.

Keywords: PAH, pyrene, Biodegradation, Bacterial Strains.

المخلص

يعتبر التلوث بالهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات من اهم التحديات التي يواجهها الباحثون والمتخصصون في مجال البيئة ، هذه المركبات هي ملوثات مستقرة، صعبة التحلل، سامة و مسببة للسرطان .

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم قدرة سلالات بكتيرية معزولة محليا على التفكيك البيولوجي للبيرين .

اظهرت النتائج قدرة السلالتين المستعملتين على استخدام البيرين كمصدر للكربون والطاقة، مما ان اضافة مفاعل سطحي يزيد من مستوى التفكيك، ضف الى ذلك تحمل السلالتين للتغيرات في درجة الحموضة والملوحة مما يسهل استخدامهما في مختلف الظروف.

كلمات البحث: الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات -البيرين- التحلل البيولوجي- سلالات بكتيرية.

DEDICACES

*Mes premier dédicaces revient à mes chers parents pour leur
patience et soutien, Que le bon dieu me les garde.*

*A l'homme qui ma vraiment encouragé pour terminé mon chemin.
Merci infiniment Mohamed pour ton soutien*

*A mes chères sœurs Amina, Fouzia, Nassima, Hadjer, khadidja et
Nesrine, A mon frère Rabah.*

*A tous mes neveux « Abd Elrahim, Ibrahim, Mourad, Chakib, Abd
Elmodjib, Yasser, Youcef, Adem, Abd Elrezak et Ilyes » et mes
nièces « Samah, Hayam et Ritadje »*

*A mes chère amies Nesrine Mimi et
Ainsi qu'à tous ceux qui me sont chers*

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le bon dieu de m'avoir aidé à réaliser ce mémoire.

Je remercie Monsieur BADIS A, Professeur à USDB de m'avoir orienté et dirigé au cours de mon travail.

Je tiens à remercier Mlle Fatma Zahra MESBAIAH, attachée de recherche pour sa participation dans la direction de ce mémoire ; merci infiniment pour votre aide précieuse, vos conseils, votre gentillesse et votre disponibilité que dieu vous garde à tous ce qui vous aime.

Merci ma sœur

Je remercie l'ensemble du jury pour avoir accepté d'examiner ce travail

Enfin je remercie tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin à la réalisation de ce travail

SOMMAIRE

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Résumé.....	2
Introduction.....	9
CHAPITRE 1 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	11
1.1. Généralités sur les HAP	12
1.2. Le pyrène, modèle des HAP lourds.....	13
1.2.1. Propriétés physico-chimiques et caractéristiques.....	13
1.2.2. Comportement.....	14
1.2.3. Production et utilisation du pyrène	14
1.2.4. Toxicité	15
1.3. Techniques de dépollution	16
1.3.1 Procédés physiques	16
1.3.2 Procédés chimiques.....	16
1.3.3 Procédés thermiques.....	17
1.3.4 Procédés biologiques.....	17
1.4 Facteurs influençant la faisabilité de la technologie pour la biodégradation des hydrocarbures	17
1.5. Biodégradation du pyrène	19
CHAPITRE 2 MATERIEL ET METHODES.....	21
2.1. Origine des souches bactériennes utilisées.....	22
2.2. Isolement des souches bactériennes	22
2.4. Sélection de la souche performante dégradatrice du pyrène	23
2.5. Etude des facteurs influençant la biodégradation.....	24
2.5.1 Effet de la concentration initiale du substrat.....	24
2.5.2. Effet du pH.....	24
2.5.3. Effet de la salinité.....	24
2.5.4. Effet de l'ajout d'un surfactant.....	24
2.5.5. Effet de l'ajout d'une source de carbone.....	25

2.6. Identification des souches bactériennes	25
CHAPITR 3 RESULTATS ET DISCUSSION.....	26
3.1. Sélection de la souche performante.....	27
3.2. Facteurs affectant la biodégradation du pyrène.....	29
3.2.1 Effet de la concentration du substrat	29
3.2.2. Effet du pH.....	31
3.2.3. Effet de la salinité.....	33
3.2.4. Effet de l'ajout d'un tensioactif.....	34
3.2.5. Effet de l'ajout d'une autre source de carbone.....	36
3.3 Caractérisation phénotypique des souches 1C et 1J.....	37
CONCLUSION	40
Références.....	41
Annexes	

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structures des 16 HAP classés comme substances prioritaires par l'US EPA.....	12
Figure 2 : Structure chimique du pyrène.....	13
Figure 3 : La voie aérobie de dégradation bactérienne du Pyrène par <i>Mycobacterium spp</i>	20
Figure 4 : Sols contaminés par le pétrole brut (Hassi-Messaoud).....	22
Figure 5 : Croissance bactérienne sur le pyrène en fonction du temps.....	28
Figure 6 : Effet de la concentration du pyrène sur la croissance de la souche 1J en fonction du temps.....	30
Figure 7: Effet de la variation du pH sur la croissance de la souche 1J sur le pyrène.....	32
Figure 8: Effet de la variation de la salinité sur la croissance bactérienne.....	34
Figure 9: Effet de l'ajout de tensioactif sur la croissance des souches 1C et 1J.....	35
Figure 10 : Effet de l'ajout du naphthalène et de tween 80 sur la croissance bactérienne.....	37
Figure 11 : Observation microscopique des souches 1J(a) et 1C (b) après coloration de Gram.....	38

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques du pyrène.....	14
Tableau 2: Classification cancérigène de l'UE, CIRC, US-EPA.....	15
Tableau 3 : le test biochimique (API 50 CHB/E Medium) pour les souches 1J et 1C.....	39

INTRODUCTION

Depuis l'explosion de l'industrie chimique au début du XXème siècle et l'utilisation de produits de synthèse dans la vie quotidienne, des quantités croissantes de substances chimiques d'origines industrielles, agricoles ou domestiques, n'ont cessé d'être émises dans l'environnement. Cet accroissement est à l'origine de pollutions anthropiques de natures très diverses (physiques, chimiques, microbiologique...) (**Kouzayha, 2011**).

Le phénomène de pollution par les hydrocarbures a une importance de plus en plus grande sur les plans environnemental, sanitaire et économique. Cette pollution peut avoir un impact soit direct ou indirect, sur la santé humaine et l'équilibre des écosystèmes aussi bien marins que continentaux (**Bouderhem, 2011**). Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont considérés comme les plus toxiques. Ils sont issus de la combustion incomplète de la matière organiques, d'origine naturelle (incendie de forêt) et anthropiques (chauffage au gaz, industrie, trafic routier...) (**Chahin, 2010**).

En effet, l'élimination des hydrocarbures reste toujours un sérieux problème, car les voies physiques et chimiques sont très limitées à cause de leurs couts ou leurs impacts secondaires sur l'environnement. La technique de bioremédiation des sites contaminés reste la solution la plus efficace, son principe est la minéralisation complète des hydrocarbures en présence des microorganismes qui ne génère aucun sous produit toxique, alors une meilleure protection de l'environnement est attendue.

Le processus de la biodégradation dépend essentiellement de la nature et de la quantité des hydrocarbures, les propriétés physico-chimiques de site contaminé et la capacité biodégradative des microorganismes (**Eddouaouda, 2012**).

Il est admis que les microorganismes, notamment bactéries, capables de dégrader les hydrocarbures sont beaucoup mieux représentées dans des sites contaminés par des produits pétroliers, du fait de leur adaptation physiologique et génétique à ce type d'environnements. Il existe donc un intérêt scientifique et biotechnologique à rechercher des bactéries adaptées à cet écosystème (**Marchand et al, 1993**). Dans notre étude, un site

anciennement contaminé par le pétrole (sol de Hassi Messaoud) a été choisi pour l'isolement des hydrocarbonoclastes.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à la biodégradation du pyrène par des souches bactériennes thermophiles isolées à partir d'un sol contaminé par le pétrole brut (région Hassi-Messaoud). Nous avons entrepris une étude sur la sélection et l'identification génotypique des souches bactériennes performantes, ainsi que sur les facteurs influençant la biodégradation du pyrène.

Ce mémoire s'articule en 3 chapitres : le premier présente une synthèse bibliographique qui regroupe des généralités sur les HAP. Le second correspond à la méthodologie suivie au cours de la réalisation de ce travail. À la fin, une synthèse des principaux résultats obtenus sont regroupés dans le chapitre 3.

CHAPITRE 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Généralités sur les HAP

La pollution de l'environnement par des composés organiques peu ou insolubles dans l'eau pose de sérieux problèmes. Les HAP sont des composés non polaires, très stables, peu volatils et très hydrophobes (ils sont lipophiles dans la nature et relativement insolubles dans l'eau) (**Boukamouche, 2012**).

Les HAP sont définis comme étant des composés aromatiques hétérocycliques constitués d'atomes de carbones et d'hydrogènes. Ils possèdent des noyaux aromatiques accolés (2 à 10), ils diffèrent par le nombre de noyaux accolés ainsi que par leur agencement. Les HAP montrent une résistance particulière à la dégradation par les bactéries endogènes pour deux raisons : leur faible biodisponibilité et leur toxicité vis-à-vis de nombreuses bactéries (**Troquet *et al*, 2001**).

Les structures de 16 HAP considérés comme polluants prioritaires par l'agence américaine de la protection de l'environnement (EPA) sont présentés dans la figure 1.

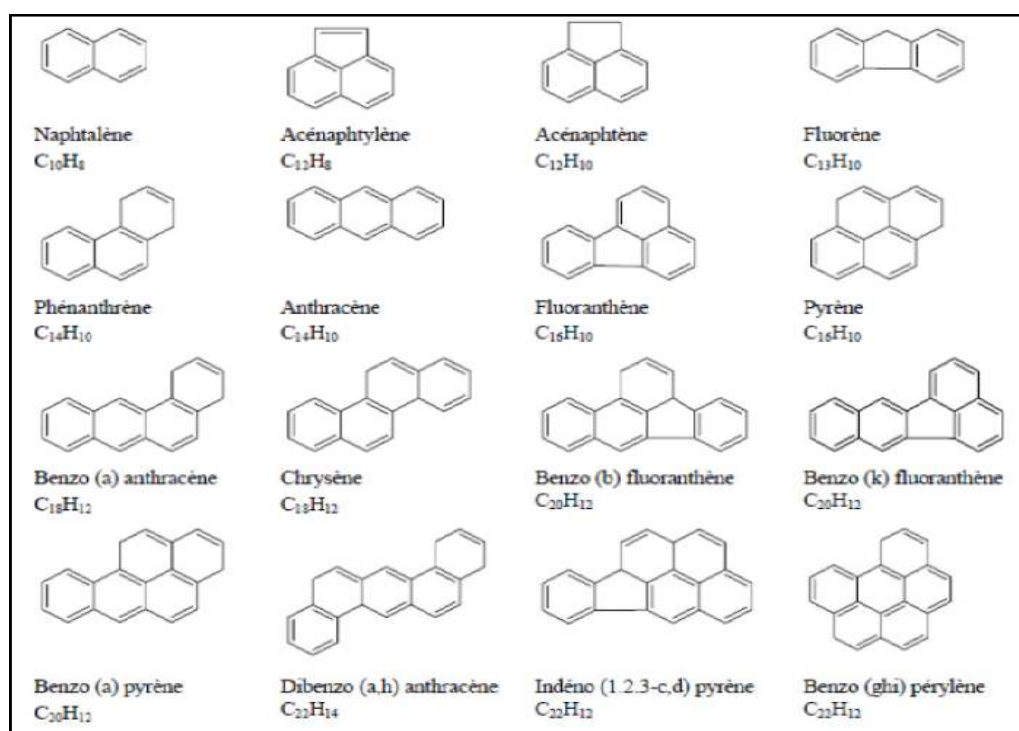


Figure 1 : Structures des 16 HAP classés comme substances prioritaires par l'US EPA.

Les HAP sont classés en deux groupes selon le nombre de cycles benzéniques :

- Les HAP légers «2 à 3 cycles» : anthracène, naphthalène et phénanthrène.
- Les HAP lourds « plus de trois cycles» : pyrène, chrysène, benzo[a]pyrène.

1.2. Le pyrène, modèle des HAP lourds

1.2.1. Propriétés physico-chimiques

Il est composé de quatre cycles benzéniques fusionnés, sa formule brute est $C_{16}H_{10}$ (figure 2). Il se trouve sous forme de plaquettes jaunes pâles (recristallisation dans le toluène) ; tablettes prismatiques monocycliques avec une fluorescence légèrement bleue (recristallisation dans l'éthanol ou par sublimation dans les conditions ambiantes habituelles **(Portet, 2004)**).

Le pyrène est un composé peu volatil, hydrophobe, ubiquitaire. Il est considéré comme un composé très toxique et cancérigène, il est identifié comme substance dangereuse prioritaire. Il est généralement utilisé comme modèle représentatif des HAP lourds **(Kouny, 2002)**. Sa principale source est la combustion incomplète de charbon et de produits pétroliers **(Feidi et al, 2002)**.

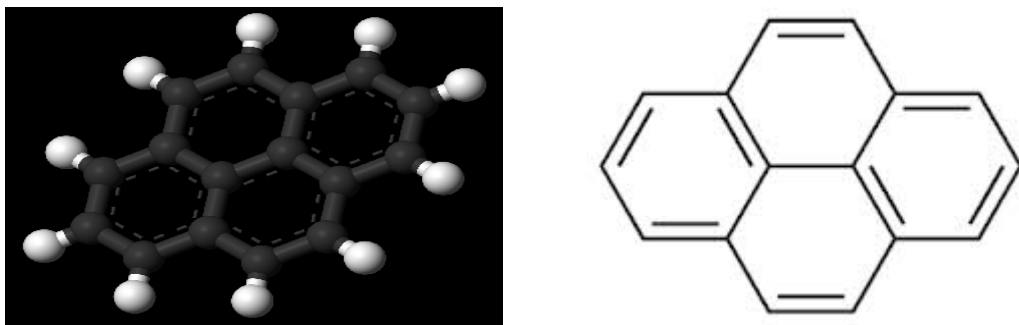


Figure2 : Structure chimique du pyrène

Comme tous les HAP, le pyrène se caractérise par un point de fusion et d'ébullition élevé, une faible solubilité dans l'eau, mais il est soluble dans les solvants organiques comme l'hexane, l'acétone, le dichlorométhane. Le tableau 3 regroupe ses caractéristiques principales.

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques du pyrène (Pe : point d'ébullition ; Pf : point de fusion).

PM g/mole	Pe (°C)	Pf (°C)	Solubilité (eau) à 25°C (mg/l)	P_L^0 à 25°C (Pa)	Volatilité constante de Henry	Log K_{OC}	Hydrophobie log K_{ow}
202,3	151	396	0,077	$4,9 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-4}$	5,29	4,88

1.2.2. Comportement

Dans l'eau : Le pyrène se volatilise à partir de l'eau.

Dans les sols : La mobilité du pyrène est négligeable dans le sol.

Dans l'air : Le pyrène est sous forme vapeur et particulaire dans l'atmosphère (Baert, 2002).

1.2.3. Production et utilisation du pyrène

Le pyrène est un constituant du goudron de houille à 3 %, qui est utilisé pour fabriquer le brai de houille. Ce dernier, rentre dans la fabrication du graphite (lui-même utilisé dans des électrodes en aciérie, dans des moteurs...), des anodes et comme liant dans des revêtements anticorrosion pour conduites, fibres et mousses de carbone, des liants réfractaires, des agents utilisés en fonderie. On note aussi qu'il se trouve dans la créosote à 8,4%, elle provient du goudron de houille et elle est utilisée dans le traitement du bois.

Les huiles couvrent des domaines d'application très variés : pneumatiques, fabrication de créosote, caoutchoucs, bitumes. Elles servent aussi à produire certains HAP isolés, qui sont eux-mêmes utilisés individuellement, comme par exemple le pyrène (teintures, substances utilisées en optique, ...) (INERIS, 2005 et 2010).

1.2.4. Toxicité

La toxicité d'un produit doit être appréciée en tenant compte des caractéristiques intrinsèques du produit, de l'intensité et la durée du contact. Le temps d'exposition nécessaire à l'apparition des effets toxiques permet souvent de les classer en aiguës, subaiguës, et chroniques. La toxicité peut être répartie entre effets sur la santé et altération de la santé (**Feidi et al, 2002**).

Il existe peu de données sur la toxicité du pyrène envers les hommes. Les études mises en œuvre ont été réalisées sur des mélanges et bien qu'induisant des effets cancérigènes, elles n'ont donc pas pu mettre en évidence le caractère toxique du pyrène seul.

L'IARC a classé le pyrène non carcinogène envers les animaux et il a été testé de façon négative ou non concluante dans tous les tests de "GENOTOX de l'USEPA". Les équipes de recherche évaluant la toxicité d'une molécule s'accordent à dire que le pyrène n'est pas un carcinogène humain, mais il est cependant classé comme tératogène. En ce qui concerne sa toxicité chronique envers les hommes ou les animaux, aucune donnée ne sont disponibles à l'heure actuelle. Des expositions orales sub-chroniques ont produit chez les souris des néphropathies, des augmentations de la taille du foie et des changements hématologiques. Aucuns bioessais par voie orale ou inhalation ne sont disponibles pour évaluer le caractère cancérigène de cette molécule. Les autres voies d'exposition (dermique, subcutanée) fournissent en général des résultats négatifs. Des tests effectués sur les animaux donnent une DL₅₀ de 2700 mg.kg⁻¹ chez le rat suite à une ingestion orale et une DL₅₀ de 170 mg.m⁻³ par inhalation (**Gabet, 2004**).

Tableau 2: classification cancérigène de l'UE, CIRC, US-EPA. (**Marchand et al, 1993**) modifié

produit	UE	CIRC / IARC	US-EPA
pyrène	nc	3	D

IARC: International Agency for Research on Cancer

UE : Union Européenne

US-EPA : United States Environmental Protection Agency

nc : non cancérigène

Groupe 3 : l'agent (ou le mélange) ne peut être classé pour sa cancérogénicité pour l'homme.

D : substance non classifiable quant à sa cancérogénicité pour l'homme.

1.3 . Techniques de dépollution

Afin de choisir une méthode de dépollution, il est nécessaire de vérifier plusieurs paramètres :

- Type de polluants et variabilité de leur comportement (volatilité, polarité, absorbance),
- Diversité des conditions locales (nature du sol, de la nappe, accessibilité, disponibilité de surfaces utilisables à proximité, zone urbaine ou non),
- Pollution récente ou ancienne, étendue ou non,
- Les exigences économiques et administratives à prendre en compte **(Boukamouche, 2012)**.

Pour ces raisons, différentes techniques ont été proposées pour éliminer les HAP et remédier les sites contaminés.

1.3.1 Procédés physiques

Les méthodes physiques consistent à transférer et concentrer les polluants, sans les modifier ou les détruire, vers des points de récupération en se servant, pour leur transport, de fluides (eau ou gaz) injectés ou présents dans les sols **(Boukamouche, 2012)**.

1.3.2 Procédés chimiques

En provoquant des réactions chimiques entre le polluant et le réactif ajouté, Les traitements chimiques détruit les polluants ou les transforme en une forme moins nocive pour l'environnement. L'oxydation est la seule méthode applicable aux HAP car la réduction ne se fait que sur des produits halogénés. Ce type de traitement est habituellement appliqué sur site. Les oxydants les plus utilisés sont : l'ozone (O₃) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Elles sont généralement réservées à des produits organiques peu volatils et difficilement biodégradables.

1.3.3 Procédés thermiques

Le traitement thermique consiste à déduire des polluants organiques par deux techniques : la combustion et la désorption thermique. Ces technologies consistent à utiliser les hautes températures pour détruire les polluants en CO₂ et H₂O, plus différents autres résidus de combustion.

1.3.4 Procédés biologiques

Le principe de base des techniques biologiques repose sur l'élimination des polluants organiques et /ou minéraux présents dans des sols, les boues, les sédiments ou les effluents liquides sous l'action de microorganismes (bactéries, levures, moisissures) **(Boukamouche, 2012)**.

Contrairement aux autres procédés, la biodégradation est une solution économiquement et écologiquement intéressante pour la dépollution des sites contaminés par les HAP à cause de l'utilisation des microorganismes au lieu des aditifs chimiques.

1.4 Facteurs influençant la faisabilité de la technologie pour la biodégradation des hydrocarbures

L'efficacité d'une technique de biodégradation, mise en œuvre pour décontaminer un site précis, dépend de nombreux facteurs qui devront être pris en compte lors de la conception de l'opération.

1.4.1. Biodégradabilité du polluant

Les recherches sur la dégradation des HAP ont permis d'isolées de nombreuses espèces de bactéries, de champignons et d'algues capables de dégrader les HAP de faible poids moléculaire (2 à 3 cycles benzéniques). En revanche, les HAP lourds sont généralement récalcitrants à l'attaque microbienne expliquant leur accumulation dans l'environnement **(Kouny, 2002 ; Kumari, 2013)**.

1.4.2. Concentration et répartition du polluant sur le site

Outre la biodégradabilité du polluant, sa concentration et sa répartition sur le site sont également importantes à considérer lors de l'application de la biodécontamination. En effet, à partir d'une certaine concentration les composés organiques, notamment les hydrocarbures peuvent devenir toxiques pour les microorganismes qui sont censés les dégrader (INERIS, 2006).

De plus, en milieu complexe comme les sols, la distribution des hydrocarbures est hétérogène: ils peuvent être sorbés sur les particules organiques, localisés dans des petits pores inaccessibles aux bactéries ce qui limite le transfert de matières des hydrocarbures vers les compartiments aqueux, où il y a lieu les phénomènes de biodégradation (Chibi, 2010). Pour résoudre ce problème, il peut être nécessaire d'augmenter leur biodisponibilité par l'ajout des tensioactifs.

1.4.3. Caractéristiques du milieu à traiter

Outre le stock de C/N/K et la quantité d'oxygène disponible dans le milieu à traiter, d'autres caractéristiques physicochimiques peuvent également avoir une influence sur le rendement de la biodégradation, avec principalement le pH, la température et l'humidité.

La température est un paramètre pouvant influencer la biodégradation des hydrocarbures en modifiant leur état physique, leur composition chimique, l'activité physiologique des microorganismes et par conséquent la vitesse de dégradation, ainsi que la nature et la concentration des espèces microbiennes présentes (Kouny, 2002 ; INERIS, 2006).

Une diminution de la température est généralement accompagnée par une diminution de la vitesse de biodégradation qui peut être expliquée par une décroissance de l'activité enzymatique. Des températures plus élevées ont pour effet d'augmenter la vitesse de biodégradation. Le maximum de l'activité métabolique des microorganismes est généralement observé à une température comprise entre 15 et 45 °C. Au delà de cet intervalle on assiste à une augmentation de la toxicité des hydrocarbures et une diminution de l'activité métabolique (Kouny, 2002 ; INERIS, 2006).

Les sols peuvent avoir des valeurs de pH très variables, allant de 2,5 à 11,0. Des valeurs extrêmes de pH, ce qui est le cas pour quelques types de sols, pourraient avoir une

influence négative sur la capacité des microorganismes à dégrader les hydrocarbures. La croissance des bactéries hétérotrophes et des champignons étant favorisée par un pH proche de la neutralité (**Kouny, 2002**).

Pour l'humidité, la teneur en eau du matériau doit être comprise entre 25 à 85% et son rôle se situe au niveau du transport et des échanges biochimiques. En cas de tendance à la dessiccation, il sera nécessaire de réhumidifier le milieu (**INERIS, 2006**).

1.5. Biodégradation du pyrène

La biodégradation des HAP de plus de 4 cycles est lente ($\log(K_{ow}) = 5,32$; temps de demi-vie ($t_{1/2}$) = 210 jours à 5,2 ans) dans l'environnement. Le principal facteur limitant la biodégradation des HAP est leurs biodisponibilités (**RECORD, 2007**). Elle dépend de : la biodégradabilité dans le sol qui varie selon le Log K_{ow} , la dégradabilité intrinsèque du polluant et la capacité de dégradation des populations de microorganismes.

La plupart des microorganismes identifiées pour leur capacité de dégradation du pyrène sont des actinomycètes des genres *Mycobacterium*, *Rhodococcus* ou *Gordonia*. Des espèces Gram⁻ ont également été identifiées, comme *Pseudomonas fluorescens*, *Sphingomonas paucimobilis* ou *Burkholderia cepacia* (**Tarantini, 2009**).

Peu de données existent sur les bactéries qui sont capables de dégrader les HAP lourds. 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. la figure 3 résume les étapes de dégradation du pyrène par *Mycobacterium spp.*

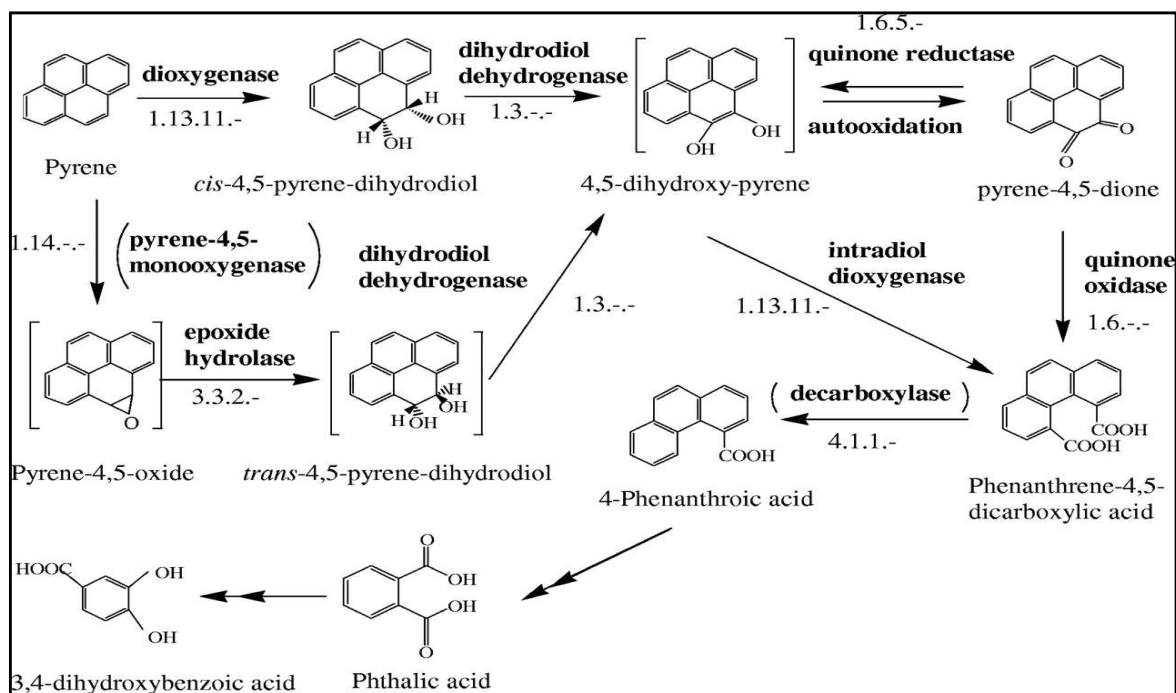


Figure 3 : La voie aérobie de dégradation bactérienne du Pyrène par *Mycobacterium spp.*

La biodégradation du pyrène peut être effectuée par des espèces du *Rhodococcus* qui ont été isolées à partir d'un sol contaminé par le pétrole. La minéralisation du composé a été menée à 72% après deux semaines à un pH neutre (pH=7) et avec une température de 30°C (Walter *et al*, 1999).

En utilisant une souche bactérienne de type *Mycobacterium sp*, Rehmann *et al*, (1998) ont trouvé que le taux de dégradation a atteint 60% au bout de 8 jours. Le milieu de culture contenant le pyrène (0,5mg/ml) a été incubé à 20°C. Les produits de dégradation ont été identifiés comme suit : Cis-4,5-pyrène dihydrodiol, l'acide 4,5-dicarboxylique, le phénanthrène, l'acide 1-hydroxy-2-naphtoïque, le 2-carboxybenzaldéhyde, l'acide phtalique et l'acide protocatéchique ont été identifiés comme produits de dégradation.

Egalement, les champignons peuvent croître sur le pyrène. Ils peuvent être des candidats idéaux pour la bioremédiation efficace des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Des champignons indigènes, isolés du sol d'un ancien site d'usine à gaz, ont été utilisés dans la dégradation du pyrène. Des taux de dégradation étaient de 75 et 67 % respectivement pour des concentrations en pyrène de 50 et 100 mg/l, pendant 28 jours d'incubation à 22°C. La souche utilisée était *Penicillium simplicissimum* (Hallberg *et al*, 2002).

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

2.1. Origine des souches bactériennes utilisées

Le biotope utilisé, pour isoler des souches bactériennes aérobies, est un sol sableux contaminé par les hydrocarbures pétroliers de la région de Hassi-Messaoud (sud d'Algérie). Les prélèvements d'échantillons ont été réalisés à différentes profondeurs. La méthode d'adaptation progressive, en utilisant le pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie, a permis d'isoler des souches à fort potentiel dégradatif des hydrocarbures et leurs dérivés (**Eddouaouda, 2012**). La figure 4 montre le biotope utilisé pour l'isolement des souches bactériennes à fort potentiel de dégradation hydrocarbures et productrices de biosurfactants. Les différentes caractéristiques de ce biotope sont données en annexe I.



Figure 4 : Sols contaminés par le pétrole brut (Hassi-Messaoud)

2.2. Isolement des souches bactériennes

Toutes les étapes de l'isolement ont été réalisées par **Eddouaouda (2012)**. (Voir annexe II).

2.3. Préparation de milieu de culture

Le milieu de culture liquide utilisé est à base de sels minéraux, milieu minimum (MM), sa composition (g/l) est la suivante :

0,1.....Extrait de levure,
 0,4..... NH₄Cl,
 0,3..... K₂HPO₄,
 0,3KH₂PO₄
 10..... NaCl,
 0,33..... MgCl₂, 6H₂O,
 0,05..... CaCl₂, 2H₂O.

Le milieu est additionné par 1 ml d'une solution d'éléments traces métalliques qui contient par litre :

0, 25 g..... H₃BO₄,
 0, 5 g..... CuSO₄, 5H₂O,
 0, 5 g..... MnSO₄, H₂O,
 0, 06 g..... NaMoO₄
 0,7 gZnSO₄, H₂O.

Le pH de la solution est ajusté à 7 puis la solution est autoclavée à 121 °C pendant 20 min.

Source de carbone : le pyrène est utilisé comme source de carbone et d'énergie.

2.4. Sélection de la souche performante dégradatrice du pyrène

Dans le but d'étudier la biodégradabilité du pyrène, cinq (05) souches bactériennes codées comme suit : 7A, 7D, 7G, 1J et NIJ ont été utilisées pour sélectionner la souche la plus performante. Les six souches sont inoculées séparément dans des flacons de 250 ml contenant 50 ml de milieu de culture. Les flacons contenant le milieu de culture sont incubés à 45 °C sous une agitation de 150 tr/min.

Des prélèvements sont effectués pour estimer la croissance bactérienne et quantifier le pyrène résiduel. Deux témoins sont préparés : témoin chimique est préparé de la même façon sans ajouter la souche bactérienne (inoculum) alors que le témoin biologique est préparé en inoculant la bactérie dans le milieu de dégradation mais sans ajouter le pyrène.

2.5. Etude des facteurs influençant la biodégradation

L'efficacité de l'élimination du polluant par voie biologique dépend de plusieurs paramètres : type de microorganismes, quantité du polluant, pH et salinité du milieu, éléments nutritifs (source d'azote), amélioration de la biodisponibilité du polluant (ajout de tensioactif). Dans ce contexte, des principaux paramètres affectant la biodégradation du pyrène ont été déterminés. Les milieux de cultures ont été incubés à 45°C sous une agitation de 150 tr/min.

2.5.1 Effet de la concentration initiale du substrat

Afin d'étudier l'effet de la quantité du polluant sur la capacité biodégradative des souches performantes, différentes concentrations en pyrène ont été testées (10, 25 et 50 mg.l⁻¹). La dégradation a été réalisée dans des flacons de 250 ml contenant 50 ml de milieu de culture. Des prélèvements ont été effectués sous la haute et avec un bec benzène (milieu stérile) afin de quantifier le pyrène résiduel.

2.5.2. Effet du pH

Le milieu de culture a été ajusté à différentes valeurs de pH : 2,5, 4 ; 5,5 ; 7 ; 8,5 ; 10 et 11,5. La concentration initiale du pyrène a été fixée à 50 mg.l⁻¹, un volume de 2 ml (4%, v/v) d'inoculum a été ajouté.

2.5.3. Effet de la salinité

Les sites contaminés connue une grande variété en sel, en effet la concentration de ce dernier influe sur la physiologie du microorganisme en affectant l'efficacité de la biodégradation. Différentes concentrations en sel (NaCl) on été utilisées: 0, 1, 2, 4, 6, 8 et 10 % (p/v). La concentration du pyrène est fixée à 50 mg.l⁻¹.

2.5.4. Effet de l'ajout d'un surfactant

A fin d'évaluer l'effet de l'ajout de surfactant sur le processus de la dégradation, un tensioactif chimique (Tween 80 à 0.02% (p/v)) a été utilisé. La concentration du pyrène est fixée à 50 mg.l⁻¹.

2.5.5. Effet de l'ajout d'une source de carbone

Afin d'augmenter le taux de dégradabilité du pyrène par les souches performantes, deux mélanges ont été préparés:

- Milieu MM contenant le pyrène et le naphthalène
- Milieu MM contenant le pyrène, naphthalène et le Tween

Les concentrations de pyrène et naphthalène étaient de 50 et 100 mg/l respectivement. Le Tween a été ajouté à raison de 0,02% (p/v).

2.6. Identification des souches bactériennes

Une identification préliminaire a été effectuée en utilisant la galerie biochimique **API 50 CH** pour déterminer l'affiliation de trois souches isolées localement. Les principaux tests de différenciation sont : coloration de Gram, mobilité, oxydase et catalase.

Le profil fermentaire est basé sur la dégradation de 49 carbohydrates suivants : glycérol, érytritol, D-arabinose, L-arabinose, ribose, D-xylose, L-xylose, adonitol, β -méthyle-d-xyloside, galactose, glucose, fructose, mannose, sorbose, rhamnose, dulcitol, inositol, mannitol, sorbitol, α -méthyle-D-mannoside, α -méthyle-D-glucoside, n-acetyl-glucosamine, amygladine, arbutine, esculine, salicine, cellobiose, maltose, lactose, melibiose, saccharose, trehalose, inuline, melezitose, raffinose, amidon, glycogène, xylitol, gentiobiose, D-turanose, D-lyxose, D-tagatose, D-fucose, L-fucose, D-arabitol, L-arabitol, gluconate, 2-keto-gluconate, 5-Keto-gluconate.

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

Les souches bactériennes aérobies utilisées dans ce travail ont été isolées à partir de sols contaminés par le pétrole brut de la région de Hassi-Messaoud (sud d'Algérie). Différentes natures de bactéries ont été ciblées [6]: bactéries mésophiles (isolées à 30 °C) et bactéries thermophiles (isolées à 45 et 55 °C).

La dégradation des HAP par microorganismes mésophiles a été largement étudiée. En revanche, peu de travaux ont été réalisés à des températures supérieures à 40 °C. Ceci montre l'importance des souches thermophiles utilisées dans notre cas d'étude.

3.1. Sélection de la souche performante

La biodégradation du pyrène (modèle des HAP lourds) a été rapportée par de nombreuses études, et certains d'eux ont proposé le mécanisme de biodégradation. D'après **Farshid et al, (2012)**, 89,1% du pyrène a été dégradé par *Mycobacterium sp* et 79,4% par *Corynebacterium* après 10 jours d'incubation.

Cinq souches thermophiles (7A, 7D, 7G, 1J, NIJ) ont été choisies pour la sélection de la souche performante. Le pyrène (0,1 g.l⁻¹) représente la seule source de carbone et d'énergie. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 5.

D'après les résultats obtenus, deux souches thermophiles, 1C et 1J ont montré une bonne capacité de croissance sur le pyrène traduit par la mesure de la densité optique à 600 nm. A titre d'exemple, les valeurs de la DO (600 nm) étaient de 0,639 et 0,732 pour les souches 1C et 1J respectivement. A la lumière de ces résultats, ces deux souches performantes (1C et 1J) seront retenues pour la suite de travail.

Notons que la souche 1C a montré un pouvoir biodégradatif très marqué pour les HAP légers de deux cycles (naphtalène) et de trois cycles (anthracène) (**Mesbaiah, 2011 ; Boukamouche, 2012**).

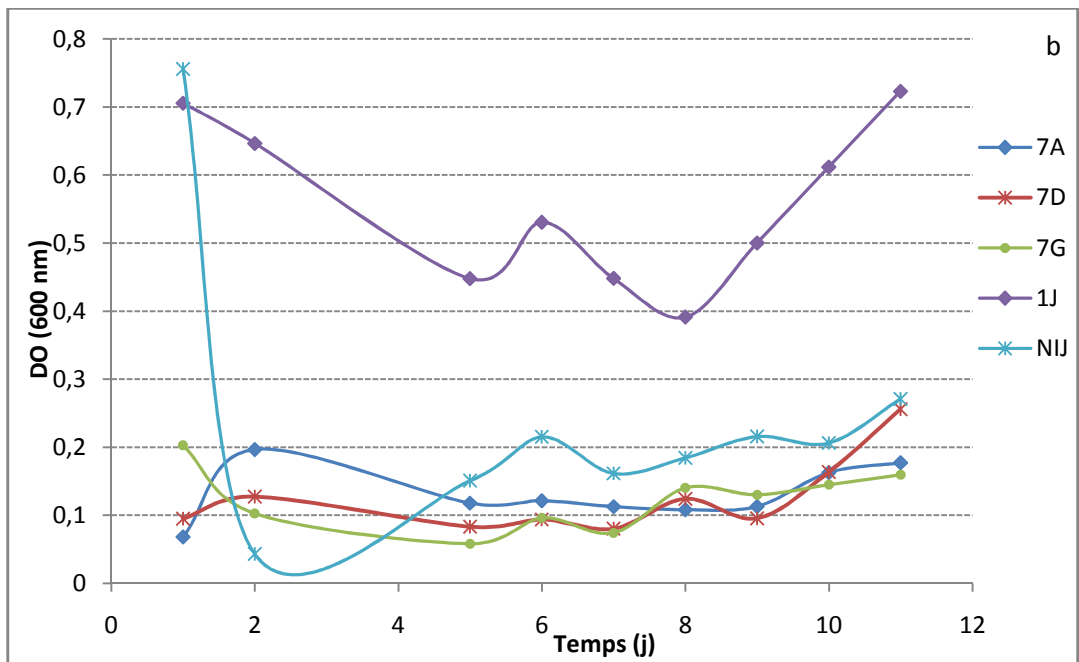
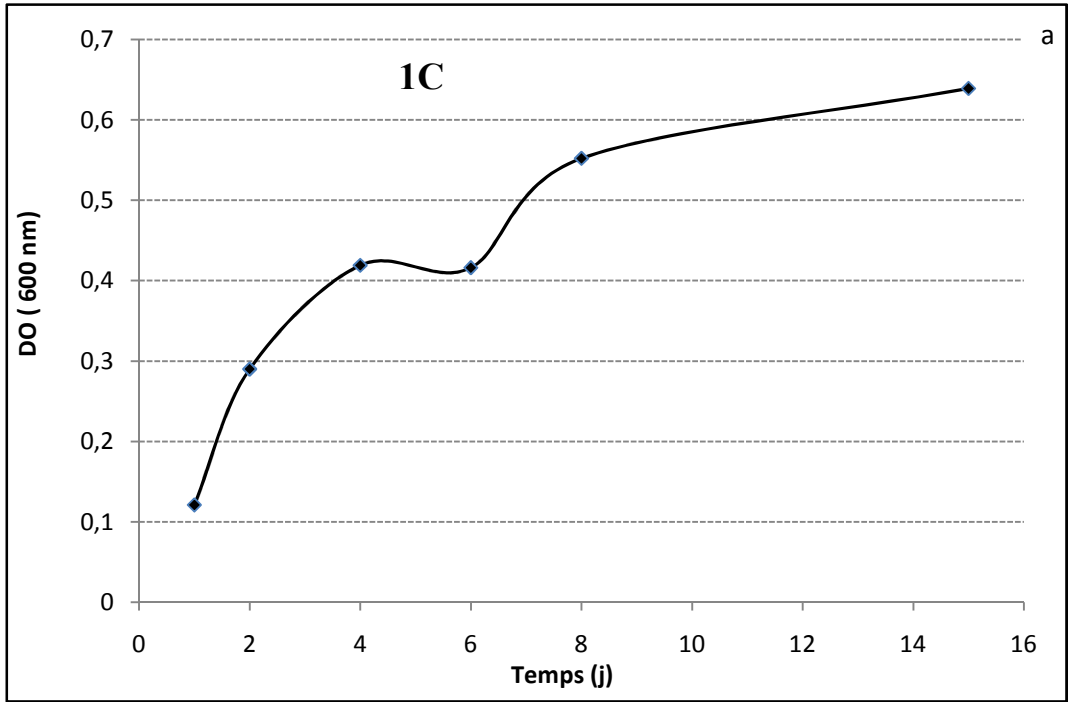


Figure 5 : Croissance bactérienne sur le pyrène en fonction du temps. ([pyrène] = 100 mg/l ; $T_{\text{incubation}} = 45^{\circ}\text{C}$; pH = 7,0 ; Agitation = 150 tr/min)

3.2. Facteurs affectant la biodégradation du pyrène

3.2.1 Effet de la concentration du substrat

Des études rapportent que les concentrations élevées des HAP ont un effet positif sur la croissance bactérienne. Par contre la faible concentration est un facteur limitant pour la croissance bactérienne (**Mesbaiah, 2011**).

Afin d'étudier le comportement des deux souches 1C et 1J en face de la quantité du polluant, différentes concentrations en substrat (10, 25 et 50 mg/l) ont été testées. Les résultats obtenus sont illustrés sur la figure 6.

Les résultats obtenus indiquent qu'il y a une activité microbienne en utilisant le pyrène comme seule source de carbone et d'énergie, cela traduit par l'augmentation de la biomasse pour les trois concentrations. La souche 1C a prouvé une croissance importante au niveaux de 25 mg/l. Cela, justifie sa capacité de croitre sur le pyrène.

Egalement, Les résultats relatifs à la souche 1J indiquent qu'une très bonne croissance bactérienne a été constatée au niveaux de 25 mg/l de pyrène (DO à 600 nm = 1,37). Donc, la souche 1J prouve une capacité de croissance sur le pyrène très marqué. En revanche, les faibles concentrations en pyrène ralentit la croissance microbienne (10 mg/l de pyrène ; DO à 600 nm = 0,7).

Le taux de croissance bactérienne et la biodégradation du pyrène dépendent de la concentration du substrat, les résultats obtenus par **Farshid et al, (2012)**, montrent que la variation de la concentration du pyrène de 0,3 à 0,7 g/l a affecté la croissance bactérienne des cinq souches utilisées, un taux de croissance très important de *Mycobactirum* et *Corynebacterium* est observé lorsque la concentration du pyrène est de 0,5 g/l.

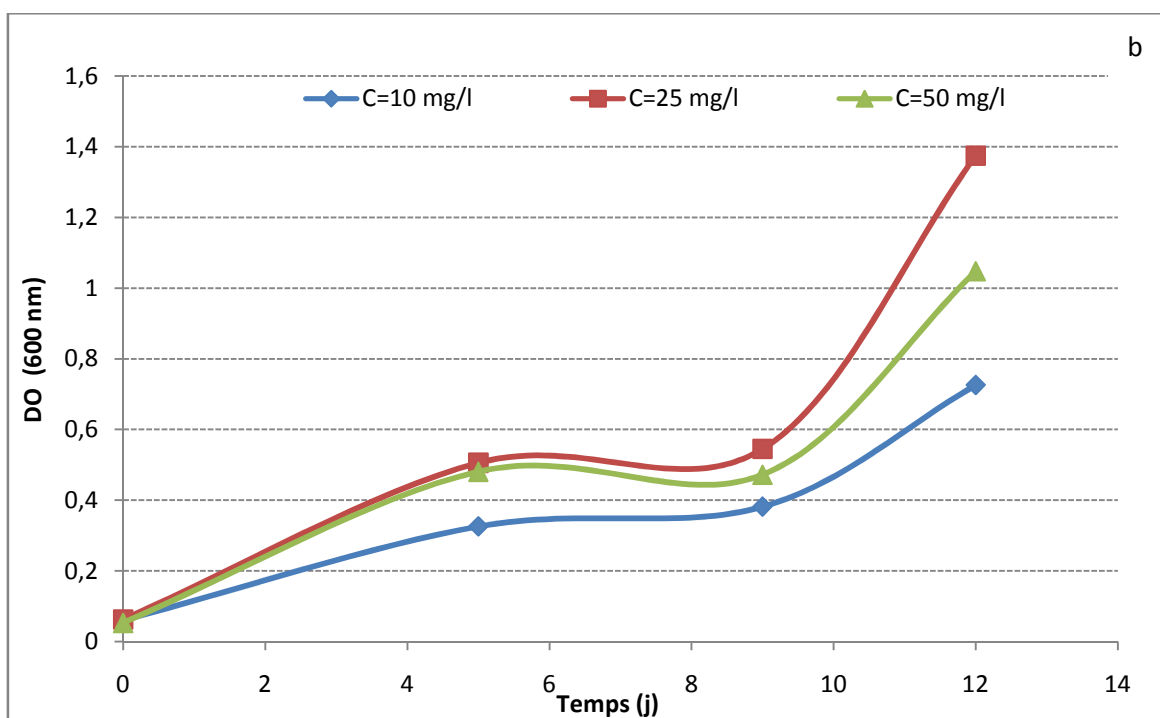
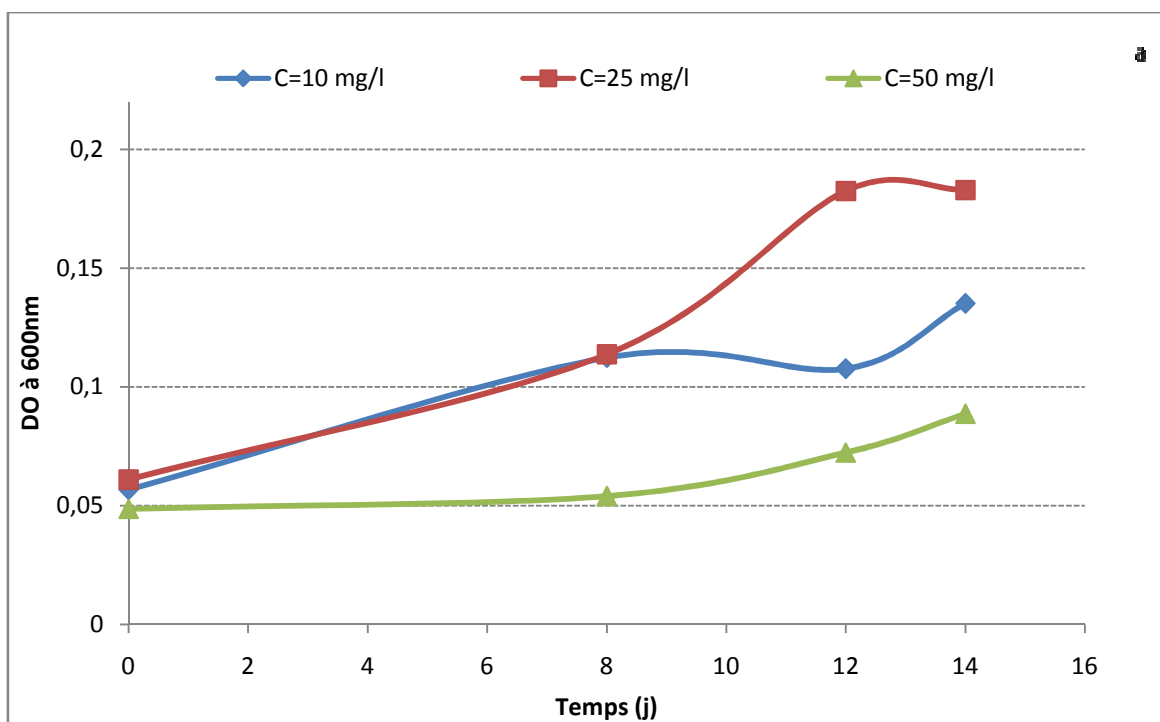


Figure 6 : Effet de la concentration du pyrène sur la croissance de la souche 1J en fonction du temps ($T_{\text{incubation}} = 45^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 7,0$; Agitation = 150 tr/min). a- souche 1C, b- souche 1J.

3.2.2. Effet du pH

Le pH est considéré comme un paramètre important qui affectant la dégradation. Le changement du pH de milieu peut altérer les charges électriques dans les groupements chimiques des enzymes et le processus de transport et la solubilité des nutriments (**Kouny, 2002**). Généralement les écosystèmes aquatiques ont un pH stable aux alentours de 7, en revanche, le sol peut avoir des valeurs de pH allant de 2,5 à 11,0 selon le type de sol et la nature du contaminant, dans ce cas peu de microorganismes peuvent tolérer ces valeurs de pH.

En raison des variations du pH des sites (sols et eaux) et par suite leurs effets sur le comportement des microorganismes, une étude a été réalisée en étudiant l'influence de la variation du pH (2,5 ; 5,5 ; 7 ; 8,5 ; 10 et 11,5) sur la croissance bactérienne des souches 1C et 1J. Les résultats obtenus sont illustrées sur la figure 7.

En effet, à pH acide (2,5), on note en général une croissance très lente de la souche 1C. Egalement, une perturbation assez importante de pH (11,5). On conclut que la souche 1C pouvait croître sur le pyrène dans une large gamme de pH (5,5 à 10). La croissance des bactéries hétérotrophes étant favorisée par un pH proche de la neutralité ou légèrement basique.

Une faible croissance est toujours observée pour un pH acide. D'après le graphe on peut dire que le milieu le plus favorable pour la croissance de la souche 1J est le milieu neutre ou peu alcalin. On peut également justifier la non stabilité de la bactérie par l'hydrolyse des enzymes, car certaines bactéries ne peuvent pas tolérer des valeurs extrêmes du pH et même par l'alternance des charges électriques dans les groupements chimiques des enzymes et le processus de transport et la solubilité des nutriments (**Bidaud, 1998**).

Notons que la souche 1C a dégradé l'anthracène dans une large gamme du pH, la gamme optimale de pH varie de 4 à 7, avec un taux de dégradation d'environ de 90% (**Boukamouche, 2012**). En outre, elle a montré une capacité biodégradative élevée du naphthalène, un taux de dégradation supérieur à 90% a été enregistré lorsque le pH du milieu variant de 6,5 à 8,5 (**Mesbaiah, 2011**).

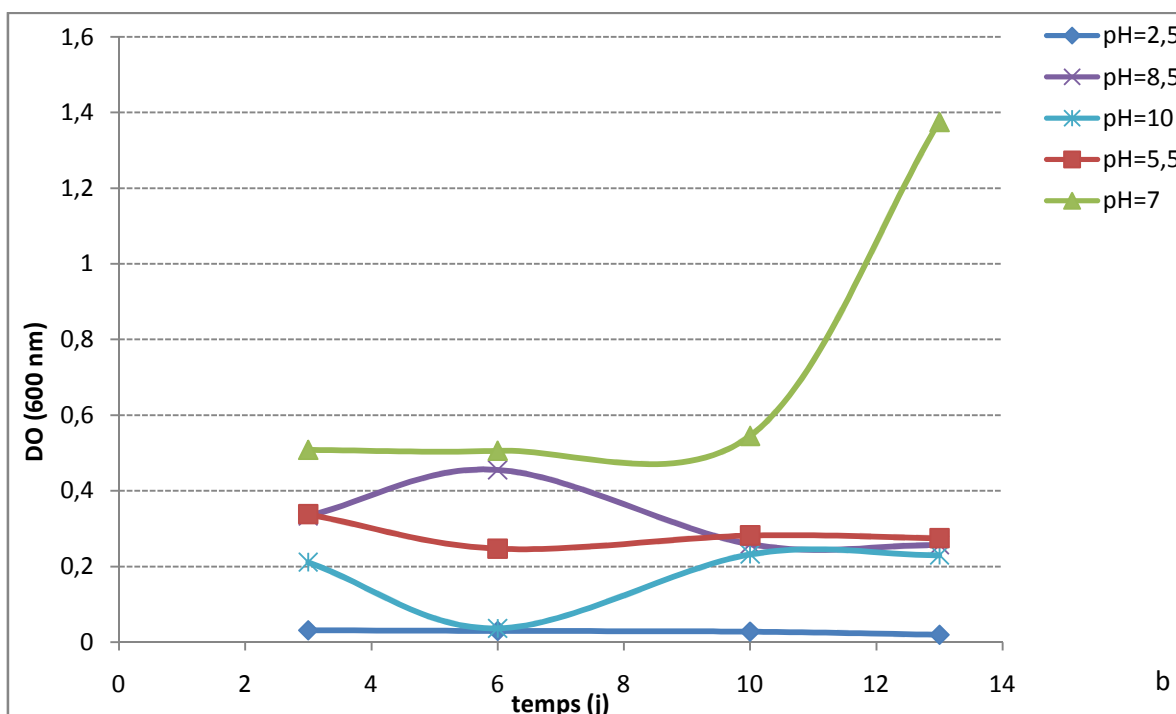
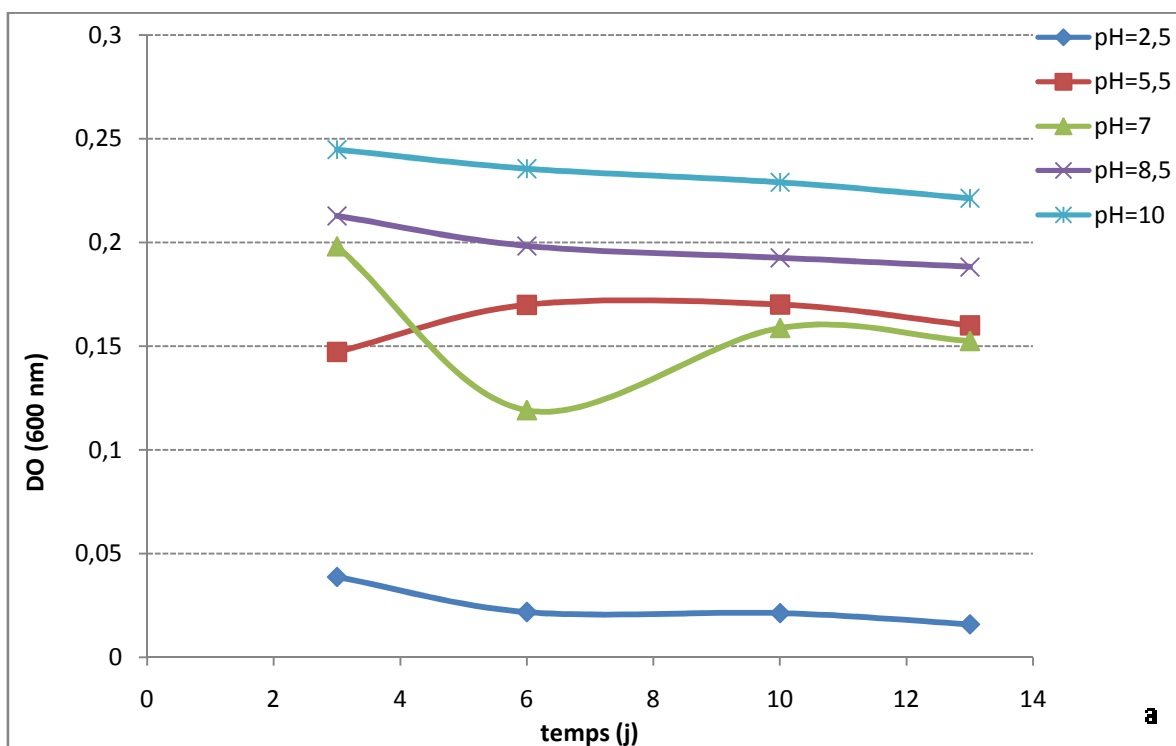
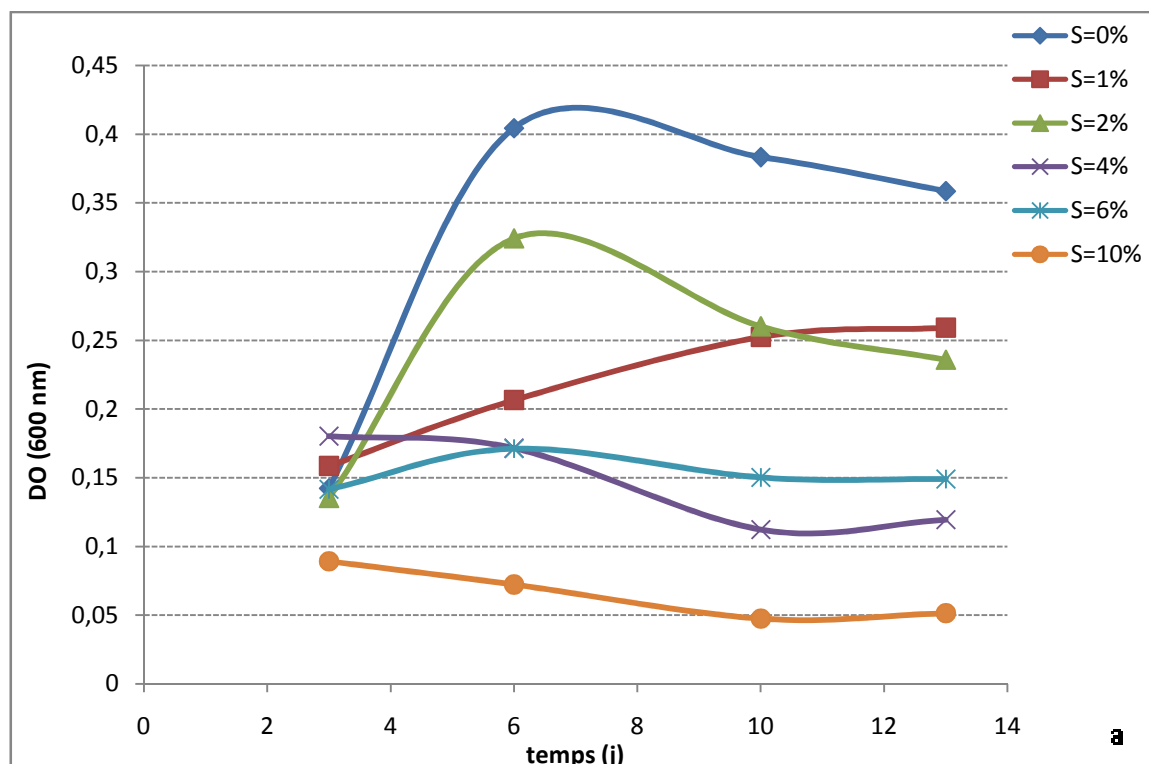


Figure 7: Effet de la variation du pH sur la croissance de la souche 1J sur le pyrène. ([pyrène] = 50 mg/l ; $T_{\text{incubation}} = 45^{\circ}\text{C}$; pH = 7,0 ; Agitation = 150 tr/min). a- souche 1C, b- souche 1J.

3.2.3. Effet de la salinité

La salinité est aussi l'un des paramètres importants influençant le processus de biodégradation des hydrocarbures. Il est intéressant de noter que 5% de NaCl est la limite supérieure de la tolérance des microorganismes des sols et des eaux douces (**Mesbaiah, 2011**). Pour suivre l'effet de la salinité sur la croissance microbienne et probablement sur la dégradation du pyrène, différentes concentrations en NaCl [0 à 10%] ont été testées. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 8.

Excepté les halophiles, l'augmentation de la concentration du sel au delà de 4% est accompagnée d'une diminution significative de la croissance bactérienne influençant sur la dégradation du polluant. Les résultats montrent une faible résistance de la souche 1C à des concentrations en sel très élevées.



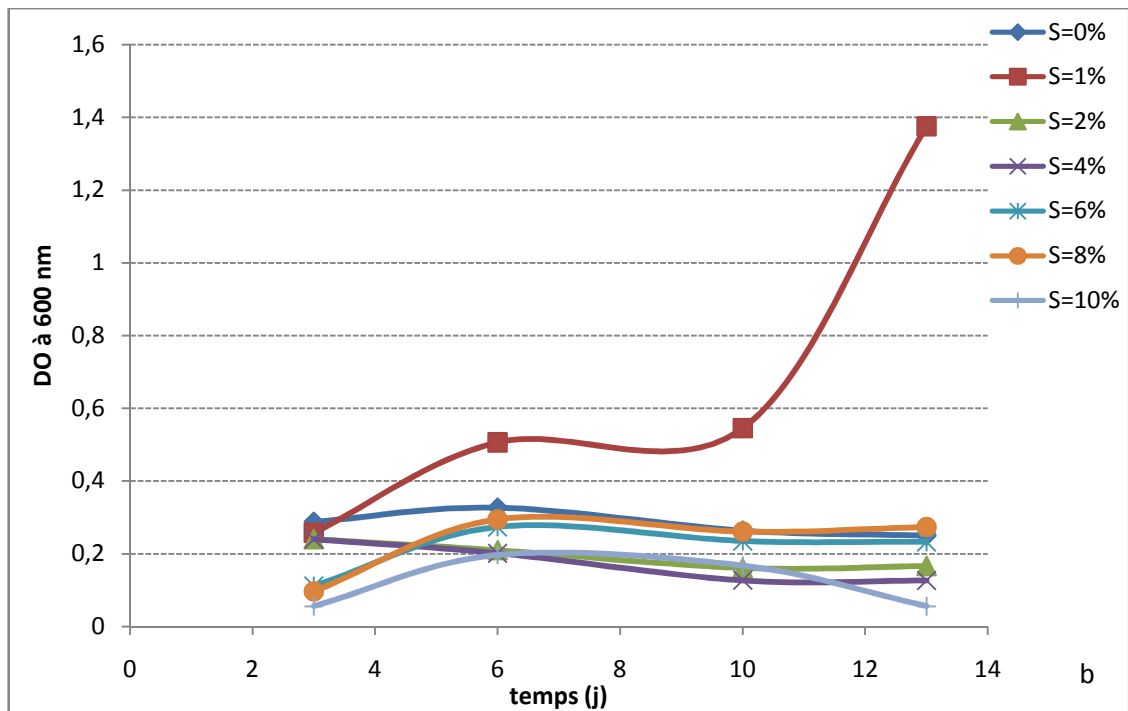


Figure 8: Effet de la variation de la salinité sur la croissance bactérienne. ($[\text{pyrène}] = 50 \text{ mg/l}$; $T_{\text{incubation}} = 45^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 7,0$; Agitation = 150 tr/min). a- souche 1C, b- souche 1J.

3.2.4. Effet de l'ajout d'un tensioactif

Les hydrocarbures sont généralement des composés insolubles ou peu solubles. Par exemple, la solubilité du pyrène dans l'eau est de l'ordre de $0,135 \text{ mg/l}$ à $T = 25^{\circ}\text{C}$. L'utilisation d'un tensioactif dans la biodégradation est très variée. La présence d'un agent amphiphile peut être bénéfique, nuisible ou sans effet sur la biodégradation du contaminant par les microorganismes. Plusieurs bactéries peuvent produire des tensioactifs biologiques afin d'améliorer la biodisponibilité du polluant.

Les tensioactifs chimiques peuvent aussi servir à augmenter le transfert d'hydrocarbures immiscibles vers la phase aqueuse, mais ils ont montré des effets inhibiteurs sur les microorganismes (**lapointe, 1996**).

En étudiant l'effet de la concentration de tensioactif sur la dégradation du pyrène, **Zhang et Zhu (2012)** ont trouvé que l'ajout de Tween 80 améliore la biodégradation du pyrène. Un taux de dégradation maximal a été observé lorsque la concentration du Tween 80 est de $13,1 \text{ mg/l}$ avec une augmentation du taux de dégradation de $22,4\%$ par rapport au contrôle.

Des résultats similaires ont été rapportés par **Chen *et al*, (2013)**, la biodégradation du pyrène par *Burkholderia cepacia* a été améliorée en présence de tween 80,

D'après les résultats obtenus, on observe une bonne croissance bactérienne dans le milieu contenant de pyrène et de Tween 80 pour la souche 1C (DO= 0,13 après 14 jours sans tween 80 et 0,39 lorsque le tween 80 est ajouté), par contre la présence du Tween 80 limite la croissance microbienne de la souche 1J (DO= 1,0 après 14 jours sans tween 80 et 0,32 lorsque le tween 80 est ajouté), comme le montre la figure 9. Les résultats obtenus révèlent que l'ajout de surfactant participe à l'amélioration de la croissance bactérienne de quelques souches et inhibe la croissance des autres.

La biodégradation des HAP dépend de la nature de tensioactif. En effet, les travaux réalisés par **Tiehm (1994)** montrent que les surfactants non-ioniques ont un effet positif sur la biodégradation des HAP. Par contre, le SDS (tensioactif anionique) inhibe la biodégradation des HAP.

Nous concluons que la biodisponibilité du polluant est très importante. Pour les contaminants insolubles ou très peu solubles (HAP), elle réalisée par l'ajout de tensioactif.

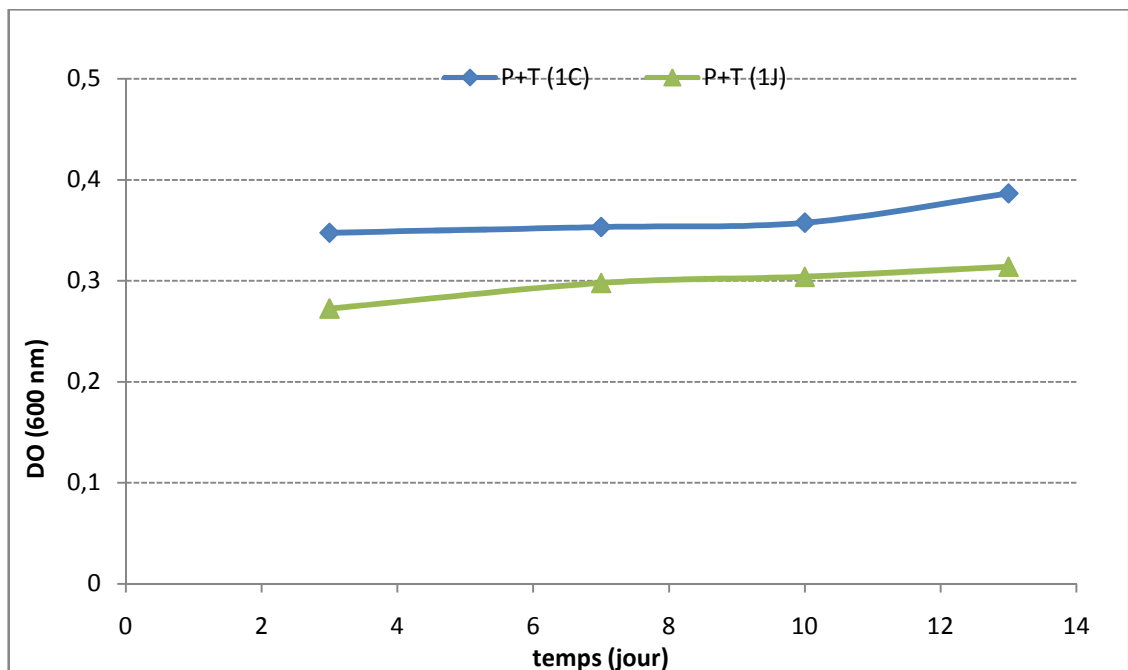


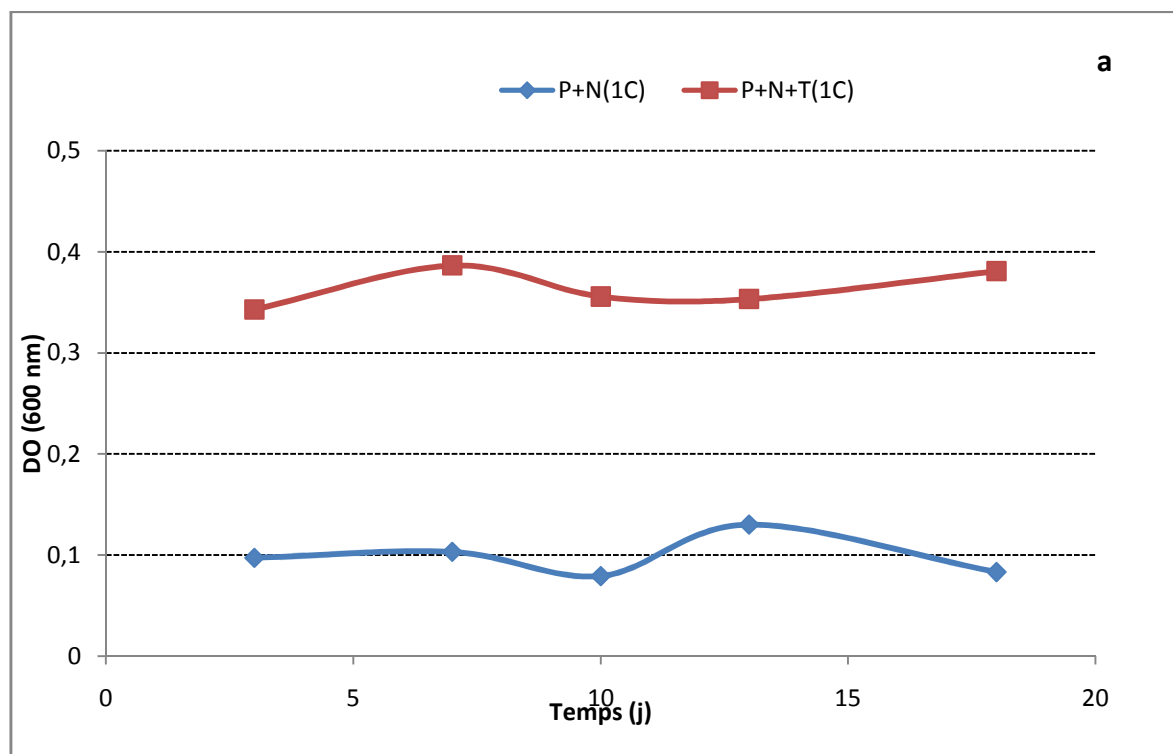
Figure 9: Effet de l'ajout de tensioactif sur la croissance des souches 1C et 1J
([pyrène] = 50 mg/l ; $T_{\text{incubation}} = 45^{\circ}\text{C}$; pH = 7,0 ; Agitation = 150 tr/min)

3.2.5. Effet de l'ajout d'une autre source de carbone

L'incorporation d'autres sources de carbone dans le milieu peut affecter la cinétique de la dégradation du pyrène.

Les résultats obtenus montrent que la croissance bactérienne de la souche 1C est importante lorsque le milieu contient une autre source de carbone (naphtalène ou tween 80), ce qui signifie que la bactérie 1C utilise le naphtalène et le tween 80. La figure 10 illustre l'effet de l'ajout du naphtalène et de tween 80 sur la croissance bactérienne.

La biodégradation du pyrène est affectée lorsqu'une deuxième source de carbone facilement dégradable est ajoutée au milieu. *Bacillus thuringiensis* isolée à partir d'un sol contaminé par le pétrole a montré une capacité de dégrader le pyrène 50 ppm (10% après 12 jours) l'ajout du glucose (1%) a augmenté le taux de dégradation à 40%. Le taux de dégradation du pyrène par la même souche est de 70% lorsque 1% du tween 80 est ajouté au milieu. (Maiti *et al*, 2012).



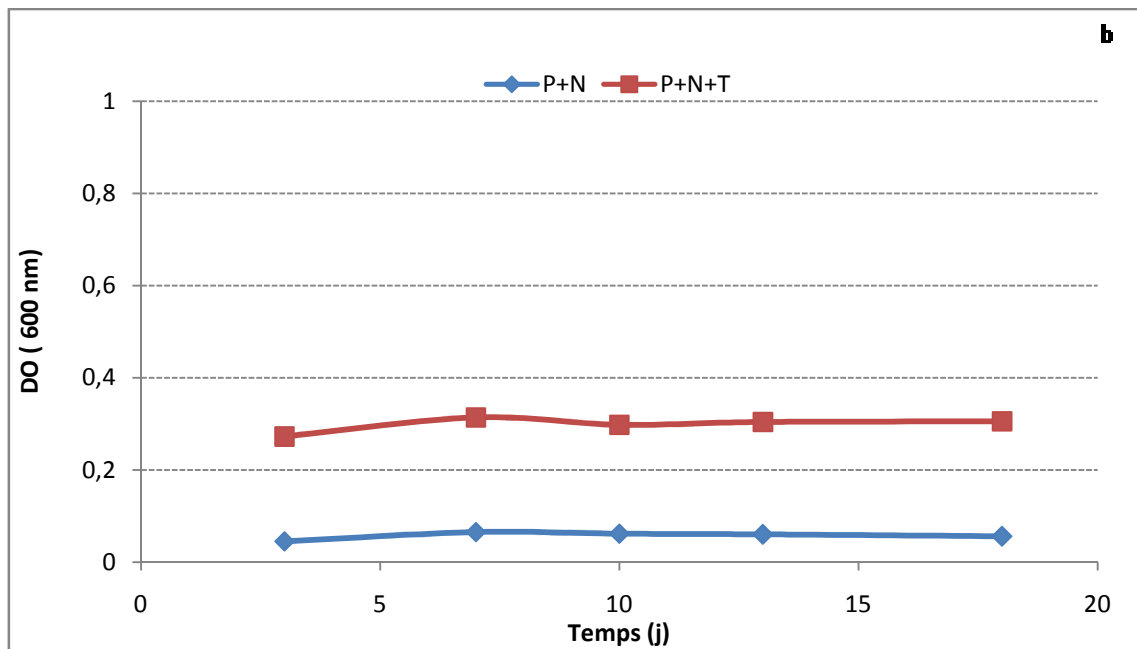


Figure 10 : Effet de l'ajout du naphthalène et de tween 80 sur la croissance bactérienne ($T_{\text{incubation}} = 45^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 7,0$; Agitation = 150 tr/min). a- souche 1C, b- souche 1J.

3.3 Caractérisation phénotypique des souches 1C et 1J

La coloration de Gram-Hucher est une coloration différentielle qui repose sur la perméabilité de la paroi bactérienne. A fin d'identifier les deux souches 1J et 1C, un test de Gram à été réalise. La figure 11 montre l'observation microscopique ($\times 40$) des deux souches.

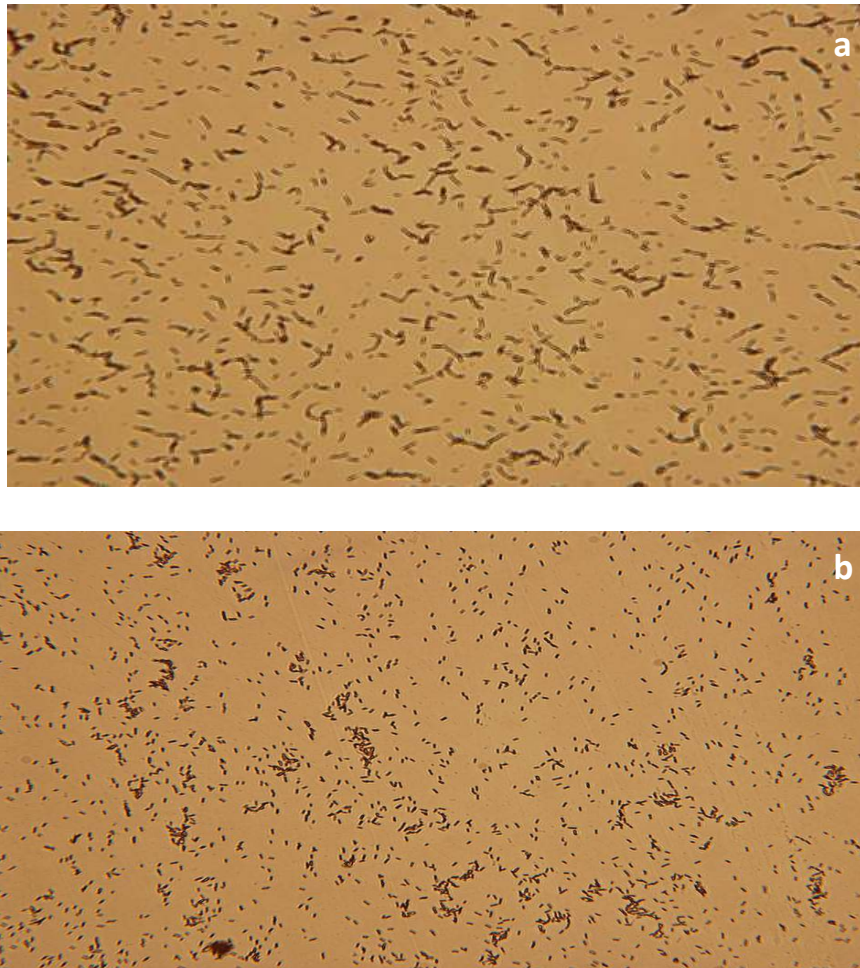


Figure 11 : Observation microscopique des souches 1J(a) et 1C (b) après coloration de Gram.

L'observation sous microscope optique montre la pénétration de la couleur violet pour les deux souches. Les résultats indiquent que ce sont des bacilles à Gram positif. La souche 1C a une forme de bacille, Gram+, aérobic stricte elle à une tendance à former une pellicule à la surface de milieu. En présence des conditions défavorables du milieu de culture elle produise des endospores.

La souche 1J a été identifiée au sein du « l'institut PASTEUR ». Après traitement des résultats avec un logiciel spécifique, la souche 1J est identifie comme *Bacillus subtilis* (99,1%).

La souche 1C a été identifiée au niveau du « laboratoire d'hygiène de Blida ». Après traitement des résultats obtenues et les calculs qui on été faits, la souche 1C est affiliée à l'espèce *Bacillus lentus* à 93,54%.

Tableau 3 : le test biochimique (API 50 CHB/E Medium) pour les souches 1J et 1C.

1 J	0	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR
	+/-	-	+	+	+	-	+	+	+	+/-
	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC
	-	+	+	+	+	+/-	+/-	-	+/-	-
	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN
	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG
	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-

1 C	0	GLY	ERY	DAR A	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MD X
	-	+	-	-	+/-	+/-	-	-	+	-
	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR
	-	+	+	+	-	-	-	+/-	-	-
	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC
	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GE N
	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DAR L	LARL	GNT	2KG	5KG
	+	-	+/-	-	-	-	-	+/-	-	-

CONCLUSION

Les sites contaminés par des substances xénobiotiques telles que les HAP représentent un vrai réservoir contenant une variété de microorganismes ayant un potentiel biodégradatif très élevé. Ces microorganismes, notamment les bactéries, peuvent être exploitée dans plusieurs domaines industriels et environnementaux ; l'application environnementale semble efficace en raison de son faible coût, de la simplicité de son application et n'affecte pas l'environnement comparativement aux méthodes physico-chimiques.

Les résultats obtenus montrent que la dégradation du pyrène est possible en utilisant des souches sélectives. Plusieurs paramètres affectent la biodégradation, tels que la quantité du pyrène, pH, la salinité et l'ajout de surfactant, ont été déterminés :

- Les deux souches performantes ont montré une capacité de croissance élevée sur le pyrène (25 mg/l)
- L'ajout du tween 80 augmente le taux de biodégradation du pyrène par la souche 1C
- Les deux souches tolèrent une large gamme du pH [5,5- 8,5] et de salinité [0- 6%] ce qui permet leur utilisation dans les milieux extrêmes.

Afin de compléter la présente étude, il serait intéressant d'étudier :

- Utilisation des co-cultures (bactéries-champignons ; bactéries-microalgues) pour la dégradation des hydrocarbures.
- Identifier les métabolites afin de proposer un mécanisme de biodégradation du pyrène par les deux souches ;
- Etudier la biodégradation d'autres hydrocarbures aromatiques polycycliques.

REFERENCES

- BAERT.A « commentaires concernant les risques liés au ramassage du fuel lourd du prestige dans l'hypothèse ou il toucherait le littoral français, et au nettoyage des oiseaux sur la base des données disponible » le 29 novembre 2002
- BIDAUD.C « Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques, Approche Microbiologique et Application au Traitement d'un Sol Pollué » thèse de doctorat De l'institut national polytechnique de Grenoble et de l'école national supérieure des mines de Saint-Etienne. 1998
- BOUDERHEM Amel « Utilisation des souches bactériennes telluriques autochtones dans la biodetection et la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures » université Kasdi Merbah-Ouargla 2011
- BOUKEMOUCHE Houda « Etude de la biodégradabilité de l'antracène par des souches bactériennes isolées a partir d'un sol anciennement contaminé par le pétrole brute a la région de Hassi Messaoud » université Saad Dahlab de Blida 2012
- CHAHIN.A « Bioindication métaboliques de l'exposition des ruminants laitiers aux hydrocarbures aromatiques » thèse de doctorat institut national polytechnique de Lorraine 2010
- Chen.K, Qing Zhu, Yiguang Qian^a, Ying Song, Jun Yao Martin M.F. Choi Microcalorimetric investigation of the effect of non-ionic surfactant on biodegradation of pyrene by PAH-degrading bacteria *Burkholderia cepacia* Ecotoxicology and Environmental Safety Volume 98, 1 December 2013, Pages 361–367
- CHIBI.S « Etude de la biodégradation des composés aromatiques et cycliques par des souches bactériennes isolées a partir du sol contaminé par le pétrole brut de la région de Hassi Messaoud » thèse de magister, université Saad Dahlab de Blida 2010
- DESALME.D « Contamination atmosphérique par les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) Toxicité et devenir du phénanthrène dans des systèmes sol-plante-microorganismes » thèse de doctorat, l'université de Franche-Comté 2011
- EDDOUAOUDA .K « Etude du potentiel biodegradatif de souches isolées du sol de Hassi Messaoud contaminé par le pétrole : criblage, biodégradation de HAP et production de biosurfactant » thèse de doctorat, université Saad Dahlab de Blida 2012.
- Farshid Kafilzadeh , Fatemeh Hoshyari pour, Yaghoob Tahery, Hamid Noorani Azad (2012) Bioremediation of pyrene by isolated bacterial strains from the soil of the landfills in Shiraz (Iran), Annals of Biological Research, 2012, 3 (1): 486-494
- Feidi. C, Groua.N, Crepinen.C « Transfert des hydrocarbures aromatiques polycycliques chez les ruminants laitier –Approche méthodologique et résultats préliminaires » rapport de la thèse 2002
- GABET.S « Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique » thèse de doctorat université de Limoges 2004
- Hallberg.R, Saraswathy .A« Degradation of pyrene by indigenous fungi from a former gasworks site » thèse de doctorat institut national polytechnique de Lorraine 2002
- INERIS : J.M.Brignon « Données technico-économiques sur les substances chimiques en France » 2006

- INERIS « Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) : Etablissement d'une stratégie de réduction des concentrations dans les cours d'eau » DRC-10-102861-02416A .2010
- INERIS « Acquisition des données d'entrée des modèles analytiques ou numériques de transferts dans les sols et les eaux souterraines » 66244-DESP-R01. 2005
- Kumari.B, S.N.Singh Farah Deeba, Marisha Sharma, Vivek Pandey and D.P.Singh « Elucidation of Pyrene Degradation Pathway in Bacteria » Advances in Bioresearch 'article' 2013
- KOUZAYHA .A« Développement des méthodes analytiques pour la détection et la quantification de traces des HAP et de pesticides dans l'eau. Application à l'évaluation de la qualité des eaux libanaises » thèse de doctorat de l'université Bordeaux 2011
- Kuony.S « Caractérisation d'arène dioxygénases impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques chez *Mycobacterium* sp. 6PY1 » thèse de doctorat, université de Joseph Fourier- Grenoble I 2002
- Lapointe.M « Mobilisation en colonne d'un hydrocarbure aromatique polycyclique (pyrène) adsorbé au sol au moyen d'un biotensioactif produit par *Pseudomonas aerogenosa* » thèse présenté comme exigence partielle du grade Maitre Sciences (M, Sc.), Institut national de la recherche scientifique, INRS-Eau. 1996
- Marchand.M, J-C .Caprais, S. Corre, D.Hussein « Utilisation des hydrocarbures la microflore bactérienne du site hydrothermal du bassin de Guaymas (golfe de Californie) » thèse de doctorat 1993
- Maiti. A, Sudip Das. S, Bhattacharyya .N (2012) Bioremediation of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Bacillus thuringiensis* Strain NA2 JOS, Vol. 1, No. 4, pp. 72-75, 2012
- MESBAIAH. FZ « Etude de la biodégradabilité d'un hydrocarbure aromatique polycyclique 'naphtalène' et optimisation de la performance bactérienne en milieu PCN » université Saad Dahlab de Blida 2011.
- PORTET.F « Monitoring continu de site pollué, Mise au point d'une méthodologie de contrôle en continu d'un site pollué en phase de surveillance ou de dépollution » thèse de doctorat de l'école de St-Etienne 2004
- RECORD « Devenir des polluants organiques dans les sols lors de la biodégradation naturelle et après biotraitement Identification des composés 'métabolites' et des cinétiques » 2007.148 p, n°05-0513/1A
- Rehman .K, E.W.Steinberg, A.Kettrup « Pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. Strain KR2 » 1998
- TARANTINI .A «Modulation de la genotoxicity des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en Melanges » 2009
- Tiehm .A (1994) Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Presence of Synthetic Surfactants Applied Environmental Microbiology 60: 258-263
- Walter.U, M.Beyer, J.Kelien, and H.Rehm « Degradation of pyrene by *Rhodococcus*.sp» West falische wilheelms university, gerrmany. 1990
- Zhang D, Zhu L (2012) Effects of Tween 80 on the removal, sorption and biodegradation of pyrene by *Klebsiella oxytoca* PYR-1 Environmental Pollution [164:169-174]

ANNEXE I

Caractéristiques du biotope utilisé pour l'isolement des souches dégradatrices des hydrocarbures

Tableau : Caractéristiques physico-chimiques du biotope

Echantillon N°	01	02	03
Paramètres	Puits OMOZ #472	Puits OMKZ #32	Puits OMKZ #502
COT (%)	2,30	7,1	3,5
N_T (‰)	0,42	1,18	0,51
COT/N_T	54,7	60,1	68,6
HPT (g/kg du sol)	27,83	59,07	36,05
Conductivité (mS/cm)	17,32	13,06	13,95
pH (1 : 2,5) H₂O	7,50	7,57	7,25

COT : Carbone Organique Total ; *N_T* : Azote total Kjeldahl
HPT : Hydrocarbures Pétroliers Totaux

- Sol non salin CE < 2
- Sol légèrement salin 2 < CE < 3
- Sol salin 3 < CE < 5
- Sol très salin 9 < CE < 16
- Sol extrêmement salé CE > 16

ANNEXE II

Isolement des souches bactériennes : L'isolement est basé sur la capacité des souches à croître sur le pétrole brut (mesurer la densité optique à 600 nm). En effet, les tests de biodégradation ont été réalisés dans des flacons de 250 ml contenant 100 ml de milieu de culture (MM), 2% (p/v) de sol contaminé par le pétrole brut et 2% (v/v) de pétrole brut comme source de carbone et d'énergie. L'incubation a été réalisée à 45°C sous une agitation de 150 tr/min (Eddouaouda, 2012).

Afin d'obtenir une culture microbienne active, des repiquages successifs ont été effectués toutes les 48 h dans un milieu neuf. La croissance bactérienne a été suivie par :

- ✓ L'observation microscopique à l'aide d'un microscope optique à contraste de phase (Olympus BX50).
- ✓ La mesure de la densité optique (DO) à 600 nm a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre.
- ✓ Le suivi de la disparition de la couche huileuse du pétrole durant la période d'incubation qui est réalisée par l'observation visuelle permet d'évaluer la dégradation du pétrole.

Milieu de culture : Le milieu de culture liquide utilisé est à base de sels minéraux, milieu minimum (MM), sa composition (g/l) est : NH_4Cl (0,4), K_2HPO_4 (0,3), KH_2PO_4 (0,3), NaCl (10), MgCl_2 (0,33), CaCl_2 (0,05), extrait de levure (0,1) et 1 ml de solution d'oligoéléments contenant (par litre): H_3BO_4 (0,25g), $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,5g), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,5g), NaMoO_4 (0,06g), $\text{ZnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,7g). Le pH est ajusté entre 7,0 et 7,5. Ensuite, le milieu est stérilisé à 120 °C pendant 20 min.