

UNIVERSITE SAAD DAHLAB BLIDA

Faculté des Sciences de l'Ingénieur
Département de Chimie Industrielle

MEMOIRE DE MAGISTER

En Chimie Industrielle

Spécialité: Génie de l'Environnement

**ETUDE DE LA BIODÉGRADATION DES COMPOSÉS
AROMATIQUES ET CYCLIQUES PAR DES SOUCHES
BACTÉRIENNES ISOLÉES À PARTIR DU SOL CONTAMINÉ
PAR LE PÉTROLE BRUT DE LA RÉGION DE HASSI
MESSAOUD**

Par

Mme SOUAD CHIBI

Devant le jury composé de ;

A. Aouabed	Professeur, U. de Blida	Président
Z. Benmaamar	Maître de conférences, U. de Blida	Examineur
M. Abou Saeoud	Maître de conférences, C.U. Médéa	Examineur
K. Eddouaouda	Chargé de cours, U. de Blida	Invité
A. Badis	Maitre de conférences, U. de Blida	Rapporteur

Blida, Décembre 2010

REMERCIEMENTS

Je remercie ALLAH, le
Tout Puissant, à qui nous devons tout.

Mes sincères remerciements vont à mes chers parents qui étaient toujours à mes côtés et m'ont tant aidée et soutenue. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma sincère gratitude et de ma profonde reconnaissance. Que mes frères et ma sœur croient en ma sincère reconnaissance pour leur soutien et leur encouragement.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements et ma sincère gratitude à mon directeur de thèse, monsieur A. BADIS, pour l'honneur qu'il m'a fait en m'accueillant au sein de son équipe, pour m'avoir initiée à la recherche et m'avoir aidée à développer un raisonnement et une rigueur scientifique, pour ses conseils précieux qui m'ont toujours orientée, et surtout pour son soutien moral et sa patience. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier monsieur A. AOUABED, professeur à l'USDB, pour avoir accepté d'examiner ce travail, et en me faisant l'honneur de présider le jury.

Mes sincères remerciements s'adressent à monsieur ABOU SEAOD, maître de conférence, C.U. Médéa, et monsieur Z. BENMAAMAR, maître de conférence à l'USDB, et monsieur K. EDDOUAOUA, Chargé de cours à l'USDB d'avoir aimablement accepté d'examiner mon travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de mes plus vifs remerciements.

Je tiens à remercier tout le personnel administratif de l'Institut de Chimie Industrielle ainsi que tous les techniciens et ingénieurs de laboratoire, en particulier l'équipe du laboratoire d'analyse, pour m'avoir aidée, soutenue, et facilité le travail.

Que mes amies et mes collègues croient en ma sincère reconnaissance pour leur aide, leur soutien et leur encouragement. Mes remerciements vont aussi à ceux qui, de près ou de loin, ont eu l'amabilité de m'aider et contribué à la réalisation de ce modeste travail.

RESUME

La biodégradation intrinsèque de deux classes d'hydrocarbures (HC), cycliques (Cyclohexanol et Cyclohexanone) et aromatiques (Benzène et Phénol) a été étudiée en utilisant des souches bactériennes aérobies isolées à partir d'un sol anciennement contaminé par le pétrole brut de la région de Hassi Messaoud (Sud d'Algérie). Quelques paramètres influant la biodégradation ont été aussi étudiés (pH, température et concentration de l'hydrocarbure).

La biodégradation totale diffère selon la structure et la concentration d'HC. Elle s'accélère avec les HC cycliques (15 à 17 jours, en concentration assez forte de 500-2000mg/l) et s'est ralentie avec les HC aromatiques (62 à 71 jours, en faible concentration <100mg/l). Par contre les HC aromatiques sont apparus difficilement biodégradable pour une concentration de 150mg/l d'où le phénol atteint un taux de dégradation de 82.64% dans une durée de 90 jours et le benzène atteint un taux de 94.84% au bout de 120 jours. L'analyse spectrale (UV-visible, FTIR et CPG) a permis de mettre en évidence un état de dégradation lié à la concentration d'HC d'où les nouveaux spectres détectés révèlent la formation de sous produits justifiée aussi par la variation du pH de milieu.

Les deux souches K1D et K7D ont été sélectionnées et considérées à fort potentiel de biodégradation d'HC. L'identification phénotypique et biochimique n'a pas pu confirmer l'appartenance de ces souches à aucun taxon.

Mots clés : Biodégradation, Hydrocarbures, Souches bactériennes, sol contaminé, Pétrole brut.

ABSTRACT

In this work we study the intrinsic biodegradability of two classes of hydrocarbons: Cyclic (cyclohexanol, cyclohexanone) and aromatic ones (benzene and phenol) using aerobics bacterial stumps. These latter have been isolated from a soil oldly Contaminated by a crude oil at the region of Hassi Messaoud, south of Algeria. We also study the influence of some parameters on the biodegradation (pH, temperature and concentration of hydrocarbons).

The total biodegradability is different according to the structure and concentration of the hydrocarbons. The cyclohexanol and the cyclohexanone with a concentration between 500 and 2000 mg/l, have been entirely biodegradate during a relative short time 15-17 days where as, the benzene and the phenol with concentration under 100 mg/l have been biodegraded during long periods that attains 82.64 % during 90 days for phenol and 94.84% during 120 days for the benzene. The follow of the biodegradation by the physical methods of analyses (UV, FTIR, GC) allows us to show a degradation state according to the concentration and to detect the formation of by-product due to the pH variation of the middle.

The two stumps K1D and K7D that have been selected and considered having high biodegradation potential. The phenotypique and biochemical identification could not confirm the affiliation of these tow stumps to any taxon.

Key words: Biodegradation, hydrocarbons, Bacterial stumps, contaminated soil, Crude oil

TABLE DES MATIERES

RESUME	
REMERCIEMENTS	
TABLE DES MATIERES	
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	
INTRODUCTION	10
	12
CHAPITRE 1 : LES HYDROCARBUES SOURCE FREQUENTE DE POLLUTION	
1. POLLUTION DE L'ENVIRONNEMENT PAR LES HYDROCARBUES	12
1.1 Introduction	12
1.2. Pollution des sols par les hydrocarbures	13
1.3. Pollution des eaux marines par les hydrocarbures	15
1.3.1. Les types de pollution marine	15
1.4. L'Origine des hydrocarbures	16
1.5. Dangers et risques de la pollution par les hydrocarbures	17
1.6. Toxicité des hydrocarbures	17
1.7. Devenir des hydrocarbures dans les sols et en milieu marin	18
1.7.1 Dans les sols	18
1.7.2 En milieu marin	21
1.7.2.1 Evaporation	22
1.7.2.2 Solubilisation	22
1.7.2.3 Emulsification	22
1.7.2.4 Sédimentation	22
1.7.2.5 Photo-oxydation	23
1.7.2.6 Biodégradation	23
1.8 Pénétration des hydrocarbures dans la chaîne alimentaire	23
1.9 Les composés pétroliers	24
1.9.1 Les hydrocarbures saturés	25
1.9.2 Les hydrocarbures aromatiques	25
1.9.3 Les composés polaires	26
1.9.4 Les asphaltènes	26
1.10 Techniques de dépollution	28

1.10.1	Techniques de dépollution des sols pollués	28
1.10.1.1	Procédés physiques	28
1.10.1.2	Procédés chimiques	29
1.10.1.3	Bioremédiation	29
1.10.2	Techniques de dépollution des eaux pollués	30
1.10.2.1	Les moyens de lutte contre la pollution par les hydrocarbures	30
		33
CHAPITRE 2 : BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES		
2.1	BIODEGRADATION OXYDATIVE DES HAP PAR LES BACTERIES	33
2.2	Processus d'oxydation des hydrocarbures	34
2.2.1	Voies métaboliques de dégradation des hydrocarbures saturés cycliques	35
2.2.2	Biodégradation des hydrocarbures aromatiques	38
2.2.3	Accession des microorganismes aux composés organiques hydrophobes	40
2.3	FACTEURS PHYSIQUES ET CHIMIQUES AFFECTANT LA BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES	41
2.3.1.	Composition chimique des hydrocarbure	41
2.3.2	Etat physique et concentration des hydrocarbures ou des pétroles	43
2.3.3	Influence de la température	43
2.3.4	Influence de l'oxygène	44
2.3.5	Influence des éléments nutritifs	45
2.3.6	Effet du pH	45
2.4	BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES DANS LES GISEMENTS DE PETROLE ET VOIES ANAEROBIES	46
2.4.1	Biodégradation des hydrocarbures dans les puits de pétrole	46
2.4.1.1	Voies de dégradation anaérobie	47
		52
CHAPITRE 3: MATERIEL ET METHODE		
3.	MATERIEL ET METHODES	52
3.1	Isolement des souches bactériennes aérobies	52
3.2	Screening des souches performantes	55
3.2.1	Souches et conditions de culture	55
3.2.2	Suivi de la biodégradation	56

3.3 Croissance en milieu à base d'hydrocarbure	56
3.4 Aptitude de biodegradation	57
3.5 Optimisation de la cinétique de la biodégradation	57
3.6 Mesure et suivi de la biodégradation	58
3.6.1 Spectroscopie Ultraviolette UV. visible	58
3.6.2 Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	58
3.6.3 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	59
3.7 Caractéristique des hydrocarbures utilisés	59
CHAPITRE 4 : RESULTATS ET DISCUSSION	
4.1 Screening des souches performantes	60
4.2 Estimation de la croissance en milieu à base d'hydrocarbure	62
4.3 Aptitude de biodégradation	63
4. 4 Optimisation des paramètres de la biodégradation	64
4.4.1 Influence de pH	65
4.4.2 Influence de la température (T°)	66
4.4.3 Effet de la concentration d'hydrocarbure sur la biodégradation	66
4.4.3.1 Cas du cyclohexanone	67
4.4.3.2 Cas du phénol	68
4.4.3.3 Cas du benzène	70
4.4.4 Effet de la durée du séjour sur la dégradation du benzène	71
4.5 Confirmation de la biodégradation	72
4.5.1 Par analyse par chromatographie en phase gazeuse	72
4.5.2 Par détermination de l'Indice de réfraction	75
4.6 Voies métaboliques de dégradation	77
4.7 Mise en évidence du changement de structure : Cas du phénol	81
4.8 Caractérisation des souches bactériennes	84
4.8.1 Souche K1D	84
4.8. Souche K7D	85
DISCUSSION GENERALE	87
CONCLUSION	91
ANNEX	

CHAPITRE 1

LES HYDROCARBUES SOURCE FREQUENTE DE POLLUTION

1. POLLUTION DE L'ENVIRONNEMENT PAR LES HYDROCARBUES

1.1 Introduction

Le terme pollution peut être défini comme suit : c'est une modification défavorable du milieu naturel qui apparaît en totalité ou en partie comme un sous produit de l'action humaine, au travers d'effets directes ou indirectes alternant les critères de répartition des flux d'énergie, des niveaux de radiation, de la constitution physico-chimique du milieu naturel et de l'abondance des espèces vivantes. Ces modifications peuvent être affectées l'homme directement ou au travers des ressources agricoles, en eau et autres produits biologique, elles peuvent aussi l'affecter en alternant les objets physiques qu'il possède les possibilités récréatives du milieu ou encore en enlaidissant la nature [3].

Aussi désigne l'ensemble des rejets des composés toxiques que l'homme libère dans l'écosphère, mais aussi les substances qui sans être vraiment dangereuses pour l'organisme vivants exercent une influence perturbatrice sur l'environnement. Elle ne doit pas être confondue avec les dangers du risque (incendie, explosion) qui peuvent également provoquer des effets polluants [4]. La définition de pollution est donc très large et elle permet de comprendre aussi bien des polluants d'origine naturelle que des polluants liés à l'activité humaine (atrophique). On distingue de différents types de pollution marine.

1.2 Pollution des sols par les hydrocarbures

La pollution des sols par les hydrocarbures a été reconnue comme un problème majeur de puis de nombreuses années. L'impact environnemental de ces molécules hydrophobes, persistantes, aux effets toxiques (mutagènes et cancérogènes) rend nécessaire la décontamination des sites concernés.

Le pétrole est une source de pollution des environnements marins ou terrestres qui peut largement influencer les équilibres écologiques et par extension les activités économiques des régions sinistrées. Cependant, les hydrocarbures déversés dans un environnement donné, marin ou terrestre, subissant 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 des hydrocarbures par les microorganismes sont à elles seules à l'origine de la disparition de la majeure partie d'un hydrocarbure déversé dans un environnement donné. L'élimination du pétrole nécessite l'intervention de différents facteurs ; parmi ces facteurs la biodégradation, par les microorganismes et en particulier les bactéries, est le processus naturel le plus important dans la dépollution.

Le pétrole accidentellement répandu s'évapore, puis retombe dans l'eau ou sur les zones exposées au vent. Il se dissout dans l'eau, s'émulsionne, s'oxyde, sédimente mais aussi se biodégrade peu. Il percole dans le sable. Par exemple, il a été constaté qu'après l'Amoco Cadiz [5], les sédiments des plages, généralement propres en surface, étaient imprégnés en profondeur par de traces de pétrole. Selon le même auteur, dans plus de cent (100) trous de prélèvement effectués en juillet 1978, soit quatre mois après le déversement, il a constaté l'apparition d'un film irisé à la surface de l'eau interstitielle, avec parfois de petits glomérules d'émulsion brune, et ce à toutes les niveaux des plages et dans tous les types de sédiments. La teneur en hydrocarbures y était très forte, alors que l'eau côtière était généralement contaminée (0,002 ppm). C'est regroupé dans le tableau (1.1).

Tableau 1.1: Composition élémentaire des pétroles bruts [5].

Compositions	Poids (%)
Carbone	84 à 87
Hydrogène	11 à 14
Soufre	0 à 6
Azote	0 à 1*
Oxygène	0 à 8**

* Souvent < 0,1

** Souvent < 1,0

Dans un sol contaminé par les hydrocarbures, les plantes peuvent croître jusqu'à un certain seuil. Une concentration de 7 tonnes par hectare permet une croissance normale de la plante et un rythme de dégradation élevé par les microorganismes qui se développent dans la rhizosphère grâce à l'activité racinaire.

Le tableau (1.2), synthétise des risques relatifs à la contamination des nappes phréatiques et à la propagation des hydrocarbures volatils dans l'atmosphère (cas des principaux polluants hydrocarbonés) [4].

Tableau 1.2 : Les principaux polluants hydrocarbonés [6].

Nature des hydrocarbures	Risque	
	Contamination de nappe (concentration Maximale)	Risques dus aux composés volatils
Essence	++ (100-150 mg/l)	++
Gazole	+ (3-10mg/l)	+
Gazole vieilli	(+) (<0,5mg/l)	-
Fioul lourd	+ (< 1mg/l)(15HAP<50µg/l)	-
Goudron de houille	+ (16HAP < 5mg/l)	-

++ : Risque très élevé : - : Risque faible.

1.3 Pollution des eaux marines par les hydrocarbures

La pollution des eaux marines par les hydrocarbures est classée comme une pollution à risque majeur pour l'humanité. Ce problème remonte au début de ce siècle et son importance s'est accrue de façon spectaculaire, parallèlement à l'accroissement de l'utilisation de cette source d'énergie.

Le pétrole a pris une place considérable dans notre civilisation comme source d'énergie ou, en outre des fabrications de produits non énergétique comme les lubrifiants, les bitumes... [7]. Mais aussi, est une source de pollution des environnements marins qui peut largement influencer les équilibres écologiques et par extension les activités économiques des régions sinistrées, la quantité de pétrole introduite annuellement dans les océans par les diverses voies est approximativement 1.3 millions de tonnes/an, sachant qu'une tonne de pétrole peut couvrir environs une surface de 12 kilomètres carrés [8].

1.3.1 Les types de pollution marine

D'après Soultani.M [9], on peut résumer les différents types de la pollution marine selon le tableau suivant :

Tableau 1.3 : Différents types et origines de la pollution marine [9].

Type de pollution	Nature	Source
Thermique	Rejets d'eau chaude	Centrales électriques
Radioactive	Radio-isotopes	Installations nucléaires
Microbiologique	Bactéries, virus, champignons	Effluents urbains, élevages, secteur agroalimentaire
Organiques (fermentescibles)	Glucides, lipides, protides.	Effluents domestiques, agricoles, industries agroalimentaires
Fertilisants	Nitrates, phosphates	Agriculture, lessives
Métaux et métalloïdes toxiques	Mercure ; calcium, plomb, aluminium ; arsenic	Industries, agriculture, combustion, pluies acides
Pesticides	Insecticides, fongicides	Agriculture, industrie
Détergents	Agents tensioactifs	Effluents domestiques
Hydrocarbures	Pétrole brut et dérivé	Industries pétrolières, transports
Composé organochlorés	Insecticides, solvants chlorés	Industries
Composés organiques de synthèse	Nombreuses molécules	Industries

1.4 Origine des hydrocarbures

Les hydrocarbures sont répartis de façon ubiquitaire dans l'environnement. Leur origine principale est l'utilisation et le transport des combustibles fossiles. Ainsi, la combustion incomplète de la matière organique fossile (charbon, pétrole et dérivés) ou plus récente (bois), ou pyrolyse, est une source majeure de l'hydrocarbure [10]. A cela s'ajoute une production de l'hydrocarbure naturelle (incendies de forêts, volcans,...).

Les hydrocarbures sont omniprésents dans l'environnement : ils sont associés à des particules émises dans l'atmosphère, lesquelles se déposent provoquant une dispersion de la pollution. Ils sont également transportés par les eaux pluviales et fluviales et se retrouvent ainsi dans les boues de stations d'épuration. Les sols d'anciennes usines à gaz et de cokeries présentent une pollution aiguë par les hydrocarbures répartie de façon hétérogène entre des goudrons, des agrégats et des hydrocarbures adsorbés aux particules de sol.

Dans les eaux de mer les accidents sont spectaculaires et peuvent avoir localement des conséquences graves, pourtant leur contribution à l'apport annuel d'hydrocarbures dans les océans est relativement faible.

On distingue essentiellement trois sources de pollution :

- Les rejets provenant des navires, en mer et dans les ports :
 - Accident en mer;
 - Rejets de cales et fuites diverses;
 - Nettoyage des citernes de pétroliers;
 - Déversements aux terminaux pétroliers.
- Les rejets provenant de l'exploitation du pétrole en mer.
- Les rejets terrestres acheminés vers la mer par les fleuves, les émissaires côtières et les retombées atmosphériques :
 - Raffinage pétrochimie;
 - Résidus, huiles usées;
 - Apports atmosphériques.

Dans tous les cas, deux causes principales sont à l'origine des déversements : les accidents et les contraintes ou les négligences opérationnelles qui conduisent à une pollution chronique[11].

1.5 Dangers et risques de la pollution par les hydrocarbures

- Risque pour l'environnement : Les hydrocarbures présentent des propriétés toxiques communes à de nombreux autres solvants, en particulier pour les effets provoqués par de forte concentration [12]. Par exemple les hydrocarbures aromatiques sont comme tous les solvants pétroliers, sont tous des composés organiques volatiles (COV). Leur vaporisation dans l'atmosphère contribue à la production d'ozone dans la troposphère par réaction photochimique, augmentant ainsi les risques pour les personnes asthmatiques ou souffrant d'insuffisance respiratoire

En cas des rejets dans un milieu aquatique, une faible partie se dissoudra dans l'eau, le reste surnageant à la surface. Leur biodégradation est faible et les hydrocarbures aromatiques sont toxiques pour les organismes aquatiques.

- Effet direct sur les organismes marins : Au-delà de l'engluement, effet purement physique, la faune et la flore peuvent souffrir du contact avec les hydrocarbures à travers des phénomènes écotoxicologiques et, le cas échéant, génotoxiques. Bien que les effets directs des hydrocarbures varient d'une espèce à l'autre à l'intérieur d'un même groupe taxonomique, certains groupes sont globalement plus sensibles que d'autres. De même, les individus aux premiers stades de leur développement peuvent être plus gravement affectés que les adultes. Dans une même espèce, les oeufs, les larves et les juvéniles sont en général plus sensibles que les adultes [13].

1.6 Toxicité des hydrocarbures

Les hydrocarbures se trouvent dans l'environnement à des doses relativement faibles, mais leur caractère hydrophobe entraîne leur bioconcentration dans la chaîne alimentaire.

Certains ont été reconnus comme cancérigènes. Chez l'homme, les hydrocarbures deviennent toxiques après oxydation enzymatique, provoquant la formation de métabolites électrophiles solubles. Ces métabolites peuvent alors former des adduits sur les acides nucléiques ainsi que sur les protéines, amenant à un dérèglement du processus de division cellulaire et à la formation de tumeurs [14]. Le benzo(a)pyrène (BaP) est certainement le plus connu et le plus étudié en tant que HC cancérigène. Certains de ses dérivés seraient impliqués dans le développement de cancers du poumon chez l'homme par la formation d'adduits avec l'ADN, notamment au niveau du gène [15]. Des études ont montré la plus grande mutagénicité de mélanges d'hydrocarbure lorsque la proportion en BaP est plus importante [16].

1.7 Devenir des hydrocarbures dans les sols et en milieu marin

1.7.1 Dans les sols

Dans les sols, les polluants se répartissent en fonction de leur densité, de leur solubilité dans l'eau, de leur volatilité et de leur capacité à s'adsorber sur la matrice solide du milieu poreux, entre la zone insaturée, qui correspond à la couche de sol située au-dessus du niveau piézométrique, et la zone saturée qui constitue l'aquifère. Les composés rencontrés dans les sites pollués sont d'origine organique ou minérale. Les principaux polluants organiques sont des HC (carburants et combustibles) et des produits halogénés (solvants chlorés, polychlorobiphényles, polychlorophénols) [17].

La diversité et l'adaptabilité des microorganismes (bactéries, actinomycètes, champignons et levures) font qu'ils sont présents naturellement dans les sols, fixés sur le milieu solide ou en suspension dans l'eau résiduelle de la zone saturée ou l'eau de la nappe. Leur nombre, variable, peut être estimé entre 10^5 et 10^9 germes par gramme de sol. Les microorganismes sont capables, après adaptation de leur métabolisme, de dégrader une grande variété de produits naturels ou xénobiotiques. La biodégradation d'un produit peut être partielle, ce qui signifie que les microorganismes l'ont transformé, souvent par des mécanismes d'oxydation, ou elle peut être totale. Les produits de l'action microbienne sont essentiellement du dioxyde de carbone et de l'eau.

Un seul et même microorganisme ne possède pas tous les enzymes dont les actions sont nécessaires à la dégradation d'une multitude de produits, comme cela peut être le cas d'une pollution par des produits pétroliers. C'est pourquoi, le plus souvent, la dégradation est réalisée par une communauté de plusieurs espèces dont les actions sont complémentaires. Les sols étant rarement stériles, la microflore en place lorsqu'elle rencontre une pollution va, en fonction des conditions chimiques et physico-chimiques de son environnement, chercher à métaboliser les polluants. L'ensemble de ces phénomènes est désigné sous le terme d'atténuation naturelle.

Le risque de transfert dans les eaux des composés organiques dépend de leur mobilité qui est plus ou moins limitée par leur rétention et leur quantité présente dans le sol, qui, elle est déterminée par leur dégradation, figure (1.1). La rétention et la dégradation sont deux phénomènes clé du processus de pollution puisqu'ils déterminent les quantités susceptibles d'être transportées [18]. On peut remarquer que ces quantités sont aussi diminuées mais dans une moindre proportion par la volatilisation et l'absorption par les plantes. Il serait cependant abusif de dire que ces deux phénomènes participent à effet protecteur des sols puisqu'ils génèrent des pollutions de l'air et de végétaux.

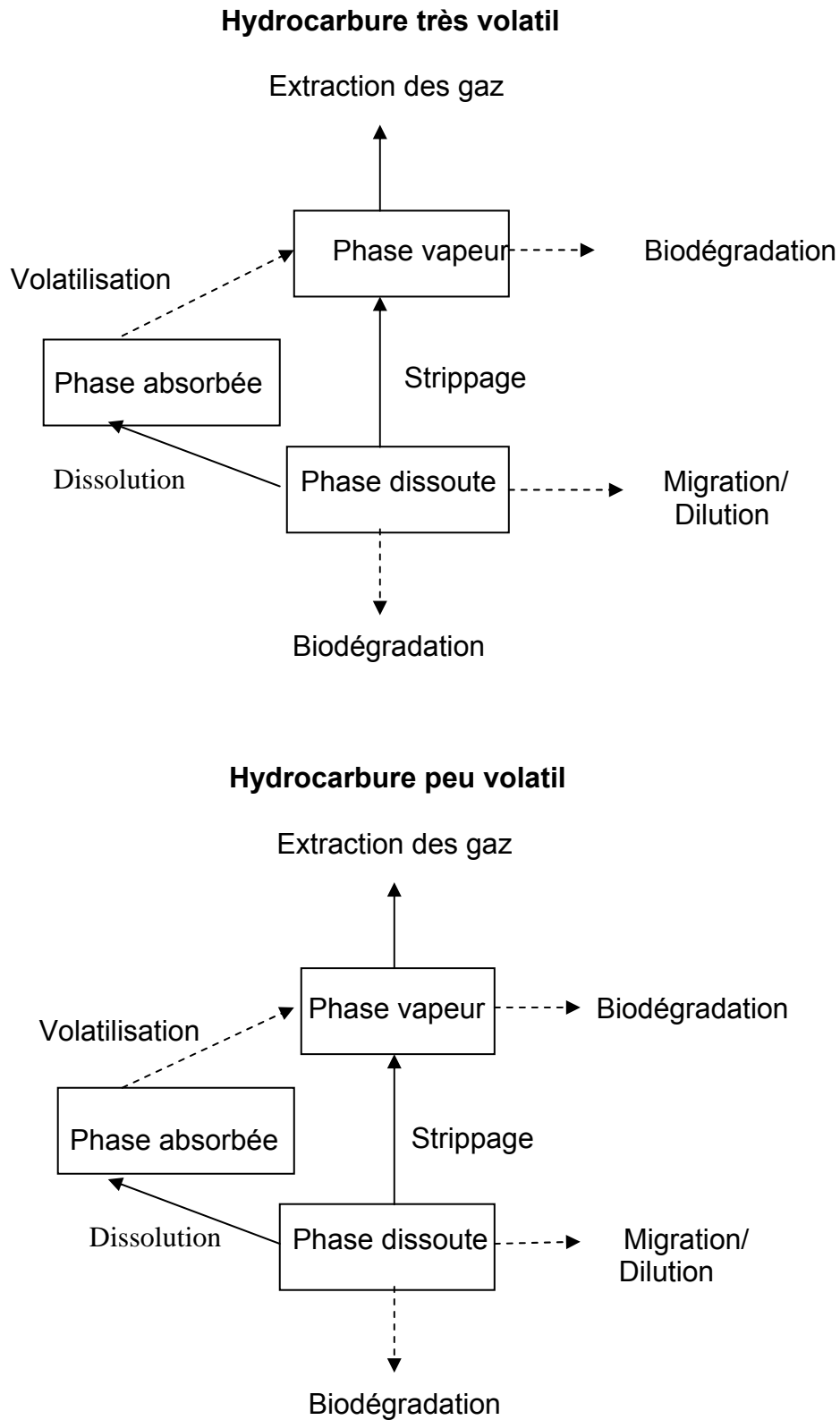


Figure 1.1 : Schéma de synthèse des mécanismes régissant les transferts de phase et le devenir des HC dans un sol, selon leur volatilité [18].

1.7.2 En milieu marin

Du fait de la très solubilité des hydrocarbures dans l'eau et leur densité qui est légèrement à l'unité, les hydrocarbures rejetés dans les océans s'étalent à la surface avant de subir une série de modifications suite à l'action de facteurs abiotiques et biologiques figure (1.2).

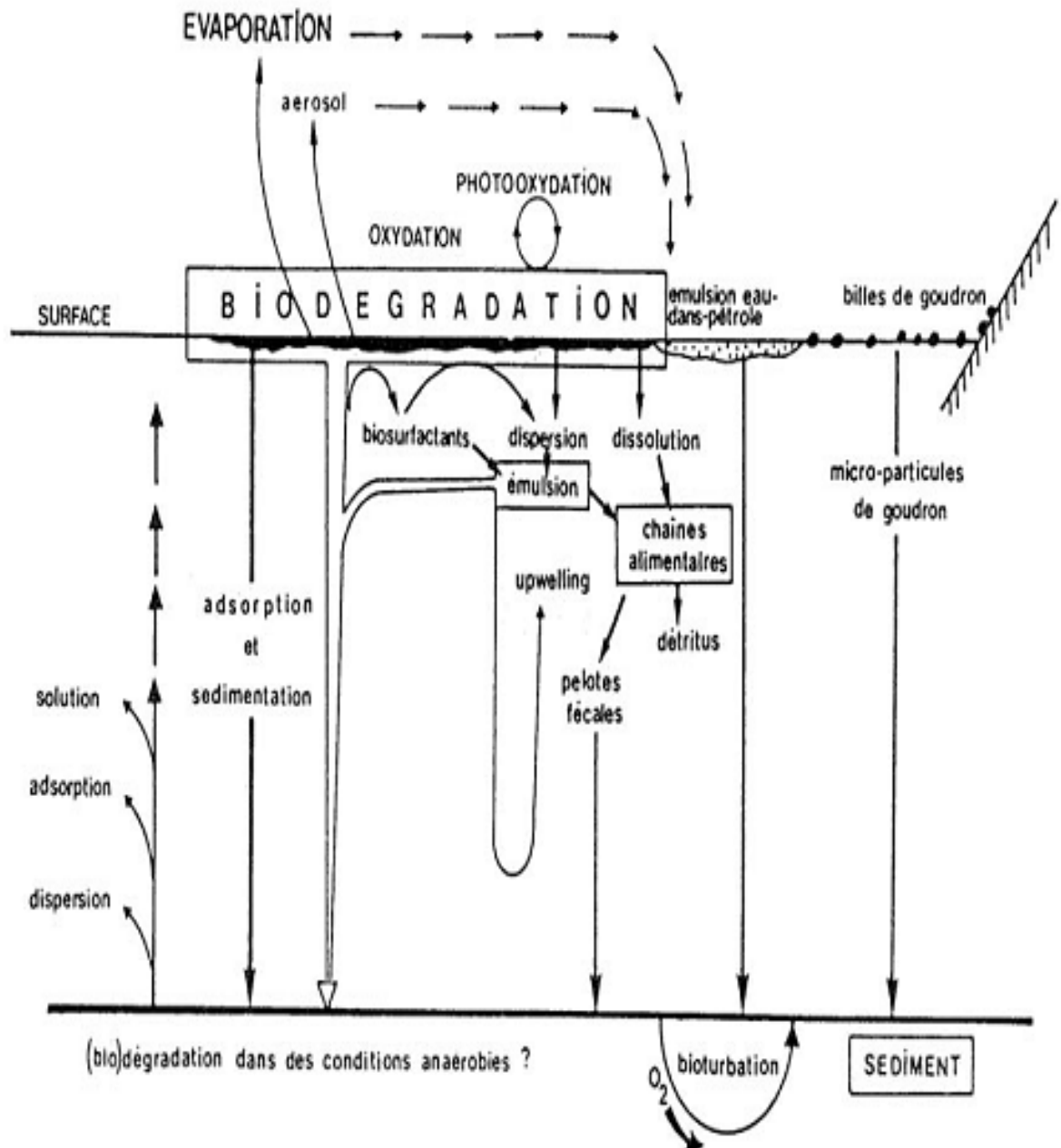


Figure 1.2 : Processus physico-chimiques et biologiques intervenant dans l'évolution d'une nappe de pétrole en milieu marin [19].

L'action simultanée de ces différents facteurs aboutira à l'élimination de cette pollution. Les facteurs environnementaux sont :

A/ Evaporation

Ce phénomène touche les fractions de faible poids moléculaire et dépend des conditions atmosphériques (vent, vagues, température,...).

Les hydrocarbures les plus légers, ayant de 4 à 12 atomes de carbone ($T_{eb} < 270^{\circ}\text{C}$), qui représentent généralement près de 50% des hydrocarbures totaux d'un moyen, sont éliminés rapidement dès les premiers jours, pouvant conduire à une pollution de l'atmosphère.

B/ Solubilisation

La solubilité des hydrocarbures dans l'eau de mer est faible. Un hydrocarbure est d'autant plus soluble que sa masse moléculaire est faible et que sa polarité est élevée. Il est importants de noter que ces hydrocarbures solubles sont parmi les plus dangereux pour l'environnement, ils sont difficiles à éliminer et sont adsorbés par la faune et la flore.

C/ Emulsification

Deux types d'émulsions peuvent se former : eau-dans-huile appelée « mousse Chocolat » et huile-dans-eau. Les émulsions eau-dans-huile sont constituées par des hydrocarbures de haut poids moléculaires. Ces émulsions difficilement dégradables sont les précurseurs des résidus goudronneux retrouvés sur les plages, alors que les émulsions huile-dans-eau facilitent l'élimination des hydrocarbures.

D/ Sédimentation

La sédimentation est le passage du pétrole de la surface vers le fond. Ce phénomène concerne les résidus goudronneux constitués de la fraction pétrolière la plus lourde et dont la densité est supérieure à celle de l'eau de mer. La sédimentation conduit à la constitution d'agrégats de haute densité difficilement dégradable par voie naturelle.

E/ Photo-oxydation

La photo-oxydation est observée au niveau de la surface de l'eau ou l'air (oxygène) et la lumière (radiations solaires) sont présents pour la transformation des hydrocarbures. L'efficacité de ce phénomène dépend de la nature des hydrocarbures et de la présence de composés non hydrocarbonés [20]. Ainsi, la photooxydation touche plus particulièrement les composés aromatiques qui sont plus photosensibles que les composés aliphatiques. Parmi ces derniers, les composés ramifiés sont plus facilement photo-oxydés que les *n*-alcanes.

La photo-oxydation conduit à la formation de composés solubles dans l'eau (acides, alcools, cétones, peroxydes et sulfoxydes) et certains travaux de recherche ont montré leur toxicité pour les communautés microbiennes alors que beaucoup de chercheurs ont montré l'existence d'interactions entre la photo-oxydation et la biodégradation pour l'élimination des alkylbenzènes et de l'antracène. L'action simultanée de ces deux phénomènes permet une élimination plus rapide de ces deux familles de composés.

F/ Biodégradation

La biodégradation est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement marin. Les microorganismes en sont responsables, en particulier les bactéries. L'importance de la biodégradation dans l'élimination du pétrole, les voies métaboliques d'oxydation des hydrocarbures par les bactéries et les paramètres qui peuvent influencer la biodégradation seront traités dans le chapitre suivant.

1.8 Pénétration des hydrocarbures dans la chaîne alimentaire

Les produits pétroliers rejetés dans l'environnement ont des répercussions sur les plantes, animaux et êtres humains. Les conséquences de la contamination dépendent des organismes eux-mêmes et de la structure chimique des hydrocarbures. Certaines espèces éprouvent des changements de comportement à peine perceptibles ou des problèmes de santé à court terme. Certaines d'entre elles éprouvent des effets toxiques instantanés et aigus parfois mortels, tandis que chez d'autres espèces, les répercussions se manifestent lentement à long terme.

Face à ces polluants, les organismes susceptibles d'être contaminés doivent être considérés en fonction de leur capacité de réponse spécifique [19].

Les bactéries, nourriture de nombreuses espèces aquatiques, peuvent être des vecteurs de contamination par lesquels les hydrocarbures peuvent entrer dans la chaîne alimentaire.

Les connaissances les plus nombreuses portent sur les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) dont la toxicité la plus souvent rapportée correspond à leur potentiel carcinogène.

1.9 Les composés pétroliers

Les pétroles bruts sont constitués de différentes familles des composés figure (1.3) dont la composition chimique varie énormément selon leur origine géographique et géologique. Les hydrocarbures constituent la fraction la plus importante d'un brut pétrolier, ils représentent entre 65 et 95% de la plupart des pétroles bruts. Les composés pétroliers peuvent être classés en quatre familles principales qui sont présentes en proportions variables selon l'origine : les hydrocarbures saturés (30 à 70%), les hydrocarbures aromatiques et polyaromatiques (20 à 40%), les composés polaires (5 à 25%) et les asphaltènes (0 à 10%).

Les produits pétroliers sont aussi introduits dans l'environnement terrestre sous forme de produits raffinés : carburants et huiles, leurs compositions dépendent de l'origine du pétrole et des opérations subies au cours du raffinage. On dénombre environ 230 composants pour l'essence et de l'ordre de 2000 pour un fuel lourd [20].

1.9.1 Les hydrocarbures saturés

Parmi lesquels, on distingue

- Les alcanes linéaires (n- alcanes, C_nH_{2n+2}), dont la longueur de chaîne varie de 7 à 40 atomes de carbone, constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40% des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier).
- Les alcanes ramifiés : les plus abondants sont les iso-alcanes (groupement méthyle en position 2), les autres composés ramifiés antéiso (groupement méthyle en position 3) ou polyramifiés tels que les isoprénoïdes (exemple : pristane, phytane) sont beaucoup moins nombreux. Ces composés se trouvent dans le pétrole brut dans des proportions sensiblement égales à celles des n-alcanes.

Par contre le pétrole brut d'origine fossile ne contient en général pas d'alcènes.

- 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 les stéranes et les triterpanes sont caractéristiques d'un pétrole brut. Cette famille peut représenter entre 30 et 50% des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut.

1.9.2 Les hydrocarbures aromatiques

Plusieurs familles d'hydrocarbures aromatiques et polyaromatiques 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. En général, les hydrocarbures aromatiques sont moins abondants que les alcanes, et ne représentent que 10 à 30% des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier. Les composés alkylés sont, la plupart du temps, plus abondants que les molécules parentales dont ils dérivent. Certains cycles aromatiques peuvent être associés à des noyaux (cycle à 5 ou à 6 atomes de carbone) saturés (naphtéoaromatiques).

1.9.3 Les composés polaires

Cette fraction correspond à des molécules hétérocycliques, telles que :

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

Les dérivés soufrés sont dans la plupart des cas plus abondants que les composés oxygénés ou azotés.

1.9.4 Les asphaltènes

Les asphaltènes correspondent à une classe de composés de hauts poids moléculaires, insolubles dans le pentane ou l'hexane. La structure de ces composés est mal connue du fait, d'une part de leur composition chimique complexe (à base de cycles aromatiques condensés, de naphthéo-aromatiques, de ramifications et d'hétéroatomes (O,N,S), d'autre part de méthodes analytiques difficilement utilisables).

Les métaux sont également présents mais à l'état de traces. Les abondants sont le vanadium et le nickel, mais du fer, du sodium, du cuivre et de l'uranium ont également été détectés.

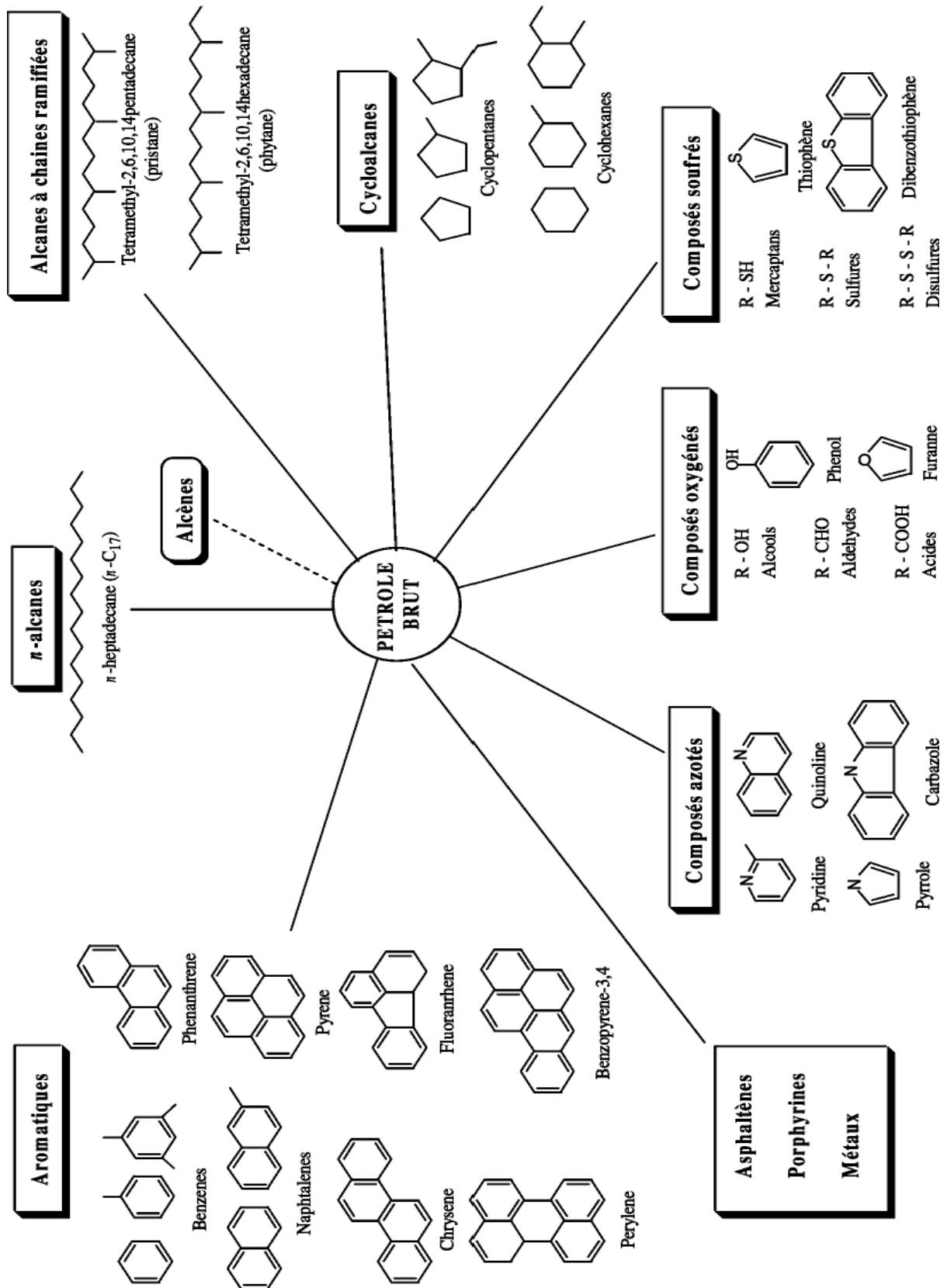


Figure 1.3: Composés hydrocarbonés et non hydrocarbonés présents dans le pétrole brut [20].

1.10 Techniques de dépollution

1.10.1 Techniques de dépollution des sols pollués

Du fait de leur caractère toxique et de leur présence en fortes concentrations dans certains sites pollués, il est important d'éliminer les HAP des milieux contaminés. Différentes solutions ont été proposées pour cela. Certaines des méthodes présentées ici sont plus détaillées dans l'étude sur les techniques de traitement par voie biologique des sols pollués [21].

A/ Procédés physiques

De nombreuses techniques de dépollution des sols par traitement physique existent avec leurs contraintes, leurs spécificités de polluants et de sols.

L'injection d'air ou de vapeur, ou **stripping**, permet d'extraire les solvants chlorés ou les produits organiques volatils en injectant de l'air ou de la vapeur sous pression directement dans le sol par des puits d'injection. Les polluants sont ainsi évaporés puis récupérés par des puits d'extraction. Le stripping a été utilisé pour la décontamination de sols pollués par les HAP [22].

La **flottation** est une technique couvrant une large gamme de polluants dont les HAP. Après avoir excavé le sol, de l'eau et des agents tensioactifs sont ajoutés. L'injection d'air dans ce mélange entraîne l'emprisonnement des

Polluants qui remontent à la surface et forment une écume flottante qui est aisément récupérée puis traitée.

Le **lavage** est une méthode bon marché et rapide avec un rendement supérieur à 80%. Elle consiste à séparer les polluants du sol par injection d'eau. Elle est, en général, associée à une autre méthode comme un traitement biologique ou une injection d'air ou de vapeur. Cette méthode a déjà été utilisée sur les HAP.

La **désorption thermique** se fait sur des sols pollués par matières organiques facilement oxydables ; c'est le procédé physique le plus couramment utilisé actuellement pour la dépollution des sols contaminés par des HAP. Après excavation et broyage du sol, celui-ci est tamisé avant de subir le traitement

thermique : injection d'oxygène (1000°C) ou four étanche (600-800°C). Enfin, les gaz d'extraction sont traités.

B/ Procédés chimiques

Ces procédés sont généralement couplés à des procédés physiques. L'**extraction par solvant** permet d'enlever de nombreux polluants (les polluants doivent être solubles dans le solvant utilisé : alcanes, alcools, cétones). Ils sont introduits dans le sol où ils permettent l'extraction des polluants en les solubilisant.

Plusieurs méthodes d'extraction sont possibles : séparation naturelle et stripping, vaporisation (la pression est diminuée jusqu'à atteindre la pression de vapeur saturante) ou la modification de température afin de rendre le solvant non-miscible à l'eau. L'utilisation des solvants présente l'inconvénient de laisser des restes de ces solvants, eux-mêmes toxiques. Les procédés chimiques doivent être rigoureusement testés afin de déterminer la quantité de réactif à utiliser, et éviter qu'il se trouve en défaut ou en excès. Il est primordial de bien connaître les propriétés des sols afin d'éviter les risques de réactions secondaires qui mèneraient à la formation de nouveaux polluants [23].

C/ Bioremédiation

C'est la technologie la plus « écologique ». Elle repose sur l'utilisation d'organismes ou micro-organismes afin de dégrader ou d'extraire les polluants du sol. Le traitement en réacteur, ou **bioslurry**, consiste à créer une boue épaisse en mettant le sol en suspension avec de l'eau et des microorganismes. La biodégradation est alors stimulée par oxygénation et apport de nutriments. Cette technique s'applique particulièrement aux sols difficiles à traiter et aux substances peu biodégradables [22]. En effet, elle permet un contrôle plus efficace des conditions de la biodégradation (homogénéisation, chauffage, apports de nutriments...) ce qui entraîne une biodégradation accrue.

Le **landfarming** repose sur l'épandage de terres contaminées sur des surfaces plus ou moins préparées à l'avance. Le site est contrôlé tant au point de vue de son nivellement qu'au niveau des eaux de ruissellement. Le pH est ajusté et une supplémentation azotée est réalisée afin de stimuler l'activité microbienne.

Cette technique s'emploie principalement *ex situ*, mais également *in situ* sur une épaisseur ne dépassant pas 50 à 60 cm. Le traitement biologique par aération du sol ou **bioventing**, fournit aux microorganismes présents dans le sol l'oxygène nécessaire à la biodégradation par injection d'air [24].

Il est également possible d'injecter de l'eau oxygénée (H₂O₂) qui est une source d'oxygène pour les bactéries. L'eau oxygénée et des nutriments sont injectés dans le sol, l'eau oxygénée en excès est récupérée par des puits de pompage.

La **phytoremédiation** consiste à utiliser des plantes pour le traitement de contaminants de l'environnement. Cette méthode est peu coûteuse et applicable à la restauration des sites et au traitement des eaux contaminées par des composés organiques. Les plantes adsorbent, accumulent ou volatilisent ces composés, elles augmentent également l'activité microbologique de la rhizosphère dans le sol. La rhizosphère est particulièrement impliquée dans la dégradation des HAP. Dans ce cas, l'apport de la phytoremédiation devient difficile à étudier du fait des interactions entre sol, plantes, rhizosphère et micro-organismes. Néanmoins, des expériences ont montré une augmentation de la dégradation de pyrène en présence de plantes [25].

Des études récentes, menées au laboratoire, ont montré que les plantes distribuent de l'oxygène au niveau de la rhizosphère, augmentant ainsi l'activité bactérienne de dégradation du pyrène [26].

1.10.2 Techniques de dépollution de l'eau polluées

A/ Les moyens de lutte contre la pollution par les hydrocarbures

Lutte contre la pollution par les hydrocarbures, c'est d'une part diminuer volontairement les opérations, d'autre part, être capable d'agir sur les déversements accidentels.

Trois types de moyens doivent être envisagés :

- a) Les moyens préventifs et réglementaires;
- b) Les moyens de contrôle;
- c) Les techniques de lutte proprement dite.

- Les moyens préventifs et réglementaires : C'est moyens a l'objectif d'une part de diminuer la pollution délibérée et intentionnelle au transport et à l'usage des hydrocarbures et de leurs dérivés, d'autre part, de réduire au minimum les diversement accidentels.

Pour les rejets en mer dus aux navires et aux plats formes d'exploitation pétrolière ; ceux-ci doivent être déchargés dans les ports, et dans tous les cas, interdits des cotes et dans certaines zones vulnérables.

Donc une grande diversité de mesures doit contribue à diminuer ce type de pollution Elles peuvent être classées dans les catégories suivantes selon le tableau 1.4:

Tableau 1.4 : Les déférents types de préventions [27]

<p><i>Prévention susceptibles d'entraîner une pollution importante</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> – Règle de sécurité de la navigation – Dispositifs de séparation du trafic – Formation des équipages et veille – Capacité de manœuvre des grands navires – Normes de construction des pétroliers – Sécurité des procédures d'exploitation
<p><i>Réduction du risque de déversement</i></p> <p><i>Réduction des dommages causés en milieu marin</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> – Capacité de suivre d'un pétrolier – Limitation des dimensions des citernes – Facilité de transfert des cargaisons dans les citernes non endommagées – Mise au point de procédure de nettoyage obligatoire – Octroi aux états de pouvoirs suffisants pour leur permettre de prendre les mesures nécessaires en vue de réduire ou d'éliminer les dommages résultant d'accidents potentiels. – Mise en place d'une procédure de réparation des dommages.

- Moyens de contrôle : Le contrôle doit s'exercer également sur le milieu lui-même, il s'agit en effet de détecter, d'identifier et de surveiller d'une part les pollueurs, d'autre part le devenir des polluants.

Les techniques d'intervention : Les nombreuses techniques mises au point depuis 1967 permettent sans aucun doute de diminuer les dommages. Elles reposent sur un certain nombre de méthodes, notamment les suivantes, d'après [28]:

La dispersion des nappes au moyen d'agents chimiques réduisant la tension superficielle, et favorisant la biodégradation de fines gouttelettes d'hydrocarbures.

- La précipitation par absorbant;
- L'absorption ou agglomération par produits flottants;
- La rétention au moyen de barrages;
- La récupération par écrémage ou pompage;
- La combustion;
- Le stockage dans les réservoirs flottants.

CHAPITRE 2

BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES

2.1 BIODEGRADATION OXYDATIVE DES HAP PAR LES BACTERIES

Certaines bactéries sont capables d'utiliser les HAP comme unique source de carbone et d'énergie [29-31]. L'étude de la biodégradation des HAP par des souches bactériennes isolées à partir de sols contaminés a permis d'établir des voies métaboliques de dégradation, d'analyser l'organisation et la régulation des gènes qui codent pour les enzymes impliquées dans la dégradation [32]. Ainsi que d'identifier et caractériser ces enzymes [33, 34].

Ces informations sont essentielles avant de se pencher sur ce qui se passe dans les sols contaminés. On distingue la dégradation des HAP de «faible poids moléculaire», de 2 ou 3 noyaux aromatiques, des HAP de «haut poids moléculaire » pour lesquels le nombre de noyaux aromatiques est supérieur ou égal à 4. En effet, les enzymes impliquées dans la dégradation de ces deux types de HAP sont généralement différentes et peu d'informations sont disponibles sur les enzymes de dégradation des HAP de haut poids moléculaire. De plus, les bactéries isolées pour leur aptitude à dégrader les HAP de faible poids moléculaire sont souvent incapables de dégrader les HAP de plus de 3 noyaux aromatiques et réciproquement.

La biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes appelés hydrocarbonoclastes a été mise en évidence dès 1946 par ZoBell. Depuis cette date le nombre d'espèces bactériennes identifiées possédant cette propriété n'a cessé d'augmenter. Une grande diversité de microorganismes agit sur la biodégradation des hydrocarbures dans le sol tableau (2.1).

Tableau 2.1 : Microorganismes agissant sur la biodégradation des hydrocarbures [9].

Bactéries		Champignons
Gram --	Gram + ou gram variable	
<i>Pseudomonas</i>		<i>Aspergillus</i>
<i>Xanthomonas</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Arthrobacter</i>	<i>Acremonium</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Trichoderma</i>
<i>Agrobacterium</i>		<i>Fusarium</i>

Ces microorganismes sont capables de dégrader les hydrocarbures lorsqu'ils sont incorporés au sol. Ils assimilent préférentiellement les *n*-alcanes et alcanes ramifiés, et peu les cycloalcanes. Les composés à haut poids moléculaire ne sont pas utilisés : ce sont les alcanes polycycliques et les cycloalkyles aliphatiques.

2.2 Processus d'oxydation des hydrocarbures

L'étude de l'oxydation des hydrocarbures se base sur l'analyse des milieux de culture des microorganismes dont la croissance dépend de la nature de l'hydrocarbure utilisé comme source de carbone ainsi que des capacités métaboliques des cellules. Les produits détectés peuvent directement provenir du substrat, mais leur accumulation ultérieure peut être due au fait qu'ils sont faiblement métabolisés ou non métabolisés. D'autre part, plusieurs produits d'oxydation peuvent être de nature transitoire et n'apparaissent jamais en quantités détectables. Les informations obtenues par l'analyse cellulaire et des milieux de cultures permettent d'établir le processus métabolique de dégradation des hydrocarbures. La confirmation de ces mécanismes nécessite des vérifications enzymologiques. Quand la dégradation suit des chemins alternatifs, Ceux-ci doivent être vérifiés par inhibition sélective de chacun d'entre eux.

2.2.1 Voies métaboliques de dégradation des hydrocarbures saturés cycliques

Le pétrole brut est un mélange complexe contenant notamment des séries homologues de cyclanes alkylés tel que les n-alkyl-cyclohexanes et les n-alkyl-cyclopentanes [35,36]. De nombreux dérivés polycycliques sont aussi présents et certains d'entre eux, tels les stéranes et les triterpanes sont caractéristiques de l'origine du pétrole. Cette famille peut représenter entre 30 à 50% des hydrocarbures d'un pétrole brut [16].

L'accumulation de ces composés dans l'environnement, montre leur caractère relativement réfractaire aux attaques microbiennes. Cependant, un grand nombre de microorganismes incluant les champignons, les algues et essentiellement les bactéries sont capables de les dégrader [37-41].

Les cycloalkanes non substitués peuvent être oxydés et transformés en lactones hydrolysables, conduisant ultérieurement à un diacide Figure (2.1)[38].

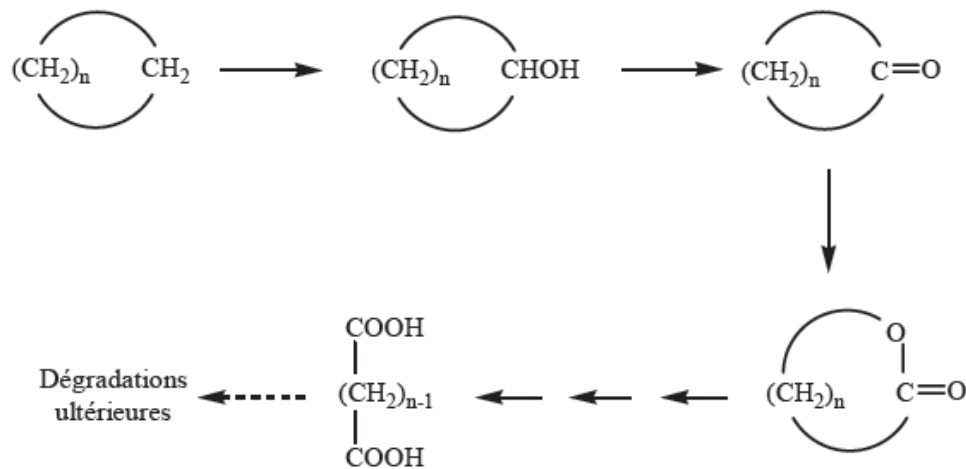


Figure 2.1 : Biodégradation des cycloalkanes non-substitués [42].

Les dérivés substitués des cycloalkanes sont plus facilement dégradés que les molécules parentales homologues. La dégradation des cyclohexanes n-alkyl substitués a été largement étudiée du fait de leur présence dans le pétrole brut et leur accumulation dans l'environnement.

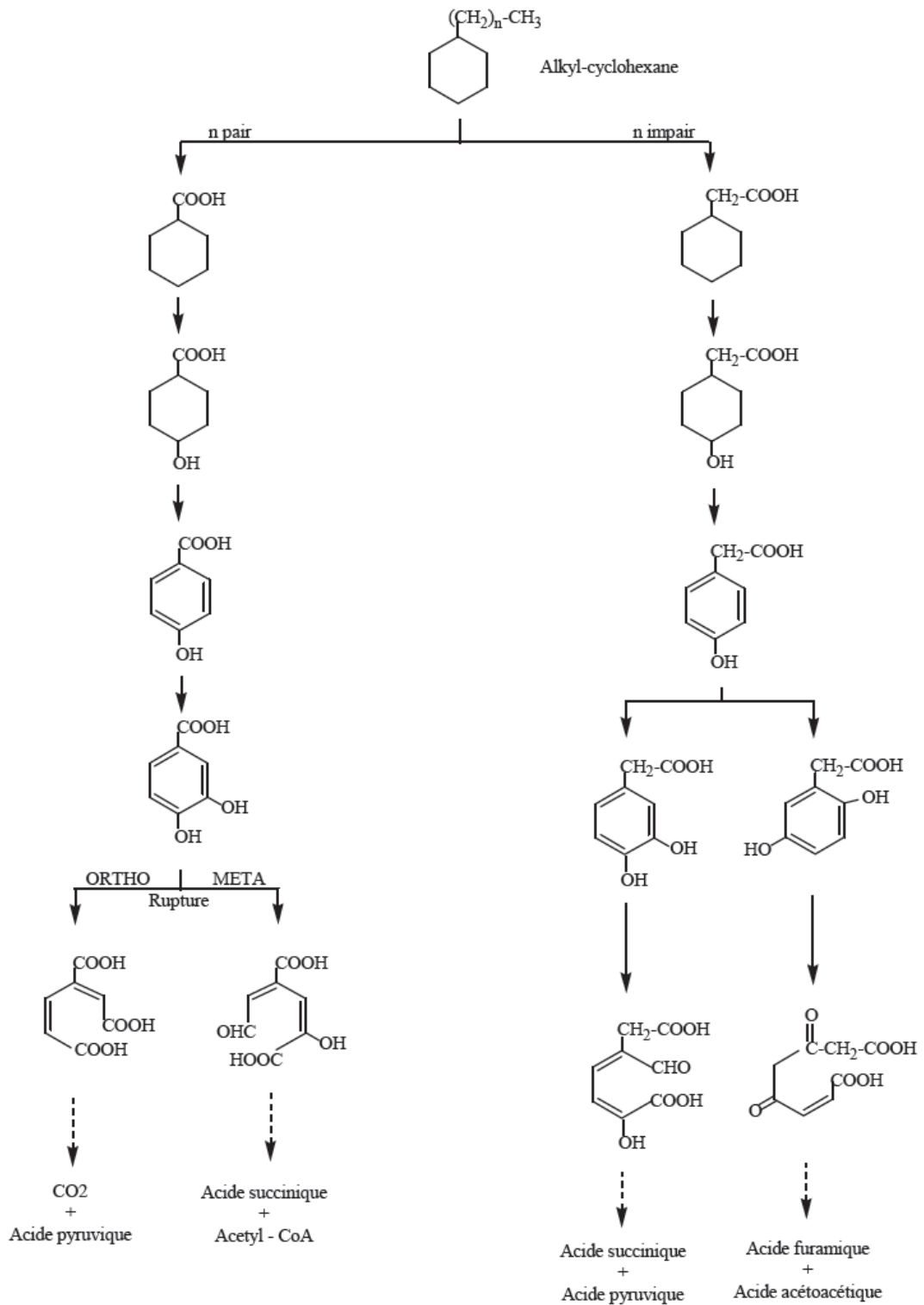


Figure 2.2 : Voies métaboliques de la dégradation des alkyl-cyclohexanes [42].

Généralement, le groupement méthyle terminal de la chaîne n-alkyl de ces composés est initialement oxydé en acide carboxylique ; un processus de dégradation par β -oxydation conduit ensuite à l'acide cyclohexylcarboxylique ou à l'acide cyclohexyl-acétique suivant que le nombre d'atomes de la chaîne alkyle est impair ou pair [40-42]. Ces derniers métabolites peuvent être dégradés par un mécanisme d'hydroxylation, aromatisation et une ouverture du cycle selon plusieurs mécanismes dépendant de la parité de la chaîne alkyle [43]. Les voies métaboliques sont rapportées sur la figure (2.2).

La présence d'un mécanisme d' α -oxydation la production de l'acide cyclohexylcarboxylique est possible à partir d'un alkyl-cyclohexane à nombre pair d'atome de carbone tel que le dodecyclohexane [44]. L'acide cyclohexyl-carboxylique formé est ensuite métabolisé par un mécanisme classique de β -oxydation, comme le montre la figure (2.3).

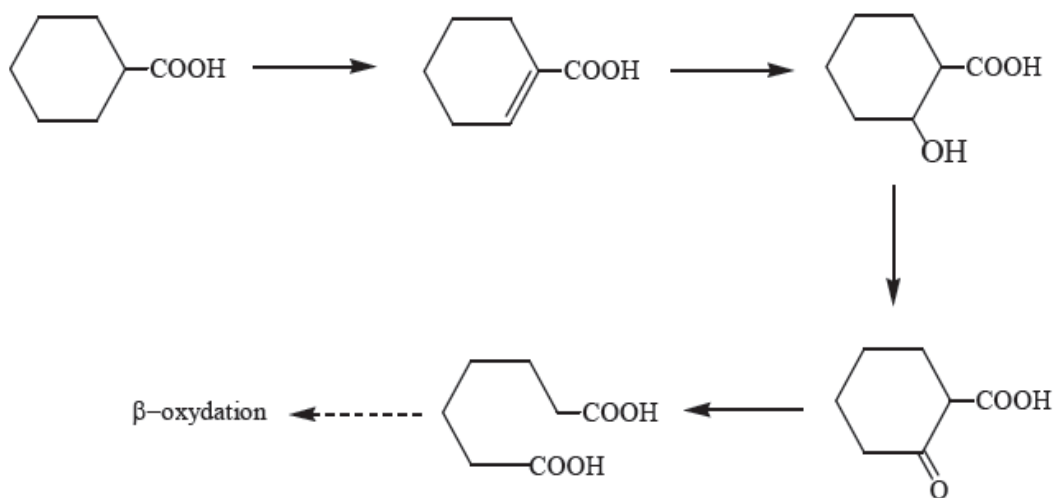


Figure 2.3 : Assimilation de l'acide cyclohexyl-carboxylique par *Alcaligenes* sp.PHY 12 suivant un mécanisme de β -oxydation [41].

Nous tenons à signaler que les phénomènes de co-oxydation sont très importants dans la dégradation totale de ce type de composés. En effet, certaines bactéries présentent une complémentarité enzymatique leur permettant la dégradation totale des cycloalcanes et des cyclanes substitués.

2.2.2 Biodégradation des hydrocarbures aromatiques

Les hydrocarbures aromatiques sont des polluants ubiquistes dans l'environnement. Plusieurs sortes d'hydrocarbures aromatiques existent avec une grande variété de substituants alkyles en certaines positions, dépendant de leurs origines. En plus de leur présence dans le pétrole (10% à 30% des hydrocarbures totaux), les hydrocarbures aromatiques sont produits en quantité importante par l'activité humaine, et notamment dans les processus de pyrolyse et de combustion mis en œuvre dans l'industrie, le transport et le chauffage. Ils sont détectés dans des échantillons d'air, d'eau et de sol, ainsi que dans les végétaux et les aliments. A part le cas particulier des aromatiques monocycliques, les pouvoirs mutagène et cancérigène apparaissent pour les hydrocarbures aromatiques polycycliques à partir de quatre cycles et sont particulièrement marqués pour les hydrocarbures polycycliques aromatiques à cinq et six cycles [45].

Plusieurs travaux de recherche ont fait l'objet de la distribution des hydrocarbures polycycliques aromatiques dans l'environnement et leurs effet sur la santé humaine : plusieurs de ces composés ont été reconnus cancérigènes.

Les hydrocarbures de faible poids moléculaire sont très solubles dans l'eau et par conséquent, très toxiques pour les microorganismes. Ils peuvent interagir avec la membrane cellulaire des microorganismes [46-47]. Ces interactions conduisent à des changements structuraux et fonctionnels de la membrane, ce qui par conséquent, peut diminuer la croissance et l'activité cellulaire.

La dégradation des hydrocarbures aromatiques par les microorganismes est très importante pour l'élimination de ces composés des systèmes aquatiques et terrestres. Les procaryotes et les eucaryotes ont des capacités enzymatiques qui leur permettent d'oxyder les composés aromatiques et polyaromatiques dont la taille peut varier du benzène au benzo(a)pyrène [48]. Les bactéries oxydent initialement les hydrocarbures aromatiques par l'incorporation de deux atomes d'oxygènes moléculaires dans le substrat pour former des dihydrodiols de configuration *cis* [49]. Cette réaction est catalysée par une enzyme, la dioxygénase. L'oxydation des *cis*-dihydrodiols conduit à la formation de catéchols. Généralement, l'oxydation se produit par une rupture *ortho* (rupture de la liaison entre les deux groupements hydroxyle) ou *méta* (rupture d'une liaison entre un

carbone portant un groupement hydroxyle et le carbone immédiatement voisin ne portant pas de groupement hydroxyle) du cycle qui est assuré par une autre dioxygénase [50], comme montre la figure (2.4) correspondant à la dégradation du benzène.

Pour les dérivés méthylés du benzène tel que le toluène ou le xylène, l'oxydation dépend du microorganisme [48]. L'attaque enzymatique initiale peut se faire au niveau du groupement méthyle pour donner l'acide benzoïque, ou sur le cycle aromatique pour former des méthyl-catéchols, ou sur les deux à la fois.

En ce qui concerne les alkyl-benzènes qui sont des produits caractéristiques du pétrole et dont la présence est utilisée comme indicateur de contamination pétrolière des sédiments et des organismes marins [46], plusieurs travaux de recherche se sont intéressés à l'étude de leur voies métaboliques de dégradation par les bactéries [42,51]. Généralement, il se produit une oxydation du groupement méthyle terminal qui donne l'acide phényl-alcoïque correspondant, qui par une série de β -oxydations peut conduire à l'acide benzoïque ou à l'acide phényl-acétique en fonction du nombre d'atomes de la chaîne alkyle. La dégradation peut s'arrêter à ce stade ou se poursuivre au niveau du cycle aromatique. Dans certains cas la co-oxydation par des populations microbiennes mixtes peut jouer un rôle très important dans la dégradation complète de ces composés [52]. Par ailleurs, la photo-oxydation des alkylbenzènes permettait d'accélérer leur dégradation par les bactéries [41].

2.2.3 Accession des microorganismes aux composés organiques hydrophobes

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 ($< 0,1 \text{ g.L}^{-1}$), les microorganismes ont développé des stratégies pour venir au contact du substrat. Quatre modes d'accession, illustrés dans la figure (2.4) ont été avancés pour expliquer l'assimilation des hydrocarbures par les microorganismes [53].

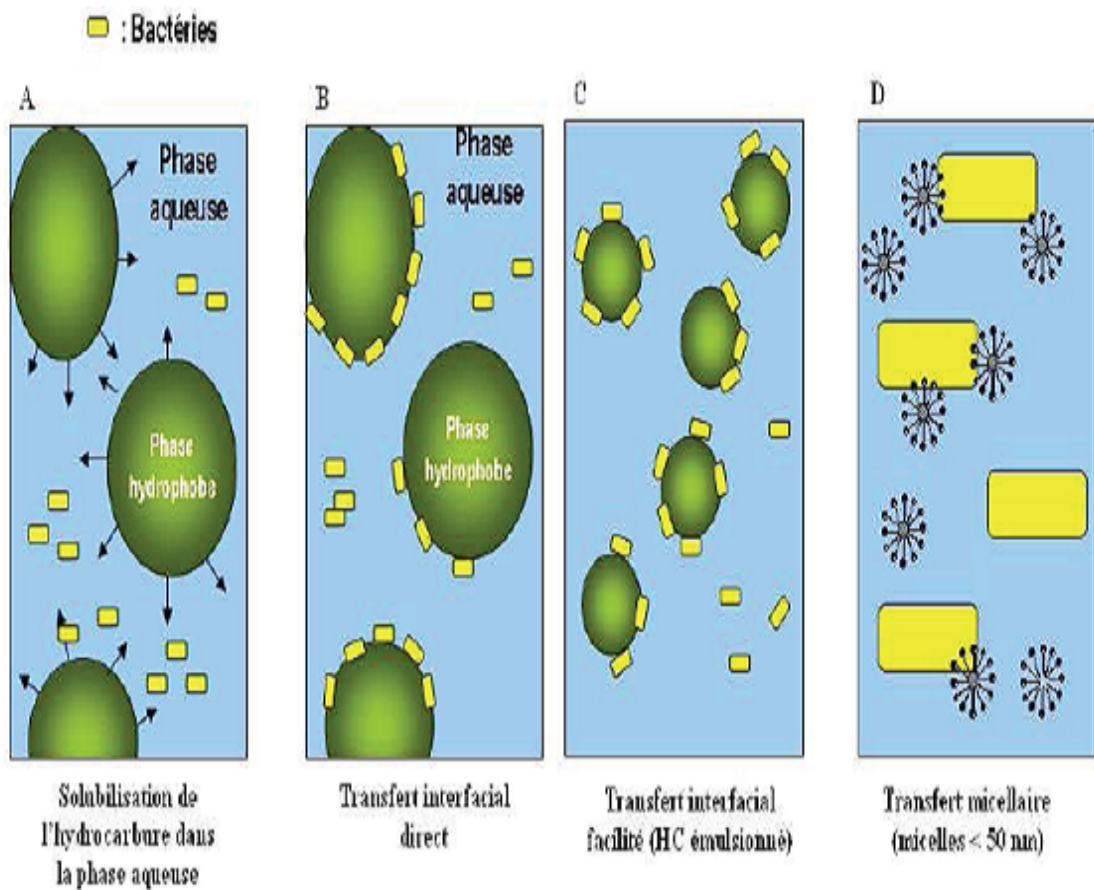


Figure 2.4: les mécanismes d'accession des microorganismes aux hydrocarbures [51].

2.3 FACTEURS PHYSIQUES ET CHIMIQUES AFFECTANT LA BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES

La biodégradation des hydrocarbures est l'un des premiers mécanismes conduisant à la transformation de ces polluants en produits moins toxiques. Les travaux de recherche sur l'oxydation des hydrocarbures par les microorganismes ont montré que ce processus dépend de la structure chimique des hydrocarbures et des conditions environnementales. Les facteurs physico-chimiques influant sur la vitesse de biodégradation microbienne sont : La température, l'oxygène disponible, le pH, les éléments nutritifs, la pression hydrostatique [53,54].

2.3.1 Composition chimique des hydrocarbures

La spécificité des substrats à l'attaque microbienne a été largement étudiée. Atlas, Leahy et Colwell [53,54], ont classé les composés du pétrole en quatre familles :

Les hydrocarbures saturés, les aromatiques, les asphaltènes (phénols, acides gras, cétones, esters et porphyrines) et les résines (pyridines, quinolines, carbazoles, sulfoxydes et amides). Ces composés diffèrent par leur susceptibilité à l'attaque microbienne. Ainsi la vitesse de biodégradation est plus élevée pour les saturés, viennent ensuite les aromatiques légers, les aromatiques à haut poids moléculaire, les composés polaires ayant la vitesse de dégradation la plus faible.

Les hydrocarbures saturés incluent les n-alcanes, les alcanes ramifiés et les cycloalcanes (naphtènes). Les alcanes normaux ou à chaînes linéaires sont les plus abondants (10 à 40% des hydrocarbures totaux dans le cas du pétrole léger et peuvent atteindre dans certains cas 60%) et les plus rapidement dégradables : les n-alcanes à nombre de carbone supérieur à 44 peuvent être métabolisés par les microorganismes, mais ceux ayant de 10 à 24 atomes de carbone (C_{10} — C_{24}) sont généralement les plus facilement dégradables.

Les alcanes ramifiés sont plus récalcitrants à la biodégradation que les n-alcanes et plus le nombre de ramifications augmente, moins ces composés sont susceptibles à la dégradation microbienne. Les hydrocarbures cycliques constituent une fraction importante des hydrocarbures dans la plupart des bruts pétroliers, ils sont plus difficilement dégradables que les deux séries précédentes

à cause de leur toxicité suite à l'interaction avec la membrane cellulaire des microorganismes [46]. Les expériences montrent de façon non équivoque que la biodégradation des cycloalcanes est très limitée [54]. La non accumulation des hydrocarbures cycliques dans l'environnement, implique des phénomènes non conventionnels de dégradation, tel que l'intervention des phénomènes de co-oxydations impliquant plusieurs souches microbiennes dont l'équipement enzymatique est complémentaire [53].

Les hydrocarbures aromatiques constituent généralement 10 à 30% des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier [39]. Des études sur la transformation de ces hydrocarbures par les microorganismes ont montré leur toxicité cellulaire [55]. Les hydrocarbures aromatiques de faible poids moléculaires constituent généralement 2 à 20% des hydrocarbures des pétroles légers et moins de 2% des hydrocarbures des pétroles lourds, tels que les alkyl-benzènes légers qui sont les plus toxiques à cause de leur solubilité, mais peuvent cependant être métabolisés par les microorganismes quand ils sont présents en faible concentration. La structure moléculaire de ces substrats détermine la vitesse de leur dégradation : un grand nombre de substituants méthyle empêche l'oxydation initiale [54].

Les polyaromatiques sont moins toxiques pour les microorganismes, mais ils sont rarement métabolisés, et quand ils le sont leur biodégradation est lente : c'est ce qui explique leur accumulation dans l'environnement. Ces hydrocarbures aromatiques lourds constituent 2 à 10% des hydrocarbures des pétroles légers et plus de 35% des hydrocarbures des pétroles lourds.

Les asphaltènes et les résines constituent une faible partie du pétrole brut, 1 à 5% du pétrole léger alors qu'un pétrole lourd peut contenir plus de 25% d'asphaltènes et de 20% de résines. Cette dernière classe de composés pétroliers n'est pas biodégradable ou très lentement dégradable.

La biodégradable des pétroles bruts est très fortement dépendante de leur composition [54] ; à une température déterminée, un pétrole léger est plus susceptible d'être biodégradé qu'un pétrole lourd.

Ratledge en 1978 [55], a rassemblé des règles qui ont une application générale à l'ensemble des microorganismes :

1. les hydrocarbures aliphatiques sont assimilés par une grande variété de microorganismes, les composés aromatiques peuvent être oxydés mais sont assimilés par quelques bactéries seulement.
2. les n-alcanes à chaînes courtes, tel que le n-nonane ne sont pas toujours assimilés, mais peuvent être oxydés. Seules quelques bactéries ont la capacité de croître sur des alcanes plus courts que le n-octane. Quand la longueur de chaîne augmente au delà de C₉, le facteur de production augmente, mais la vitesse d'oxydation décroît.
3. les composés saturés sont plus rapidement dégradés que les insaturés.
4. les composés ramifiés sont moins rapidement dégradés que les composés non substitués.

2.3.2 Etat physique et concentration des hydrocarbures ou des pétroles

Les hydrocarbures à faibles poids moléculaires 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 [55]. Rapporte que les n-alcanes de courtes chaînes (<C₉) sont très toxiques pour les microorganismes alors que ceux plus longs que le n-nonane, les alcènes (>C₁₂), les alkyle-bromides (>C₁₀) et les alcanols (>C₁₄) ne sont toxiques pour aucun microorganisme.

La dégradation des n-alcanes longs ($\geq C_{12}$), pour lesquels les solubilités sont inférieures à 0,01mg/l s'effectue à des vitesses qui dépassent les vitesses de dissolution des hydrocarbures et sont fonction de la surface des hydrocarbures disponibles pour l'émulsification et leur fixation par les cellules [56].

2.3.3 Influence de la température

La température est un paramètre pouvant influencer la biodégradation du pétrole en modifiant son état physique, sa composition chimique, l'activité physiologique des microorganismes et, par conséquence, la vitesse de

dégradation des hydrocarbures, ainsi que la nature et la concentration des espèces microbiennes présentes [53,54].

A basse température, la viscosité du pétrole augmente, la volatilisation des composés toxiques pour les microorganismes tels que les alcanes de faibles poids moléculaires est réduite et leur solubilité dans l'eau augmente par diminution de leur volatilisation, ce qui entraîne un ralentissement du métabolisme des microorganismes [56].

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 [57,58]. Si l'oxydation des hydrocarbures a été observée à des températures inférieures à 0°C [59], ou élevées 70 – 80°C [60] le maximum de l'activité métabolique des microorganismes est généralement observé à une température comprise entre 30 et 40°C[61]. Au delà de la température optimale de croissance et de biodégradation, on assiste à une augmentation de la toxicité des hydrocarbures et une diminution de l'activité métabolique.

Selon Roling et Head [62] mentionnent une inhibition totale de la biodégradation au delà de 80 – 90°C malgré l'isolement de bactéries thermophiles (*thermotoga*, *thermoanaerobacter*, *thermodesulfobacterium*) et d'Archae hyperthermophiles (*Thermococcus*, *Archeaoglobus*) dans des puits de pétrole où la température peut atteindre 100°C.

2.3.4 Influence de l'oxygène

L'étape initiale du catabolisme des hydrocarbures aliphatiques, cycliques et aromatiques par les bactéries et les champignons inclut l'oxydation de ces substrats par l'intermédiaire d'hydroxylases et d'oxygénases, pour lesquelles l'oxygène moléculaire est indispensable [43,53]. Les conditions aérobies sont, par suite, nécessaires pour cette voie d'oxydation microbienne des hydrocarbures dans l'environnement. Le problème de la limitation de l'oxygène moléculaire dans les couches superficielles des colonnes d'eau est inexistant, en effet la concentration en oxygène est suffisamment élevée pour assurer l'activité des

microorganismes hydrocarbonoclastes. Théoriquement, 3,5g d'oxygène sont nécessaires pour l'oxydation complète de 1 g de pétrole ; la quantité d'oxygène dissoute dans 320m³ d'eau de mer est nécessaire pour l'oxydation de 1L de pétrole brut [62].

Dans un site très pollué, on aboutira fréquemment à un ralentissement de la biodégradation par suite d'une carence en oxygène. Les facteurs influençant la biodégradation des hydrocarbures par la bactérie *Acinetobacter calcoaceticus*, ont constaté une augmentation de la dégradation des hydrocarbures totaux et des n-alcanes de 10% après un rapport supplémentaire d'oxygène par agitation.

La concentration en oxygène a été identifiée comme une variable limitante de la vitesse de la biodégradation du pétrole dans les sols [63] et les eaux souterraines [64].

2.3.5. Influence des éléments nutritifs

Le rejet des hydrocarbures dans les environnements, qui contiennent des éléments nutritifs inorganiques en faibles concentrations, conduit généralement à des rapports carbone/azote et carbone/phosphore très élevés, défavorables pour la croissance microbienne [53]. Le pétrole lui-même contient de tels nutriments en petites quantités, mais ils sont toujours présents sous forme de composés hétérocycliques (exemple : dérivés de la pyridine et du pyrrole pour l'azote) ou organométalliques complexes ; ils ne sont donc pas utilisables par les microorganismes [43]. Les sources d'azote et de phosphore sont toujours faibles, surtout pendant les périodes de forte activité des organismes photosynthétiques.

L'azote et le phosphore sont aussi des facteurs limitant la biodégradation des hydrocarbures dans les sols [57].

2.3.6 Effet du pH

L'influence du pH a été très peu étudiée, mais il ne semble jouer qu'un rôle relativement mineur en milieu marin. Contrairement à la plupart des écosystèmes aquatiques, 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 quelque 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 [53]. La dégradation des hydrocarbures est plus élevée dans des conditions légèrement basiques [65,66].

2.4 BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES DANS LES GISEMENTS DE PETROLE ET VOIES ANAEROBIES

2.4.1 Biodégradation des hydrocarbures dans les puits de pétrole

La bidirectionnel du pétrole conduit à une diminution du pourcentage des hydrocarbures facilement biodégradables (*n*-alcanes, alcanes monocycliques, phénylalcane) et par conséquent une augmentation de sa densité, de sa teneur en soufre, de son acidité et sa viscosité [67]. Ces changements ont des conséquences économiques négatives sur la production du pétrole et les opérations de son raffinage.

L'activité microbologique dans les puits de pétrole peut être le résultat des activités humaines par introduction de microorganismes et de produits chimiques (nutriments, accepteurs d'électrons) lors de l'exploitation des gisements. Ces derniers peuvent stimuler la croissance microbienne et donc induire des modifications dans la composition du pétrole.

La biodégradation aérobie des hydrocarbures dans les gisements de pétrole a été largement étudiée. Cependant, il a été montré que l'apport en oxygène dans ces gisements est insuffisant pour assurer l'activité microbologique aérobie [68], il a donc été suggéré que la biodégradation anaérobie est le processus prépondérant dans la dégradation des hydrocarbures dans les roches réservoirs de pétrole. En effet, les premières bactéries isolées des eaux provenant des champs de pétrole étaient anaérobies et Connan et ses collaborateurs ont montré la présence de différents organismes anaérobies dans les gisements de pétrole. Ils ont avancé l'hypothèse que ces organismes sont majoritairement responsables de la dégradation des hydrocarbures en profondeurs. La détection de métabolites spécifiques, produits uniquement par voies métaboliques anaérobies a confirmé cette hypothèse [60].

Les organismes majeurs responsables de la dégradation des hydrocarbures dans les réservoirs de pétrole sont les bactéries et les archaea et la connaissance du degré de dégradation du pétrole est très importante avant toute exploitation [69]. Cette dégradation se passe à une vitesse très faible de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-7} kg d'hydrocarbures /kg de pétrole /an, ce qui nécessite des millions d'années pour perturber la composition du pétrole dans les roches réservoirs [70]. Par exemple : 15 millions d'années sont approximativement nécessaires pour éliminer les *n*-alcanes d'un pétrole lourd et 5 millions d'années pour un pétrole léger.

Les conditions physico-chimiques dans les réservoirs de pétrole telles que le pH, les conditions redox et la température, représentent des obstacles dans l'isolement et l'étude des microorganismes présents [71]. La reproduction des conditions *in situ* permet généralement d'isoler des organismes représentatifs

La plupart des informations obtenues ont été recueillies à partir d'échantillons de pétrole provenant des réservoirs : des bactéries thermophiles (*Thermotoga*, *Thermoanaerobacter*, *thermodesulfobacterium*) et des archaea hyperthermophiles (*Thermococcus*, *Archeaoglobus*) ont été isolées d'échantillons de pétrole provenant d'un gisement à 1670 mètres de profondeur.

2.4.1.1 Voies de dégradation anaérobie

De nombreux microorganismes ont développé des capacités métaboliques leur permettant d'utiliser les hydrocarbures comme donneurs d'électrons et comme source de carbone pour la synthèse cellulaire.

La dégradation des hydrocarbures par les microorganismes dans des conditions aérobies est bien connue depuis plus d'un siècle, alors que l'utilisation de ces composés dans des conditions anoxiques (sédiments profonds et réservoirs de pétrole) n'a été étudiée que durant la dernière décennie. En effet, il a été largement admis que pour les bactéries dégradant les hydrocarbures en aérobiose, la présence d'oxygène moléculaire est indispensable pour l'activation enzymatique initiale des hydrocarbures [48]. Cette activation se traduit par l'introduction d'un ou plusieurs groupements hydroxyles dans la molécule apolaire.

L'absence de l'oxygène moléculaire dans les environnements anoxiques nécessite un nouveau mode d'activation biochimique pour convertir les hydrocarbures apolaires en des composés comportant des groupements fonctionnels : la présence de groupements fonctionnels (hydroxyle, carboxyle ou carbonyle) dans les composés organiques est indispensable pour toute réaction d'oxydation ultérieure [72].

Différentes souches de bactéries anaérobies capables de dégrader les hydrocarbures ont été isolés de sites contaminés. Ces bactéries utilisent le nitrate, le fer (III) ou le sulfate comme accepteurs d'électrons figure (2.5). Un mécanisme de dégradation par méthanogènes peut avoir lieu dans des environnements où l'oxygène, le nitrate, le fer (III) et le sulfate sont totalement absents.

Le tableau (2.2) montre des exemples de bactéries anaérobies dégradant les hydrocarbures aliphatiques et aromatiques classées en fonction de l'accepteur d'électrons [73].

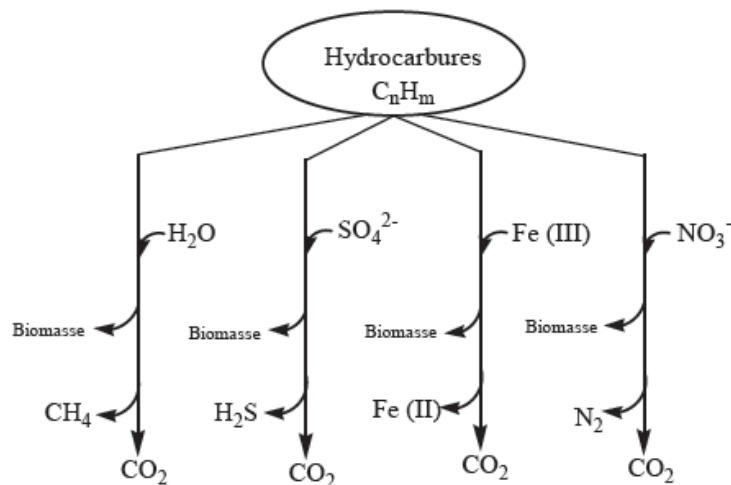


Figure 2.5 : Les différentes voies métaboliques de la dégradation des hydrocarbures en fonction de l'accepteur d'électrons [73].

Tableau 2.2 : Exemples de bactéries anaérobies dégradant les hydrocarbures aromatiques et aliphatiques [74]

Espèce ou souche bactérienne	Hydrocarbures métabolises	Références
Bactéries dénitrifiantes <i>Thauera aromatica</i> T1 <i>Azoarcus tolulyticus</i> Td15 <i>Azoarcus</i> sp. souche EB1 Souche HxN1 Souche HxN1	Toluène Toluène, <i>m</i> -xylène Ethylbenzène Alcanes (C6-C8) Alcanes (C14-C20)	Evans et al. (1991) Fries et al. (1994) Ball et al. (1996) Ehrenreich et al. (2000) Ehrenreich et al. (2000)
Bactéries réduisant le fer <i>Geobacter metallireducens</i> GS15	Toluène	Loveley et Lonergan (1990)
Bactéries réduisant le sulfate <i>Desulfobacula toluolica</i> <i>Desulfobacterium cetonicum</i> Souche AK-01	Toluène Toluène Alcanes (C13-C18)	Rabus et al. (1993) Harms et al. (1999) So and Young (1999)

La dégradation des hydrocarbures aromatiques et en particulier le toluène a été la plus étudiée du fait qu'elle assure une croissance rapide des bactéries. Des études récentes, ont montré que l'étape initiale dans la dégradation des *n*-alcanes, du toluène, des xylènes et de l'éthylbenzène par les bactéries dénitrifiantes se traduit par l'introduction d'une molécule de fumarate pour former un substituant succinate [75] comme le montre la Figure 2.6.

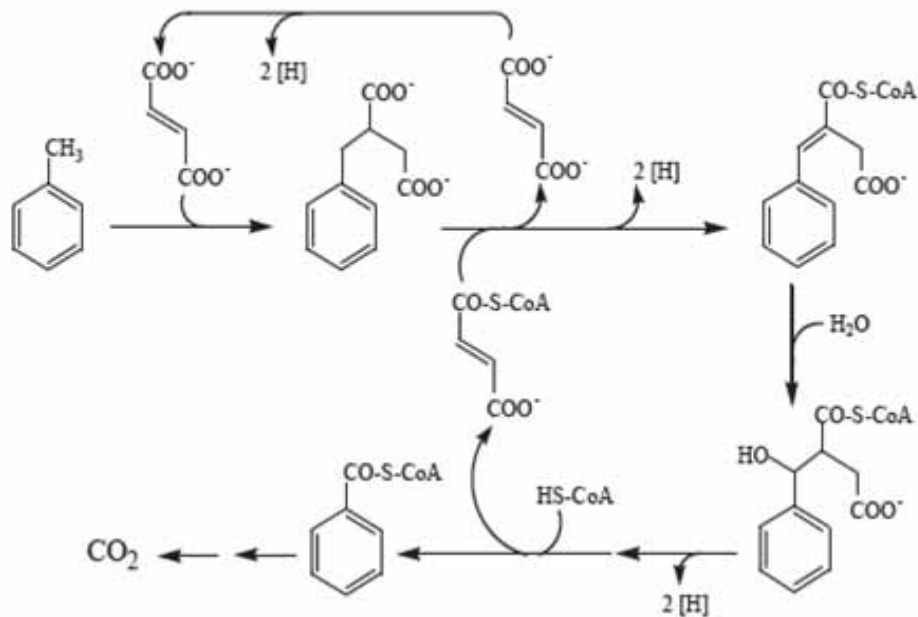


Figure 2.6 : Métabolisme de dégradation du toluène par les bactéries dénitrifiantes [76]

La dégradation du propylbenzène par les bactéries dénitrifiantes s'effectue par hydroxylation pour donner le 1-pheny-1-propanol et ensuite la propiophénone figure (2.7) [77].

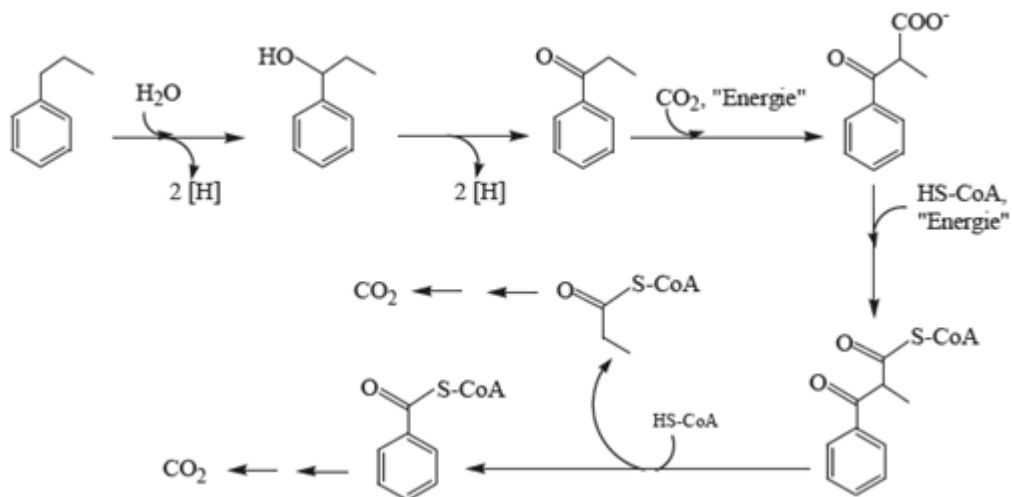


Figure 2.7 : Métabolisme de dégradation du propylbenzène par les bactéries dénitrifiantes [77].

La dégradation anaérobie du toluène et des alkylbenzènes tel que le *m*-xylène ou l'éthylbenzène a été également étudiée pour différents accepteurs d'électrons. L'activation des hydrocarbures saturés s'effectue par l'addition d'un composé carboné plutôt que par désaturation ou hydratation. Enfin, il faut noter que la dégradation des hydrocarbures en anaérobiose compte encore des domaines mal connus.

CHAPITRE 3

PARTIE EXPERIMENTALE

3. MATERIEL ET METHODES

3.1. Isolement des souches bactériennes aérobies

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 (CF. photo de la figure 3.1). Les prélèvements de sol sont réalisés à différentes profondeurs (0 à 20 cm). Ces souches bactériennes ont été préalablement sélectionnées pour leurs capacités à utiliser le pétrole brut comme source unique de carbone et d'énergie en utilisant un milieu solide gélosé à base du pétrole brut. L'isolement des souches a été effectué à différentes températures (30 °C, 37 °C et 45 °C) (CF. Photos 3.2).



Figure 3.1 (a) : Sol anciennement contaminé du pétrole de la région de Hassi Messaoud, sud d'Algérie.



Figure 3.1 (b) : Sol récemment contaminé du pétrole de la région de Hassi Messaoud, sud d'Algérie.

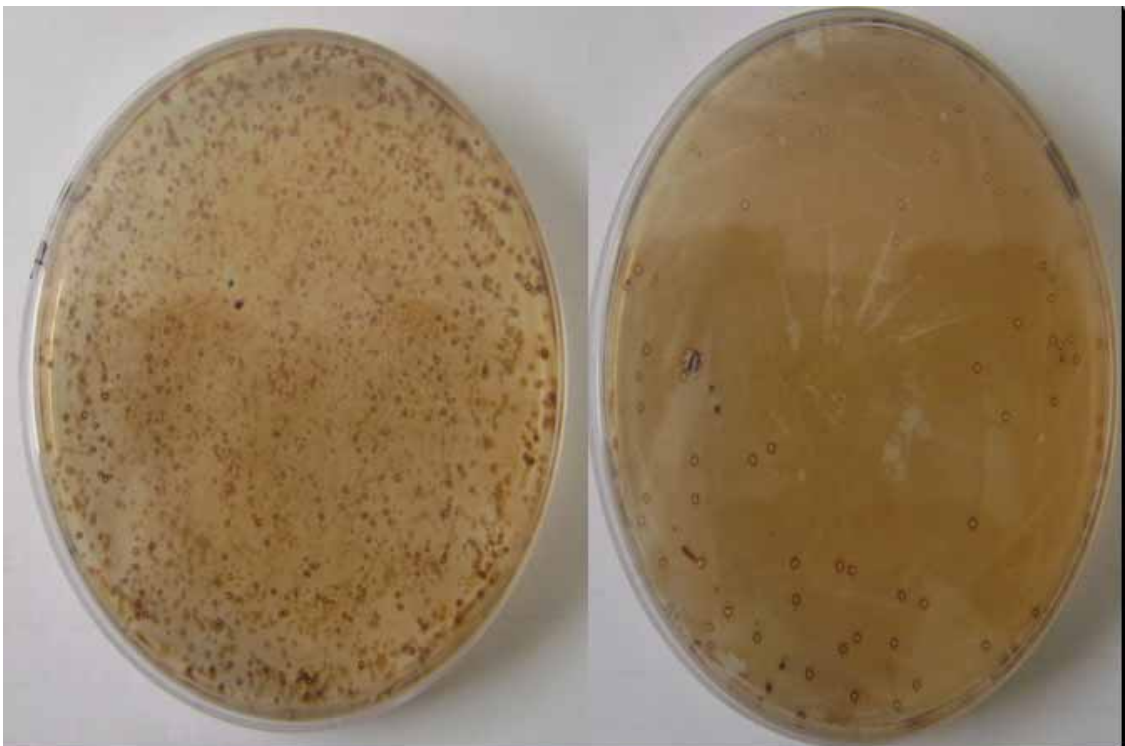


Figure 3.2 : Isolement des souches bactériennes sur milieu gélosé à base du pétrole brut

Le milieu de culture liquide utilisé est à base de sels minéraux, sa composition g l^{-1} 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 d'oligo-éléments, le pH est ajusté à 7,0. Après la stérilisation du milieu à 120 °C pendant 20 mn, 2% (p/v) de sol contaminé par le pétrole a été ajouté. La dégradation a été réalisée dans des erlens de 250 ml contenant 100 ml du milieu de culture, sous une agitation de 180 tr/mn, deux températures d'incubation ont été utilisées. Le pétrole brut est la seule source de carbone et d'énergie dans ce milieu (CF. Photos 3.2).



Figure 3.3 : Sélection des souches bactériennes sur milieu liquide à base du pétrole brut

Des repiquages successifs ont été effectués chaque 48h et les cultures ont été suivies par l'observation microscopique, par la mesure de DO à 600 nm et par le suivi de la dégradation de la couche huileuse du pétrole durant la période d'incubation. L'observation microscopique a donné plusieurs formes de bactéries : bacilles et coques qui se présentent sous forme isolée, diplo ou chaînettes.

Pour la purification des souches, le choix des colonies a été fait par la forme et la couleur. La purification se fait par strie sur le milieu solide. Trois repiquages successifs de purification ont été réalisés afin d'obtenir des souches pures, la vérification se fait par l'observation microscopique.

3.2 Screening des souches performantes

3.2.1 Souches et conditions de culture

Au total, dix souches microbiennes retenues, ayant une aptitude biodégradatives et poussent bien à 45 °C, sont codées comme suit : *K7D*, *K1N*, *K1C*, *K1H*, *K1F*, *K1D*, *K7H*, *K7J*, *K7* et *K7B*. Ces souches sont réactivées sur milieu LB liquide et conservées sur milieu LB gélose et repiquées chaque un (01) mois. La composition du milieu LB est donnée dans l'annexe. Une préculture est préparée pour chaque souche à partir des colonies poussées sur milieu solide. Une incubation de 24h est suffisante pour obtenir une croissance optimale des souches à tester.

Le milieu de dégradation renferme 9 ml d'un milieu minéral + 2% de Cyclohexanol représentant la seule source du carbone et d'énergie + 1 ml d'une préculture bactérienne préalablement préparée. Un ajout de 0.5 g l⁻¹ d'extrait de levure était nécessaire pour le bon démarrage de croissance. Le pH est ajusté à 7.0. Les dix souches ont été testées en culture pure contenant 10 ml du volume réactionnel dans des tubes à essai (16 cm x 1 cm). L'incubation a été assurée en batch (sans agitation) à une température de 45 °C.

3.2.2 Suivi de la biodégradation :

Nous avons pris comme modèle type d'une substance successible d'être dégradée le Cyclohexanol à 2% (v/v). Il représente la seule source de carbone et d'énergie dans le milieu de culture.

L'échantillon a été préparé en prélevant chaque jour un volume de 10 ml à partir du milieu de culture d'où la biomasse a été éliminée par centrifugation à 5000 tr/min. Les mesures ont été réalisées aussi bien avec le test que avec les témoins (un témoin chimique sans souche bactérienne et un témoin biologique sans Cyclohexanol incubés sous les mêmes conditions de celui du test).

La dégradation a été suivie par la mesure de l'absorbance d'HC comme détaillé dans la section méthodes d'analyse.

3.3 Croissance sur milieu à base d'hydrocarbure

Nous avons retenu deux souches (*K1D* et *K7D*) dites performantes suite à leur fort potentiel de dégrader le Cyclohexanol dans la partie screening dont nous

avons préparé les précultures à partir des colonies poussées sur milieu solide (disque de 0.5 cm pleine de colonie transféré dans 50 ml de milieu LB). Après 24h d'incubation à 45 °C nous avons obtenu un trouble de croissance qui servira à une inoculation optimale.

Le milieu de dégradation est inoculé à raison de 5% (v/v) et le pH de milieu est ajusté à 7.0. L'incubation a été assurée en batch (sans agitation) à une température de 45 °C pendant 24h.

Il est à noter que l'hydrocarbure prêt comme model est le Cyclohexanol avec une concentration initiale de $C_0 = 500 \text{ mg l}^{-1}$.

La mesure de la turbidité et la détermination de la masse bactérienne a été suivie durant 168h en prélevant chaque 24h :

- 10 ml pour la mesure directe de la turbidité.
- 40 ml sont filtrés sur papier microfibre (0,45 μm).et séchés à 48 °C pendant 48h pour mesurer la biomasse.

3.4 Aptitude de biodégradation

- L'aptitude de dégradation de deux souches (K1D et K7D) a été comparée en utilisant deux classes d'HC : cycliques (Cyclohexanol et Cyclohexanone) et aromatiques (Phénol et Benzène).

- Le milieu de culture renfermant 9 ml de milieu minéral est additionné à raison de 500 mg l^{-1} pour les composés cycliques et 15 mg l^{-1} pour les composés aromatiques (le choix de la concentration est justifié par les limites de la toxicité). Ce milieu est inoculé par 1 ml de préculture et le pH ajusté à 7.0. L'incubation est réalisée en batch à 45 °C pendant 15 jours en cas d'HC cyclique et 31 jours pour l'HC aromatique.

3.5 Optimisation des paramètres de la biodégradation

Les deux souches (K1D et K7D) ont été testées pour l'optimisation des paramètres influençant la dégradation en prenant le Cyclohexanol (500 mg l^{-1}) comme seul représentant de la source du carbone et d'énergie dans le milieu de culture.

Trois paramètres ont été étudiés, à savoir, le pH, la température et la concentration d'HC :

- Les valeurs du pH du milieu sont ajustées à 4, 7 et 9.
- Les températures d'incubation sont 45, 50 et 55 °C.
- Les concentrations d'HC sont : 500-20000 mg l⁻¹ pour le Cyclohexanone et 15-150 mg l⁻¹ pour le Phénol et le Benzène.

- Sachant que le pH du milieu de dégradation pour les trois HC est ajusté à 4.0 et l'incubation est assurée en batch à 45 °C.

3. 6 Mesure et suivi de la biodégradation

3.6.1 Spectroscopie UV-visible :

Les maxima d'absorption des différents produits utilisés sont obtenus à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible de type CHIMADZU UV-1700 Pharma Spec. Les HC sont analysés en solution avec une cellule en quartz de 1 cm d'épaisseur. Les spectres ont été tracés de 800 à 200 nm après réalisation d'une ligne de base sur toute la longueur d'onde du spectre à tracer avec la cuve remplie d'eau distillée.

N.B. Les cinétiques de dégradation ont été suivies en mesurant les absorbances suivantes : 288 nm pour le Cyclohexanol, 276,5 nm pour le Cyclohexanone, 270 nm pour le phénol et 262 nm pour le Benzène.

3.6.2 Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Les spectres IRTF sont enregistrés à l'aide d'un appareil de type SHIMADZU de type FTIR 9800 muni du logiciel Hyper, la résolution est de 4 cm⁻¹ moyennant 40 balayages dans le domaine 4000 – 400 cm⁻¹. Le logiciel BIO-RED IR Search Master a été utilisé pour le traitement des spectres obtenus.

L'échantillon d'HC est préparé par micropastillage de 1 ou 2 mm dans du bromure de potassium (KBr) à une concentration d'environ 0,004% (1 mg HC/ 250 mg KBr).

3.6.3 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Les sous produits de la biodégradation sont caractérisés par chromatographie en phase gazeuse en utilisant un appareil de marque SHIMADZU de type GC-17A muni d'un détecteur FID et d'un intégrateur. Les deux colonnes utilisées sont : la colonne capillaire OV17 et la colonne SE 20.

- La colonne OV 17 : une colonne capillaire moyennement polaire de type FSCW de 25 m de long, son diamètre interne est de 0,25 mm et l'épaisseur du film de phase stationnaire déposée est de 0,25 μm , son température maximale 260°C, le gaz vecteur est l'azote, les étalons sont en majorité de grade analytique.

- La colonne SE 20 : une colonne capillaire apolaire de type FSCW de 25 m de long, son diamètre interne est de 0,25 mm et l'épaisseur du film de phase stationnaire déposée est de 0,25 μm , son température maximale 320°C, le gaz vecteur est l'azote, les étalons sont en majorité de grade analytique.

Les résultats sont représentés sous forme de chromatogrammes intégrés qui permettent la détermination de la concentration d'HC.

3.7 Caractéristiques des hydrocarbures utilisés

Les hydrocarbures utilisés comme source de carbone dans les différents milieux de culture au long de cette étude sont indiqués dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1: Liste des hydrocarbures utilisés comme source de carbone.

Hydrocarbure	Formule chimique	Solubilité dans l'eau à 20°C	Origine
Cyclohexanol	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}$	36,00 g/l	Merck
Cyclohexanone	$\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CO}$	25,00 g/l	Panreac
Phénol	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$	82,00 g/l	Panreac
Benzène	C_6H_6	1,80 g/l	Fluka

CHAPITRE 4

RESULTATS ET DISCUSSION

4.1 Screening des souches performantes

Les dix souches microbiennes sont des souches thermophiles poussent bien à 45 °C, elles utilisent le pétrole brut comme unique source de carbone et d'énergie. Cette étape nous a permis de sélectionner deux souches dites performantes qui font l'objet du reste de travail.

Les résultats, rassemblés dans la figure 4.1, représentent la dégradation du Cyclohexanol en calculant le pourcentage de dégradation comme suit :

$$\frac{DO_t - DO_{t_0}}{D_{t_0}} \times 100\%$$

DO_t : Densité optique du milieu contenant le Cyclohexanol à $\lambda = 288$ nm au temps t de l'incubation (en jour) ; DO_{t_0} : Densité optique du milieu contenant le Cyclohexanol au temps t_0 (avant incubation).

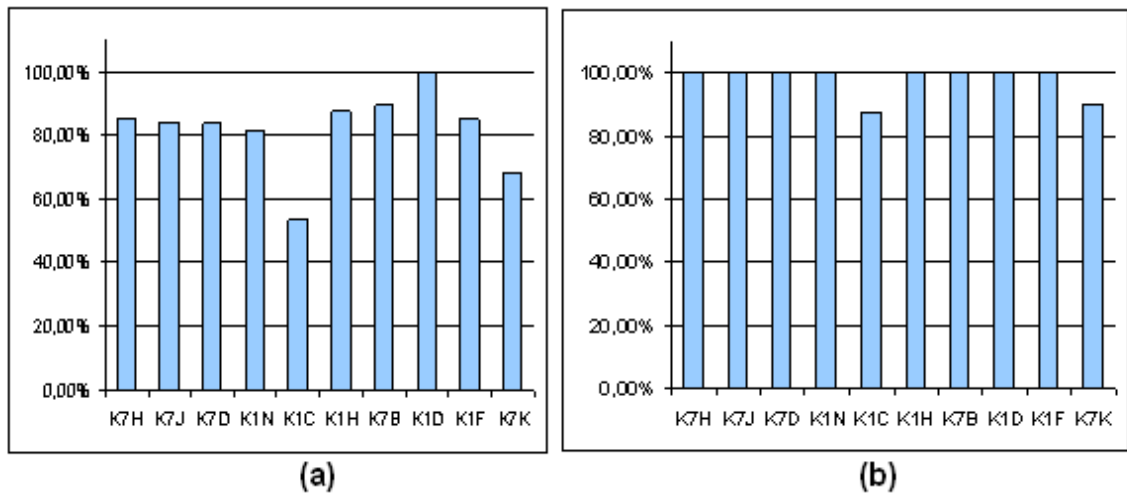


Figure 4.1 : Pourcentage de la dégradation : (a) Mesure dans le cinquième jours d'incubation et (b) dans le huitième jours d'incubation. Les dix souches bactériennes ont été testées.

Le pourcentage de dégradation est très élevé, il dépasse les 90% au bout de huit jours d'incubation pour atteindre les 100% pour la totalité des souches. Ceci signifie que les dix milieux contenant les souches deviennent de plus en plus faibles en Cyclohexanol. Une distinction particulière pour le milieu en présence de la souche (K1D) pour laquelle l'absorbance du Cyclohexanol s'annule au bout du cinquième jour (100% de dégradation). Mais pour la majorité des autres souches l'élimination totale du Cyclohexanol était au bout du huitième jour. Inversement la disparition du Cyclohexanol en présence de K1C et K7K était lente jusqu'au 5^{ème} jour, donc le Cyclohexanol se dégrade plus rapidement en présence de la souche bactérienne K1D. Notons aussi que la dégradation s'accélère pour les dix souches bactériennes dans le 8^{ème} jour même pour les deux souches (K1C et K7K) ayant une faible aptitude aux premiers jours d'incubation.

En se basant sur la rapidité de dégradation et la bonne croissance nous avons choisi les deux souches (K1D et K7D) comme étant les souches les plus performante en matière de dégradation du Cyclohexanol. Elles ont été retenues pour la poursuite du travail.

4.2 Estimation de la croissance sur milieu à base d'hydrocarbure

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure (4.2).

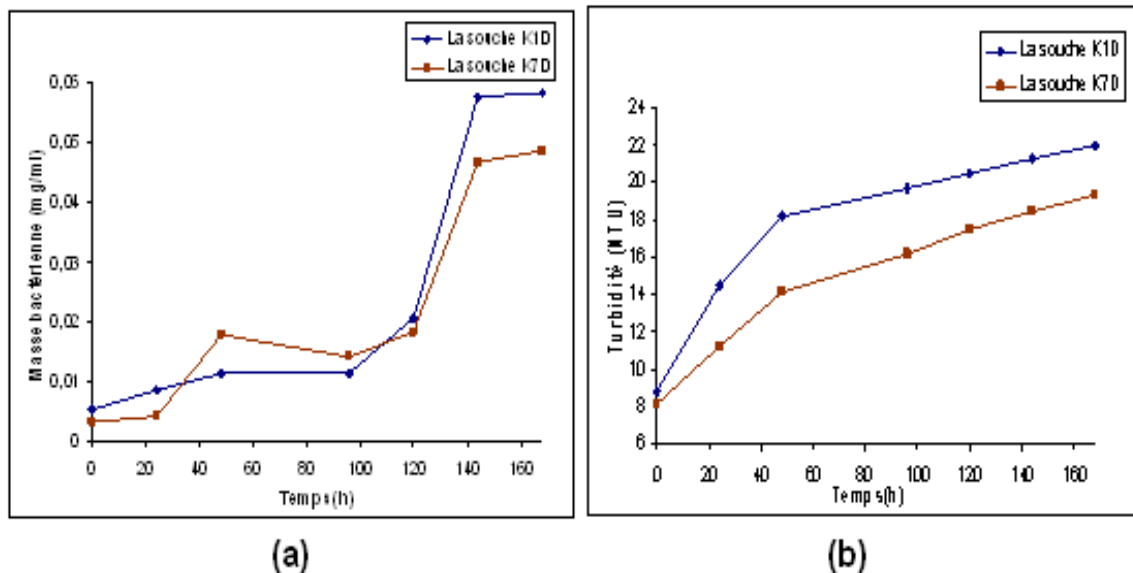


Figure 4.2 : Croissance sur milieu à base du Cyclohexanol représentant la seule source de carbone. (a) Estimation de la biomasse et (b) suivi de turbidité.

La croissance, nettement observée par un trouble du milieu de culture, a été estimée par une évolution de la biomasse et la turbidité. La courbe de la biomasse est divisée en trois phases, jusqu'à la 120h, une évolution un peu lente, une augmentation très remarquable jusqu'à la 140h, puis une phase constante finira la croissance. Tandis que l'évolution de la croissance détectée par la turbidité est en augmentation régulière à partir des premiers jours jusqu'à la fin d'incubation. Nous avons aussi remarqué que la relation entre la croissance bactérienne et la dégradation de l'hydrocarbure est inversement proportionnelle.

Ceci peut être expliqué par le fait que l'augmentation de la masse bactérienne de deux souches K1D et K7D est justifiée par l'utilisation du Cyclohexanol, comme source de carbone car le processus de dégradation intégrale conduit au recyclage du carbone de son état organique à son état minéral (CO_2) comme rapportés plusieurs chercheurs [78].

Cette bioconversion est accomplie à travers d'une série de réactions d'oxydation enzymatique, avec de l'oxygène comme accepteur finale d'électrons.

Notons que l'alcalinité du milieu est due à la présence des autres sous produits du métabolisme tels que : H_2O , H_2 , les sels d'acétate et autres produits (tableau (4.1)).

Tableau 4.1: Variation de pH au cours de la biodégradation de Cyclohexanol.

Temps (h)	0	24	48	96	120	144	168
pH	7,0	7,24	7,85	8,14	8,69	8,47	7,98
K1D	7,0	7,24	7,85	8,14	8,69	8,47	7,98
K7D	7,01	7,17	7,64	7,62	8,54	7,89	8,07

Nous avons enregistré également que la relation entre la croissance bactérienne et la dégradation de l'hydrocarbure est inversement proportionnelle.

4.3 Aptitude de biodégradation

Nous avons essayé l'aptitude de deux souches à la dégradation de quatre hydrocarbures différents. La concentration initiale est choisie selon des essais préliminaires. La figure (4.3) présente la diminution de la concentration en fonction du temps.

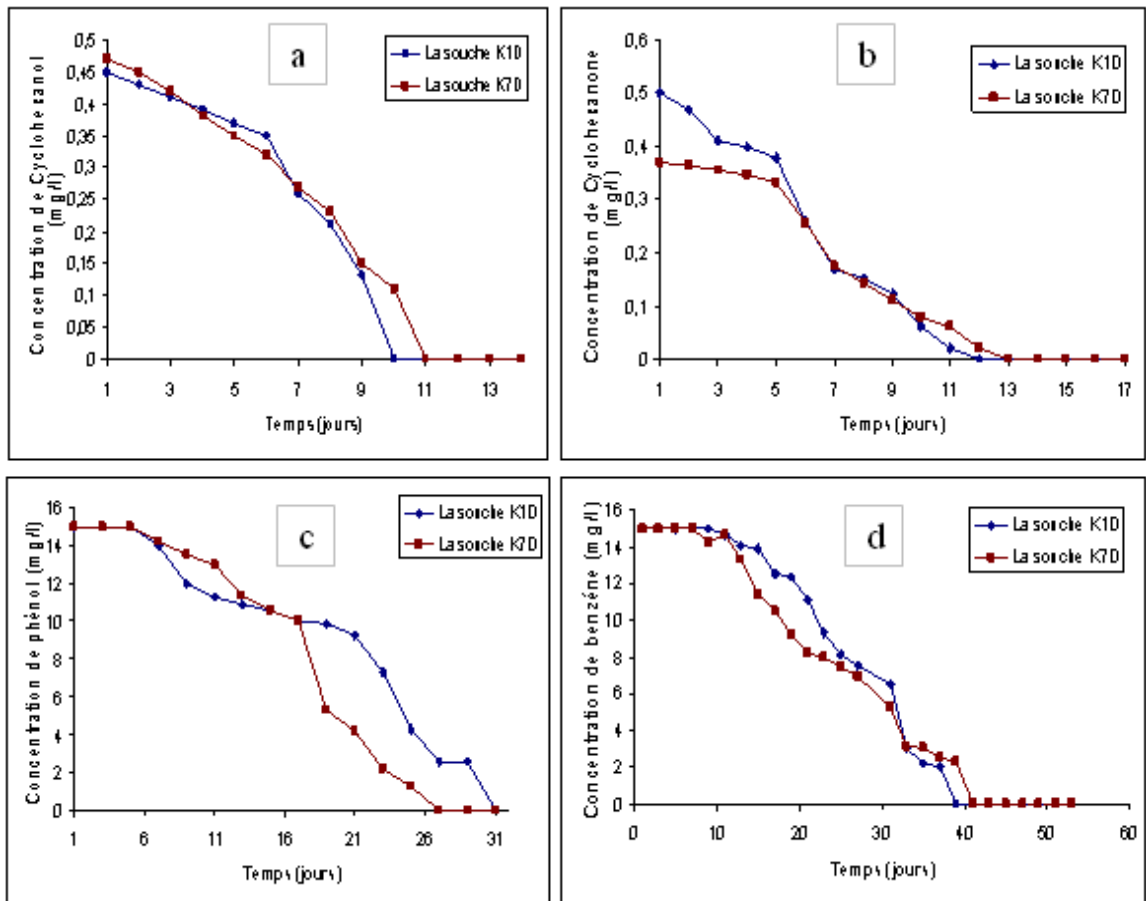


Figure 4.3 : Diminution de la concentration en fonction du temps, (a) : Cyclohexanol ($C_0=500 \text{ mg l}^{-1}$), (b) : Cyclohexanone ($C_0=500 \text{ mg l}^{-1}$), (c) : Phénol ($C_0=15 \text{ mg l}^{-1}$) et (d) : Benzène ($C_0=15 \text{ mg l}^{-1}$). Les conditions de culture sont pH 7 et $T^\circ\text{C}$ 45.

Une remarque très pertinente soulevée par rapport à l'utilisation d'HC est en relation avec la structure. Les composés aromatiques sont plus difficiles à dégrader comparativement à ceux d'une structure cyclique, ceci est justifié par la rapidité de dégradation observée chez les deux souches testées.

4.4 Optimisation des paramètres de la biodégradation

Pour bien comprendre les effets des paramètres physiques sur le mécanisme de la biodegradation par les deux souches sélectionnées, on a enrichi notre travail par des variations de quelques paramètres physiques qui sont élucidés dans des autres études précédentes tels que la température et le pH ainsi que la concentration d'HC qui est un facteur limitant pour la croissance bactérienne.

4.4.1 Influence du pH

La figure (4.4) illustre la diminution de la concentration de Cyclohexanol utilisé par les deux souches en variant le pH initial du milieu de culture.

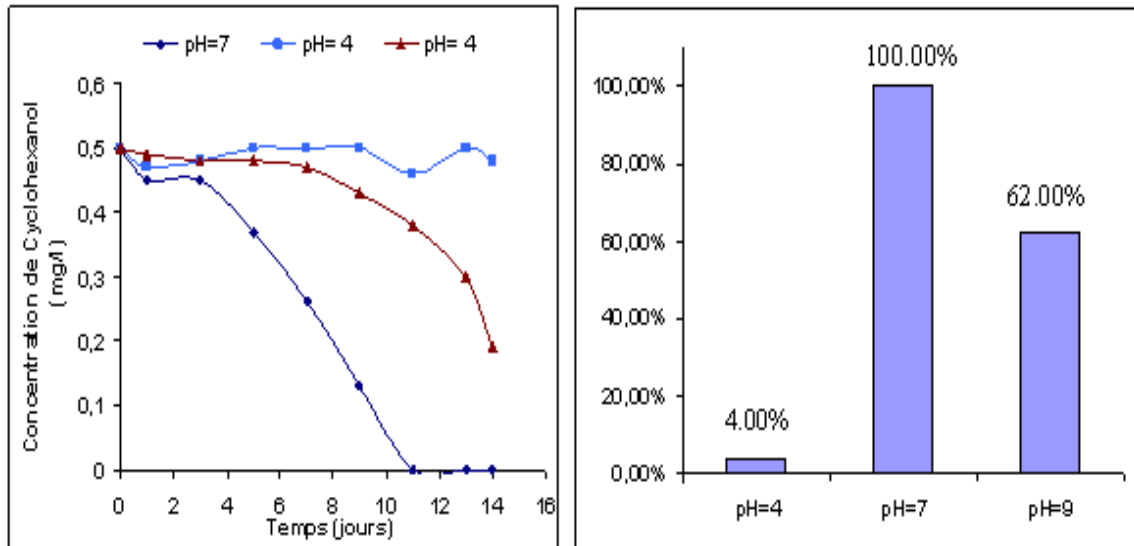


Figure 4.4 : Influence du pH sur la biodégradation du Cyclohexanol. $C_0 = 500 \text{ mg l}^{-1}$ et $T = 45^\circ\text{C}$. La souche testée est la K1D.

La meilleure dégradation du Cyclohexanol est obtenue à pH 7. Notons ainsi qu'une élimination totale (100%) et même rapide de l'HC était au bout de moins de dix jours. A pH légèrement basique (9) le taux d'élimination de Cyclohexanol est de l'ordre de 62% mais il est long (quatorze jours). Par contre à pH acide (4,00) aucun bénéfice pratique (4% uniquement) n'a été observé. Généralement, une diminution du pH est accompagnée par une diminution de la vitesse de biodégradation qui peut être expliquée par une décroissance de l'activité enzymatique.

Les résultats obtenus à des différentes valeurs de pH montrent que la souche dégrade rapidement ce composé dans des conditions du pH neutre et légèrement basique et selon Dibble et Bartha [79] et Hambrick et al [80] qui ont trouvé une dégradation plus élevée des HC dans des conditions légèrement basiques.

4.4.2 Influence de la température

Les résultats obtenus sont représentés graphiquement sur la figure (4.5).

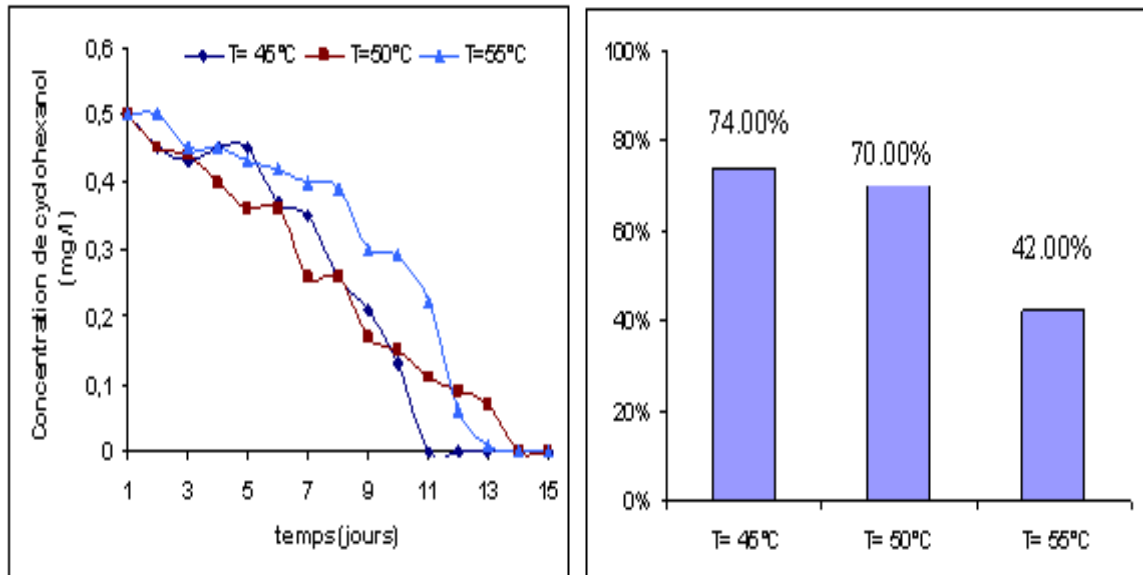


Figure 4.5 : Influence de la température sur la biodégradation de Cyclohexanol. $C_0 = 500 \text{ mg l}^{-1}$ et $\text{pH} = 7$. La souche testée est la K1D.

Il apparaît qu'un rendement de 100, 70 et 42% est atteint après neuf jours d'incubation à température 45 °C, 50 et 55 °C, respectivement. A partir du 13 et au 14 jours l'élimination était totale avec les deux températures les plus élevées, 50 et 55, respectivement. Nous pouvons conclure que les trois températures sont favorables pour dégrader l'HC.

Les taux les plus élevés de dégradation sont observés sous des conditions de pH neutre ($\text{pH} \sim 8$) et La gamme de la température la plus favorable était de 45 à 55°C.

4.4.3 Effet de la concentration d'hydrocarbure

L'expérience a été faite pour les deux souches en commençant par des concentrations faibles allant à des concentrations relativement élevées. En testant trois HC (Cyclohexanone, Phénol et Benzène). Les périodes d'essai sont différentes selon la nature d'HC (15 jours pour le Cyclohexanone et de 71 jours pour les deux autres).

4.4.3.1 Cas du Cyclohexanone : Figures (4.6) et (4.7).

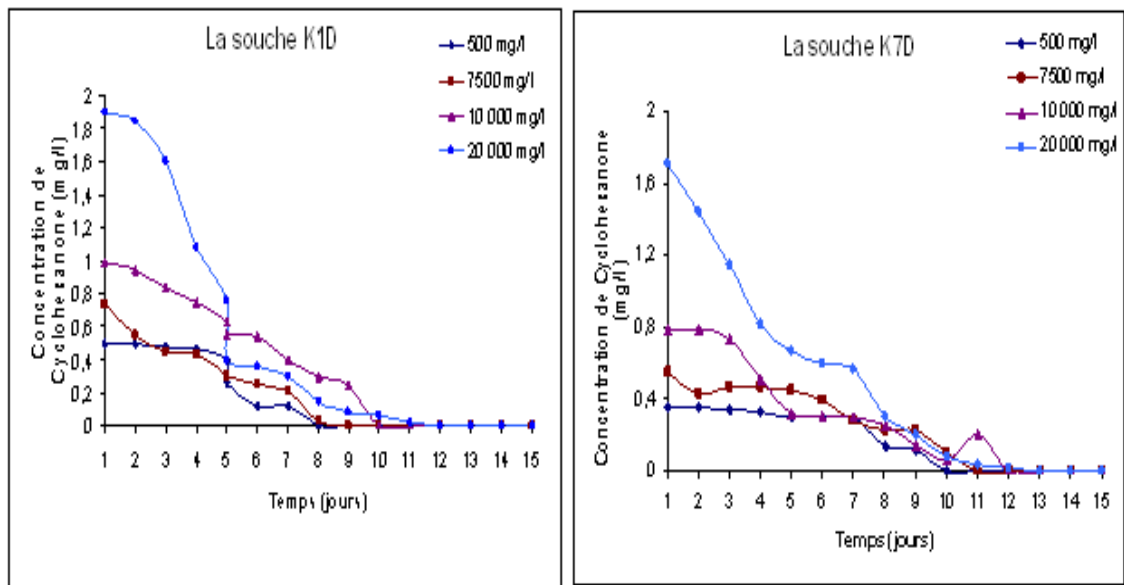


Figure 4.6 : Effet de la concentration du Cyclohexanone sur le taux de la dégradation. Incubation à température de 45°C et un pH initial de 7.0.

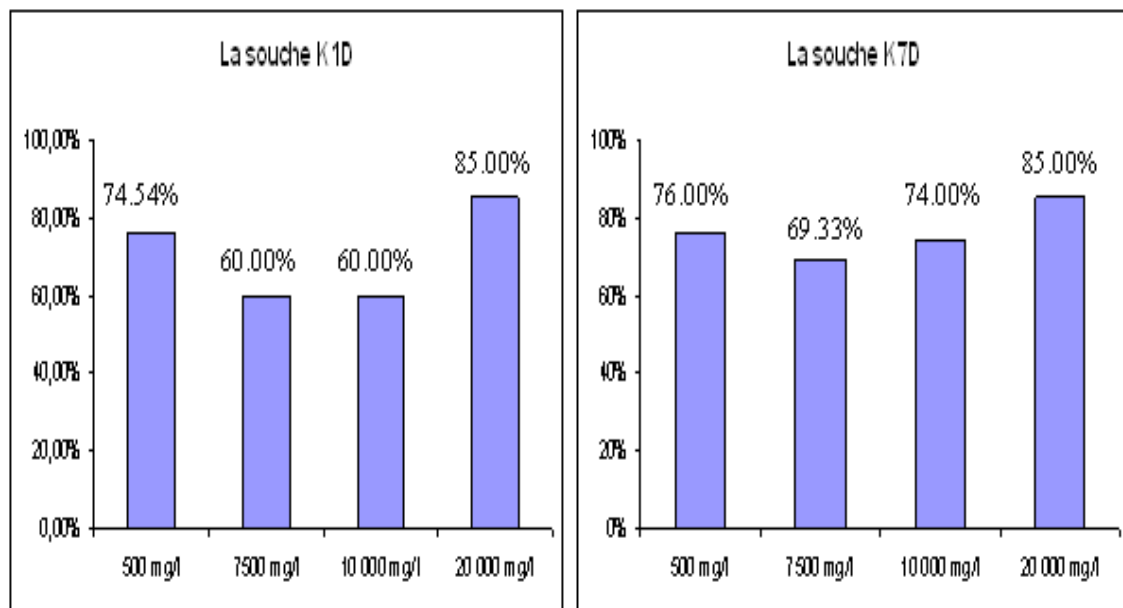


Figure 4.7 : Taux de la dégradation du Cyclohexanone au bout de 8^{ème} jours d'incubation à 45°C et pH 7.

La réduction de la concentration du Cyclohexanone commence dès le premier jour d'incubation soit en présence de la souche K1D ou la souche K7D jusqu'à une élimination complète au bout d'une période moyenne comprise entre 9 à 12 jours.

Les taux de dégradations sont les plus élevés et atteignent les 100% pour en utilisant les quatre concentrations initiales de Cyclohexanone. On conclut que les deux souches bactériennes peuvent métaboliser le Cyclohexanone comme une seule source de carbone et d'énergie pour se croître et se développer.

4.4.3.2 Cas du Phénol :

Les résultats obtenus sont représentés sur les figures (4.8) et (4.9).

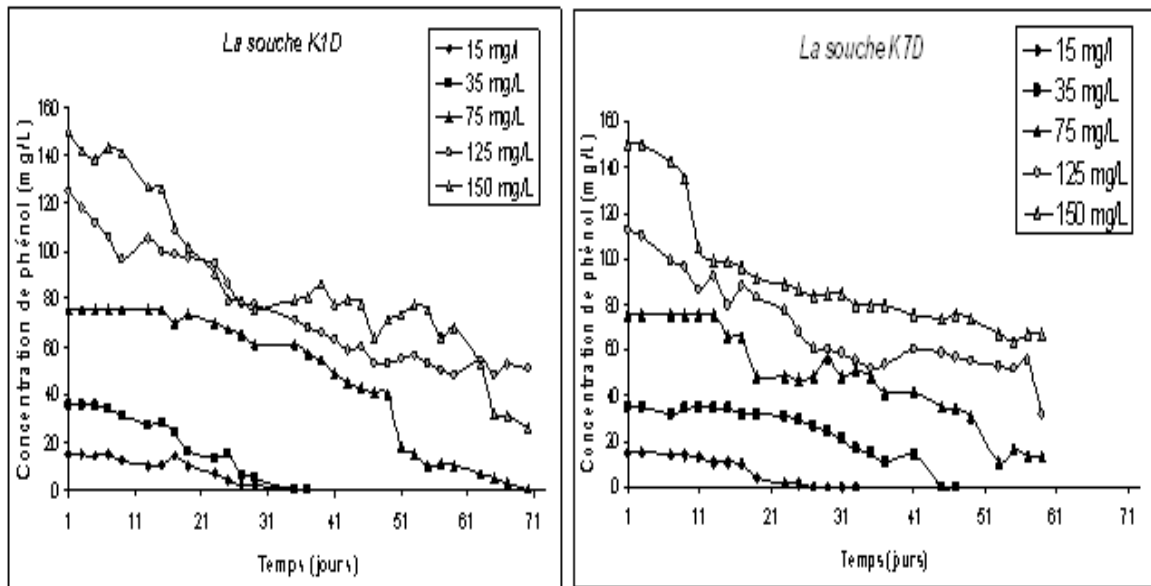


Figure 4.8 : Effet de la concentration du Phénol sur le taux de la dégradation. Incubation à température de 45°C et un pH initial de 7.0. L'expérience a été réalisée avec les deux souches.

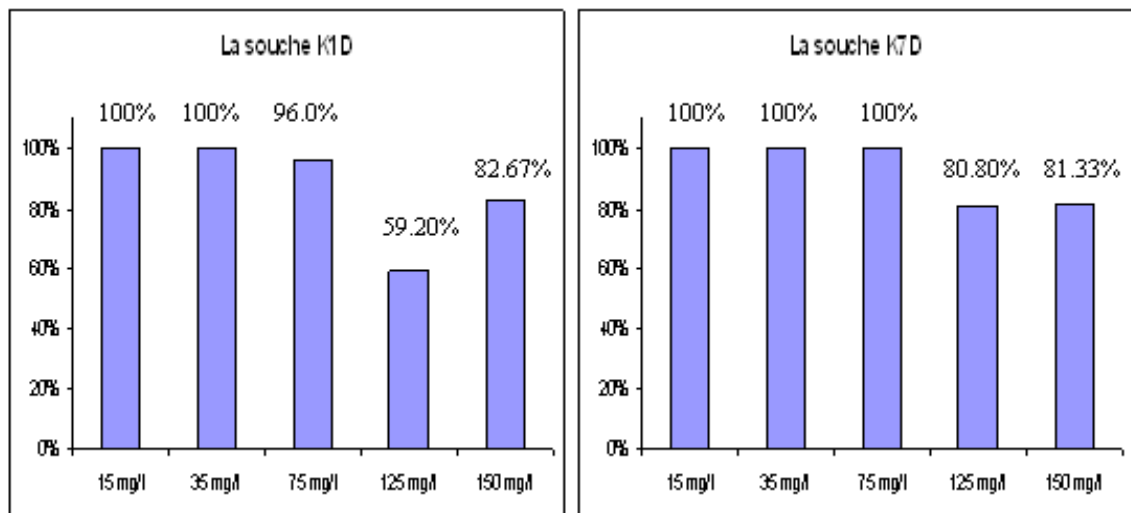


Figure 4.9 : Taux de la dégradation du Phénol au bout de 25^{ème} jours d'incubation à 45°C et pH 7.

La figure (4.8) montre le profil du temps de la biodégradation du Phénol par les souches K1D et K7D. C'est clair que le temps pris par les deux souches bactériennes pour dégrader le Phénol était dépendant sur sa concentration initiale.

Par exemple pendant qu'il a pris approximativement 33 jours d'incubation à dégrader complètement quand la concentration du Phénol initiale était inférieure à 100 mg l^{-1} , alors qu'il a pris approximativement 70 jours pour dégrader 59,2% et 82,67% respectivement des concentrations initiales de 125 et 150 mg l^{-1} du Phénol pour la souche K1D, de la même pour la K7D le taux de dégradation atteint 80,8 et 81,33% pour des concentrations initiales de 125 et 150 mg l^{-1} .

Le temps de la biodégradation total pris à tout le Phénol peut être divisé en deux phases : phase du décalage initiale et phase de concentration de la biodégradation active. L'ampleur de deux phases, dans le tour, dépend de la concentration initiale du Phénol.

Les souches bactériennes ont montré une haute résistance à la toxicité du phénol, car ils ont pu le biodégrader complètement, mais on a constaté qu'après 25 jours d'incubation la valeur de la longueur d'onde maximale (λ_{max}) devenus 241.0 nm avec une absorbance $A = 0.108$, au lieu de 270 nm de départ, cette valeur probablement présente l'absorbance des sous produits qui ont été produits durant la dégradation du phénol (équation 4.1).



4.4.3.3 Cas du Benzène :

Les résultats obtenus sont représentés sur les figures (4.10) et (4.11).

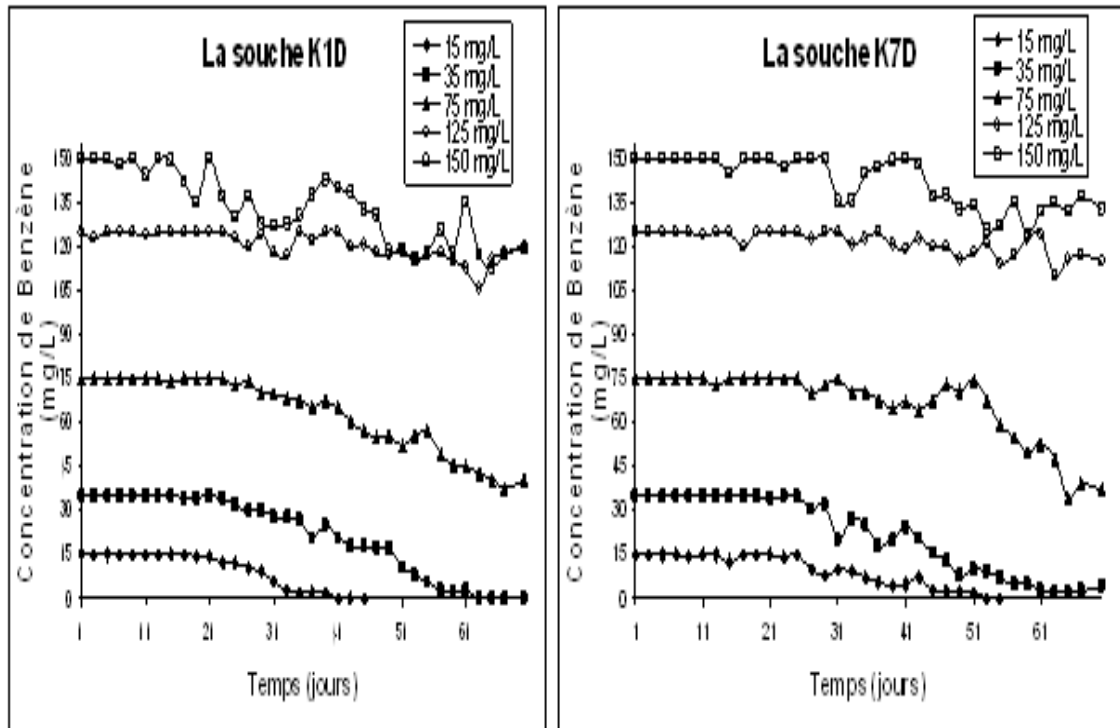


Figure 4.10: Effet de la concentration du Benzène sur le taux de la dégradation. Incubation à température de 45°C et un pH initial de 7.0.

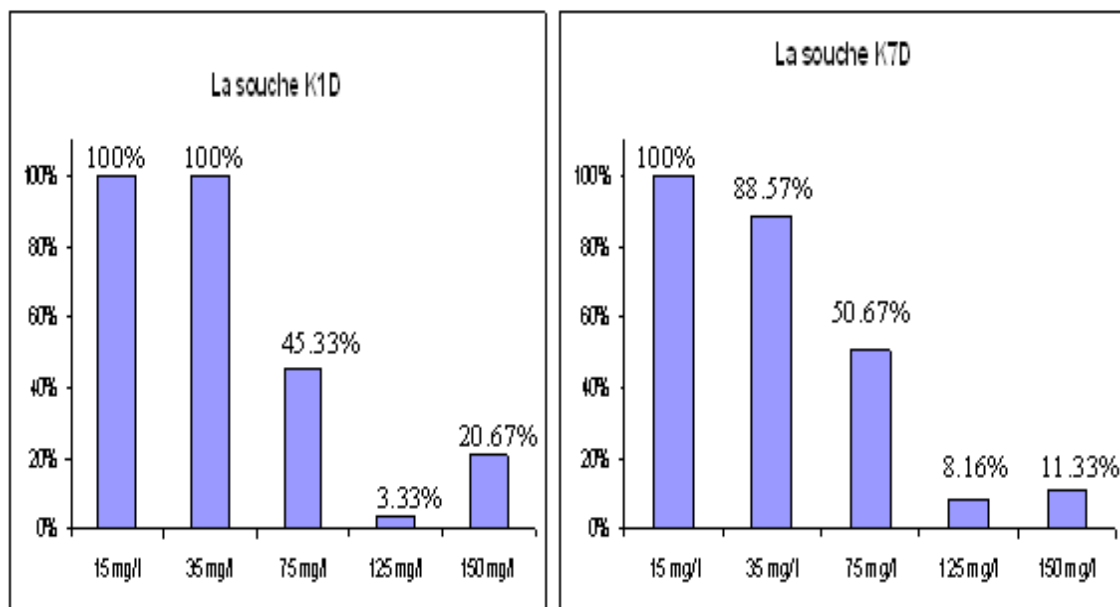


Figure 4.11 : Taux de la dégradation du Benzène au bout de 24^{ème} jours d'incubation à 45°C et pH 7.

Les deux souches à Gram négatifs utilisent le Benzène comme seule source de carbone et d'énergie pendant leur croissance, la dégradation atteint sa maximale au bout de 70 jours d'incubation. Notre expérience de dégradation a montré que les souches bactériennes sont capables de dégrader le Benzène, jusqu'à atteindre un niveau stable, et ont montré une haute résistance à la toxicité du Benzène, car ils ont pu le biodégrader. Mais on constate clairement que cette biodégradation est limitée par la nature du milieu, et le taux de croissance bas à hautes concentrations du Benzène, au-delà d'une concentration initiale de 75 mg l⁻¹ de phénol, une phase du décalage s'est produite et le taux de la déchéance de Benzène a diminué, en indiquant probablement l'inhibition du substrat toxique sur les cellules se conduit à la mortalité des microorganismes.

4.4.4 Effet de la durée du séjour

Dans cette expérience, nous avons pris le Benzène comme modèle en dégradation à long séjour d'une période de 120 jours.

Les résultats obtenus sont motionnés dans la figure (4.12).

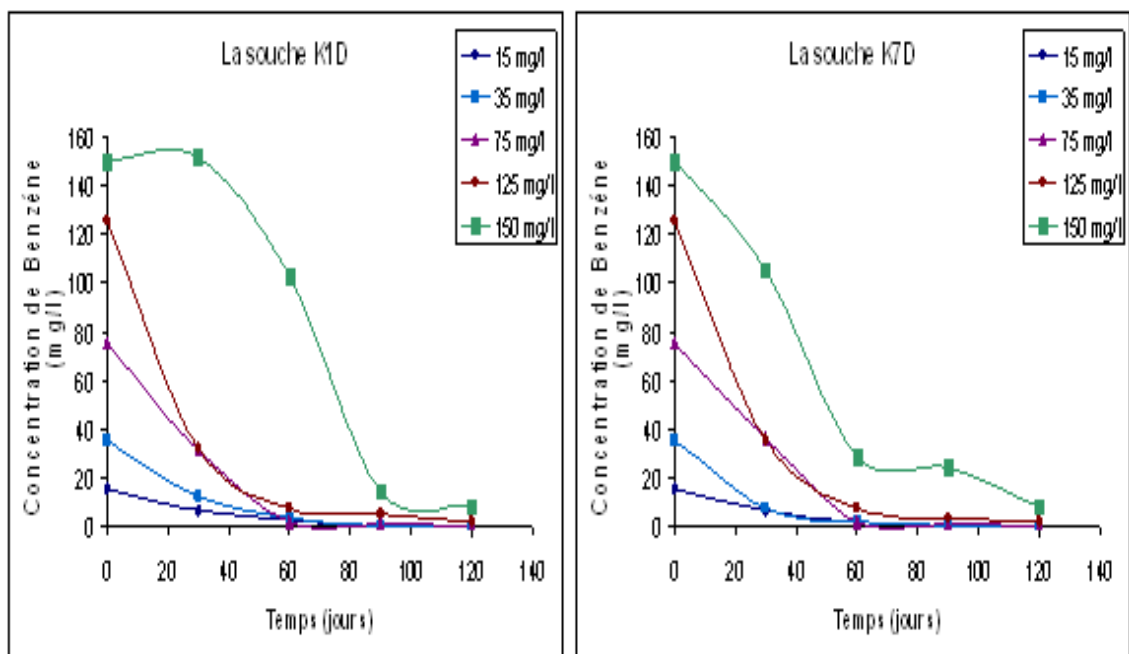


Figure 4.12 : Effet de la durée du séjour sur la dégradation du Benzène. pH 7 et T °C 45. La concentration comprise entre 15 à 150 mg l⁻¹.

Les souches bactériennes ont montré une capacité de dégradation très importantes, car le taux de dégradation a atteint une valeur supérieurs à 94.84%

au bout de 120 jours pour les hautes concentrations de Benzène (150 mg l^{-1}), et probablement on enregistre une dégradation complète au bout de quelque jours après le 120^{ème} jour. Et dont les souches bactériennes peuvent métaboliser le Benzène comme seule source de Carbone et d'énergie pendant leurs croissances.

4.5 Confirmation de la biodégradation

4.5.1 Par analyse par chromatographie en phase gazeuse

- Cas du Cyclohexanol

Pour la confirmation de l'élimination du Cyclohexanol de milieu de culture bactérien nous avons analysé le milieu de culture après incubation (contenant le mélange souche + Cyclohexanol) à différents intervalles du temps par. L'analyse a été appliquée pour les cultures de deux souches K1D et la K7D. Les chromatogrammes sont représentés dans la figure (4.13).

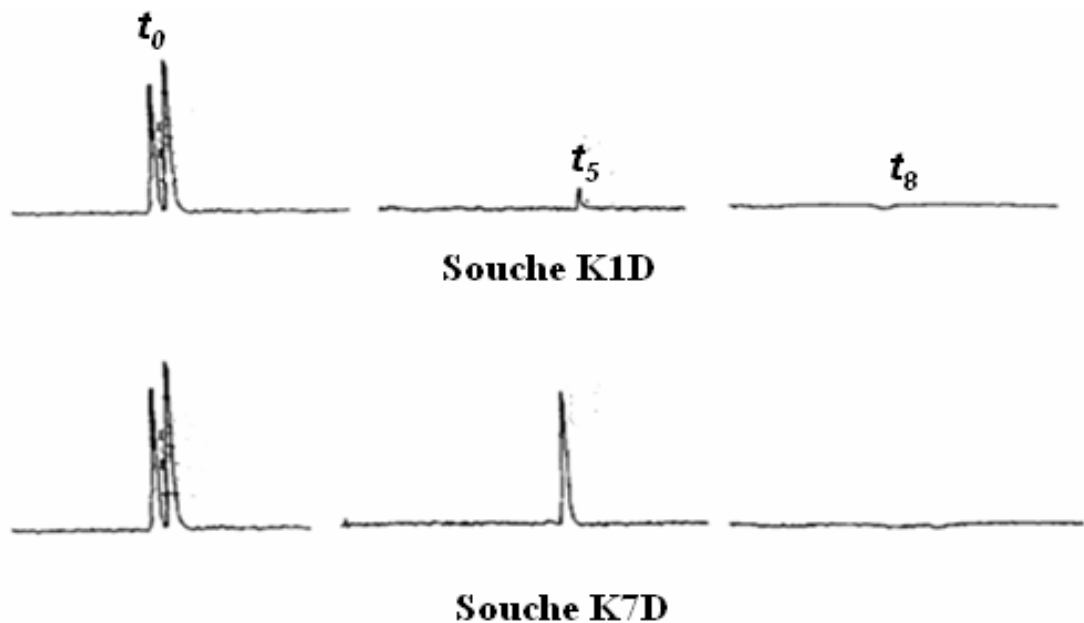


Figure 4.13 : Chromatogrammes obtenus par CPG pour les deux souches. Les concentrations du Cyclohexanol : 2% avant incubation (pic t_0), au 5^{ème} jour d'incubation (pic t_5) et au 8^{ème} jour (pic t_8).

Au temps zéro, le temps de rétention a été 1.848 avec une surface de pic est de 1946 pour les deux souches bactériennes, après 5 jours d'incubation à 45°C et pH 7.0, le temps de rétention devient 1.809 pour la souche K1D et 1.823

pour la K7D et la surface des pic est 0 et 1309, respectivement. Après 8 jours d'incubation dans les mêmes conditions opératoires la surface est s'annulée pour les deux souches, ce qui signifie que la concentration du Cyclohexanol dans le milieu de culture est devenue faible ou nulle.

En conclusion, les deux analyses faites par UV-visible et CPG ont révélé la disparition du Cyclohexanol en présence de la souche bactérienne. La bonne croissance des souches testées liée à la diminution de la concentration du Cyclohexanol a confirmé la dégradation de ce dernier. En effet, il apparaît que les deux souches bactériennes sont capables de dégrader le Cyclohexanol d'une manière définitive.

- Cas du Cyclohexanone

A titre confirmatif nous avons recourt à l'analyse par CPG (estimation quantitative). Le volume des échantillons injectés est de 0,1 μL et un débit de 30 mm/min. Les chromatogrammes sont représentés dans les figures (4.14), (4.15), (4.14), et (4.15).

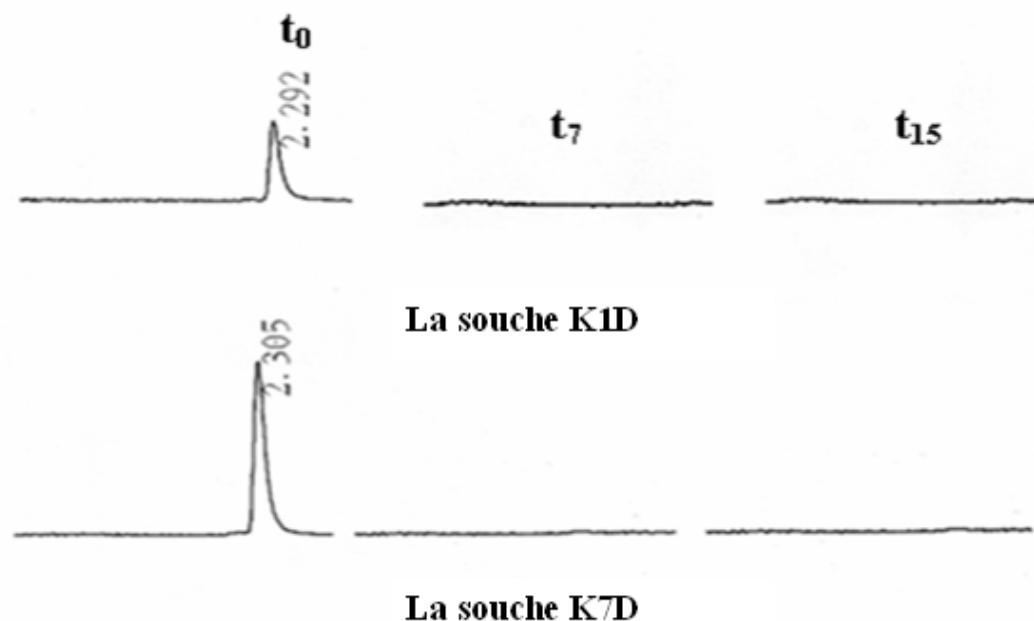


figure 4.14 : Chromatogrammes obtenus par CPG pour les deux souches. Les concentrations du Cyclohexanone : 500 mg/l avant incubation (pic t_0), au 7^{ème} jour d'incubation (pic t_7) et au 15^{ème} jour (pic t_{15}).

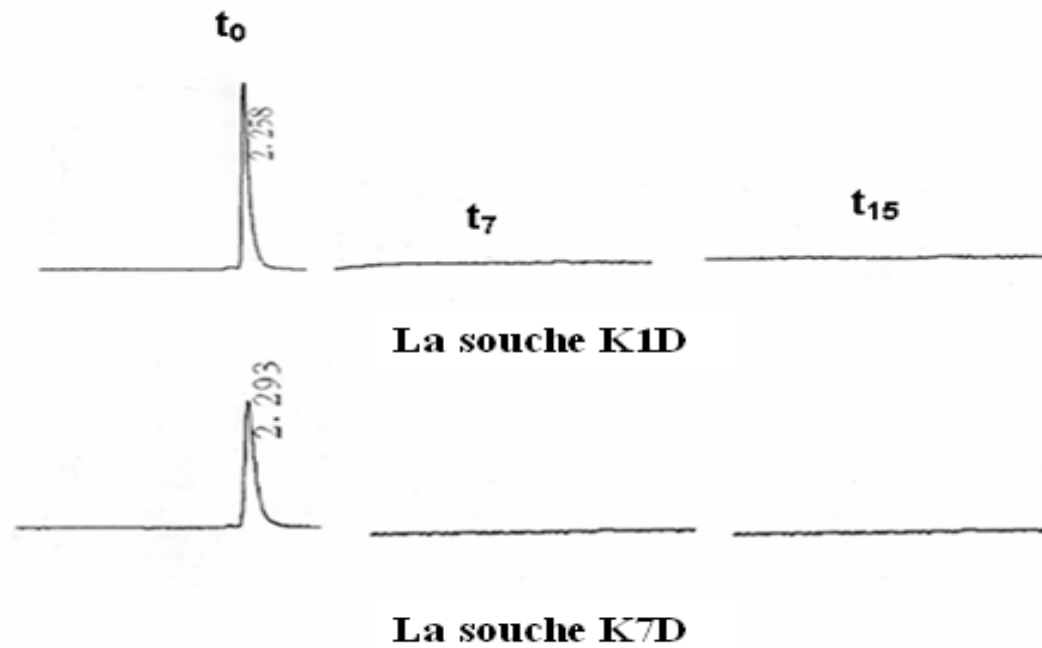


Figure 4.15 : Chromatogrammes obtenus par CPG pour les deux souches. Les concentrations du Cyclohexanone : 7500 mg/l avant incubation (pic t_0), au 7^{ème} jour d'incubation (pic t_7) et au 15^{ème} jour (pic t_{15}).

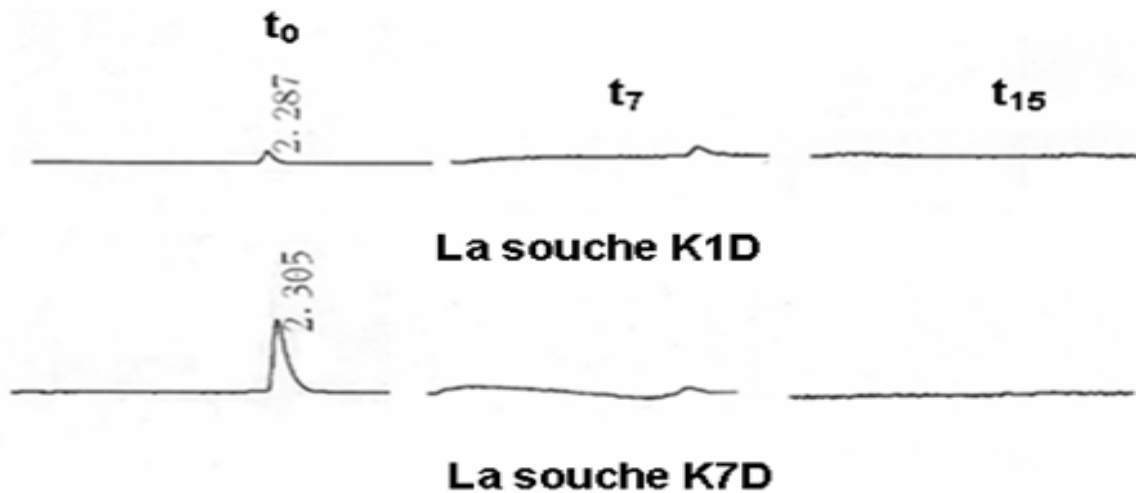


Figure 4.16 : Chromatogrammes obtenus par CPG pour les deux souches. Les concentrations du Cyclohexanone : 10 000 mg/l avant incubation (pic t_0), au 7^{ème} jour d'incubation (pic t_7) et au 15^{ème} jour (pic t_{15}).

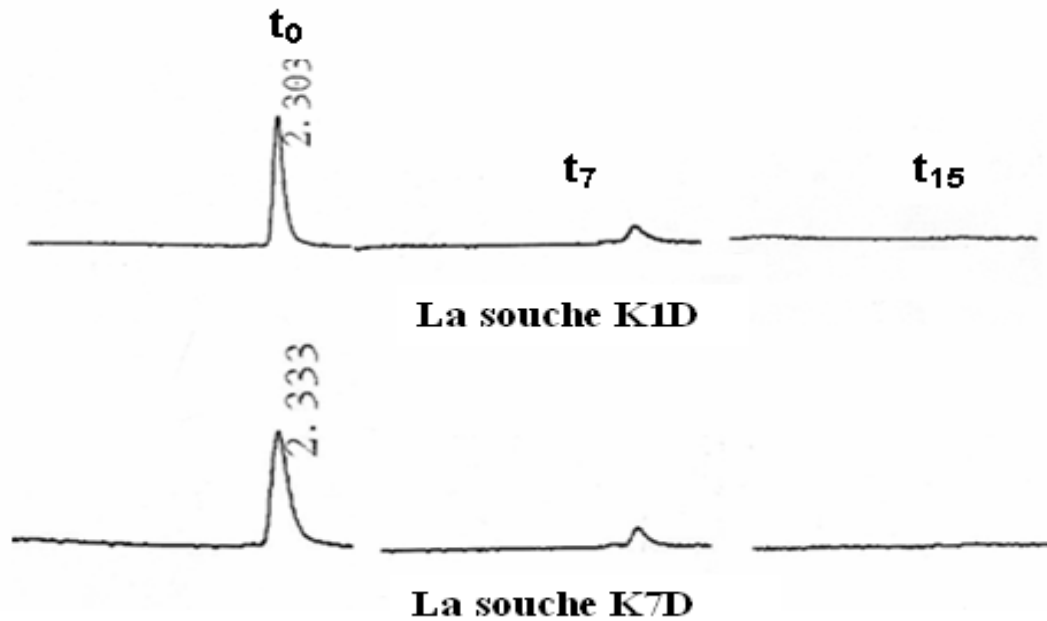


Figure 4.17 : Chromatogrammes obtenus par CPG pour les deux souches. Les concentrations du Cyclohexanone : 20 000 mg/l avant incubation (pic t_0), au 7^{ème} jour d'incubation (pic t_7) et au 15^{ème} jour (pic t_{15}).

Les profils chromatographiques obtenus sont présentés en figure (4.14) à (4.15). Durant une phase rapide de dégradation qui débute après 24 heures d'incubation, les concentrations de Cyclohexanol commencent à s'annuler soit en présence de la souche K1D ou la souche K7D, les deux souches sont très actives et pouvons dégrader le Cyclohexanone complètement au bout de 7 jours.

En comparant les résultats de dégradation de Cyclohexanone avec celle obtenue par l'analyse par UV-visible, on observe une légère différence. Donc, le Chromatogramme de l'analyse par CPG confirme les résultats obtenus avec UV-visible. Notons que les tests de biodégradation des HC ont été assurés en conditions optimales (température 45°C et pH 9,0).

4.6 Voies métaboliques de dégradation

Un moyen très efficace pour suivre les voies métaboliques de dégradation des HC est suivi de changement du pH dans le milieu de culture.

○ Variation du pH au cours de la biodégradation du Cyclohexanone

La figure suivante (figure 4.18) présente la variation du pH de milieu de la culture de deux souches bactériennes dans les conditions optimales.

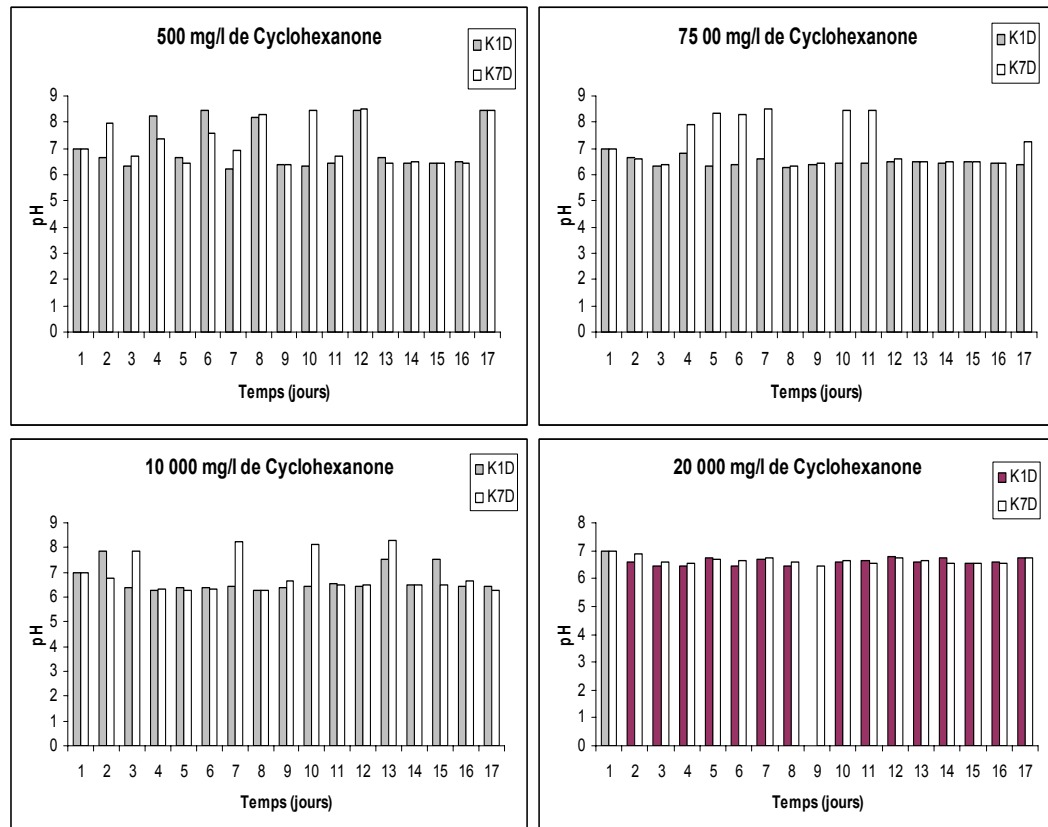


Figure 4.18 : la variation du pH de milieu de la culture de deux souches bactériennes dans les conditions optimales. T °C 45 et pH 7.0.

Nous pouvons expliquer toutes ces variations (augmentation et diminution du pH) par le phénomène de biodégradation du Cyclohexanone par les deux souches bactériennes K1D et K7D.

Le changement du pH du milieu de culture microbien est lié aux voies métaboliques car un virage vers l'acidité explique la dégradation du substrat par voie fermentative par contre un virage vers l'alcalinité justifié l'alcalinisation du milieu par production des sels d'ammonium suite à une désamination du substrat.

o Variation du pH au cours de la biodégradation du Benzène

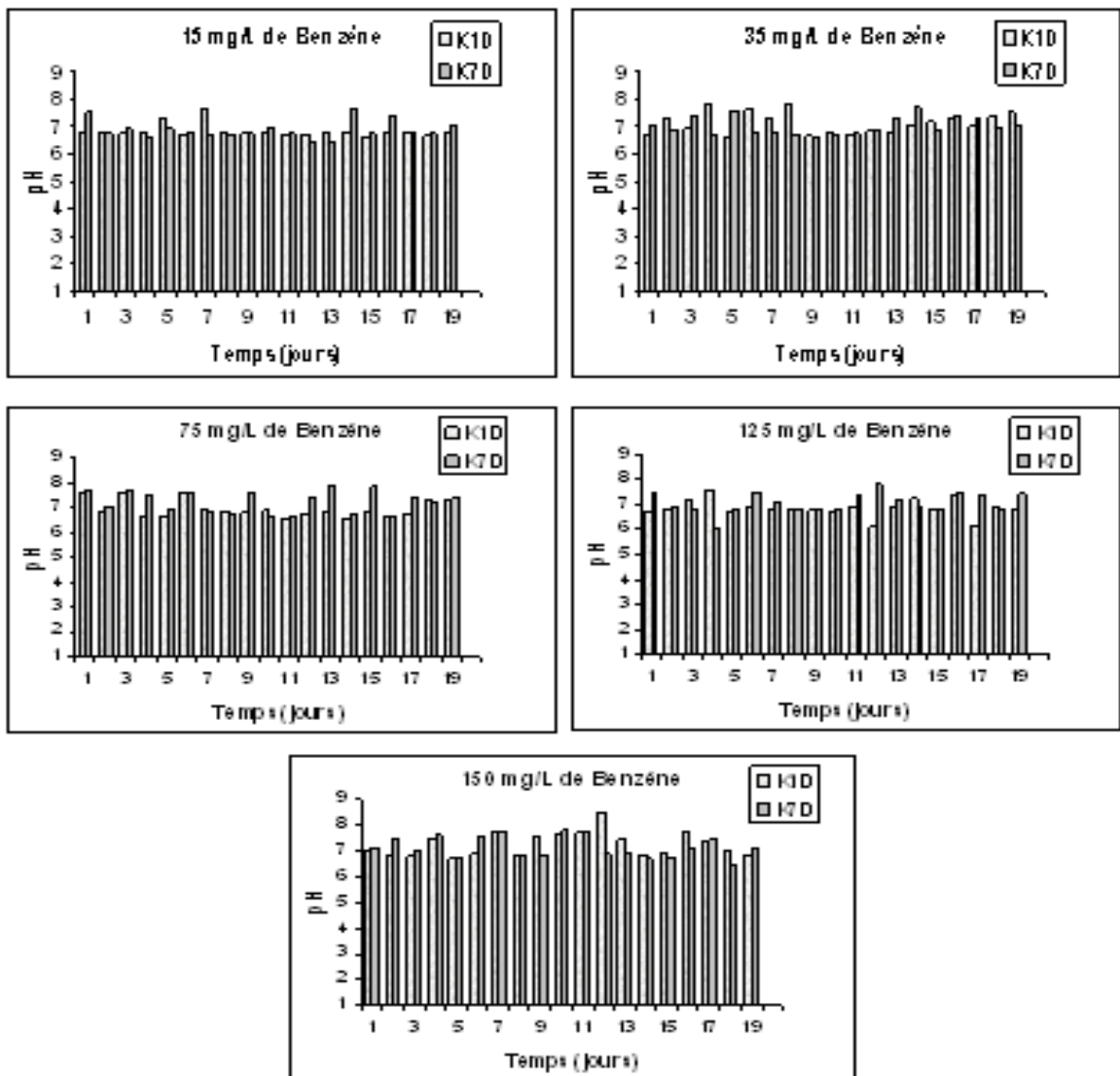


Figure 4.19: Variation du pH au cours de la dégradation du Benzène

Les résultats présentés précédemment indiquent que durant la biodégradation benzène la variation du pH du milieu a été comprise entre une région neutre ou légèrement alcaline [6.84 - 8.21]; ceci est peut être du à la production du CO_2 .

Des constatations ont été soulevées dans le cas du Benzène, à savoir,

- **Après 24 jours incubation** nous avons remesuré la valeur de la longueur d'onde maximale (λ_{\max}) et nous trouvons une valeur de 268.5 nm avec une absorbance $A = 0.156$, au lieu de 262 nm de celle de départ, cette valeur probablement due à la présence des sous produits.
- **Après 73 jours d'incubation** à une température constante de l'ordre de 45°C et pH neutre, l'aspect physique est différent de celui des produits de départ (Photo, figure 4.15).



Figure 4.20: Changement de l'aspect physique de celui des produits de départ : Cas du Benzène.

Notons aussi que les procédés biologiques sont toutefois très sensibles aux fluctuations de la concentration du substrat toxiques, telles que le Benzène, puisqu'à partir d'une teneur seuil, l'activité microbienne est inhibée de ce fait, et la teneur seuil dans notre cas est à peu près de $C_0 = 100 \text{ mg l}^{-1}$.

○ Variation du pH au cours de la biodégradation du Phénol

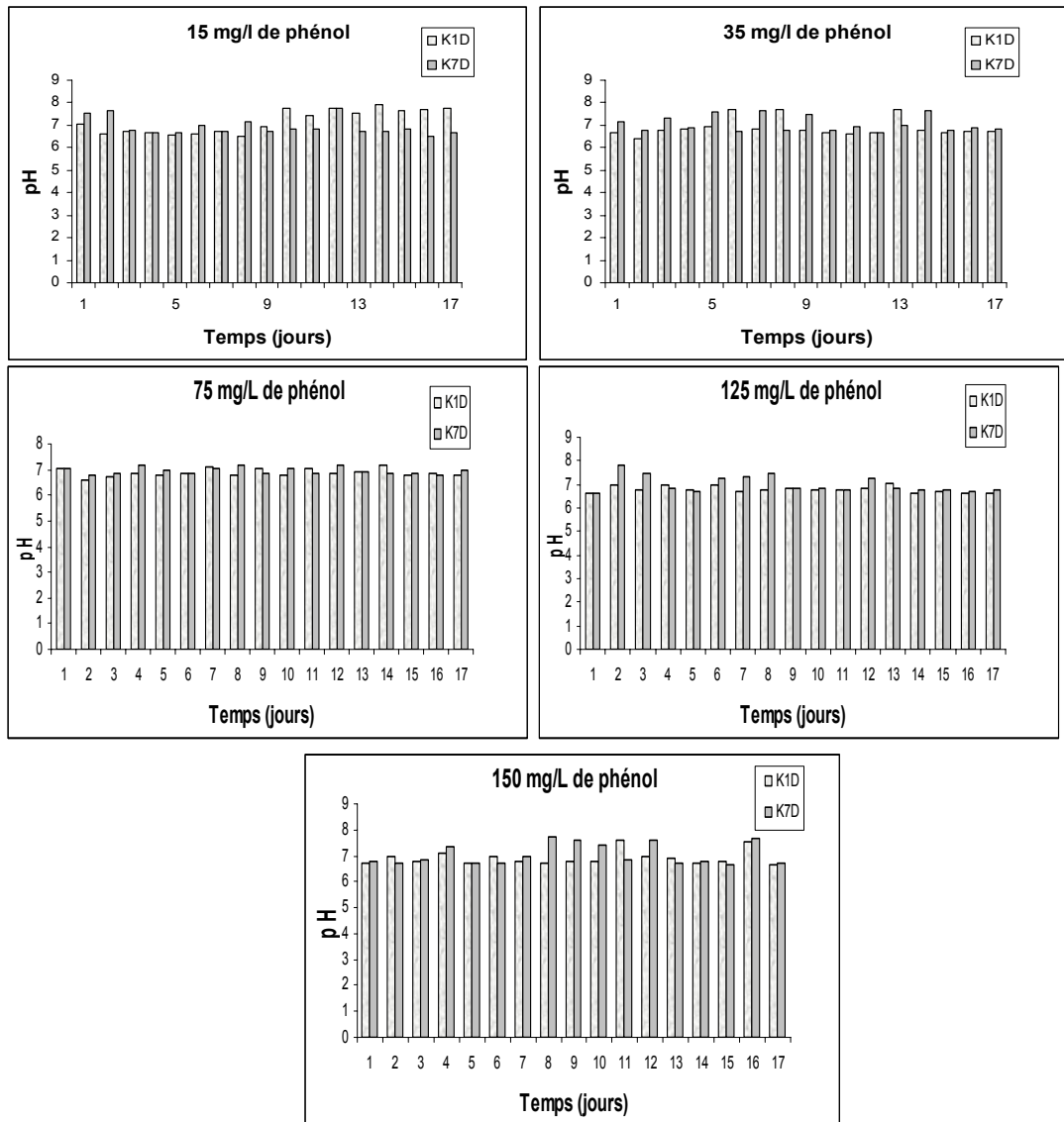


Figure 4.21 : Variation du pH au cours de la dégradation du phénol.

4.7 Mise en évidence du changement de structure : Cas du phénol

Le phénol a été pris comme modèle pour détecter le changement de la structure issue de l'activité biodégradante de la souche bactérienne. La détection de la disparition ou l'apparition de nouveaux spectres a été analysée par FTIR.

La bande d'absorption caractéristique des phénol es spectroscopie infrarouge est celle de l'élongation de la liaison O---H du groupement hydroxyde. Notion que cette bande large et de forte intensité en présence de ponts hydrogène. Le tableau (4.3), donne Les variations spectrales observables avec et sans ponts d'hydrogène.

Tableau 4.3: Bandes caractéristiques (spectre IRTF) le phénol.

	cm ⁻¹	Intensité	Assignment
Phénol	3600	Variable	O---H élongation (libre)
	3400	Forte	O---H élongation (lié)
	1200	Forte	C---O élongation

Il est à noter que la bande d'absorption caractéristique des phénols analysée par FTIR est celle de l'élongation de la liaison O---H du groupement hydroxyde. Elle est large et de forte intensité en présence de ponts hydrogènes.

Le spectre FTIR de témoin noté (01) (contient le milieu de dégradation et une concentration de 150 mg l⁻¹ du phénol sans ajoute des souches bactériennes, et le témoin noté (02) (comporte uniquement le milieu de dégradation) sont exposés dans la figure (4.22).

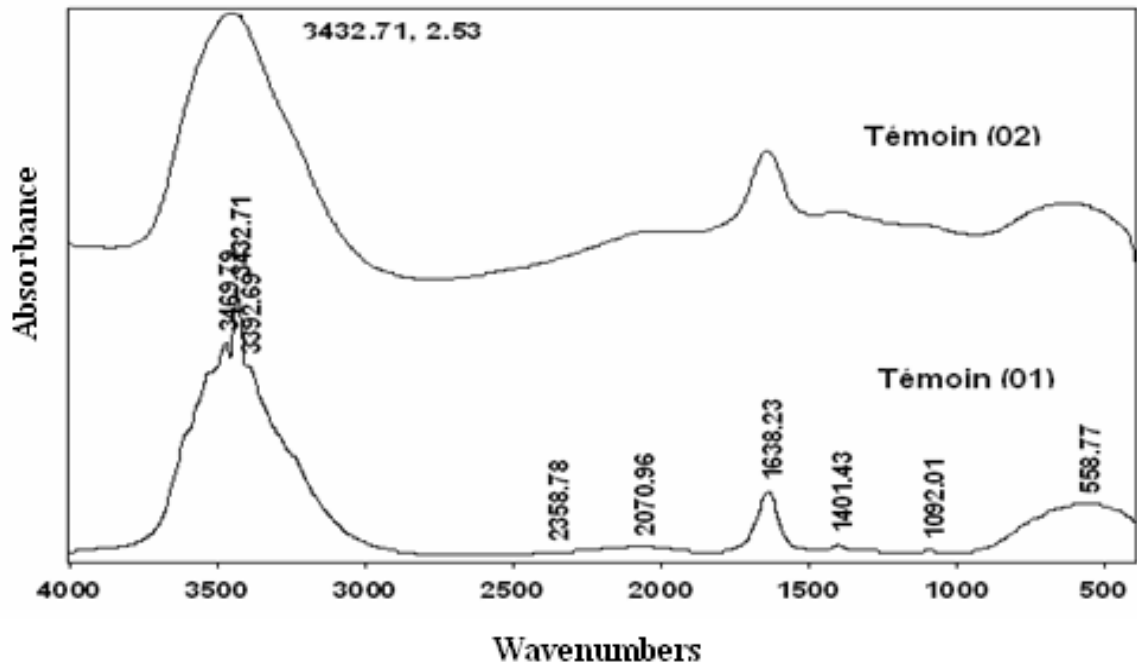


Figure 4.22 : Spectre IR de témoin (01) et témoin (02).

Tableau 4.4: Bandes caractéristiques (spectre IRTF) des groupements fonctionnels du témoin (01) et témoin (02).

Nombres d'onde (cm ⁻¹)	Mode de vibration et attribution
3451,53	Vibrations des liaisons O---H associées par la liaison hydrogène intermoléculaire.
3432,67	Vibration forte d'élongation de la liaison O---H élongation lié.
3393,14	La vibration de la liaison O---H associées par la liaison hydrogène intermoléculaire.
1638,23	Correspond à la déformation de la liaison O---H
1092,48	Correspond au groupement méthylène.

En solution et dans un solvant polaire (H₂O) noté témoin (02), on observe un pic un peu large à 3451.53 cm⁻¹. Il s'agit des liaisons O--H associées par la liaison hydrogène intermoléculaire.

Nous représentons ci-dessous (Figures 4.23 et 4.24) les spectres IR des échantillons analysés après de différentes périodes d'incubation pour les deux souches bactériennes K1D et K7D.

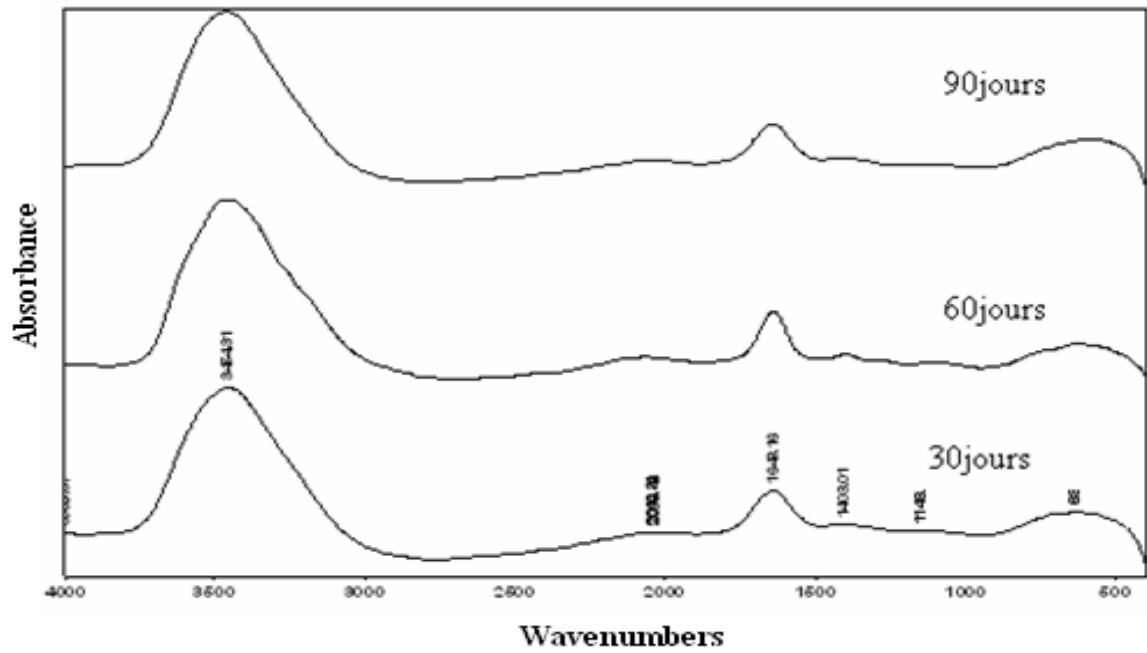


Figure 4.23: Spectre IR du phénol ($C_0 = 15 \text{ mg l}^{-1}$) en présence de la souche K1D.

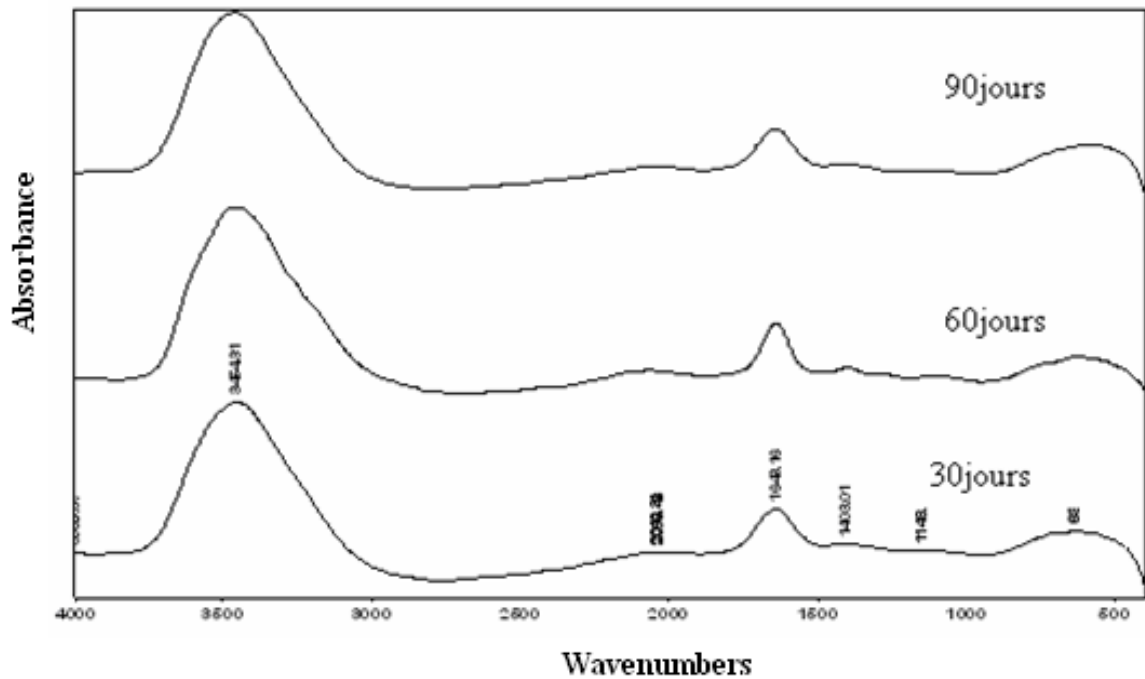


Figure 4.24 : Spectre IR du phénol ($C_0 = 15 \text{ mg l}^{-1}$) en présence de la souche K7D.

Ces spectres montrent les différentes bandes d'absorption et vibration associés de chaque échantillon.

Une chose très particulière concernant la souche K7D, est la non utilisation de n'importe quel sucre et donc son adaptation très forte à la biodégradation des HC. Cela aussi est souvent observé suite à l'activité de cette souche vis-à-vis tous les HC testés.

Sur le plan morphologique, il n'y a pas une différence significative entre les deux souches mais sur le plan d'activité biochimique sont très éloignées par la plus part de tests soit enzymatiques ou profil de fermentation de sucres. Ce nous permet de signaler une différence très nette entre les deux souches du point de vu taxonomique. En outre, les tests effectués ne permettent pas de rattacher ces deux souches à aucun taxon et faut recourir sur une identification plus approfondie en utilisant les critères génotypiques tels que le séquençage du gène d'ADN correspondant au ARN 16S.

DISCUSSION GENERALE

Notre contribution à la biodégradation des HC par des souches bactériennes isolées à partir d'une niche écologique très particulière (sol contaminé par le pétrole brut) entre dans une stratégie globale dont plusieurs laboratoires nationaux et internationaux s'intéressent à l'exploration et tirer d'avantage de propriétés des microorganismes vivent dans des milieux extrêmes.

Les souches bactériennes utilisées dans notre cas sont bien adaptées à l'utilisation du pétrole brut comme seule source de carbone et énergie et sont aussi des souches thermophiles. Ces caractéristiques révèlent l'importance de ses souches dans l'emploi et la confection des procédés de dépollution des sites contaminés par le pétrole brut ou ses dérivés (HC).

Par ailleurs, cette présente investigation dans le domaine de la dégradation des HC par des souches très performantes permettra en premier lieu de connaître l'aptitude de ces souches à la dégradation de différentes classes des HC et déterminer les conditions dans lesquelles s'effectuera la bonne élimination de ce type de polluants, en deuxième lieu.

Notre approche était d'une vision globale d'où l'aidé d'obtenir des souches capables d'éliminer les HC dans des conditions proches de celles du milieu environnant, à savoir, la concentration d'HC, le pH et la température.

Les échantillons du sol contaminé par le pétrole brut nous ont parmi d'isoler dix souches bactériennes dont deux sont considérées plus actives comme excellentes biodégradatives d'HC. D'après une caractérisation préliminaire nous supposons que les deux souches bactériennes sont chimioorganotrophes puisque le donneur d'électrons est exclusivement organique [81]. Notons que une longue période de contamination d'un environnement naturel est souvent favorable à la sélection de microorganismes performants qui peuvent soit participer au cométabolisme des HC, soit les utiliser comme seules sources de carbone et d'énergie [82]. Ainsi, de nombreux microorganismes ont été isolés à partir de

milieux fortement contaminés pour leurs propriétés de dégradation et de minéralisation des HC selon Sutherland [83].

Les résultats de l'optimisation de la dégradation de Cyclohexanol à différentes valeurs du pH, montrent que les souches bactériennes K1D et K7D dégradent la plus rapide se produit dans la gamme de pH de 7 et 9, et la température la plus favorable était 45-55°C. Dans ces conditions la biodégradation d'HC cyclique a permis d'atteindre des efficacités très appréciables (100% en 5 jours). La température influence la biodégradation des HC, elle agit directement sur l'état physique et sur la composition du pétrole brute ou raffiné ; une diminution de la température augmente la viscosité du produit pétrolier, réduit la volatilité des fractions volatiles toxiques pour la microflore bactérienne. La température influence également sur la composition de la communauté bactériennes et la cinétique du métabolisme microbien [84]. Et Selon Dibble et Bartha [79] et Hambrick et al.[80] qui ont trouvé que la dégradation des HC est plus élevée dans des conditions légèrement basiques. Par contre, et selon Prescott et Harley [85] qui ont montré qu'il est possible de trouver des microorganismes dans des sites pollués dans des milieux extrêmes ayant une température *in situ* allant de -10°C à 110°C et pH de 5,5 à 11,5.

Nous pouvons expliquer l'augmentation de la masse bactérienne des deux souches K1D et K7D par son utilisation du Cyclohexanol, comme source de carbone et d'énergie, car le processus de dégradation intégrale conduit au recyclage du carbone de son état organique à son état minéral (CO₂) comme un sous produit et l'alcalinité du milieu est due à la présence des autres sous produits portant le groupement NH₂. Le processus complète de dégradation est appelé minéralisation ou biodégradation ultime [86]. Et selon Marchand et Kantin [87] si la bactérie atteint sa cible, la biodégradation est envisageable soit par :

- Adsorption sur le substrat,
- Excrétion des tensions actives capables de solubiliser les molécules insolubles,
- Excrétion des exoenzymes capables de transformer le substrat en petite molécule, soluble, susceptibles de traverser l'enveloppe cellulaire bactérienne.

Dans les mêmes conditions opératoires (45 °C et pH 7) la biodégradation du deuxième hydrocarbure cyclique "Cyclohexanone" a été complète (100%) au bout de 9 jours. Par contre, les hydrocarbures aromatiques "Phénol et Benzène" ayant une grande effet toxique sur la plupart des microorganismes et sont potentiellement cancérigènes aux êtres humains [88]. Cependant, les hautes concentrations du Benzène affectent la capacité de la dégradation de ce composé, et créent un retard au cours de la croissance microbienne comme rapporté Saravanan et al [89]. Du même, nos souches ont montré une résistance vis-à-vis les fortes concentrations du Benzène dont nous avons estimé une croissance nettement faible et une phase du décalage s'est produite au-delà d'une concentration initiale de 75 mg l⁻¹. Mais après quatre mois d'incubation en batch à 45 °C nous avons enregistré une valeur de dégradation supérieure à 94% pour une concentration maximale de 150 mg l⁻¹ ceci peut être expliquer par une consommation progressive du substrat, d'une part, et élaboration d'un mécanisme d'adaptation, d'autre part. Les mêmes constatations ont été remarquées dans le cas du Phénol d'où le taux de biodégradation était de 100% à une concentration inférieur à 100 mg l⁻¹, qu'a pris approximativement 33 jours d'incubation, alors qu'il a pris approximativement 70 jours pour dégrader 59,2% et 82,67% respectivement des concentration initiales de 125 et 150 mg l⁻¹ par la souche K1D et 80,8 et 81,33% par K7D pour 125 et 150 mg l⁻¹, respectivement. D'après Fusey et Oudot [90] des fortes concentrations de substrat peuvent inhiber le processus de dégradation ou par des effets toxique sur la microflore par la fraction volatile de l'HC. Les procédés biologiques sont toutefois très sensibles aux fluctuations de la concentration de substrats toxiques telles que le phénol et le benzène, puisque à partir d'une teneur seuil, l'activité microbienne est inhibée [91].

D'une manière générale, les HC de faibles poids moléculaires sont plus facilement dégradés que ceux de hauts poids moléculaires [92,93]. Leur biodégradabilité dans le milieu naturel dépend également de leur biodisponibilité vis-à-vis des microorganismes susceptibles de les dégrader : les HC les plus petits étant les plus solubles, ils sont plus accessibles aux microorganismes et donc plus facilement biodégradables [94].

En effet, deux voies métaboliques sont généralement préconisées, notamment celles liées à la dégradation du Cyclohexanol et du Benzène selon les schémas ci-dessous (Figure 4.25 et 4.26).

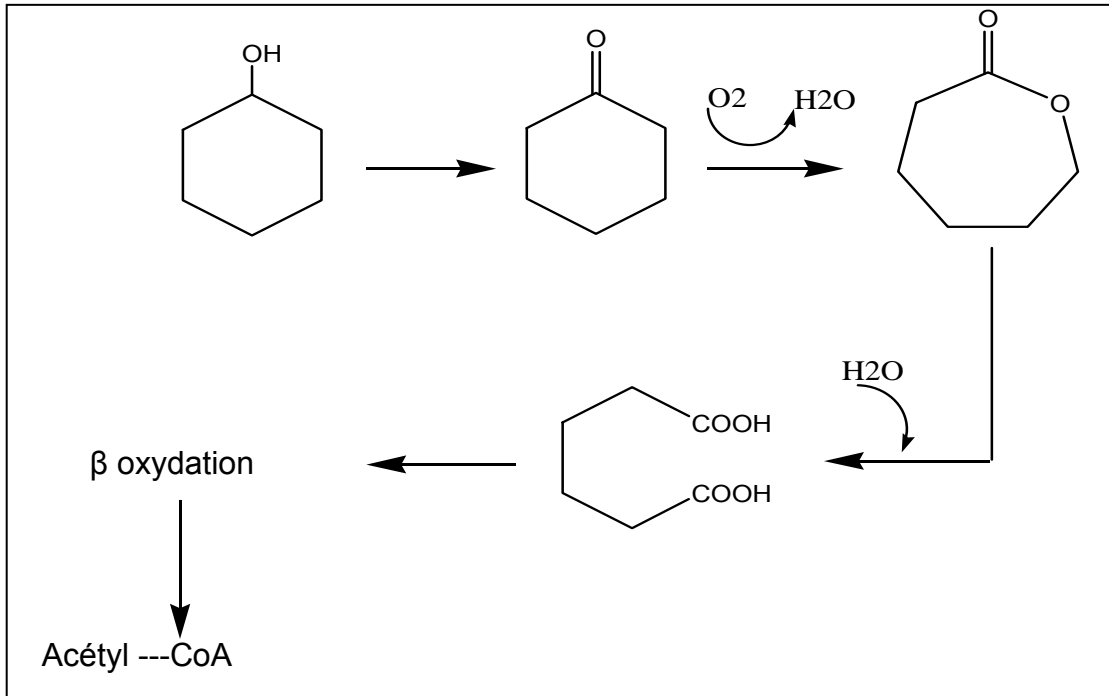


Figure 4.25 : Voie métabolique générale de Cyclohexanol.

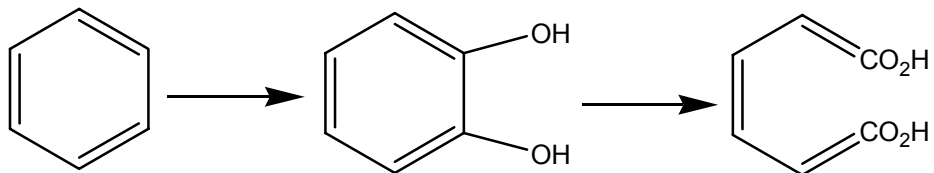


Figure 4.26: dégradation de benzène dans les conditions aérobies

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude du potentiel biodégradatif est réalisée sur deux types d'hydrocarbures, cycliques et monoaromatiques choisis en raison de leur disponibilité et leur solubilité dans l'eau comme solvant servant comme milieu de culture. De ce fait, la durée d'incubation des expériences entreprises a été variée pour les besoins de la représentativité du processus d'évolution de la biodégradation en fonction du temps ainsi que pour permettre la dégradation totale des différents types d'HC étudiés.

Il ressort des expériences effectuées que les bactéries à Gram négatif partiellement identifiées sont capables de dégrader les HC cycliques tels que le Cyclohexanol et le Cyclohexanone. Cette dégradation peut atteindre un pourcentage de 100% en moins de 10 jours à température de 45°C et pH neutre. Au vu des résultats obtenus nous pouvons donc en conclure que les deux HC cycliques sont facilement biodégradables par les deux souches sélectionnées. Ceci est en concordance parfaite avec la littérature dont les HC à C9 sont les plus facilement dégradables par une très grande variété de microorganismes. Pour les HC aromatiques, les deux souches bactériennes ont montré une capacité de dégradation aussi intéressante même pour les concentrations les plus élevées (83% en cas du phénol et 95% en cas du Benzène) mais dans une durée très lente (90 et 120 jours pour le phénol et Benzène, respectivement).

Cette présente étude permet de retenir les potentialités des souches sélectionnées en tant que fortes dégradatrices des HC et de souligner l'importance du sol saharien de l'Algérie contaminé par le pétrole brut comme un biotope bien adapté pour rechercher les microorganismes ayant une capacité multiple en vue d'une application environnementale fortement souhaitable.

Le travail présenté ici a évidemment une durée limitée et est loin de venir à bout des problèmes envisagés. Sa prolongation devrait nous semble t'il porter sur les points suivants :

- Identification complète des souches sélectionnées par les outils de la biologie moléculaire ;
- Etudier les facteurs influençant la biodégradation tels que la salinité du milieu et le volume d'inoculum ;
- Mise en évidence des enzymes responsables à la biodégradation après extraction, purification et caractérisation ;
- Essais de la biodégradation enzymatique en mode libre et/ou immobilisé ;
- Optimisation du potentiel biodégradatif en utilisant un bioréacteur en mode continu.

BIBLIOGRAPHIE

1. Delavie., «Les phénomènes de pollution dans les pays en voie de développement», Hachette multimédia, (2001), 25.
2. C.O.I et l'UNISCO., «La pollution marine est d'origine continentale COI : commission océanographique intergouvernementale», (1999), 63
3. Lacaze J.C., «La pollution pétrolière en milieu marin», (1980), 381-382.
4. Bocard C., «Marées noire et sols pollués par des HCS Enjeux environnementaux et traitement des pollutions», (2003), 40-246.
5. Chaineau et al., «Microbial degradation in soil microcosms of fuel oil hydrocarbons from drilling cuttings», from ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY, VOL 29,(1995), 1615-1621.
6. Jouanneau, Y., Willison, J.C. et D. Rodarie., «Dégradation microbiologique des hydrocarbures aromatiques polycycliques». Rapport pour l'ADEME, (1999), 156.
7. C.E.Chitour., Raffinage; «Les propriétés physique des hydrocarbures et des fractions pétrolières», Tome 1, (1999), 386.
8. Bouquet.D., «La méditerranée en péril», (2001), 1-14.
9. Sultani.M., «Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes». Variation en fonction de la source de carbone, 2005, pp.16.
10. Institute national de recherché et de sécurité (INRS), fiche solvants, «les hydrocarbures aromatiques», (2004).
11. Hyland J.L., Schneider E.D., «Petroleum hydrocarbons and their effects on marine organisms», populations, communities, and ecosystems, (1976).
12. Szeliga, J. et A. Dipple., «DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol epoxides», Chem. Res. Toxicol.(1998), 1-11.
13. Denissenko, MF., A. Pao, M. Tang et GP. «Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53», Science 274,(1996), 430-432.
14. Randerath, K., E. Randerath, G. D. Zhou, N. Supunpong, L. Y. He, T. J. McDonald et K.C. Donnelly. «Genotoxicity of complex PAH mixtures recovered from contaminated lake sediments as assessed by three different methods». Environ Mol Mutagen 33(4),(1999), 303-312.
15. Calvet R., «Le sol propriétés et fonctions», Tome 2 phénomènes physiques et chimiques applications agronomiques et environnementales,(2003), 381-382.

16. Bertrand, J.C. et Mille, G., «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,(1989), 343-385.
17. Payne, J.R. and Philipps, C.R., «Photochemistry of petroleum in water: Photooxidation causes changes in oil and enhances dissolution of its oxidized products». *Environmental Science and Technology* 19,(1985), 569-579.
18. Rontani, J.F., Rambeloarisoa, E., Bertrand, J.C. and Giusti, G., «Favourable interaction between photooxidation and bacterial degradation of anthracène in sea water»,(1992).
19. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, *communiqué de presse*, (6 Janvier 2000).
20. Bertrand, J.C. et Mille, G., «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,(1989), 343-385.
21. Tissot, B.P. and Welte, D.H., «*Petroleum formation and occurrence*». Springer, Berlin, (1984).
22. Ballerini, D., C. Gatellier et T. Vogel., «Techniques de traitement par voie biologique des sols pollués». *Rapport pour l'ADEME*, (1998), 248.
23. Costes, J.-M. et V. Druelle., «Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement: la réhabilitation des anciens site industriels». *Revue de l'Institut Français du Pétrole* 52(4), (1997), 425-440.
24. Chu, W. et C. Y. Kwan., «Remediation of contaminated soil by a solvent/surfactant system». *Chemosphere* 53. (2003), 9-15.
25. Harmsen, J., «Possibilities and limitations of landfarming for cleaning contaminated soils». *On-Site Bioreclamation: Processes for Xenobiotic and Hydrocarbon Treatment*, R. E.-B. Hinchee, ed, (1991).
26. Newman, L. A. et C. M. Reynolds., «Phytodegradation of organic compounds». *Curr Opin Biotechnol* 15(3), (2004), 225-230.16.
27. Jouanneau, Y., Willison, J.C., Meyer, C., Krivobok, S., Chevron, N., Besombes, J-L. et G.Blake., «Stimulation of pyrene mineralization in freshwater sediments by bacterial and plant bioaugmentation». *Environ. Sci. Technol.* 39, (2005), 5729-5735.
28. Massin J.M et all., «La pollution des mers par les hydrocarbures, recueil de preuve concernant les rejets en prévenance des navires», (1993), 120.

29. Rodier, J et Call., «L'analyse de l'eau, eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer»; 8^e édition,(2005), 1383
30. Churchill, S. A., J. P. Harper et P. F. Churchill.,«Isolation and characterization of a *Mycobacterium* species capable of degrading three- and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons».Appl Environ Microbiol 65(2), (1999), 549-552.
31. Dean-Ross,D.,«Degradation of pyrene by *Mycobacterium flavescens*». Appl Microbiol Biotechnol 46(3), (1996), 307-312.
32. Demanèche, S., C. Meyer, J. Micoud, M. Louwagie, J. C. Willison et Y. Jouanneau., «Identification and functional analysis of two aromatic-ring-hydroxylating dioxygenases from a *Sphingomonas* strain that degrades various polycyclic aromatic hydrocarbons».Appl Environ Microbiol 70,(2004), 6714-6725.
33. Armengaud, J., B. Happe et K. N. Timmis., « Genetic analysis of dioxin dioxygenase of *Sphingomonas* sp. strain RW1: catabolic genes dispersed on the genome». J. Bacteriol.180 (15),(1998), 3954-3966.
34. Carredano, E., A. Karlsson, B. Kauppi, D. Choudhury., « Substrate binding site of naphthalene 1,2-dioxygenase: functional implications of indole binding». J Mol Biol 296(2),(2000), 701-712.
35. Ensley, B. D. et D. T. Gibson., «Naphthalene dioxygenase: purification and properties of a terminal oxygenase component».J Bacteriol 155(2),(1983), 505-511.
36. Williams, W.C., «Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis». In: Williams, W.C. (Eds.), Advances in lipid methodology – Two.The Oily Press Scotland,(1993), 69-111.
37. Dong, J.Z., Vorkink, W.P. and Lee, M.L., Origin of long-chain alkylcyclohexanes and alkylbenzenes in coal-bed wax. Geochimica et Cosmochimica Acta 57,(1993), 837-849.
38. Davis, J.B. and Raymond, R.L., «Oxidation of alkyl-substituted cyclic hydrocarbons by *Nocardia* during growth on *n*-alkanes». Applied Microbiology 9,(1961), 383-388.
39. Beam, H.W. and Perry, J.J., «Microbial degradation and assimilation of *n*-alkyl-substituted cycloparaffins». Journal of Microbiology 118,(1974),394-399.
40. Feinberg, E.L., Ramage, P.I.N. and Trudgill, P.W., « The degradation of *n*-alkylcycloalkanes by a mixed bacterial culture». Journal of General Microbiology 121,(1980), 507-511.
41. Rontani, J.F. and Bonin, P., «Utilization of *n*-alkyl-substituted cyclohexanes by a marine *Alcaligènes*». Chemosphere 24,(1992),1441-1446.

42. Dutta, T.K. and Harayama, S., «Biodegradation of *n*-alkylcycloalkanes and *n*-alkylbenzenes *via* new pathway in *Alcanivorax* sp. Strain MBIC 4326». Applied and Environmental Microbiology 64,(2001),1970-1974.
43. Bertrand, J.C., Bianchi, M., Al Mallah, M., Acquaviva, M. and Mille, G., «Hydrocarbon Biodegradation and hydrocarbonoclastic bacterial communities composition grown in seawater as a function of sodium chloride concentration». Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 168, (2000), 125-138.
44. Trudgill, P.W., «Microbial degradation of the alicyclic ring: structural relationship and metabolic pathway», (1984), 131-180.
45. Bouchez, M., Blanchet, D., Haeseler, F. et Vandecasteele, J.P., «Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement– Propriétés, origines, devenir». Revue de l'Institut Français du Pétrole. Vol. 51, N° 3,(1996).
46. Sikkema, J., Poolman, B., Koning, W.N. and de Bont, J.A.M., «Effect of the membrane on tetralin on the functional and structural properties of artificial and bacterial membranes». Journal of Bacteriology 174,(1994), 2986-2992.
47. Uribe, S., Ramirez, J. and Pena, A., «Effect of β -pinene on yeast membrane functions». Journal of Bacteriology 161,(1985), 1195-1200.
48. Cerniglia, D.E., «Microbial transformation of aromatic hydrocarbons». In: Atlas, R.M. (Ed.), Petroleum Microbiology. Macmillan Publishing Company, New York.(1984), 99-128.
49. Gibson, D.T., Mahadevan, V., Jerina, D.M., Yagi, H. and Yeh, H.J.C., «Oxidation of the carcinogens benzo(a)pyrene and benz(a)anthracene to dihydrodiols by a bacterium». Science, 189,1975, pp. 295-297.
50. Dagley, S., «Catabolism of aromatic compounds by microorganisms». Advances in Microbiology Physiology 6,(1971), 1-46.
51. Chablain, P.A., Zgoda, A.L., Sarde, C.O. and Truffaut, N., «Genetic and molecular organisation of the alkylbenzene catabolism operon in the psychrotrophic strain *Pseudomonas Putida* 01G3». Applied Microbiology 67, (2001), 453-458.
52. Hopper, D.J., «Microbial degradation of aromatic hydrocarbons». In: Watkinson, R.J. (Ed.), Development in biodegradation of hydrocarbons-1. Applied Science Publishers, London,(1978), 85-112
53. Leahy, J.G. and Colwell, R.R., «Microbial degradation of hydrocarbons in the environment». Microbiological Reviews 54, (1990), 305-315.
54. Atlas, R.M., «Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective». Microbial Reviews 45, 1990, pp 180-209.

55. Rattledge, C., Degradation of aliphatic hydrocarbons. In: Watkinson, R.J.(Ed.), «Development in biodegradation of hydrocarbons». Applied Sciences Publishers. Vol. 1,(1978), 1-46. London.
56. Atlas, R.M. and Bartha, R., «Biodegradation and mineralization of petroleum in seawater at low temperature». Canadian Journal of Microbiology 18,(1972), 1851-1855.
57. Walworth, J., Braddock, J. and Woolard.,«Nutrient and temperature interactions in bioremediation of cryic soi»l. Cold Region Science and Technology 32,(2001), 85-91.
58. Song, H.G., Wang, X. And Bartha, R., «Bioremediation potential of terrestrial fuel spills». Applied and Environmental Microbiology 56,(1990), 652-656.
59. Rike, A.G., Haugen, K.B., Borrensen, M., Engene, B. and Kolstad, P., In situ biodegradation of petroleum hydrocarbons in frozen arctic soils. Cold Region Science and technology 907, (2003), 1-24.
60. Annweiler, E., Richnow, H.H., Antranikian, G., Hebenbrock, S., Garms, C., Franke, S., Francke, W. and Michaelis, W., «Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans*». Applied and Environmtal Micobiology 66, (2000), 518-523.
61. Bossard, I. And Bartha, R., «The fat of petroleum in soil ecosystems». In: Atlas, R.M. (Ed.), Petroleum Microbiology. Macmillan, New York, (1984), 440-445.
62. Röling, W.F.M., Head, I.M. and Larter, S.R., «The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects». Research in Microbiology 154, (2003), 321-328.
63. ZoBell, C.E., «Microbial modification of crude oil in the sea. In: Proceedings of joint conferences on prevention and control of oil spills». American. Petroleum. Institute. Washington, D.C.,(1969), 317-326.
64. Hurst, C.J., Sims, R.C., Sims, J., Sorensen, D.L., McLean, J.E. and Huling, S., «Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation as a function of oxygen tension in contaminated soils». Journal of Hazardous materials 51, (1996), 193-208.
65. Boyd, T.J., Montgomery, M.T., Spargo, B.J., Smith, D.C., Coffin, R.B., Kelley, C.A. and Mueller, J.G., «Effects of oxygenation on hydrocarbon biodegradation in a hypoxic environment». Bioremediation. Journal 5, (2001), 145-157.
66. Dibble, J.T. and Bartha, R., «Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge». Applied and Environmental Microbiology 37, (1979), 729-739.

67. Hambrick, G.A., DeLaune, R.D. and Patrick, W.H.Jr., «Effect of estuarine sediment pH and oxidation-reduction potential on microbial hydrocarbon degradation». *Applied Environmental Microbiology* 40, (1980), 365-369.
68. Connan, J., Lacrampe-Coulomb, G. and Magot, M., «Origin of gases in reservoirs». In: *Proc. International Gas Research Conference, Cannes, France, 6-9 November, (1995)*.
69. Larter, S., Wilkhelms, A., Head, I., Koopmans, M., Aplin, A., Di-Primio, R., Zwasch, C., Erdmann, M. and Telnaes, N., «The control of the composition of biodegraded oils in the deep subsurface-part 1: Biodegradation rate in petroleum reservoirs». *Organic Geochemistry* 34, (2003), 601-613.
70. Grassia, G.S., McLean, K.M., Glenat, P., Bauld, J. and Sheedy, A.J., «A systematic survey for thermophilic fermentative bacteria and archaea in high temperature petroleum reservoirs ». *FEMS Microbiology Ecology* 21, (1996), 47-58.
71. Spormann, A.F. and Widdel, F., « Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria ». *Biodegradation* 11, (2000), 85-105.
72. Zengler, K., Richnow, H.R., Rossello-Moro, R., Michaelis, W. and Widdel, F., « Methane formation from long chain alkanes by anaerobic microorganisms ». *Nature* 401, (1999), 266-269.
73. Rabus, R. and Widdel, F., «Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria ». *Archives of Microbiology*, (1995), 163, 96-103.
74. Silverstein R.M., Bassler G. et Morrill T.C., « Identification spectrométrique de composés organiques », Traduction français de la 5ième Edition par E.Larue, DeBoek Université, Paris, (1998), 99.
75. Cerniglia, C. E.«Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons». *B0iodegradation* **3**:, (1992), 351-368.
76. Chaîneau C.H. and Morel J.L et «Microbial Degradation in Soil Microcosms of fuel Oil Hydrocarbons from Drilling Cuttings». From *ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY*, Vol 29, (1995), 1615-1621.
77. Goyal, A. K. et G. J. Zylstra «Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39». *Appl Environ Microbiol* **62**(1): (1996), 230-236.
78. Jerome J.Perry.James T.staley.Stephen lorry .microbiologie .PCEM-PCEP.1ièr cycle licence .2^{ème} cycle/master .DUNOD .Cours questions de revision,(2004), 891.

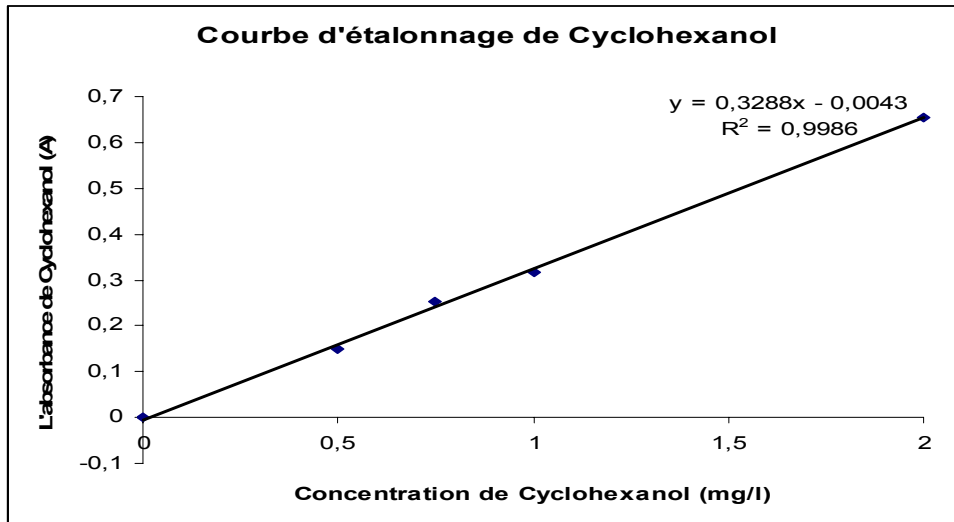
79. Dibble, J.T. and Bartha, R. «Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge». *Applied and Environmental Microbiology* 37, (1979), 729-739.
80. Hambrick, G.A., DeLaune, R.D. and Patrick, W.H.Jr. «Effect of estuarine sediment pH and oxidation-reduction potential on microbial hydrocarbon degradation». *Applied Environmental Microbiology* 40,(1980), 365-369.
81. Bartha.R and Atlas R.M., «the microbiology of aquatic oil spills». *Adv.Apl Microbiol* (22),(1977), 225-226
82. Kanaly R.A. and Harayama S. «Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria». *J.Bacteriol.* 182(8),(2000), 2_59-2_67.
83. Sutherland J.B., Rafii F., Khan A.A. and Cerniglia C.E. «Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation». In : *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*. Edited by L.Y. Young and C.E. Cerniglia, Wiley-Liss, Inc., (1995), New York.
84. Gibson, T.D. and Subramanian, V.,. «Microbial degradation of aromatic hydrocarbons». In:Gibson, T.D. (Ed.), *Microbial degradation of organic compounds*, MarcelDekker, New York, Basel, (1984), 181-252.
85. Prescott M.J ; Harley P and A.M Charissou. «State of knowledge on becoming to organic pollutants in sols during the natural biodegradation and after biotreatments», (2007), 4.
86. Contiero J, Angelis DF, «Use of weathered diesel oil as a low-cost raw material for biosurfactant production». Brazil, (2008), 274.
87. Marchand, M et Kantin, R. «Contamination chimiques en milieu aquatiques ; 2iem partie : comportement des substances selon les modes de contamination».(1999), 279
88. Kumar, G.S., Jagannadham, M.V. and Ray, M.K., «Low temperature induced changes in composition and fluidity of lipopolysaccharides in the Antarctic psychrotrophic bacterium *Pseudomonas syringae*». *Journal of Bacteriology* 184, (2002), 6746-6749.
89. Saravanan, P., Pakshirajan, K., Saha, P. «Growth kinetics of an indigenous mixed microbial consortium during phenol degradation in a batch reactor». *Bioresour. Technol.* 99, (2008), 205–209.
90. Fusey,J.Oudot., «Comparaison de deux methode d'evaluation de la biodegradation des hydrocarbures in vitro Matter U Organ 11, (4), (1976), 241-251.

91. Lee, K., Park, J.W., Ahn, I.S. «Effect of additional carbon source on phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* G7»,(2003), 105, 157–167
92. Goodin J.D. and Webber M.D. «Persistence and fate of anthracene and benzo(a)pyrene in municipal sludge treated soil». *J. Environ. Qual.* 24, (1995), 271-278.
- 93 Mueller J.G., Devereux R., Santavy D.L., Lantz S.E., Willis S.G. and Pritchard P.H. «Phylogenetic and physiological comparisons of PAH-degrading bacteria from geographically diverse soils». *Anton.Leeuw.Int.J.* 71, (1997), 329-343.
94. Straube W.L., Jones-Meehan J., Pritchard P.H. and Jones W.R. Bench-scale «Optimization of bioaugmentation strategies for treatment of soils contaminated with high molecular weight polyaromatic hydrocarbons». *Resou.Conserv.Recy.* 27, (1999), 27-37.

ANNEX

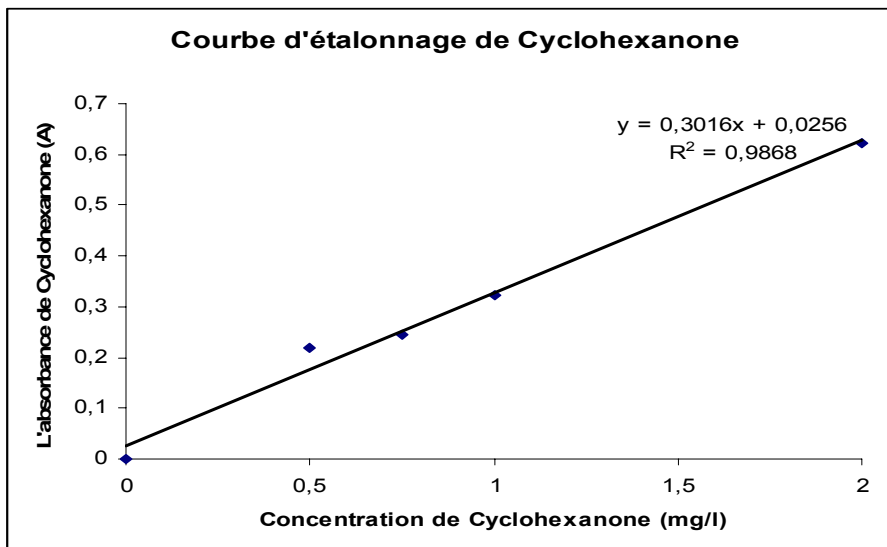
A/ Les courbes d'étalonnages

1- La courbe d'étalonnage de Cyclohexanol



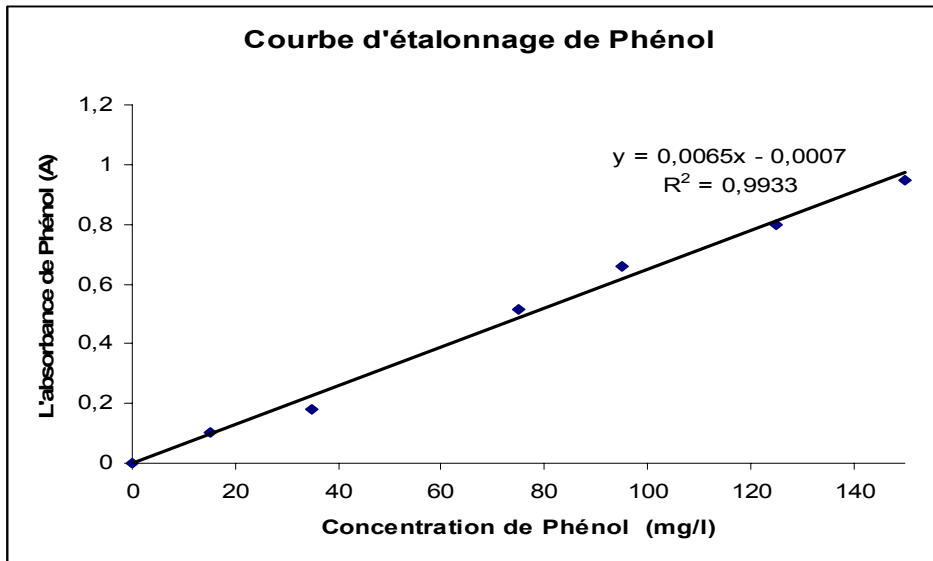
Concentration de Cyclohexanol en mg/l	0.5	0.75	1	2
L'absorbance de Cyclohexanol à 288nm	0.149	0.478	0.318	0.655

2- La courbe d'étalonnage de Cyclohexanone



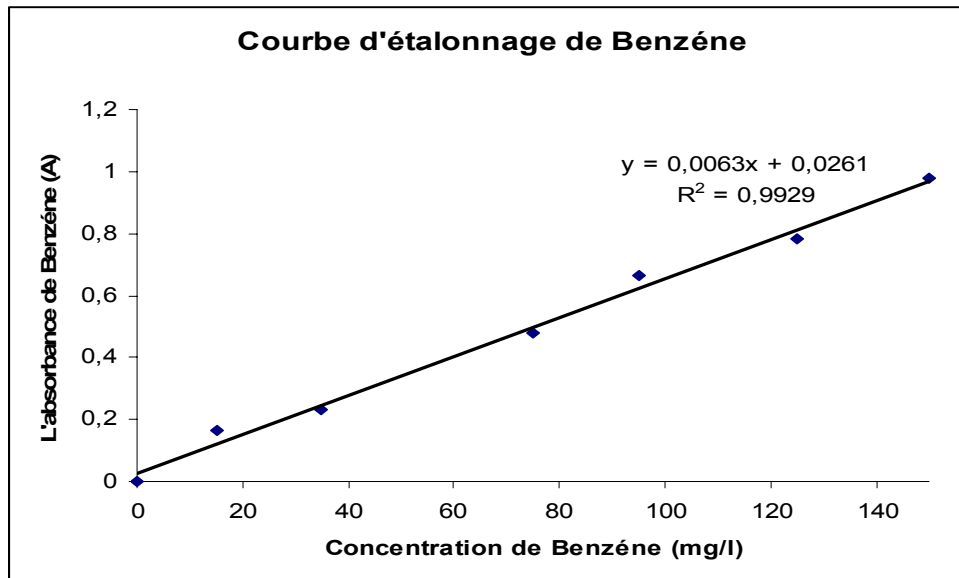
Concentration de Cyclohexanone en (mg/l)	0.5	0.75	1	2
L'absorbance de Cyclohexanone à 276,5 nm	0.220	0.244	0.323	0.623

3- La courbe d'étalonnage de phénol

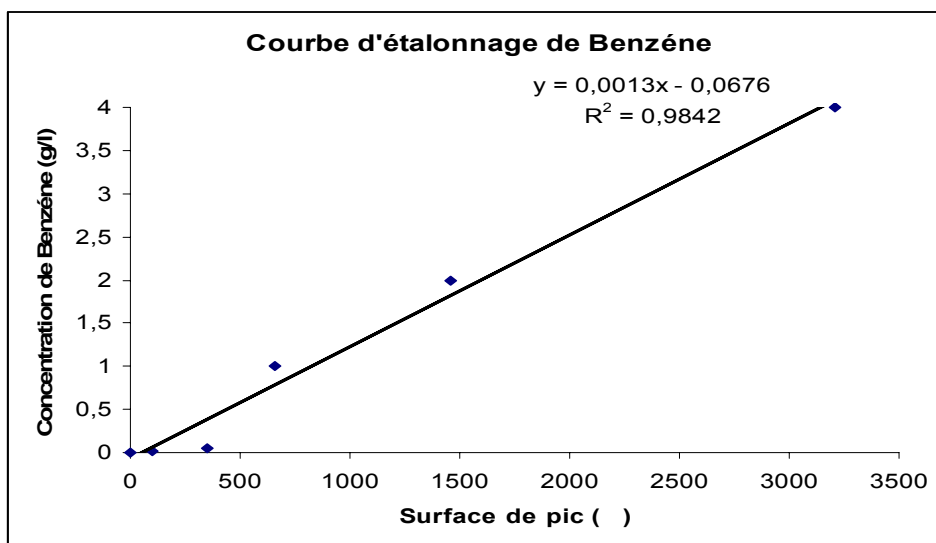


Concentration de Phénol en mg/L	15	35	75	95	125	150
L'absorbance de phénol à 270 nm	0.105	0.179	0.514	0.657	0.798	0.950

4- La courbe d'étalonnage de Benzène



Concentration de Benzène (mg/L)	15	35	75	95	125	150
L'absorbance de Benzène 262 nm	0.163	0.231	0.478	0.662	0.784	0.978



Concentration de Benzène en g/L	0.25	0.5	1	2	4
Surface de pic en CPG	98	348	662	1460	3207

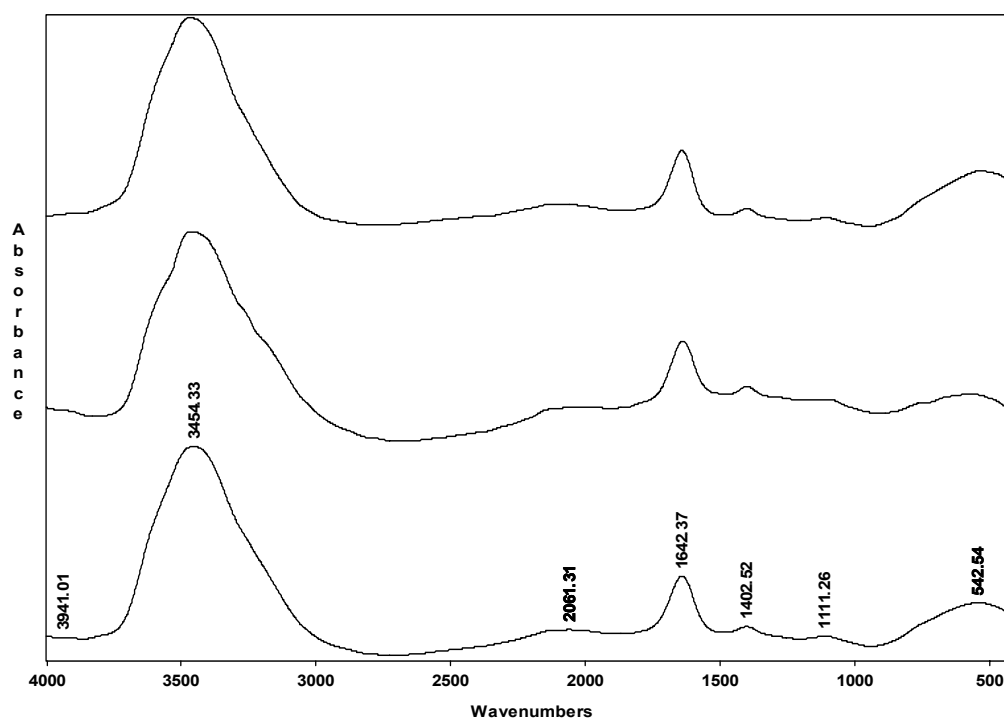


Figure4.27 : Spectre IR de 75 mg/l de phénol (K1D)

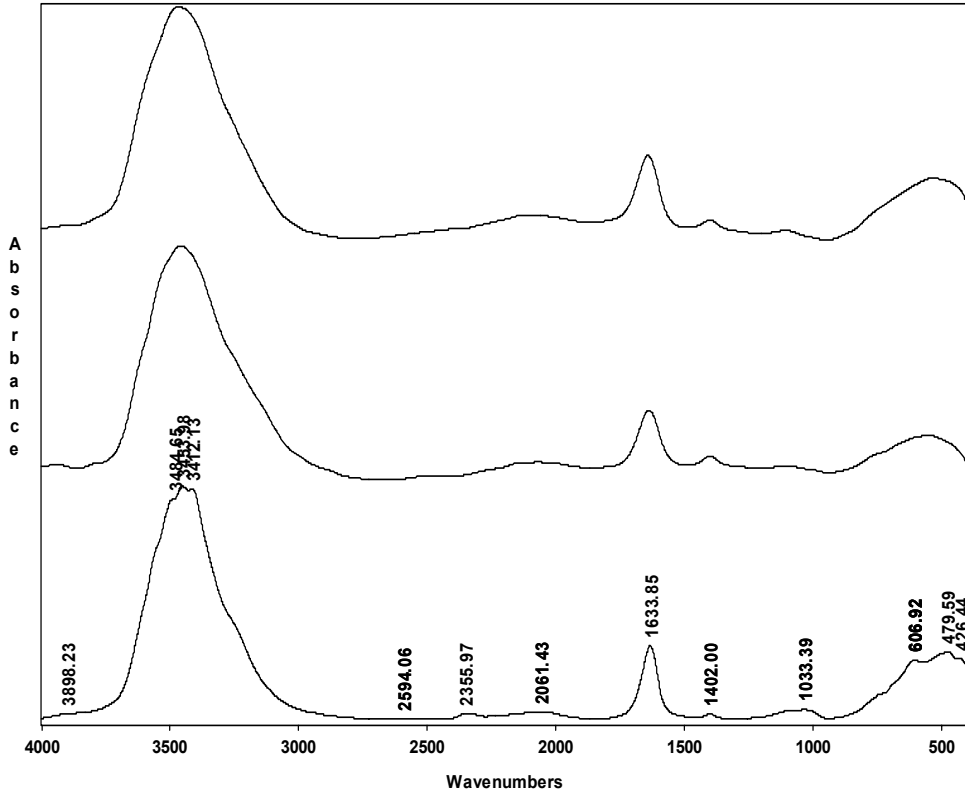


Figure 4.28 : Spectre IR de 35mg/l de phénol (K7D)

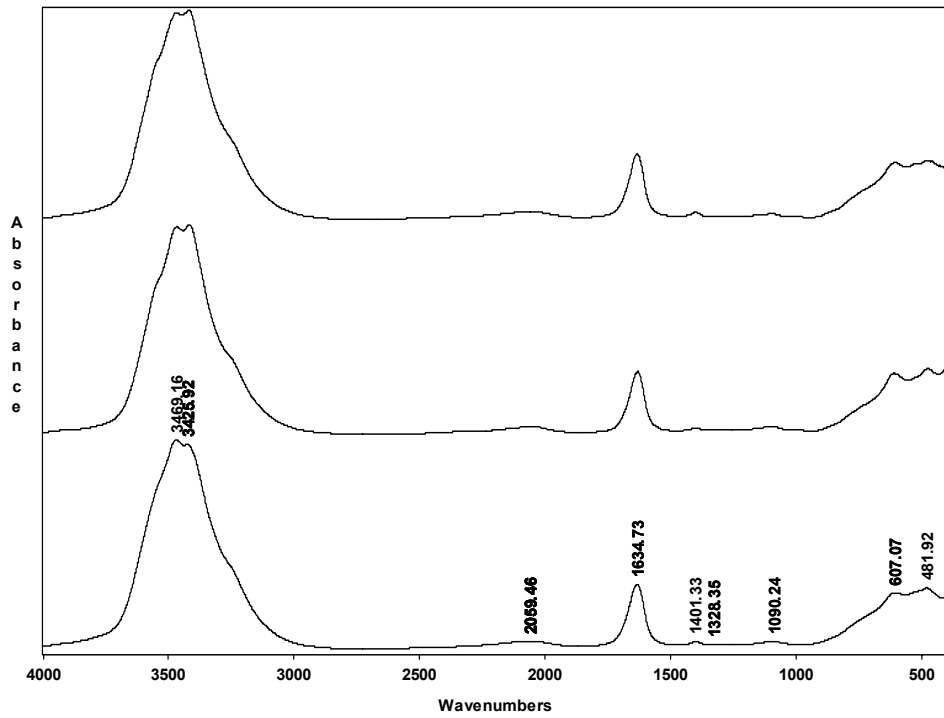


Figure 4.29 : Spectre IR de 75mg/l de phénol (K7D)

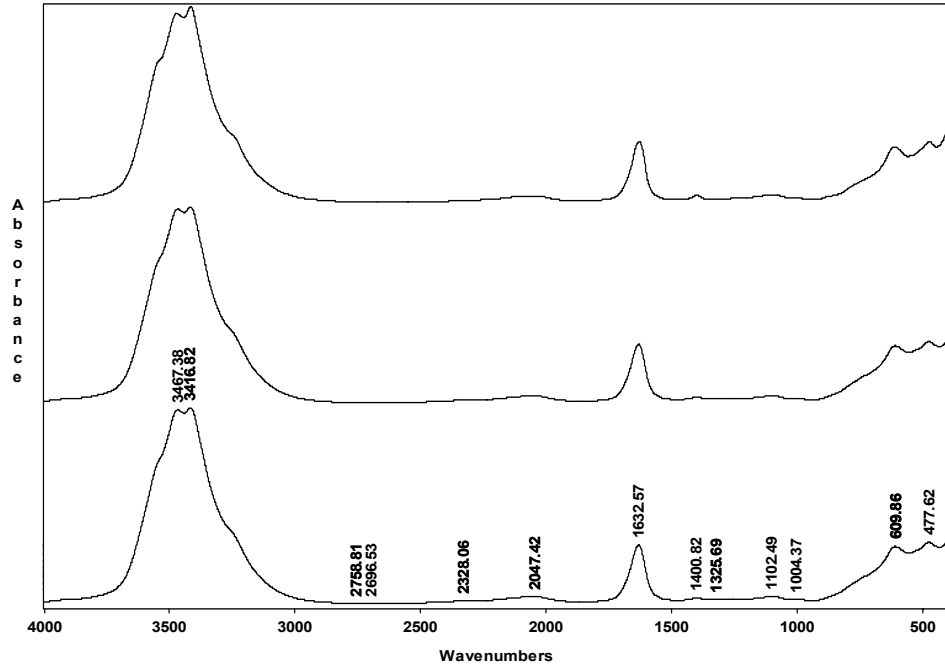


Figure 4. 30: Spectre IR de125mg/l de phénol (K1D)

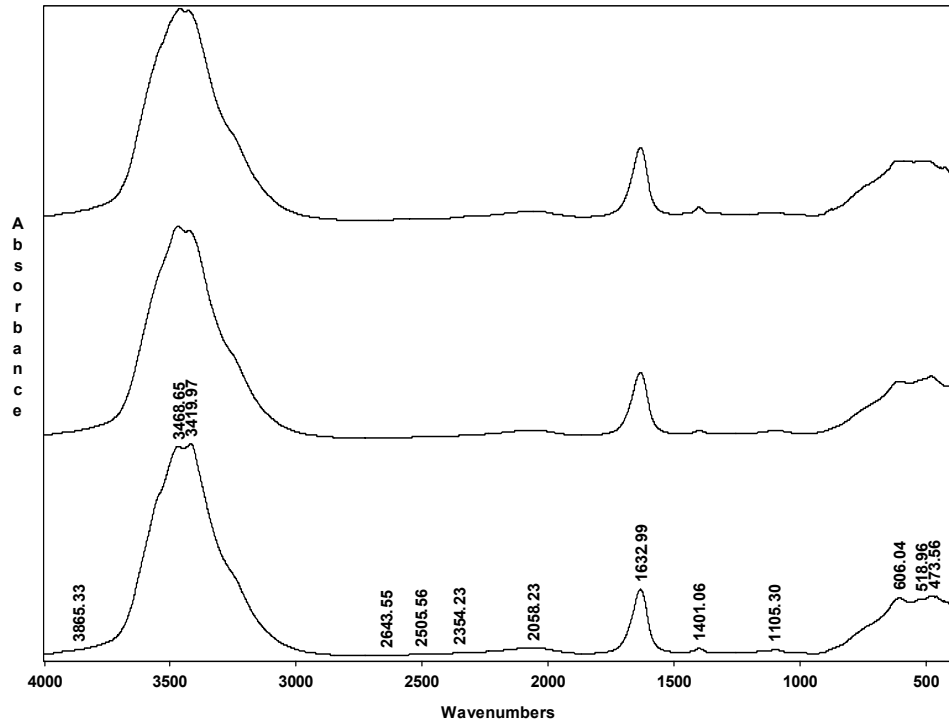


Figure 4.31 : Spectre IR de125mg/l de phénol (K7D)

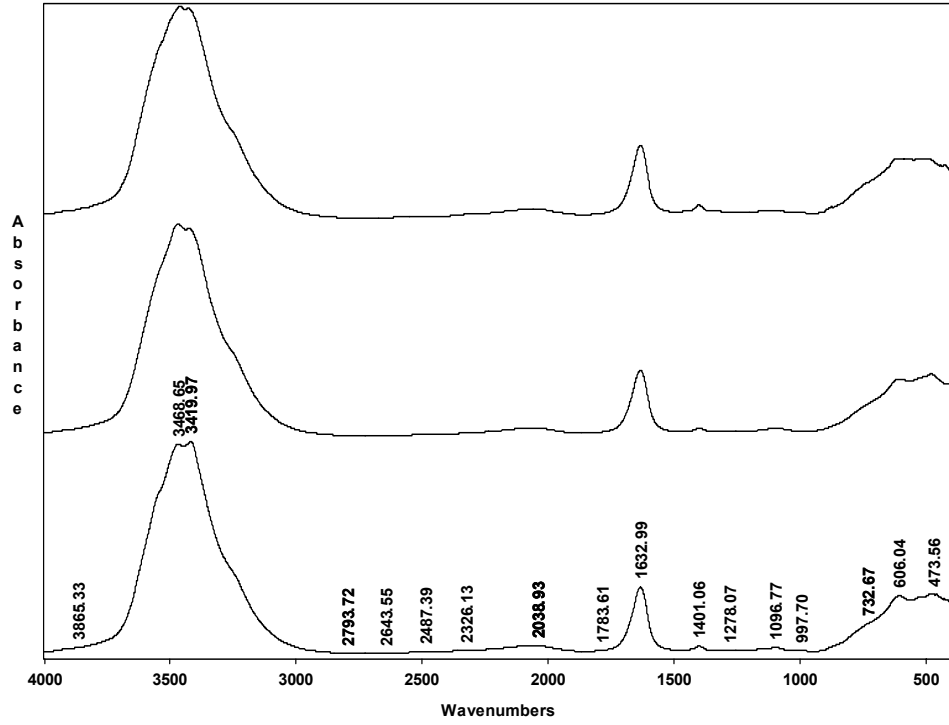


Figure 4.32 : Spectre IR de 150mg/l de phénol (K7D)

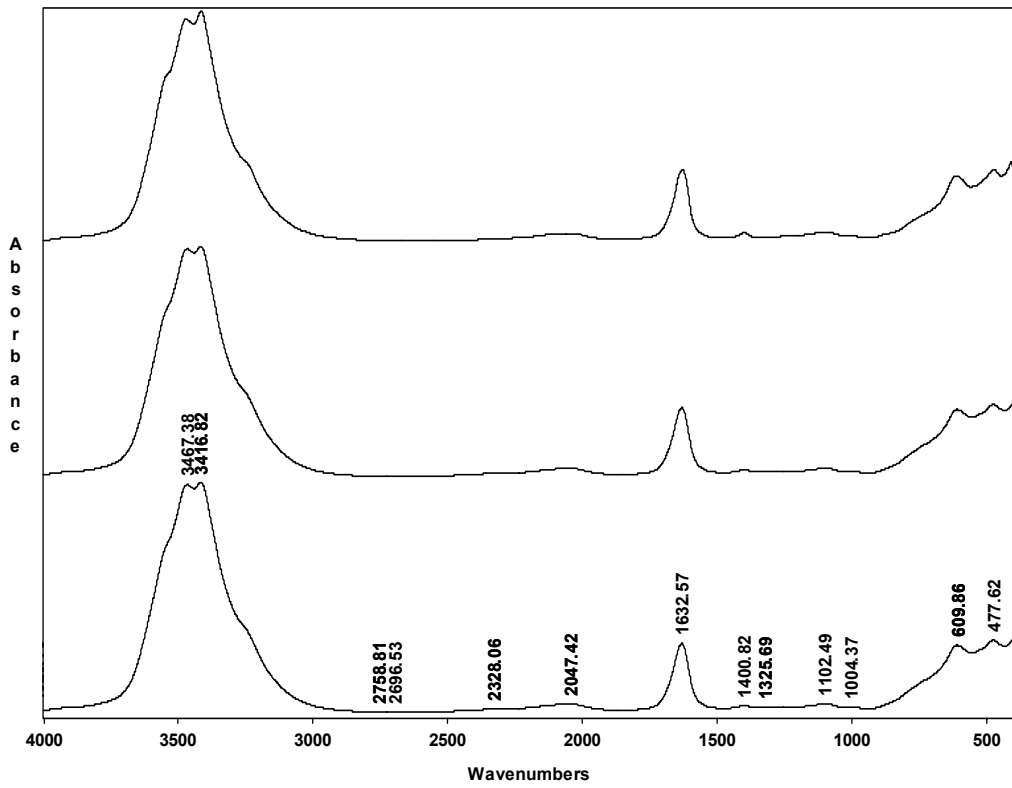


Figure 4.33 : Spectre IR de 150 mg/l de phénol (K1D)

B/ EXPRESSION DES RESULTATS DE LA GALERIE BIOCHIMIQUE

- l'API 20 E:tableau des résultats –méthode de 18 à 24 heures

Tableau 1 : L'API 20 E:tableau des résultats –méthode de 18 à 24 heures

TUBE	REACTION	
	POSITIVE	NEGATIVE
ONPG	Jaune	Incolore
ADH	Rouge ou orange	Jaune
LDC	Rouge ou orange	Jaune
ODC	Rouge ou orange	Jaune
CIT	Turquoise ou bleu foncé	Vert pale ou jaune Aucun dépôt noir
H₂S	Dépôt noir	
URE	Rouge ou orange	Jaune
TDA	Brun Rouge	Jaune
IND	Anneau rouge	jaune
VP	Rose foncé ou rouge	Incolore où rose pale
GEL	Diffusion du pigment	Aucune diffusion incolore
GLU MAN INO SOR RHA SAC MEL AMY ARA	Jaune	Bleu ou bleu vert
GLU	N ₂ gazeux (présence de bulles) Présence de NO ₂ (rouge)	Jaune
Reduction des nitratess	Présence de bulles et coloration jaune (après l'ajout du réactif zinc)	Orange (après l'ajout du réactif de zinc)

BIBLIOGRAPHIE

1. Delavie., «Les phénomènes de pollution dans les pays en voie de développement», Hachette multimédia, (2001), 25.
2. C.O.I et l'UNESCO., «La pollution marine est d'origine continentale COI : commission océanographique intergouvernementale», (1999), 63
3. Lacaze J.C., «La pollution pétrolière en milieu marin», (1980), 381-382.
4. Bocard C., «Marées noire et sols pollués par des HCS Enjeux environnementaux et traitement des pollutions», (2003), 40-246.
5. Chaineau et al., «Microbial degradation in soil microcosms of fuel oil hydrocarbons from drilling cuttings», from ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY, VOL 29,(1995), 1615-1621.
6. Jouanneau, Y., Willison, J.C. et D. Rodarie., «Dégradation microbiologique des hydrocarbures aromatiques polycycliques». Rapport pour l'ADEME, (1999), 156.
7. C.E.Chitour., Raffinage; «Les propriétés physique des hydrocarbures et des fractions pétrolières», Tome 1, (1999), 386.
8. Bouquet.D., «La méditerranée en péril», (2001), 1-14.
9. Soultani.M., «Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes». Variation en fonction de la source de carbone, 2005, pp.16.
10. Institute national de recherché et de sécurité (INRS), fiche solvants, «les hydrocarbures aromatiques», (2004).
11. Hyland J.L., Schneider E.D., «Petroleum hydrocarbons and their effects on marine organisms», populations, communities, and ecosystems, (1976).
12. Szeliga, J. et A. Dipple., «DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol epoxides», Chem. Res. Toxicol.(1998), 1-11.
13. Denissenko, MF., A. Pao, M. Tang et GP. «Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53», Science 274,(1996), 430-432.
14. Randerath, K., E. Randerath, G. D. Zhou, N. Supunpong, L. Y. He, T. J. McDonald et K.C. Donnelly. «Genotoxicity of complex PAH mixtures recovered from contaminated lake sediments as assessed by three different methods». Environ Mol Mutagen 33(4),(1999), 303-312.

15. Calvet R., «Le sol propriétés et fonctions», Tome 2 phénomènes physiques et chimiques applications agronomiques et environnementales,(2003), 381-382.
16. Bertrand, J.C. et Mille, G., «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,(1989), 343-385.
17. Payne, J.R. and Philipps, C.R., «Photochemistry of petroleum in water: Photooxidation causes changes in oil and enhances dissolution of its oxidized products». Environmental Science and Technology 19,(1985), 569-579.
18. Rontani, J.F., Rambeloarisoa, E., Bertrand, J.C. and Giusti, G., «Favourable interaction between photooxidation and bacterial degradation of anthracène in sea water»,(1992).
19. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, communique de presse, (6 Janvier 2000).
20. Bertrand, J.C. et Mille, G., «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,(1989), 343-385.
21. Tissot, B.P. and Welte, D.H., «Petroleum formation and occurrence». Springer, Berlin, (1984).
22. Ballerini, D., C. Gatellier et T. Vogel., «Techniques de traitement par voie biologique des sols pollués».Rapport pour l'ADEME, (1998), 248.
23. Costes, J.-M. et V. Druelle., «Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement: la réhabilitation des anciens site industriels». Revue de l'Institut Français du Pétrole 52(4), (1997), 425-440.
24. Chu, W. et C. Y. Kwan., «Remediation of contaminated soil by a solvent/surfactant system». Chemosphere 53. (2003), 9-15.
25. Harmsen, J., «Possibilities and limitations of landfarming for cleaning contaminated soils».On-Site Bioreclamation: Processes for Xenobiotic and Hydrocarbon Treatment, R. E.-B. Hinchee, ed, (1991).
26. Newman, L. A. et C. M. Reynolds., «Phytodegradation of organic compounds».Curr Opin Biotechnol 15(3), (2004), 225-230.16.
27. Jouanneau, Y., Willison, J.C., Meyer, C., Krivobok, S., Chevron, N., Besombes, J-L. et G.Blake., «Stimulation of pyrene mineralization in

freshwater sediments by bacterial and plant bioaugmentation». Environ. Sci. Technol. 39, (2005), 5729-5735.

28. Massin J.M et all., «La pollution des mers par les hydrocarbures, recueil de preuve concernant les rejets en prévenance des navires», (1993), 120.

29. Rodier, J et Call., «L'analyse de l'eau, eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer»; 8^e édition,(2005), 1383

30. Churchill, S. A., J. P. Harper et P. F. Churchill.,«Isolation and characterization of a *Mycobacterium* species capable of degrading three- and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons».Appl Environ Microbiol 65(2), (1999), 549-552.

31. Dean-Ross,D.,«Degradation of pyrene by *Mycobacterium flavescens*». Appl Microbiol Biotechnol 46(3), (1996), 307-312.

32. Demanèche, S., C. Meyer, J. Micoud, M. Louwagie, J. C. Willison et Y. Jouanneau., «Identification and functional analysis of two aromatic-ring-hydroxylating dioxygenases from a *Sphingomonas* strain that degrades various polycyclic aromatic hydrocarbons».Appl Environ Microbiol 70,(2004), 6714-6725.

33. Armengaud, J., B. Happe et K. N. Timmis., « Genetic analysis of dioxin dioxygenase of *Sphingomonas* sp. strain RW1: catabolic genes dispersed on the genome». J. Bacteriol.180 (15),(1998), 3954-3966.

34. Carredano, E., A. Karlsson, B. Kauppi, D. Choudhury., « Substrate binding site of naphthalene 1,2-dioxygenase: functional implications of indole binding». J Mol Biol 296(2),(2000), 701-712.

35. Ensley, B. D. et D. T. Gibson., «Naphthalene dioxygenase: purification and properties of a terminal oxygenase component».J Bacteriol 155(2),(1983), 505-511.

36. Williams, W.C., «Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis». In: Williams, W.C. (Eds.), Advances in lipid methodology – Two.The Oily Press Scotland,(1993), 69-111.

37. Dong, J.Z., Vorkink, W.P. and Lee, M.L., Origin of long-chain alkylcyclohexanes and alkylbenzenes in coal-bed wax. Geochimica et Cosmochimica Acta 57,(1993), 837-849.

38. Davis, J.B. and Raymond, R.L., «Oxidation of alkyl-substituted cyclic hydrocarbons by *Nocardia* during growth on *n*-alkanes». Applied Microbiology 9,(1961), 383-388.

39. Beam, H.W. and Perry, J.J., «Microbial degradation and assimilation of *n*-alkyl-substituted cycloparaffins». *Journal of Microbiology* 118,(1974),394-399.
40. Feinberg, E.L., Ramage, P.I.N. and Trudgill, P.W., « The degradation of *n*-alkylcycloalkanes by a mixed bacterial culture». *Journal of General Microbiology* 121,(1980), 507-511.
41. Rontani, J.F. and Bonin, P., «Utilization of *n*-alkyl-substituted cyclohexanes by a marine *Alcaligènes*». *Chemosphere* 24,(1992),1441-1446.
42. Dutta, T.K. and Harayama, S., «Biodegradation of *n*-alkylcycloalkanes and *n*-alkylbenzenes via new pathway in *Alcanivorax* sp. Strain MBIC 4326». *Applied and Environmental Microbiology* 64,(2001),1970-1974.
43. Bertrand, J.C., Bianchi, M., Al Mallah, M., Acquaviva, M. and Mille, G., «Hydrocarbon Biodegradation and hydrocarbonoclastic bacterial communities composition grown in seawater as a function of sodium chloride concentration». *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 168, (2000), 125-138.
44. Trudgill, P.W., «Microbial degradation of the alicyclic ring: structural relationship and metabolic pathway», (1984), 131-180.
45. Bouchez, M., Blanchet, D., Haeseler, F. et Vandecasteele, J.P., «Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement– Propriétés, origines, devenir». *Revue de l'Institut Français du Pétrole*. Vol. 51, N° 3,(1996).
46. Sikkema, J., Poolman, B., Koning, W.N. and de Bont, J.A.M., «Effect of the membrane on tetralin on the functional and structural properties of artificial and bacterial membranes». *Journal of Bacteriology* 174,(1994), 2986-2992.
47. Uribe, S., Ramirez, J. and Pena, A., «Effect of β -pinene on yeast membrane functions». *Journal of Bacteriology* 161,(1985), 1195-1200.
48. Cerniglia, D.E., «Microbial transformation of aromatic hydrocarbons». In: Atlas, R.M. (Ed.), *Petroleum Microbiology*. Macmillan Publishing Company, New York.(1984), 99-128.
49. Gibson, D.T., Mahadevan, V., Jerina, D.M., Yagi, H. and Yeh, H.J.C., «Oxidation of the carcinogens benzo(a)pyrene and benz(a)anthracene to dihydrodiols by a bacterium». *Science*, 189,1975, pp. 295-297.
50. Dagley, S., «Catabolism of aromatic compounds by microorganisms». *Advances in Microbiology Physiology* 6,(1971), 1-46.

51. Chablain, P.A., Zgoda, A.L., Sarde, C.O. and Truffaut, N., «Genetic and molecular organisation of the alkylbenzene catabolism operon in the psychrotrophic strain *Pseudomonas Putida* 01G3». *Applied Microbiology* 67, (2001), 453-458.
52. Hopper, D.J., «Microbial degradation of aromatic hydrocarbons». In: Watkinson, R.J. (Ed.), *Development in biodegradation of hydrocarbons-1*. Applied Science Publishers, London, (1978), 85-112
53. Leahy, J.G. and Colwell, R.R., «Microbial degradation of hydrocarbons in the environment». *Microbiological Reviews* 54, (1990), 305-315.
54. Atlas, R.M., «Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective». *Microbial Reviews* 45, 1990, pp 180-209.
55. Ratledge, C., Degradation of aliphatic hydrocarbons. In: Watkinson, R.J.(Ed.), «Development in biodegradation of hydrocarbons». Applied Sciences Publishers. Vol. 1,(1978), 1-46. London.
56. Atlas, R.M. and Bartha, R., «Biodegradation and mineralization of petroleum in seawater at low temperature». *Canadian Journal of Microbiology* 18,(1972), 1851-1855.
57. Walworth, J., Braddock, J. and Woolard.,«Nutrient and temperature interactions in bioremediation of cryic soil». *Cold Region Science and Technology* 32,(2001), 85-91.
58. Song, H.G., Wang, X. And Bartha, R., «Bioremediation potential of terrestrial fuel spills». *Applied and Environmental Microbiology* 56,(1990), 652-656.
59. Rike, A.G., Haugen, K.B., Borrensen, M., Engene, B. and Kolstad, P., In situ biodegradation of petroleum hydrocarbons in frozen arctic soils. *Cold Region Science and technology* 907, (2003), 1-24.
60. Annweiler, E., Richnow, H.H., Antranikian, G., Hebenbrock, S., Garms, C., Franke, S., Francke, W. and Michaelis, W., «Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans*». *Applied and Environmental Microbiology* 66, (2000), 518-523.
61. Bossard, I. And Bartha, R., «The fate of petroleum in soil ecosystems». In: Atlas, R.M. (Ed.), *Petroleum Microbiology*. Macmillan, New York, (1984), 440-445.
62. Röling, W.F.M., Head, I.M. and Larter, S.R., «The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects». *Research in Microbiology* 154, (2003), 321-328.

63. ZoBell, C.E., «Microbial modification of crude oil in the sea. In: Proceedings of joint conferences on prevention and control of oil spills». American. Petroleum. Institute. Washington, D.C.,(1969), 317-326.
64. Hurst, C.J., Sims, R.C., Sims, J., Sorensen, D.L., McLean, J.E. and Huling, S., «Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation as a function of oxygen tension in contaminated soils». *Journal of Hazardous materials* 51, (1996), 193-208.
65. Boyd, T.J., Montgomery, M.T., Spargo, B.J., Smith, D.C., Coffin, R.B., Kelley, C.A. and Mueller, J.G., «Effects of oxygenation on hydrocarbon biodegradation in a hypoxic environment». *Bioremediation. Journal* 5, (2001), 145-157.
66. Dibble, J.T. and Bartha, R., «Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge». *Applied and Environmental Microbiology* 37, (1979), 729-739.
67. Hambrick, G.A., DeLaune, R.D. and Patrick, W.H.Jr., «Effect of estuarine sediment pH and oxidation-reduction potential on microbial hydrocarbon degradation». *Applied Environmental Microbiology* 40, (1980), 365-369.
68. Connan, J., Lacrampe-Coulomb, G. and Magot, M., «Origin of gases in reservoirs». In: *Proc. International Gas Research Conference, Cannes, France, 6-9 November, (1995)*.
69. Larter, S., Wilkhelms, A., Head, I., Koopmans, M., Aplin, A., Di-Primio, R., Zwasch, C., Erdmann, M. and Telnaes, N., «The control of the composition of biodegraded oils in the deep subsurface-part 1: Biodegradation rate in petroleum reservoirs». *Organic Geochemistry* 34, (2003), 601-613.
70. Grassia, G.S., McLean, K.M., Glenat, P., Bauld, J. and Sheedy, A.J., «A systematic survey for thermophilic fermentative bacteria and archaea in high temperature petroleum reservoirs ». *FEMS Microbiology Ecology* 21, (1996), 47-58.
71. Spormann, A.F. and Widdel, F., « Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria ». *Biodegradation* 11, (2000), 85-105.
72. Zengler, K., Richnow, H.R., Rossello-Moro, R., Michaelis, W. and Widdel, F., « Methane formation from long chain alkanes by anaerobic microorganisms ». *Nature* 401, (1999), 266-269.
73. Rabus, R. and Widdel, F., «Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria ». *Archives of Microbiology*, (1995), 163, 96-103.

74. Silverstein R.M., Bassler G. et Morrill T.C., « Identification spectrométrique de composés organiques », Traduction français de la 5^{ième} Edition par E.Larue, DeBoek Université, Paris, (1998), 99.

75. Cerniglia, C. E. «Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons». Biodegradation **3**, (1992), 351-368.

76. Chaîneau C.H. and Morel J.L et «Microbial Degradation in Soil Microcosms of fuel Oil Hydrocarbons from Drilling Cuttings». From ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY, Vol 29, (1995), 1615-1621.

77. Goyal, A. K. et G. J. Zylstra «Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39». Appl Environ Microbiol **62**(1): (1996), 230-236.

78. Jerome J.Perry.James T.staley.Stephen lorry .microbiologie .PCEM-PCEP.1^{ier} cycle licence .2^{eme} cycle/master .DUNOD .Cours questions de revision,(2004), 891.

79. Dibble, J.T. and Bartha, R. «Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge». Applied and Environmental Microbiology **37**, (1979), 729-739.

80. Hambrick, G.A., DeLaune, R.D. and Patrick, W.H.Jr. «Effect of estuarine sediment pH and oxidation-reduction potential on microbial hydrocarbon degradation». Applied Environmental Microbiology **40**,(1980), 365-369.

81. Bartha.R and Atlas R.M., «the microbiology of aquatic oil spills». Adv.Appl Microbiol (22),(1977), 225-226

82. Kanaly R.A. and Harayama S. «Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria». *J.Bacteriol.* **182**(8),(2000), 2_59-2_67.

83. Sutherland J.B., Rafii F., Khan A.A. and Cerniglia C.E. «Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation». In : *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*. Edited by L.Y. Young and C.E. Cerniglia, Wiley-Liss, Inc., (1995), New York.

84. Gibson, T.D. and Subramanian, V.,. «Microbial degradation of aromatic hydrocarbons». In:Gibson, T.D. (Ed.), *Microbial degradation of organic compounds*, MarcelDekker, New York, Basel, (1984), 181-252.

85. Prescott M.J ; Harley P and A.M Charissou. «State of knowledge on becoming to organic pollutants in sols during the natural biodegradation and after biotreatments», (2007), 4.

86. Contiero J, Angelis DF, «Use of weathered diesel oil as a low-cost raw material for biosurfactant production». Brazil, (2008), 274.
87. Marchand, M et Kantin, R. «Contamination chimiques en milieu aquatiques ; 2^{iem} partie : comportement des substances selon les modes de contamination».(1999), 279
88. Kumar, G.S., Jagannadham, M.V. and Ray, M.K., «Low temperature induced changes in composition and fluidity of lipopolysaccharides in the Antarctic psychrotrophic bacterium *Pseudomonas syringae*». Journal of Bacteriology 184, (2002), 6746-6749.
89. Saravanan, P., Pakshirajan, K., Saha, P. «Growth kinetics of an indigenous mixed microbial consortium during phenol degradation in a batch reactor». Bioresour. Technol. 99, (2008), 205–209.
90. Fusey,J.Oudot., «Comparaison de deux methode d'evaluation de la biodegradation des hydrocarbures in vitro Matter U Organ 11, (4), (1976), 241-251.
91. Lee, K., Park, J.W., Ahn, I.S. «Effect of additional carbon source on phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* G7»,(2003), 105, 157–167
92. Goodin J.D. and Webber M.D. «Persistence and fate of anthracene and benzo(a)pyrene in municipal sludge treated soil». *J.Environ.Qual.* 24, (1995), 271-278.
- 93 Mueller J.G., Devereux R., Santavy D.L., Lantz S.E., Willis S.G. and Pritchard P.H. «Phylogenetic and physiological comparisons of PAH-degrading bacteria from geographically diverse soils». *Anton.Leeuw.Int.J.* 71, (1997), 329-343.
94. Straube W.L., Jones-Meehan J., Pritchard P.H. and Jones W.R. Bench-scale «Optimization of bioaugmentation strategies for treatment of soils contaminated with high molecular weight polyaromatic hydrocarbons». *Resou.Conserv.Recy.* 27, (1999), 27-37.