

République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Blida1

Faculté : des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologie



Mémoire de fin d'études en vue de
l'obtention du Diplôme de Master
Option : Biotechnologie microbienne

Thème

Isolement et caractérisation préliminaire de bactéries
hydrocarbonoclastes marines à partir des sites contaminés par des
hydrocarbures pétroliers.

Présenté par :

BOUCHERIT Kawthar

HACHICHI Hanane

Devant le jury :

BENKORTEBY H.	MAA (USDB, Blida1)	President
AMMAD F.	MCA (USDB, Blida1)	Promotrice
ZENATI B.	MCB (C.N.R.D.P.A)	Co Promoteur
BENSAID F.	MAA (USDB, Blida1)	Examinatrice

Année universitaire 2019/2020



Dédicaces :

Je tiens à dédier ce modeste travail à mes tendres parents **Hamid** et **Radia**, pour leurs sacrifices, leur patience, leur amour inconditionnel, leur confiance en moi, à eux qui ont donnée de leurs âmes pour me voir réussir un jour, vous êtes la source de ma joie et de ma force aucune dédicace ne saurait exprimer mon amour et mon respect envers vous !

A mon cher mari **Habib**, qui m'a toujours poussé vers le haut, m'a motivé même dans les moments les plus stressants en sachant pertinemment que j'y arriverai un jour, merci de faire ressortir le meilleur de moi-même.

A mon binôme **Kawthar** une sœur de cœur, la sœur que je n'ai jamais eue, et a **Nesrine** l'amie fidèle qui a toujours marqué sa présence même en étant loin, merci d'avoir rempli notre parcours universitaire de beaux souvenirs, et merci d'avoir été les partenaires, les amies et les camarades dont tout le monde rêve.

A mes chères tentes qui ne m'ont jamais oublié avec leurs prières, a vous mes deuxièmes mamans **Kheira, Zoubida, Nadia** et **Souhila**.

A mes chers et tendres grands parents **Salah** et **Fatima el Zohra** qui nous ont quitté trop tôt, et qui malheureusement n'assisterons pas à ma joie aujourd'hui.

A tous nos enseignants qui nous ont guider, épauler, et dirigé tout au long de nos cinq années en faisons de leurs mieux pour nous conférer une bonne formation malgré tout.



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A ma chère mère **Samira**, vous avez guidé mes pas, et m'avez couverte de tendresse. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Vous m'avez aidée et soutenue pendant de nombreuses années avec à chaque fois une attention renouvelée.

A mon cher père **Hakim**, ce travail est le résultat de l'esprit de sacrifice dont vous avez fait preuve, de l'encouragement et le soutien que vous ne cessez de manifester, j'espère que vous y trouverez les fruits de votre semence et le témoignage de ma grande fierté de vous avoir comme père.

A celui qui m'a soutenue tout au long de ce projet : mon fiancé **Billel**, merci d'avoir eu confiance en mes compétences et de m'avoir épaulée.

Que dieu réunisse nos chemins pour une longue vie sereine

A mon cher frère **Mohamed**, ta bonté, ton précieux soutien, ton encouragement tout au long de mes années d'étude, ton amour et ton affection, ont été pour moi l'exemple de persévérance.

A ma chère **Zineb**, la tante exceptionnelle, ma deuxième maman a la grande femme qu'elle est, tu es ma motivation, un exemple de succès et de réussite merci d'être ma source d'inspiration.

Un spéciale dédicace à mon binôme **Hanane**, mon âme-sœur et à **Nesrine**, je n'aurais rien fait sans vous et je ne pourrais pas avancer si vous n'étiez pas là .Merci d'être toujours à mes côtés. Que Dieu nous garde toujours unies.

A toute ma famille en générale et mes amis et en particulier

Abir et **Imen** pour tous les moments que nous avons partagés durant ces années des plus difficiles aux meilleurs, en espérant pouvoir en partager encore tant d'autres.

Remerciements :

Nous remercions Dieu tout puissant « ALLAH » de nous avoir accordé le courage, la foi, et clarté d'esprit pour réaliser ce travail en ces circonstances.

Nous tenons à remercier vivement Dr. AMMAD d'avoir su nous guider tout au long de ce travail, et Dr. ZENATI d'avoir fait son possible pour nous orienter malgré la situation présente.

Nous sommes très reconnaissantes envers Mme BENKORTEBY de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de soutenance,

Nous exprimons notre gratitude aux membres du jury d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail : Mme BENSALD (MAA), Mme BENKORTEBY (MAA), Dr. AMMAD (MCA) et Dr. ZENATI (MCB),

Mais un travail ne se réalise jamais sans les soldats de l'ombre, pour cela nous faisons part de nos remerciements à toutes les personnes qui nous ont aidé ne serait-ce qu'avec une prière, et notamment ceux qui ont participé à notre formation tout au long de notre cursus universitaire : Pr BENCHAAABANE, Pr. BELKAHLA, Mme SABRI, Dr AMMAD, Pr. KRIMI ,Mme BENSALD et notre chère et défunte Mme CHEBATA (paix a son âme) et ainsi que Mme BENCHAAABANE, un grand merci également à Melle FADIL Djamila notre ingénieur de laboratoire.

Résumé

Le développement de la vie humaine n'a fait qu'empirer le phénomène de pollution des eaux de mer par les hydrocarbures, qui s'avère être un fléau majeur, les mers et les océans ont été toujours considérés par l'Homme comme une solution pour se débarrasser de tout ce qui est nocif et toxique ainsi, ces derniers sont le réceptacle final et un réservoir important pour tous les déchets anthropique, causant ainsi une toxicité remarquable sur l'écosystème aquatique en touchant toute la chaîne trophique marine du plancton et microorganisme jusqu'au mammifères marins et humain , ce qui peut être létale.

Parmi les dérivés de pétrole les plus récalcitrants qu'on retrouve au niveau des mers et des côtes nous citons les Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) et les BTEX, suite à leur déversement ce suit naturellement une chaîne d'étapes pour leurs dégradation : L'évaporation des fractions de faible poids moléculaire, la dispersion, l'émulsification, la dissolution des composés hydrosolubles, la sédimentation, la photo oxydation, et enfin la biodégradation, qui ce fait a l'aide de microorganisme marins notamment des bactéries ce qui a inspirer a la bioremédiation de ces eaux contaminées en utilisant majoritairement des bactéries hydrocarbonoclastes comme alternative au déroulement naturelle qui prendrais beaucoup plus de temps.

Mots clés : Hydrocarbures, HAPs, BTEX, Pollution, Bioremédiation, Bactéries hydrocarbonoclastes.

Abstract

Isolation and preliminary characterization of marine hydrocarbonoclast bacteria from sites contaminated by petroleum hydrocarbons

The constant evolution of human life has only worsened the phenomenon of hydrocarbons pollution of sea water, which turns out to be a major scourge. The seas and the oceans have always been considered by man as a quick fix to get rid of all what is harmful and toxic therefore, these are the final receptacle and a transmitter reservoir for all anthropogenic waste, this causing remarkable toxicity on the aquatic ecosystem by affecting the entire marine trophic chain from plankton and microorganisms to marine mammals and humans, which can be lethal. Among the most recalcitrant petroleum derivatives found at sea and coast we mention PAHs and BTEX which are aromatic hydrocarbons, following their spillage, a chain of steps for their degradation begins:

Evaporation of low molecular weight fractions, dispersion, emulsification and dissolution of water-soluble compounds, sedimentation, photo oxidation, and finally biodegradation, which is done using marine microorganisms including bacteria that inspired the bioremediation of these contaminated waters using mainly hydrocarbonoclastics bacteria as an alternative to the natural course which would take much more time.

Key words: Hydrocarbons, PAHs, BTEX, Pollution, Bioremediation, Hydrocarbonoclastics bacteria.

عزل ووصف أولي لبكتيريا هيدروكربوناتية بحرية من مواقع ملوثة بالهيدروكربونات البترولية.

الملخص

تطور حياة الإنسان لم يؤدي إلا الى تفاقم ظاهرة تلوث مياه البحر بواسطة الهيدروكربونات التي تعد واحدة من المشاكل البيئية الرئيسية، فلقد كان الإنسان دائماً ما يعتبر البحار والمحيطات حلاً للتخلص من كل ما هو ضار وسام مما جعل هذه الأخيرة خزان مهم لجميع النفايات البشرية المنشأ وهذا ما تسبب في تسمم النظام البيئي المائي الذي أثر سلباً على السلسلة الغذائية البحرية بأكملها من العوالق والكائنات الدقيقة إلى الثدييات البحرية والبشرية.

من بين المشتقات النفطية المقاومة الموجودة في البحار والسواحل نذكر PAHs و BTEX والتي تنتمي الى الهيدروكربونات العطرية ، فبعد انسكابها تتبع عدة مراحل من اجل تحليلها تتمثل في : تبخر الأجزاء ذات الوزن الجزيئي المنخفض ، التثنت ، الاستحلاب ، تذيب المركبات القابلة للذوبان في الماء ، الترسيب ، الأكسدة الضوئية ، وأخيراً التحلل البيولوجي ، والذي يتم باستخدام الكائنات الحية الدقيقة البحرية بما في ذلك البكتيريا و من خلال هذا تطرقنا إلى عملية المعالجة الحيوية لهذه المياه الملوثة باستخدام البكتيريا الهيدروكربونية كبديل للعملية الطبيعية التي تستغرق وقتاً أطول.

الكلمات المفتاحية: الهيدروكربونات ، PAHs BTEX ، التلوث ، المعالجة الحيوية ،

بكتيريا الهيدروكربونية.

Table des matières

Remerciement	
Dédicaces	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste d'abréviation	
Chapitre 1 : Les hydrocarbures	02
1- composition du pétrole	03
1-1. Hydrocarbures aliphatiques	04
1-2. Hydrocarbures aromatiques	04
1-3. Résines	05
1-4. Asphaltènes	06
2- Prévenance des rejets d'hydrocarbures pétroliers en milieu marin	08
3- Toxicité des hydrocarbures au milieu marin	08
3-1. Chez les planctons	09
3-2. Chez les poissons et mammifères marin	09
3-3. Chez l'humain	09
3-4. Effet de la biodiversité microbienne	10
4- Devenir des hydrocarbures dans l'environnement marin	10
4-1. Evaporation	10
4-2. Dispersion	11
4-3. Emulsification	11
4-4. Dissolution	11
4-5. Sédimentation	11
4-6. La photooxydation	12
4-7. La biodégradation	12
Chapitre 2 : Bactéries Hydrocarbonoclastes et Bioremédiation.	14
1- Les microorganismes hydrocarbonoclastes	15
1-1. Les fungi.....	15
1-2. Les bactéries	16
2- Les différentes stratégies permettent l'utilisation des hydrocarbures pétroliers	18
2-1. Adhésion bactérienne aux hydrocarbures	18
2-2. Mode d'accession aux hydrocarbures	18
2-2-1. Utilisation de la phase dissoute	18
2-2-2. Accession interfacial	19
2-2-3. Accession interfacial facilitée au l'émulsification	19
2-2-4. le transfert micellaire	20
3- Mécanismes de biodégradation des hydrocarbures.....	20
3-1. Généralité	20
3-2. Voies métaboliques de dégradation	22
3-2-1. Voie métabolique aérobie	22
3-2-1-1. Biodégradation aérobie des alcanes	22
3-2-1-1. La biodégradation aérobie des polluants hydrocarbonés monoaromatiques	24

3-2-1-2. La biodégradation aérobie des polluants hydrocarbonés polyaromatiques	25
3-2-2. Voie métabolique anaérobie	25
4- Approches biotechnologiques adaptées pour la remédiation de l'environnement marin contaminé par les hydrocarbures	27
4-1. Bioaugmentation	28
4-2. Biostimulation	29
4-3. Biosparging	30
4-4. Phycoremédiation	31
5- Biodégradation des hydrocarbures par des consortiums microbiens.....	33
Chapitre 3 : Etude de cas : isolement des bactéries marines à partir d'un cite contaminé par les hydrocarbures	35
1- Echantillonnage	36
1-1. Présentation du site de prélèvement	36
1-2. Méthode de prélèvement et matériels utilisés	37
1-3. L'étiquetage	38
2- Isolement des bactéries hydrocarbonoclastes	38
2-1. Isolement	38
2-2. Enrichissement et sélection des bactéries hydrocarbonoclastes	39
3- Purification	40
3-1. Première purification	40
3-2. Seconde purification	41
3-2-1. Préparation du milieu ONR7a gélosé+petrol	41
4- Conservation des isolats purifiés	42
4-1. Conservation à court terme	42
4-2. Conservation à long terme.....	43
5- Caractérisation morphologique des isolats	43
5-1. Observation macroscopique	43
5-2. Observation microscopique	44
5-2-1. A l'état frais	44
5-2-2. Coloration de Gram	45
6- Caractérisation biochimique	45
6-1. Test de mobilité	45
6-2. Test d'oxydase	46
6-3. Teste de catalase	46
6-4. Gallérie API20Eet API20NE	47
7- Caractérisation phylogénétique des isolats	48
7-1. Extraction de l'ADN génomique	48
7-2. Electrophorèse de l'ADN	48
7-3. Amplification de l'ADNr 16s, séquençage et analyse phylogénétique	48
Conclusion	51
Références bibliographique.....	52

Liste des figures

Figure 1 : Schéma des étapes de formation du pétrole.....	03
Figure 2 : Composition chimique de l'essence et du gazole.....	05
Figure 3 : Composés hydrocarbonés et non hydrocarbonés présents dans le pétrole brut.....	07
Figure 4 : Suivi des sources et des impacts de la pollution par les hydrocarbures dans le milieu marin.....	08
Figure 5 : Processus physico-chimique et biologique affectant le devenir des hydrocarbures pétroliers au sein de la colonne d'eau et des sédiments.....	13
Figure 6 : Les taxons microbiens qui dégradent le pétrole, les phyla microbiens qui dégradent le pétrole, en rouge, ont été identifiés à partir des trois domaines de la vie	15
Figure 7 : Phylogénie des principaux groupes de bactéries hydro marines.....	17
Figure 8 : Les mécanismes d'accession des microorganismes aux hydrocarbures.....	19
Figure 9 : Trois voies périphériques possibles pour la dégradation du n-alcane (aérobie) par les micro-organismes.....	23
Figure 10 : Description schématique du processus de bioremédiation (bioaugmentation).....	29
Figure 11 : Description schématique du processus de bioremédiation (biostimulation).....	30
Figure 12 : Localisation du site d'échantillonnage du port de Khemisti.....	36
Figure 13 : Présentation de la station de prélèvement des échantillons au niveau du port de khemisti.....	36
Figure 14 : Mode d'action de la benne van-veen.....	37
Figure 15 : Schéma représentant l'opération de dilution décimale successive.....	40
Figure 16 : Schéma expliquant la technique du repiquage à partir des différentes concentration (10 ⁻¹ _ 10 ⁻⁶).....	41
Figure 17 : Schéma expliquant le procédé de seconde purification.....	42
Figure 18 : Forme des colonies de la souche SdK644 cultivée dans le milieu LB, après 48 h d'incubation.....	44

Figure 19 : Test de Mannitol-mobilité des bactéries.....	46
Figure 20 : Profil d'une API test 20 ^E	47
Figure 21 : Arbre phylogénétique de la souche SdK644.....	49
Figure 22 : Arbre phylogénétique de la souche FLU5.....	50

Liste des tableaux

Tableau 1: Enzymes impliquées dans la dégradation microbienne des polluants d'hydrocarbures pétroliers.....	21
Tableau 2 : Liste des bactéries capables de dégrader les composés aromatiques.....	26
Tableau 3:Exemple de stratégies de biorestauration réussies.....	32

Liste d'abréviations :

ADBT : Alkylated dibenzothiophene

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNr : Acide désoxyribonucléique ribosomal

ADNr 16S : ADN codant la sous unité 16 S de l'ARN ribosomal

ANT : Anthracène

API : Analytical Profile Index

ARN : Acide ribonucléique

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

BaA : Benz(a)anthracene

BaP : Benzol (a) pyrène

BLAST : Basic Local Alignement Search Tool

BP : Biphenyl

BT : Benzothiophene

BTEX : Benzène, Toluène, Ethylbenzène, Xylènes

BZ : Benzoate

C : Carbone.

CaCl₂-2H₂O, : chlorure de calcium

CBP : Chlorobiphenyl

CBZ : Carbazole

CDBF : Chlorinated dibenzothophene

CDD : Chlorinated dibenzo-p-dioxin;

CHR : Chrysene

CO₂ : Dioxyde de carbone

COR : Coronene

°C : degré Celsius.

DD : Dibenzo-p-dioxin

DO : Densité Optique.

DBA : Dibenzen(a,h) anthracene

DBF : Dibenzofuran

DDBJ : DNA Data Bank of Japan

DMBaA : Dimethylbenz (a) anthracene

EMBL : European Molecular Biology Laboratory.

Fe : Fer

FeCl₂-4H₂O : Chlorure de fer

FLA : Fluoranthrene

FLE : Fluorène

g, mg : gramme, milligramme

H, min : Heure, minute.

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.

HAM : Hydrocarbures Aromatiques Mononucléiques.

H₃BO₃ : Acide borique

HCB : Hydrocarbonoclastic Bacteria

HFBT : 3-hydroxy-2-formylbenzothiophene

HPT (TPH) : Concentration d'hydrocarbures pétroliers totaux

KCl : Chlorure de potassium

LB : Lauria-Bertani

L, ml, µl : Litre, millilitre, microlitre

MgCl₂- 6H₂O : Chlorure de magnésium

MNAP : Methyl naphthalene

N : Azote

NaCl : Chlorure de sodium

NaF : Fluorure de sodium

NAP : Naphthalene

Na₂SO₄ : Sulfate de sodium

Na₂HPO₄·7H₂O : Hydrogènephosphate de sodium

NaBr : Bromure de sodium

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NH₄Cl : Chlorure d'ammonium

NaHCO₃ : Bicarbonate de sodium

Ni : Nickel

NAT : Naphthothiophene

O : Oxygène

P : Phosphore

PCR : Polymerase Chain Reaction

PHE : Phénanthrène

pH : potentiel hydrogène

PYR : Pyrène

16S : 16 Svedberg

S : Soufre

SrCl₂·6H₂O : Chlorure de strontium

sp. : Espèce non précise

Tr/min : Tour / minute

TAPSO : Acide sulfonique

TERHC : Total Extracted and Resolved Hydrocarbons

V : Vanadium

Introduction :

L'utilisation mondiale d'hydrocarbures pétroliers pour l'énergie et les matières premières dans diverses applications a augmenté avec le rejet important d'une grande variété de contaminants dans l'environnement. (Ossai *et al* 2020). Le déversement d'hydrocarbures pétroliers est une problématique environnementale fréquente dans le monde entier ; en effet, plus de 10 000 galons de pétrole ont été reportés dans la base de données internationale des déversements pétroliers. Ces déversements entraînent une dégradation dans les écosystèmes et représentent un risque pour la santé humaine (Pulgarin, 2012).

Nous pouvons distinguer de nombreuses sources anthropiques telles que les champs d'extraction et de traitement du pétrole, les accidents de carburants de transport, les fuites des réservoirs de stockage souterrains, la pétrochimie activités de l'industrie et rejets des sites de raffinerie de pétrole (Mahjoubi *et al.*, 2018), La dissolution des hydrocarbures se produit en fonction de la solubilité des composants. La solubilité varie en fonction des propriétés spécifiques telles que la taille moléculaire, la structure et la polarité (Clay, 2014). Cette dissolution est le résultat des effets combinés de la transformation chimique et de la biodégradation (Joutey *et al.*, 2013).

Selon Varjani, (2017) les hydrocarbures pétroliers sont principalement dégradés par des mécanismes d'enzymes spécifique de biodégradation soit aérobie (en présence d'oxygène) ou anaérobie (en l'absence d'oxygène).

La bioremédiation est basée sur les capacités métaboliques des micro-organismes, et elle est considérée comme le moyen le plus fiable d'éliminer le pétrole et ses composés récalcitrants. C'est une alternative plus efficace que les techniques classiques de remédiation. Une grande diversité de micro-organismes hydrocarbonoclastes a été signalé et les bactéries constituent le groupe le plus abondant. Plusieurs approches de biorestauration par bioaugmentation ou / et biostimulation ont été appliquées avec succès. (Mahjoubi *et al.*, 2018).

Les objectifs tracés pour ce travail sont :

- L'étude de différents hydrocarbures polluant le milieu marin et la mise en évidence de leurs toxicités.
- L'étude de la bioremédiation par les bactéries hydrocarbonoclastes comme alternative naturelles et durables et leurs mécanismes d'action.
- Démontrer quelques exemples d'étude de cas d'isolement de bactéries hydrocarbonoclastes marines partir de sites contaminés.

CHAPITRE I :

Les Hydrocarbures

1- Composition du pétrole :

D'après Speight (2014), de nos jours le pétrole serait peut-être la substance la plus utilisée dans la société moderne ses dérivés sont utilisés dans plusieurs industries comme le plastique, les fertilisants, le textile et les insecticides. Le mot *Petroleum* dérivé du latin est composé de *Petrae* et *Oleum* qui signifient « huile de roche » (Vieira et al., 2007).

Selon Varjani (2017), le pétrole est le résultat d'une décomposition thermique précédée par une activité microbiologique intense sur la matière organique tel que les planctons, les végétaux et les animaux, enfouies dans les profondeurs sur des de millions d'années, une fois extrait il subit une distillation au niveau des raffineries pour obtenir divers dérivés (Figure 1).

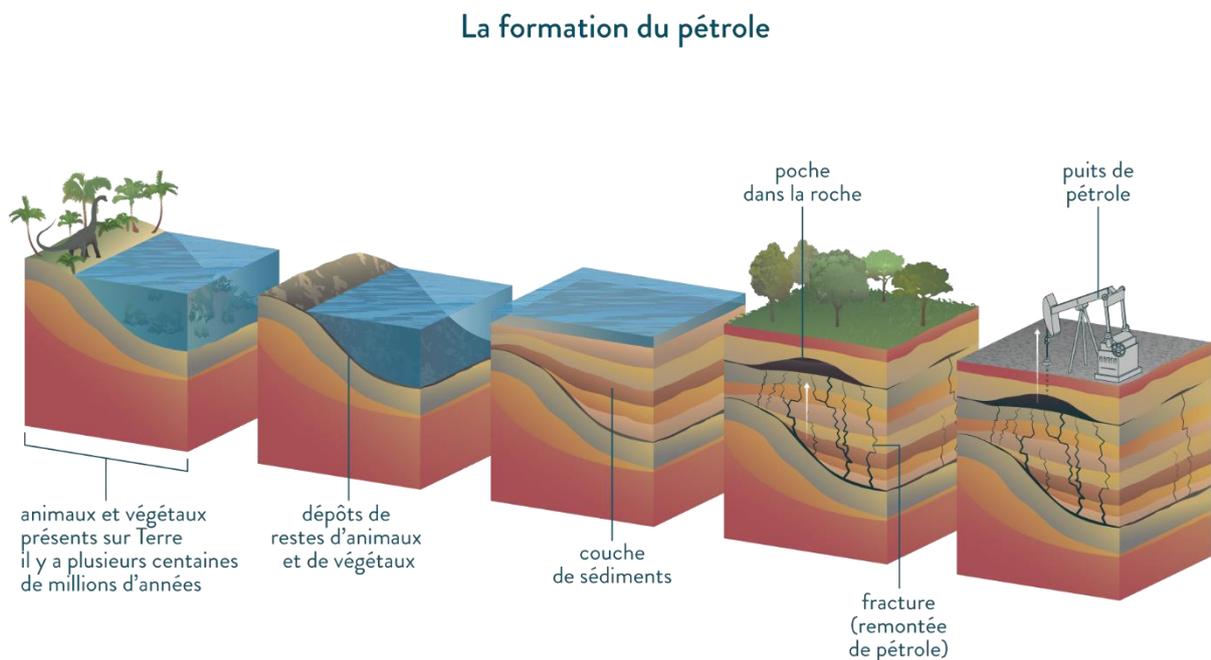


Figure 1 : Schéma des étapes de formation du pétrole (Anonyme, 2020).

D'un point de vue chimique le pétrole est un composé complexe essentiellement formé de proportions variables de carbone et d'hydrogène, mais notamment de nitrogène, d'oxygène, de soufre et de trace de métal, lui conférant ainsi un aspect liquide, visqueux et sombre (Speight, 2014).

D'après Lefebvre, (1978), la composition élémentaire des brutes se situe dans les limites suivantes :

Carbone : 84 à 87%, Hydrogène : 11 à 14%, Soufre : 0 à 5%, Azote : 0 à 1%, Oxygène : 0 à 1%

La composition du pétrole brut varie selon l'âge, l'emplacement et la profondeur du puits pétrolier, mais environ 85% des types de pétrole brut sont majoritairement classés comme : base asphalte, base paraffine, et base mixte. Le pétrole brut est classé en quatre grandes fractions : **(a)** saturées (aliphatiques), **(b)** aromatiques, **(c)** résines et **(d)** asphaltènes (Varjani, 2017).

Les composés saturés selon Varjani, (2017) sont définis comme des hydrocarbures sans doubles liaisons et représentent le pourcentage le plus élevé de constituants du pétrole brut. Ils sont classés en fonction de leurs structures chimiques en alcanes (paraffines) et cycloalcanes. Quant aux fractions saturées et aromatiques, la résine et les asphaltènes eux contiennent des composés polaires non hydrocarbonés. Chaque composé a un comportement chimique unique qui affecte sa biodégradabilité, dans l'arrangement structural des quatre classes principales du pétrole brut, les composés saturés constituent la couche qui se trouve en haut du pétrole. Alors que les asphaltènes sont des composés de masse moléculaire élevée, constituent la partie la plus sédimentée (Figure3).

1-1 Hydrocarbures aliphatiques :

Les hydrocarbures aliphatiques sont composés d'hydrogène et de carbone, qui peuvent être linéaires, ramifiés ou cyclique. Les composés aliphatiques peuvent être saturés ou insaturés (Mahdjoubi, *et al.*, 2018).

Il existe plusieurs types d'aliphatiques les hydrocarbures, y compris les alcanes, les alcènes et les alcynes. Les alcanes sont les plus abondants constituants du pétrole brut et sont le premier composant à être dégradé.

D'après Abbasian, *et al.* (2015), les n-alcanes sont divisés en quatre groupes selon leur poids moléculaire :

Alcanes gazeux, Hydrocarbures aliphatiques de faible masse moléculaire (C8-C16), Hydrocarbures aliphatiques de poids moléculaire moyen (C17-C28), Les hydrocarbures aliphatiques à haut poids moléculaire (> C28).

1-2 Hydrocarbures aromatiques :

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) forme un groupe d'environ 10.000 composés qui sont des polluants atmosphériques, de l'eau et du sol contenant un ou plusieurs cycles aromatiques, parmi les composés mon aromatiques (HAM) nous avons les BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène et xylènes). Les BTEX sont des composés volatils, inflammables, cancérigènes et neurotoxiques et sont classifiés comme polluants prioritaires selon l'Agence Américaine de Protection de l'Environnement (Hazrati *et al.*, 2016).

Quant aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), nous retrouvons le naphthalène, l'anthracène et phénanthrène. En raison de leur structure complexe, les HAP sont très résistants à la dégradation et restent persistants dans l'écosystème (Mahdjoubi, *et al.*, 2018).

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) sont parmi les polluants les plus fréquemment rencontrés dans les environnements côtiers. La plupart des HAPs de milieu marin sont issus des retombées atmosphériques, du ruissellement urbain, de l'abrasion de l'asphalte, des effluents urbains et industriels et du déversement ou fuite du pétrole (Duran *et Cravo*, 2016), (Figure 2).

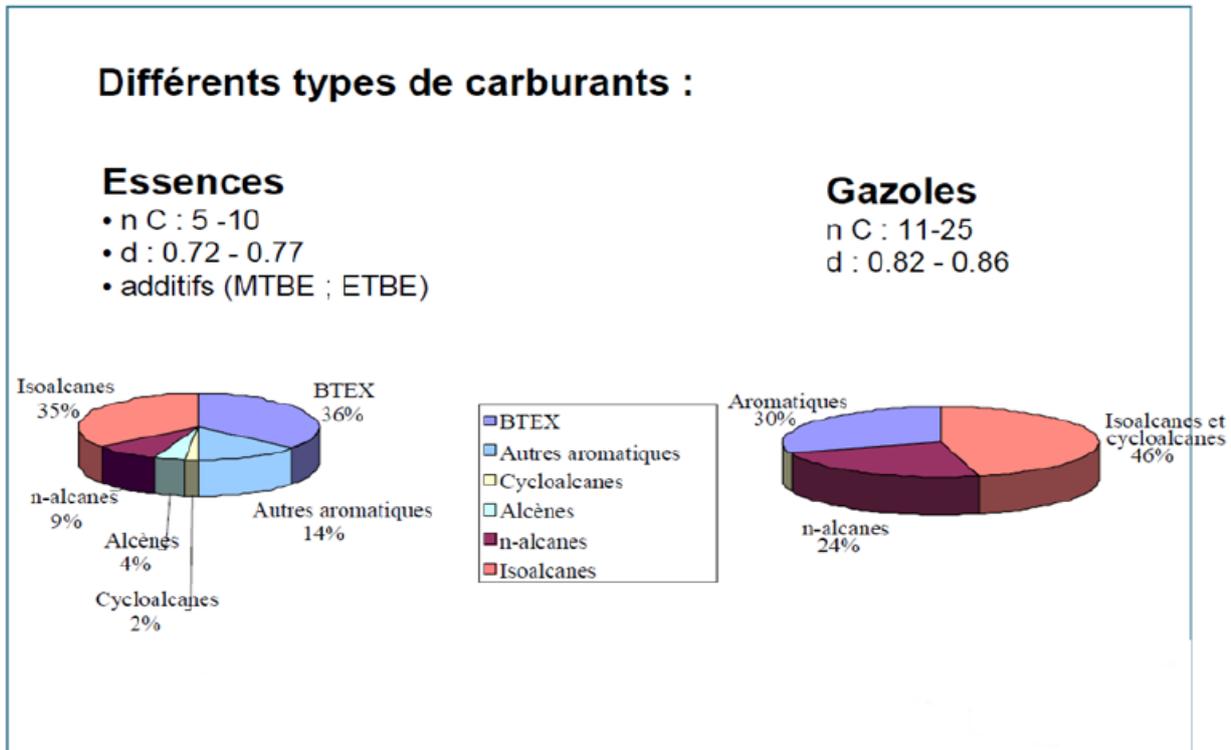


Figure 2 : Composition chimique de l'essence et du gazole (Colombano *et al.*, 2008)

1-3. Résines :

Selon Varjani, (2017), les résines sont des structures aromatiques (plus de 6 cycles) à longue chaîne alkyle, tels que pyridines, quinolines, carbazoles, sulfoxydes et amides ils contiennent de nombreux groupes fonctionnels polaires formés avec N, S, O et traces de métaux (Ni, V, Fe). Ce sont des solides amorphes et très solubles dans l'huile.

1.4. Asphaltènes :

Les asphaltènes sont définis en fonction de leur solubilité dans les solvants non polaires et non de leur structure chimique. (Parra-Barraza *et al.*, 2003).

Comme les résines contiennent de nombreuses fonctions polaires groupes, ce sont des molécules de grande taille et complexe qui sont dispersés de manière colloïdale dans des acides gras saturés et aromatiques. Ils sont solubles dans les hydrocarbures aromatiques légers tels que le benzène et le toluène. Les asphaltènes sont des composés visqueux et de poids moléculaire élevé composés d'amas polycycliques, à substitution variable avec des groupes alkyles, ce qui contribue à leur résistance à la biodégradation (Varjani, 2017) (Figure 3).

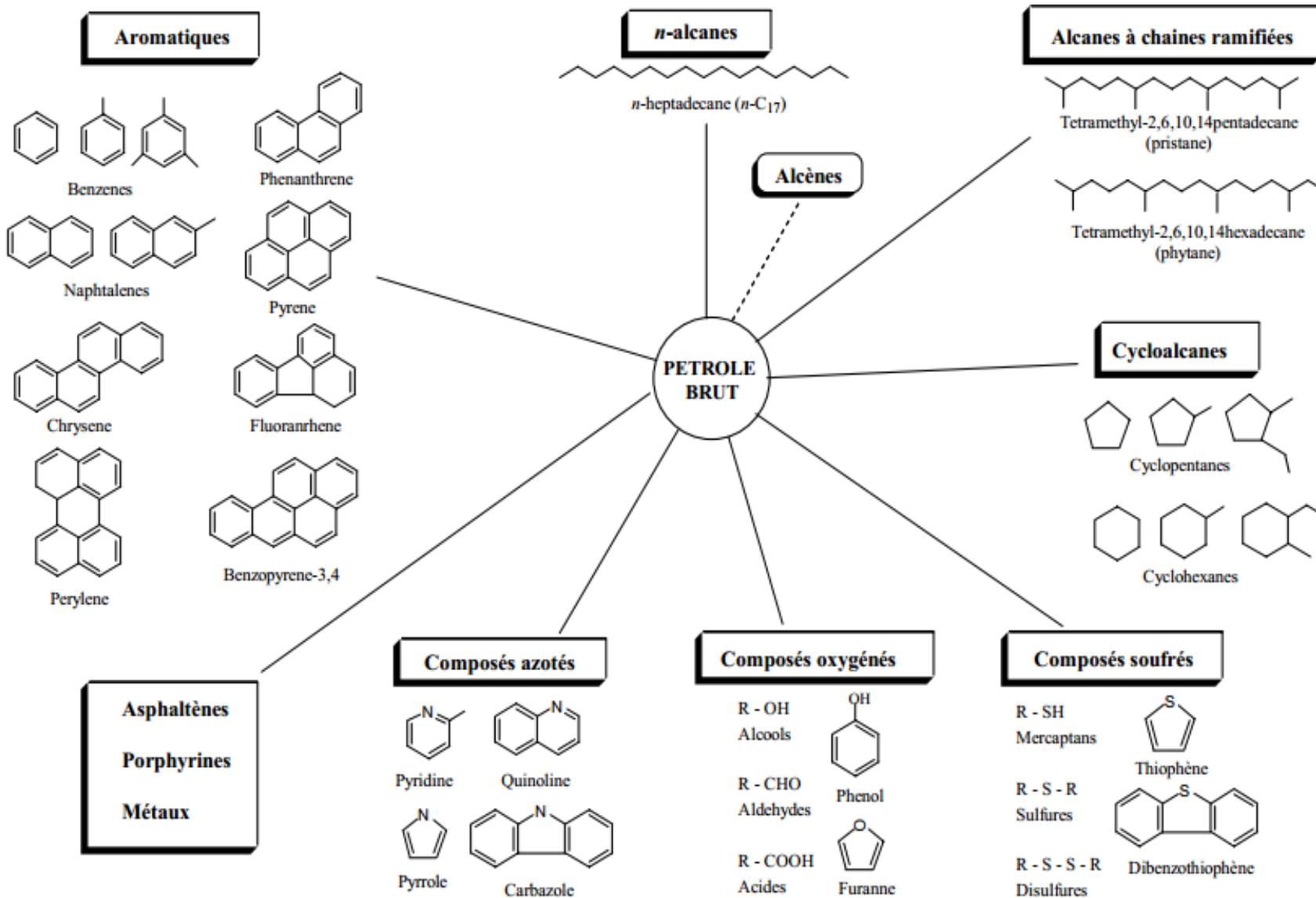


Figure 3 : Composés hydrocarbonés et non hydrocarbonés présents dans le pétrole brut (Mohamed S., 2004).

2- Provenance des rejets d'hydrocarbures pétroliers en milieu marins :

D'après McGenity *et al.*, (2012), Nos mers, océans et zones côtières sont soumises à une grande pollution, notamment par le pétrole brut qui demeure une menace majeure pour la durabilité de la planète Terre environ 1,3 million de tonnes de pétrole pénètrent dans le milieu marin chaque année.

La pollution côtière devient une menace importante pour les écosystèmes marins et les humains, la dégradation des côtes sont aggravées par les activités anthropiques (Chitrakar, 2019).

Selon Bogdan Cioruța *et al.*, (2020), le transport maritime de pétrole, l'exploration et l'exploitation des gisements marins, leur transformation au niveau des raffineries situées à proximité des zones côtières, ont généré et génèrent encore un certain nombre de facteurs de risque, qui impliquent de nombreux incidents de pollution. Les accidents de navigation de grands réservoirs de pétrole ou les incidents sur les plates-formes de forage offshore ont provoqué, au cours de la même période, des catastrophes environnementales majeures, avec les conséquences les plus graves. (Figure 4).

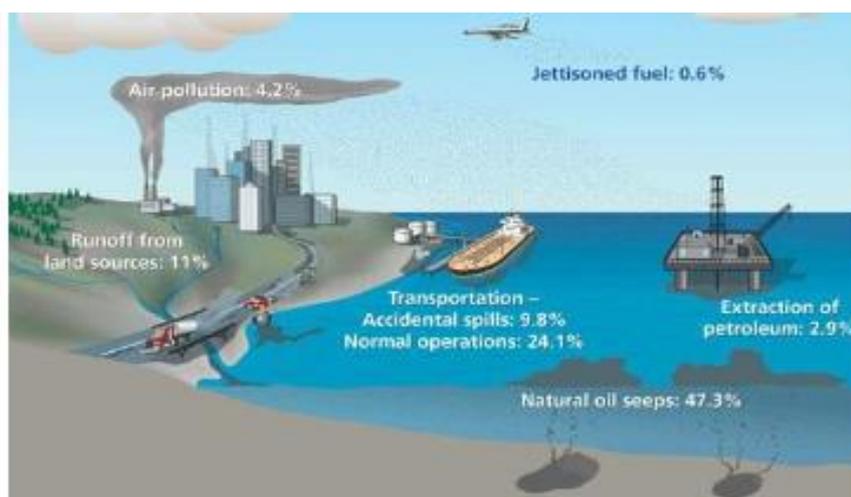


Figure 4 : Suivi des sources et des impacts de la pollution par les hydrocarbures dans le milieu marin (Cioruța *et al.*, 2020).

3- Toxicité des hydrocarbures en milieu marin :

Les hydrocarbures pétroliers sont généralement toxiques et mortels selon la nature chimique, la composition et propriétés des fractions composées, mode d'exposition, niveau d'exposition et durée d'exposition.

Des espèces aquatiques peuvent mourir par suite d'une courte exposition après un déversement de pétrole dans l'environnement (Ossai *et al.*, 2020). Nous prenons pour exemple la toxicité chez quelques types d'êtres vivants :

3-1 Chez les Planctons :

En milieu marin tous les niveaux trophiques sont vulnérables à la contamination par les hydrocarbures commençant des planctons aux mammifères marins. Les organismes planctoniques sont relativement sensibles aux effets toxiques d'une exposition aux hydrocarbures, en particulier aux fractions solubles dans l'eau et aux petites gouttelettes d'hydrocarbures (ITOPF, 2011).

Selon Dupuis et Ucan-Marin, (2015), pour les invertébrés plusieurs études montrent que le zooplancton est vulnérable à l'exposition aux hydrocarbures. Une étude sur du zooplancton côtier et océanique exposé à la fraction aqueuse du mazout tend à indiquer que la mortalité dépend du temps d'exposition plutôt que des niveaux d'exposition.

3-2 Chez les Poisson et mammifères marins :

Pour les poissons une large plage de concentrations d'hydrocarbures pouvait causer leur mort, de très faibles concentrations d'HAP aqueux (de l'ordre de parties par milliard) entraînent la mortalité des premiers stades de vie du poisson. Les mammifères marins sont également sensibles aux nappes de pétrole en surface, puisqu'ils doivent remonter à la surface pour respirer, là où ils peuvent être exposés par inhalation à des composés volatils (Dupuis et Ucan-Marin, 2015).

Schwacke *et al.* (2014) ont découvert que les dauphins ayant séjourné dans des eaux mazoutées risquaient de présenter des signes de stress toxique, dont l'hypoadrénocorticisme et la maladie pulmonaire caractérisée par le syndrome interstitiel alvéolaire, des masses pulmonaires et la condensation pulmonaire. Les auteurs soutiennent que les symptômes observés correspondaient à ceux qui sont liés à une exposition aux hydrocarbures et que des dauphins en mauvais état pouvaient mourir.

3-3 Chez les humains :

Selon Ossai *et al.* (2020), Les contaminants peuvent causer divers problèmes de santé toxicologiques aux humains, dont :

- L'hémotoxicité (destruction des globules rouges),
- La cancérogénicité (capacité ou tendance à provoquer le cancer),
- La génotoxicité (capacité à induire de l'ADN non transmissible),
- La mutagénicité (capacité à provoquer des mutations génétiques transmissibles),
- La tératogénicité (induction de malformations embryon ou fœtus),
- La cytotoxicité (capacité d'être toxique pour les cellules),
- La neurotoxicité (dommages au cerveau et au système nerveux),

- La immunotoxicité (capacité à réprimer le système immunitaire),
- La néphrotoxicité (lésions rénales),
- L'hépatotoxicité (capacité pour provoquer des dommages au foie),
- La cardiotoxicité (capacité à endommager les muscles cardiaques),
- La toxicité oculaire (capacité à induire des troubles oculaires).

3-4 Effet sur la biodiversité microbienne :

Plusieurs Hydrocarbures sont récalcitrants bioaccumulatifs et toxiques pour les microorganismes et l'écosystème.

La biodiversité microbienne peut être altérée significativement par ce polluant, une pression sélective sur les communautés de microorganisme à la suite d'une pollution a été observé, les microorganismes hydrocarbonoclastes ne peuvent représenter que 0,1% de la communauté microbienne mais pourraient constituer 100% de la diversité microbienne viable dans un écosystème pollué par le pétrole (Kumar et *al.*, 2018).

4- Devenir des hydrocarbures dans l'environnement marin :

Selon Hentati (2018), après le déversement dans l'environnement marin, les hydrocarbures passent par de nombreux processus naturels, qui vont entraîner des modifications de son aspect général et de ses caractéristiques physico-chimiques. Ces processus sont soumis au contrôle de facteurs abiotiques et biologiques.

Ce processus est appelé altération ou vieillissement, ce dernier passe par plusieurs étapes:

- L'évaporation des fractions de faible poids moléculaire,
- La dispersion
- L'émulsification,
- La dissolution des composés hydrosolubles,
- La sédimentation,
- La photo oxydation,
- La biodégradation.

4-1 Evaporation :

L'évaporation est le processus de transformation le plus important des hydrocarbures lors des deux premiers jours d'évolution de la nappe.

Selon le type de pétrole, elle peut affecter la quasi-totalité ou une partie insignifiante du pétrole déversé. Elle agit sur les fractions légères et elle s'intensifie lorsque l'étalement des hydrocarbures est important. L'agitation de la mer et des vents favorisent fortement l'évaporation (Goeury Cédric, 2012).

4-2 Dispersion :

La dispersion est induite par le courant, le vent, les vagues et la diffusion turbulente. La vitesse d'étalement dépend du point d'écoulement et de la viscosité. En effet, les hydrocarbures légers s'étaleront très rapidement, quelle que soit la température de la mer, alors que les hydrocarbures lourds s'étaleront plus lentement et resteront épais plus longtemps, notamment dans les mers froides, qui constituent des environnements réduisant la vitesse de dispersion (ANPE, 2012).

4-3 Emulsification :

L'émulsification modifie les propriétés et les caractères des hydrocarbures déversés. Lorsque les conditions d'agitation sont suffisantes et en présence des composés ayant des propriétés tensioactives.

Selon Soltani, (2004) deux types d'émulsions peuvent se former : eau dans l'huile appelée "mousse Chocolat" et huile dans l'eau. Les émulsions eau dans l'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 l'eau » facilitent l'élimination des hydrocarbures.

4-4 Dissolution :

Généralement, nous estimons qu'une très faible partie de la masse d'hydrocarbure déversée va se dissoudre dans l'eau, ainsi peu de modèles prennent ce phénomène en compte. La présence de sels minéraux contribue à réduire l'espace limité disponible pour les molécules d'hydrocarbures. En fait, plus l'eau de mer est salée, plus la dissolution est faible (Marchand *et* Kantin, 1997).

La solubilisation des hydrocarbures permet d'accélérer les réactions de dégradation (photooxydation et biodégradation), par l'augmentation de l'interface eau-pétrole (Asia, 2012).

Selon la fédération T.I.T.O.P., (2018), les composés les plus solubles dans l'eau de mer sont les hydrocarbures aromatiques légers tels que le benzène et le toluène.

4-5 Sédimentation :

La sédimentation est le passage du pétrole de la surface vers le fond. Les gouttelettes d'hydrocarbures dispersées peuvent interagir naturellement avec les matières en suspension présentes dans la colonne d'eau, tels que les minéraux argileux ou la matière organique, pour former des agrégats hydrocarbures-MES (Fitzpatrick *et al*, 2015).

Dans les situations les plus défavorables, un dépôt important de particules contaminées pourrait entraîner une pollution significative des sédiments du fond marin. Ces particules sont susceptibles de persister pendant des années et d'avoir des effets durables (Bertrand *et Mille*, 1989).

En effet, une fois que tous les composés légers se sont évaporés et que la nappe pétrolière a été altérée en mer, la densité de certains pétroles devient proche à celle de l'eau de mer (Fédération T.I.T.O.P, 2018).

4-6. La photo oxydation :

La photo-oxydation, ou oxydation photochimique est un processus d'altération des hydrocarbures qui est modulé par différents facteurs, notamment le spectre et l'intensité lumineuse du rayonnement solaire et la composition chimique des hydrocarbures déversés (Prince *et al*, 2003). La photo-oxydation est plus rapide lorsque les hydrocarbures sont étalés en film mince (Chalghmi, 2015).

4-7 .La biodégradation :

Les bactéries marines ont évolué pour produire des enzymes leur permettant d'utiliser les hydrocarbures issus des pétroles bruts comme source de carbone et d'énergie (Haritash *et Kaushik*, 2009).

Ils peuvent dégrader partiellement ou complètement les pétroles en composés hydrosolubles ou en dioxyde de carbone et en eau. La biodégradation est considérée comme l'étape ultime dans l'élimination des hydrocarbures de l'environnement marin (Zenati, 2018) (Figure 5).

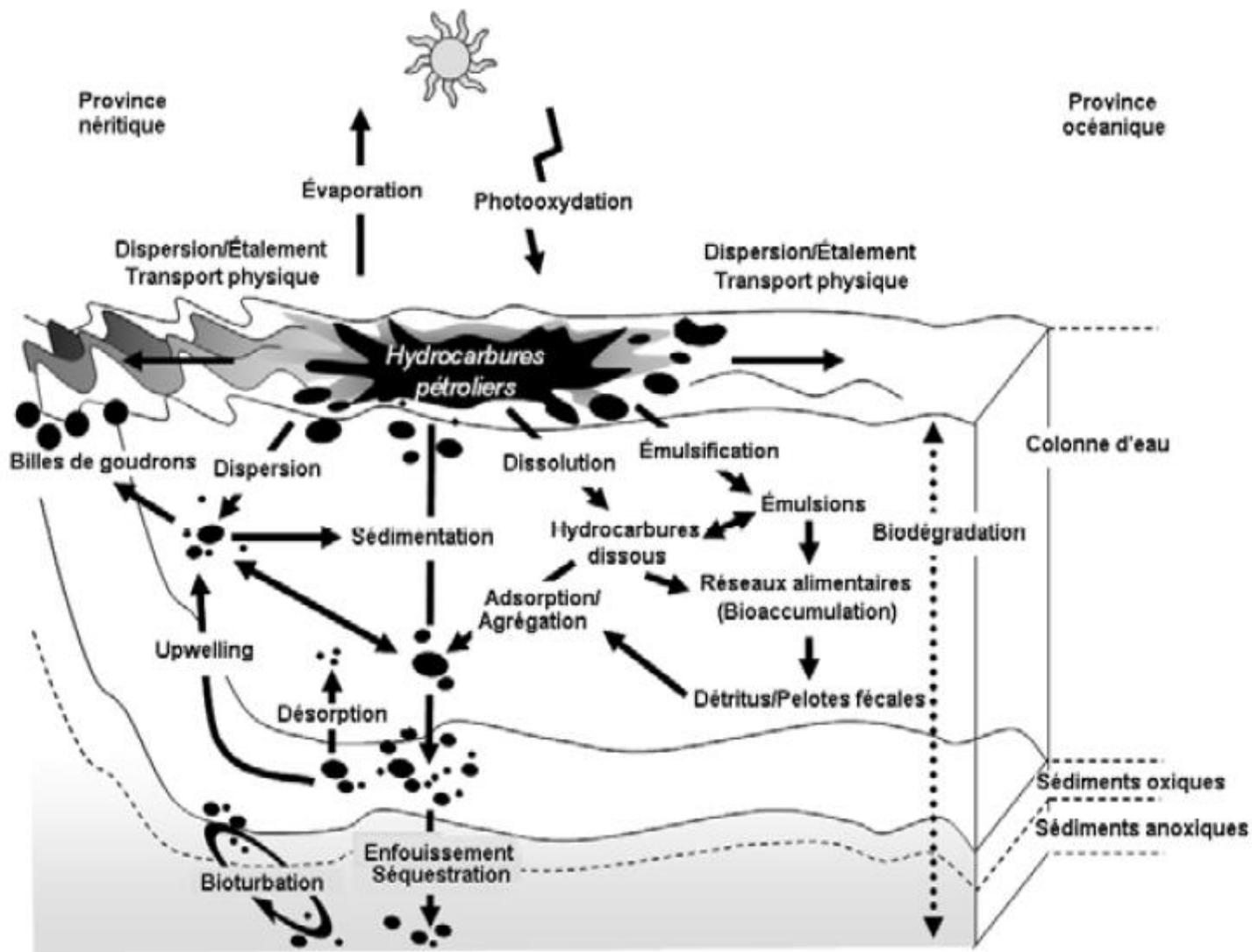


Figure 5 : Processus physico-chimique et biologique affectant le devenir des hydrocarbures pétroliers au sein de la colonne d'eau et des sédiments (Mirales, 2007).

CHAPITRE II :

Bactéries Hydrocarbonoclastes et Bioremédiation.

1- Les microorganismes hydrocarbonoclastes :

De nombreux micro-organismes (procaryotes et eucaryotes) présentent la capacité de dégrader les hydrocarbures, ils sont qualifiés d'hydrocarbonoclastes. Ces micro-organismes sont largement répandus dans le milieu marin, à la fois dans la colonne d'eau et dans les sédiments (Bertrand *et al.*, 1989).

Prince, (2005) a répertorié une liste de 9 genres de cyanobactéries, 103 genres de champignons, 14 genres d'algues ayant des propriétés hydrocarbonoclastes et 79 genres bactériens qui peuvent utiliser des hydrocarbures comme source unique de carbone et d'énergie, elles ont notamment prouvé qu'elles étaient qualitativement et quantitativement plus efficaces dans cette fonction. (Figure 6).

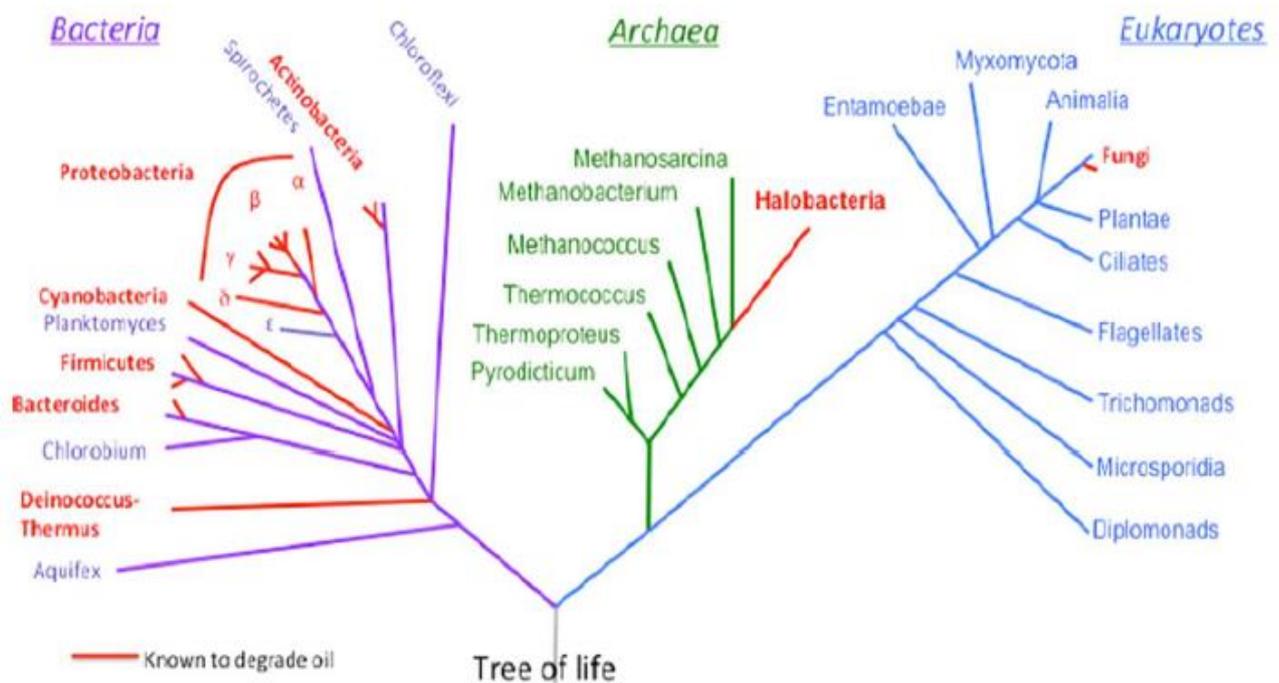


Figure 6 : Les taxons microbiens qui dégradent le pétrole, les phyla microbiens qui dégradent le pétrole, en rouge, ont été identifiés à partir des trois domaines de la vie (Prince et al., 2007)

1-1 Les Fungi :

Les fungi font partie des principaux microorganismes hydrocarbonoclastes, ils utilisent des mécanismes différents à ceux des bactéries, ils sont communément utilisés pour la dégradation des HAPs à 5 noyaux qui sont rarement dégradés par les bactéries (Zaida, 2018).

Les enzymes fongiques sont considérées comme un choix puissant pour la dégradation des HAP. *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* et *Bjerkandera adusta* sont les plus couramment utilisés pour la dégradation de ces composés en raison de leur production d'enzymes ligninolytiques telles que la lignine peroxydase, le manganèse peroxydase et laccase (Kadir *et al.*, 2017).

1-2. Les Bactéries :

En milieu marin, les bactéries constituent le groupe prédominant de la communauté microbienne qui dégrade les hydrocarbures (Ron et Rosenberg, 2014).

Selon Feknous (2017), Des groupes bactériens typiques sont déjà connus pour leur capacité à dégrader les hydrocarbures dans les milieux marins comprennent *Pseudomonas*, *Marinobacter*, *Alcanivorax*, *Microbulbifer*, *Sphingomonas*, *Micrococcus*, *Cellulomonas*, *Dietzia*, et *Gordonia*. Ils ont été isolés sous forme de dégradeurs d'alcanes ou de composés aromatiques tels que le toluène, le naphthalène et phénanthrène (Figure7).

Selon Zenati, (2018). Ces bactéries sont généralement indigènes mais se manifestent en abondance lors d'un déversement pétrolier, chaque bactérie dégrade un nombre restreint d'hydrocarbures, comme exemple nous avons :

- Les espèces du genre *Alcanivorax* se développent sur les *n*-alcanes et les alcanes ramifiés, alors qu'ils ne peuvent pas croître sur les sucres ou acides aminés comme sources de carbone. (Harayama, *et al.*, 2004).
- Les espèces du genre *Cycloclasticus* croissent sur les hydrocarbures aromatiques, le naphthalène, le phénanthrène et l'anthracène (Yakimov *et al.*, 2007).
- Les espèces du genre *Oleispira* se développent sur les hydrocarbures aliphatiques, les alcools et les alcooates (Dyksterhouse *et al.*, 1995).

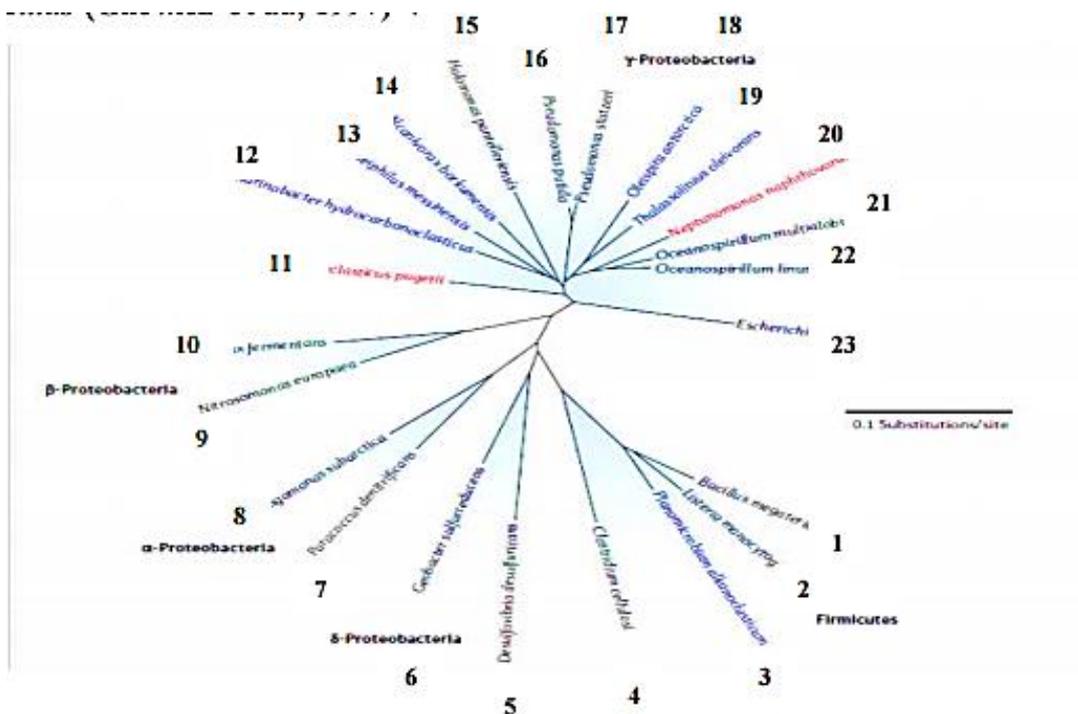


Figure 7 : Phylogénie des principaux groupes de bactéries hydro marines (Feknous, 2017).

Légende:

- | | |
|--|---|
| 1. <i>Bacillus megaterium</i> | <i>hydrocarbonoclasticus</i> |
| 2. <i>Listeria monocytogenes</i> | 13. <i>Oleiphilus messinensis</i> |
| 3. <i>Planomicrobium alkanoclasticum</i> | 14. <i>Alcanivorax borkumensis</i> |
| 4. <i>Clostridium cellulosi</i> | 15. <i>Halomonas pantelleriensis</i> |
| 5. <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> | 16. <i>Pseudomonas putida</i> |
| 6. <i>Geobacter sulfurreducens</i> | 17. <i>Pseudomonas stutzeri</i> |
| 7. <i>Paracoccus denitrificans</i> | 18. <i>Oleispira Antarctica</i> |
| 8. <i>Sphingomonas subarctica</i> | 19. <i>Thalassolituus oleivorans</i> |
| 9. <i>Nitrosomonas europaea</i> | 20. <i>Neptunomonas naphthovorans</i> |
| 10. <i>Rhodospirillum rubrum</i> | 21. <i>Oceanospirillum multilobuliferum</i> |
| 11. <i>Cycloclasticus pugetii</i> | 22. <i>Oceanospirillum linum</i> |
| 12. <i>Marinobacter</i> | 23. <i>Escherichia colicarbonoclastes</i> |

2- Les différents Stratégies permettent l'utilisation des hydrocarbures pétroliers :

2-1- Adhésion bactérienne aux hydrocarbures :

D'après Tremblay et al, (2014), certains microorganismes utilisent les hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie pour leur croissance. Les hydrocarbures sont des composés hydrophobes dont la solubilité diminue d'autant que la masse moléculaire est importante. De ce fait, ils ont développé des stratégies pour utiliser ce type de substrat.

La première étape de ce processus nécessite souvent la participation d'oxygénases bactériennes liées à la membrane, qui nécessitent un contact direct et efficace entre les cellules bactériennes et les substrats d'hydrocarbures pétroliers.

Pour bien comprendre les propriétés particulières de la surface cellulaire des bactéries qui leur permettent de se développer sur les hydrocarbures, il est nécessaire de considérer la dynamique de la dégradation du pétrole dans les milieux naturels.

Suite d'un déversement d'hydrocarbures en mer, les hydrocarbures remontent à la surface et entrent en contact avec l'air. Certains d'entre eux de faible poids moléculaire se volatilisent ; le reste est métabolisé relativement d'une manière rapide par des microorganismes qui absorbent les hydrocarbures solubles. A cause de la faible hydrophobicité de surface de ces bactéries ils n'adhèrent pas aux pétroles. Les microorganismes ayant une forte hydrophobicité cellulaire peuvent adhérer aux hydrocarbures résiduels de haut poids moléculaire (Xu *et al.*,2018). L'adhésion est causé par les fimbriae hydrophobes, les fibrilles, les lipides, les protéines de la membrane externe et certaines molécules de faible surface cellulaire. Les capsules bactériennes et d'autres exopolysaccharides anioniques semblent inhiber l'adhésion des microorganismes aux hydrocarbures (Zenati, 2018).

2-2- Modes d'accession aux hydrocarbures :

Selon Bouchez-Naitali *et al.* (1999) il existe quatre modes d'accession, qui expliquent l'assimilation des hydrocarbures par les microorganismes (Figure 8).

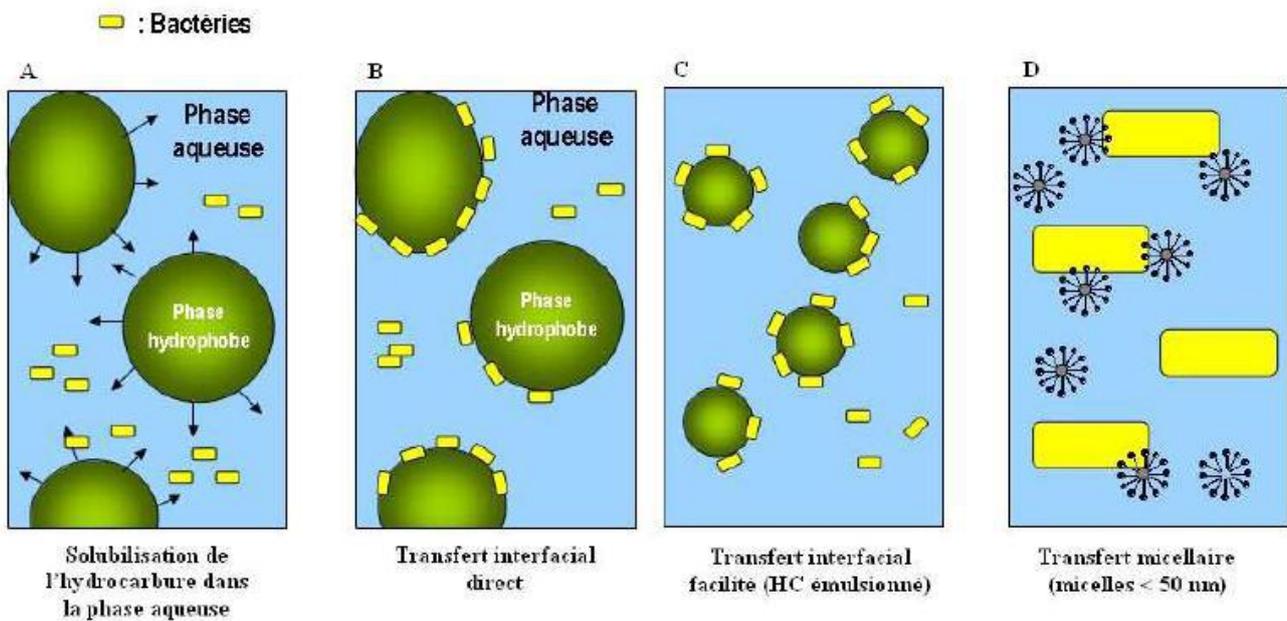


Figure 8 : Les mécanismes d'accession des microorganismes aux hydrocarbures (Vandecasteele, 2005).

2-2-1. Utilisation de la phase dissoute :

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

2-2-2. L'accession interfaciale facilitée ou émulsification :

Les microorganismes utilisant les alcanes peu solubles possèdent fréquemment une membrane externe hydrophobe (Rosenberg *et al.*, 1989). L'hydrophobicité élevée de la membrane cellulaire externe permet l'adhésion du microorganisme aux gouttelettes du substrat présentes dans le milieu aqueux. Le substrat pénètre directement dans la cellule par diffusion ou transport actif sans se dissoudre dans la phase aqueuse (Ducker, 1996).

2-2-3. L'accession interfaciale:

Des biosurfactants produits par des microorganismes accélèrent le transfert de l'hydrocarbure dans la cellule après contact direct substrat-cellule. Ce transfert facilité est dû à une augmentation de l'aire interfaciale entre la phase hydrophobe et la phase hydrophile (Perfumo *et al.*, 2010).

2-2-4. Le transfert micellaire :

Il existe une formation d'une microémulsion suite à une pseudosolubilisation de l'hydrocarbure par des biosurfactants produits par le microorganisme. La micelle entre en contact avec la cellule. La surface externe de la micelle est majoritairement hydrophile et le transfert micellaire est privilégié chez les microorganismes dont l'hydrophobicité de l'enveloppe cellulaire est faible (Bouchez-Naitali *et al.*, 1999).

3- Mécanismes de biodégradation des hydrocarbures :

3-1- Généralité :

Le processus de biodégradation des hydrocarbures pétroliers comprend une série d'étapes impliquant la transformation chimique par biais d'activités enzymatiques (Tableau 1) d'un composé organique métabolisable sous une autre forme plus simple, qui peut être plus ou moins toxique que le composé d'origine (biotransformation) et aboutit à un produit final qui est le dioxyde de carbone (minéralisation) (Maletic *et al.*, 2013; Abbasian *et al.* 2015). Ce processus comprend aussi la fixation et la liaison des cellules microbiennes aux substrats avec la production de biosurfactants et d'émulsifiants (Chandran, 2011 ; Das et ; Hu, 2016 ; Varjani et Upasani, 2017).

Les microorganismes dans les zones polluées s'adaptent en fonction de l'environnement, ce qui entraîne des mutations génétiques dans les générations suivantes, les préparant à devenir des dégradeurs d'hydrocarbures (Watkinson et Morgan, 1990 ; McDonald *et al.*, 2006).

Certains de ces micro-organismes ont la capacité de dégrader les aliphatiques, certains peuvent dégrader les monoaromatiques ou les polyaromatiques tandis que d'autres dégradent les résines ; Ces hydrocarbures peuvent être catabolisés soit en conditions aérobies ou anaérobies (Widdel et Rabus, 2001 ; Abbasian *et al.*, 2015 ; Meckenstock *et al.*, 2016).

Tableau 1: Enzymes impliquées dans la dégradation microbienne des polluants d'hydrocarbures pétroliers((Salleh et al.,2003).

Enzyme	Petroleum hydrocarbon compound	Name of microorganism	References
Soluble/particulate Methane Monooxygenases	C1-C8 alkanes, C1-C5 (halogenated) alkanes, Alkenes, Cycloalkanes	<i>Methylocystis, Methylomonas, Methylocella, Methylobacter, Methylococcus, Geobacillus hermodenitrificans, Methyloirabilis ,oxyfera</i>	McDonald <i>et al.</i> (2006) et Abbasian <i>et al.</i> (2015)
AlkB related Alkane Hydroxylases	C5-C16 alkanes, Alkyl benzenes, Cycloalkanes, Fatty acids.	<i>Pseudomonas, Burkholderia, Rhodococcus, Mycobacterium.</i>	Abbasian <i>et al.</i> (2015)
Eukaryotic P450 (CYP52)	C10-C16 alkanes, Fatty acids	<i>Candida maltose Candida tropicalis Yarrowia lipolytica</i>	Salleh <i>et al.</i> (2003) et Abbasian <i>et al.</i> (2015)
Bacterial P450 oxygenase system (CY153)	C5-C16 alkanes, Cycloalkanes	<i>Acinetobacter, Caulobacter Mycobacterium</i>	Watkinson and Morgan (1990) et Abbasian <i>et al.</i> (2015)
Dioxygenases	C10 -C30 alkanes	<i>Acinetobacter sp.</i>	Abbasian <i>et al.</i> (2015)

3-2- Voies métaboliques de dégradation :

3-2-1. Voie métabolique aérobie :

3-2-1-1. Biodégradation aérobie des alcanes :

Les alcanes sont généralement facilement dégradés, en particulier ceux des chaînes relativement plus courtes en raison de leur faible hydrophobicité. Il existe plusieurs voies de la dégradation du n-alcane dans les micro-organismes telles que l'oxydation terminale, l'oxydation sub-terminale, l'oxydation ω et la β -oxydation (Salleh et al., 2003 ; Abbasian et al., 2015) (Figure 9).

Chez *Pseudomonas sp.* et *Acinetobacter sp.* la dégradation des hydrocarbures comprend la dégradation de l'alcane et l'oxydation du groupe méthyle pour former l'alcool (Ni Chadhain *et al.*, 2006), qui est ensuite déshydrogéné via l'aldéhyde en carboxylique correspondant acide, qui peut ensuite être métabolisé par la voie de la β -oxydation des acides gras (Das et Chandran, 2011 ; Abbasian *et al.*, 2015).

Il existe d'autres voies d'oxydation : l'oxydation di-terminale et sous-terminale (Li et Liu, 2002 ; Das et Chandran, 2011).

- Dans la voie di-terminale, les deux extrémités de la molécule d'alcane sont oxydées par ω -hydroxylation (la position ω représente le groupe méthyle terminal) des acides gras puis convertie en acide di-carboxylique et traitée par β -oxydation (Abbasian *et al.*, 2015).
- Lors d'une oxydation sub-terminale, la molécule d'alcane est oxydée en alcool secondaire puis en cétone et ester correspondants. Ce dernier est ensuite hydrolysé et génère un alcool et un acide gras (Rojo, 2009).

Zhang *et al.* (2011) ont étudié la dégradation du diesel, du pétrole brut, des n-alcanes et des HAP via la voie d'oxydation terminale.

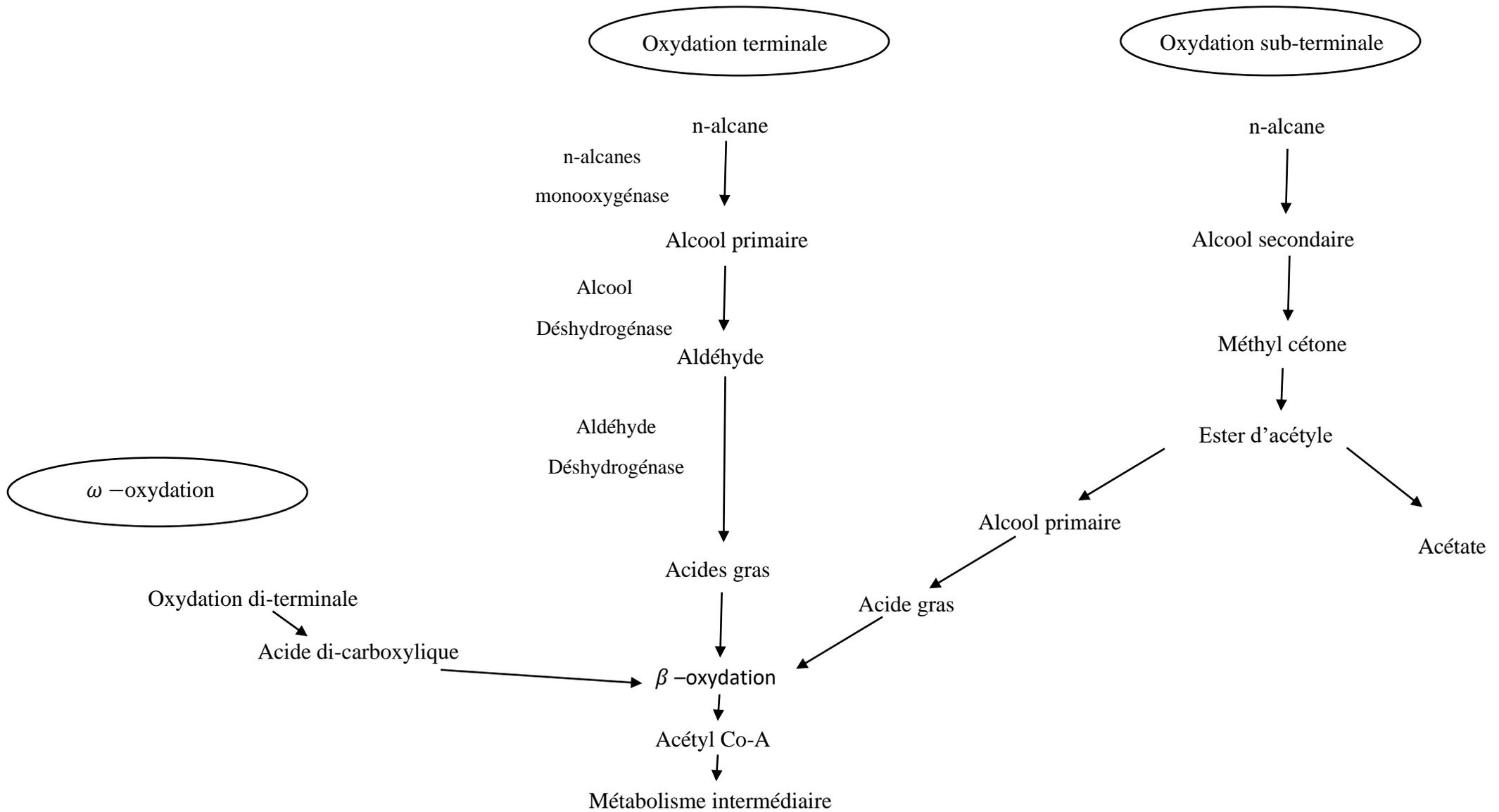


Figure 9 : Trois voies périphériques possibles pour la dégradation du n-alcane (aérobie) par les micro-organismes (Zenati, 2018).

3-2-1-1. La biodégradation aérobie des polluants hydrocarbonés monoaromatiques :

Les hydrocarbures monoaromatiques sont moins biodégradables que les hydrocarbures saturés (Salleh *et al.*, 2003). L'étude de la dégradation de ces hydrocarbures se fait par *Pseudomonas aeruginosa* DQ8 en deux principales étapes : l'attaque oxydative initiale et le clivage du cycle benzénique (Hendrickx *et al.*, 2006).

➤ Chez les bactéries la dégradation des aromatiques implique normalement la formation d'un diol, suivie du clivage du cycle et de la formation d'acide di-carboxylique (Tableau 2).

➤ Les champignons et autres eucaryotes oxydent les aromatiques à l'aide de mono-oxygénases, formant un trans-diol (Zhang *et al.*, 2011).

La dégradation du benzène commence par l'oxydation de la molécule au moyen d'un système à trois enzymes, qui introduit deux groupes hydroxyles dans la molécule formant le cis-dihydriol, qui est déshydrogéné pour donner du catéchol (Abbasian *et al.*, 2015). L'anneau aromatique du catéchol peut être clivé par oxydation de deux manières différentes, l'ortho-clivage ou le méta-clivage pour produire respectivement de l'acide muconique ou du semialdéhyde.

Les voies de clivage ortho et méta diffèrent par le site de clivage. Les gènes de méta-clivage sont localisés sur les plasmides tandis que les gènes d'ortho-clivage sont localisés sur le chromosome et les ortho-gènes génétiquement modifiés sont localisés sur les plasmides cataboliques (Van der Meer *et al.*, 1992).

Le toluène, un polluant qui se biodégrade rapidement par rapport aux autres composés BTEX dans l'environnement aérobie. Il a été étudié presque entièrement chez *Pseudomonas sp* et d'autres souches du genres *Acinetobacter*, *Azoarcus*, *Mycobacterium*, *Nevskia*, *pseudonocardia* et *Rhodococcus* (Juteau *et al.*, 1999).

3-2-1-2. La biodégradation aérobie des polluants hydrocarbonés polyaromatiques :

Les HAP sont plus difficiles à dégrader par rapport aux alcanes, leur persistance est due à leur faible solubilité dans l'eau et à l'énergie de résonance de leurs structures ceci les rend des polluants prioritaires dans les processus de bioremédiation (Abbasian *et al.*, 2015).

La dégradation aérobie des HAP commence par l'addition de deux atomes d'oxygène (dioxygénase) pour former un cis-dihydrodiol qui est ensuite déshydraté en catéchol, qui est un intermédiaire central de la biodégradation aérobie des composés aromatiques. L'ortho clivage se fait grâce à une catéchol 1,2-dioxygénase et au niveau de la liaison situé entre deux atomes de carbone adjacents portant le groupement hydroxyle. Le méta clivage est catalysé par un catéchol 2,3-dioxygénase et situé entre deux atomes de carbone dont un seul porte un groupement hydroxyle (le deuxième est non substitué) (Wang, 2013).

Les produits respectifs 3-oxoadipate (voie ortho) et 4-hydroxy-2-oxapentanoate (voie méta) sont transformés en produits du métabolisme intermédiaire : succinate et acétate (voie ortho) ou pyruvate et acétaldéhyde (voie meta). Le carbone benzénique est alors introduit dans le cycle de Krebs.

3-2-2- Voie métabolique anaérobie :

Sous métabolisme anaérobie les n-alcanes des composés aromatiques BTEX (Benzène, Toluène, Éthylbenzène et Xylènes) sont initialement activés par addition à la double liaison du fumarate au niveau du carbone 2. Ce processus est catalysé par l'alkylsuccinate synthase chez alkyl succinate (Widdel et Grundmann, 2010).

De façon analogue la dégradation du toluène et autres hydrocarbures mono-aromatiques substitués se fait par l'addition d'une molécule de fumarate au groupement substitué grâce à une benzylsuccinate synthase (Tierney et Young, 2010). Les molécules d'hydrocarbures ainsi activées sont ensuite dégradées en acétyl-CoA par des étapes de déshydrogénation et d'hydratation, avant d'entrer dans le cycle de Krebs. D'autres mécanismes d'activation des hydrocarbures ont aussi été identifiés en anaérobiose et passent par la carboxylation ou encore l'hydroxylation des molécules (Qiao et Marsh, 2005 ;Berdugo-Clavijo *et al.*, 2012 et Bozinovski *et al.*, 2012).

Tableau 2 : liste des bactéries capables de dégrader les composés aromatiques (Salleh et al., 2003).

Bacterial species	Aromatics	Bacterial species	Aromatics
<i>Achromobacter sp.</i>	CBZ	<i>Pseudomonas sp.</i>	NAP/PHE/HFBT /BP/CBP/DBF/C BZ/CDD/FLE/D BT
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	FLA	<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	PHE
<i>Arthrobacter sp.</i>	FLE/DBT/CBZ/ PHE	<i>Pseudomonas vesicularis</i>	FLE
<i>Arthrobacter sulphureus</i>	PHE	<i>Pseudomonas putida</i>	NAP/PHE/MNA P
<i>Acidovorax delafieldii</i>	PHE	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PHE/CHR/BaA
<i>Bacillus cereus</i>	PYR	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	PYR
<i>Brevibacterium sp.</i>	PHE	<i>Pseudomonas saccharophila</i>	PYR
<i>Burkholderia sp.</i>	PHE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PHE
<i>Burkholderia cepacia</i>	NAP/PHE/PYR	<i>Ralstonia sp.</i>	DBF/NAp
<i>Burkholderia cocovenenans</i>	PHE	<i>Rhodanobacter sp.</i>	BAP
<i>Burkholderia xenovorans</i>	BZ/BP	<i>Rhodococcus sp.</i>	PYR/FLA/BT/N AT
<i>Chryseobacterium sp.</i>	CBZ	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	ADBT/DBT
<i>Cycloclasticus sp.</i>	PYR	<i>Staphylococcus sp.</i>	PHE
<i>Janibacter sp.</i>	DBF/FLE/DBT/ PHE/ANT/DD	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	PYR/FLA/BaP/B aA/DBA/COR
<i>Marinobacter sp.</i>	NAP	<i>Sphingomonas yanoikuyae</i>	PYR
<i>Mycobacterium sp.</i>	PYR/BaP/FLA/	<i>Sphingomonas sp.</i>	FLE/PHE/FLA/

	BaA/PHE/ANT/ FLE		ANT/DBF/DBT/ CBZ
<i>Mycobacterium flavescens</i>	PYR/FLA	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	FLA/PAP/ANT/ PHE
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i>	PHE/PYR/dMBa A	<i>Sphingomonas wittichii</i>	CDD
<i>Nocardioides aromaticivorans</i>	CBZ	<i>Terrabacter sp.</i>	DBF/CDBF/CD D/FLE
<i>Pasteurella sp.</i>	FLA	<i>Xanthamonas sp.</i>	PYR/BaP/CBZ

4- Approches biotechnologiques adoptées pour la remédiation de l'environnement marin contaminé par les hydrocarbures :

Il est largement reconnu que la pollution par les hydrocarbures pétroliers dans les eaux de surface et les eaux souterraines constitue une énorme menace pour la santé humaine et la chaîne trophique. Les méthodes et techniques de traitement de remédiation jouent un rôle essentiel dans le nettoyage, le confinement, l'enlèvement, la remise en état et restauration d'un environnement contaminé (Tableau 3).

Le choix de toute technique de traitement de remédiation pour un environnement contaminé repose sur la nature, la composition et la concentration des hydrocarbures et la localisation des contaminants (Chalghmi, 2017).

La bioremédiation est une méthode facile, écologique, durable et rentable pour la restauration et le nettoyage des eaux contaminées par les hydrocarbures. Elle implique la dégradation naturelle des contaminants d'hydrocarbures pétroliers par des micro-organismes (bactéries, levures, champignons) d'une manière sélective par une souche individuelle ou un consortium de souches microbiennes appartenant à des genres identiques ou différents (Boopathy, 2000 ; Varjani *et al.*, 2015 ; Varjani et Upasani, 2016).

Ces microorganismes éliminent et neutralisent les contaminants dans l'eau en composés non toxiques ou plus simples tels que l'oxyde de carbone et l'eau par oxydation avec apport en

nutriments et optimisation des facteurs limitants de leurs activités biologiques (Chaillan *et al.*, 2004 ; Kostka *et al.*, 2011 ; Dzionek *et al.*, 2016 ; Wu *et al.*, 2017 ; Yanti, 2018).

4-1. Bioaugmentation :

Cette technologie consiste à introduire des cultures de microorganismes au milieu contaminé dans l'objectif d'augmenter la biodégradation des hydrocarbures. La technique repose sur l'addition d'une souche bactérienne pure pré-adaptée ; ajout d'un consortium pré-adapté ; introduction de bactéries génétiquement modifiées ; et l'addition de gènes pertinents de biodégradation conditionnés dans un vecteur à transférer par conjugaison dans des microorganismes indigènes (El Fantroussi et Agathos, 2005).

Généralement les microorganismes sont sélectionnés sur la base de leurs aptitudes métaboliques à dégrader les hydrocarbures et également sur leurs caractéristiques essentielles qui permettent aux cellules d'être fonctionnellement actives et persistantes dans les conditions environnementales souhaitées. Les inoculant microbiens sont des suspensions cellulaires homogènes produites dans des conditions optimales qui subissent souvent un stress lorsqu'elles sont en contact avec la complexité des habitats naturels. Dans les cas réels, la population introduite commence à diminuer peu après avoir été ajoutée en raison de plusieurs stress abiotiques et biotiques.

En effet, les stress engendrés par les changements des paramètres abiotiques qui peuvent inclure les températures extrêmes, la teneur en eau, le pH, l'épuisement des nutriments et aussi des niveaux potentiellement toxiques de polluants dans les eaux contaminé (Gentry *et al.*, 2004) et des paramètres biotiques notamment les problèmes d'adaptation des micro-organismes inoculés; insuffisance de substrat; la compétition avec la microflore autochtone; utilisation d'autres substrats organiques de préférence au polluant; l'apparition de prédateurs comme les nématodes peuvent compromettre le maintien et la croissance des microorganismes introduits. Ainsi les souches microbiennes artificiellement ajoutées peuvent rapidement décliner (Goldstein *et al.*, 1985 ; Van Veen *et al.*, 1997 ; Singer *et al.*, 2005 ; Vinas *et al.*, 2005).

Dans le site pollué par le pétrole du champ ONGC au Gujarat, en Inde, Varjani *et al.* (2015) ont démontré une bioaugmentation in situ en utilisant un consortium de bactéries utilisant des hydrocarbures comprenant six isolats bactériens pour la dégradation des contaminants d'hydrocarbures pétroliers et ont atteint une efficacité d'élimination de 83,7% sur une période de 75 jours (Figure10).

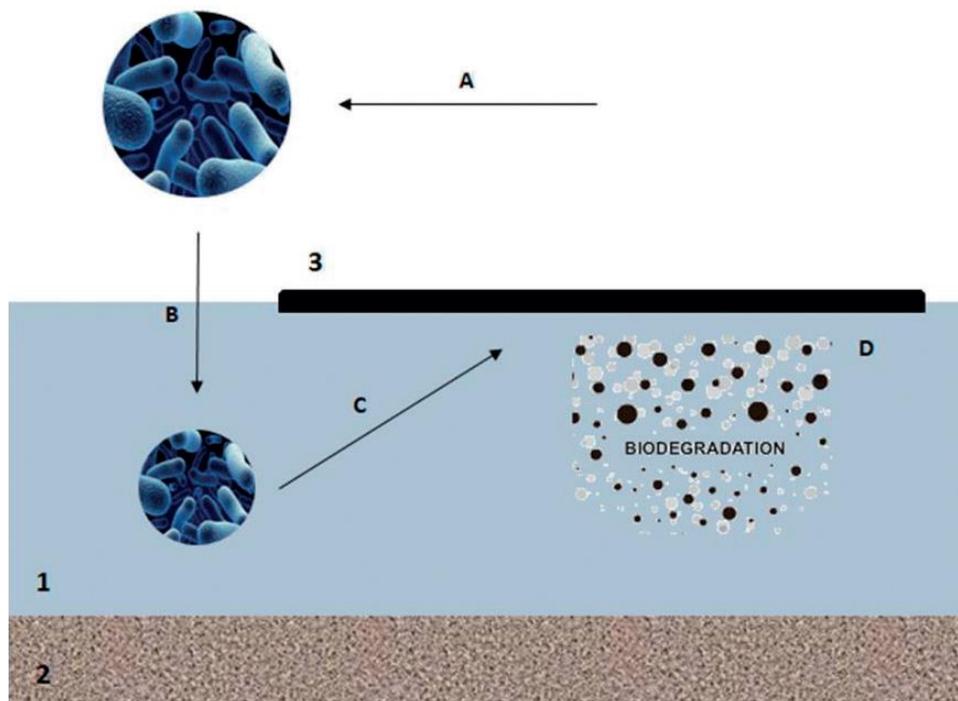


Figure 10 : Description schématique du processus de bioremédiation (bioaugmentation).
(Mahjoubi *et al.*, 2018).

1 : eau de mer ; 2 : sédiments marins ; 3 : pétrole brut.

4-2- Biostimulation :

La biostimulation est la méthode de biorestauration la plus efficace par rapport à d'autres remèdes des eaux contaminés par des hydrocarbures pétroliers (Simpanen *et al.*, 2016). La raison derrière cette approche est que les microorganismes hydrocarbonoclastes sont généralement abondants dans les environnements marins et bien adaptés pour résister aux stress environnementaux locaux. Cependant, lorsque le pétrole est déversé en grande quantité, la capacité des microorganismes à dégrader les hydrocarbures est limitée en raison du manque de nutriments. L'ajout d'azote, de phosphore et d'autres nutriments vise à surmonter ces déficits et à permettre la biodégradation du pétrole à une cadence optimale (Prince, 2003).

Les exigences de biostimulation comprennent la présence de micro-organismes corrects, la capacité de stimuler les micro-organismes cibles, la capacité de fournir des nutriments pour une croissance équilibrée (Hazen, 2010).

La combinaison de bioaugmentation, biostimulation et l'addition de biosurfactant, selon les caractéristiques du site contaminé, pourrait être une stratégie prometteuse pour accélérer la bioremédiation (Baek *et al.*, 2007) (Figure 11).

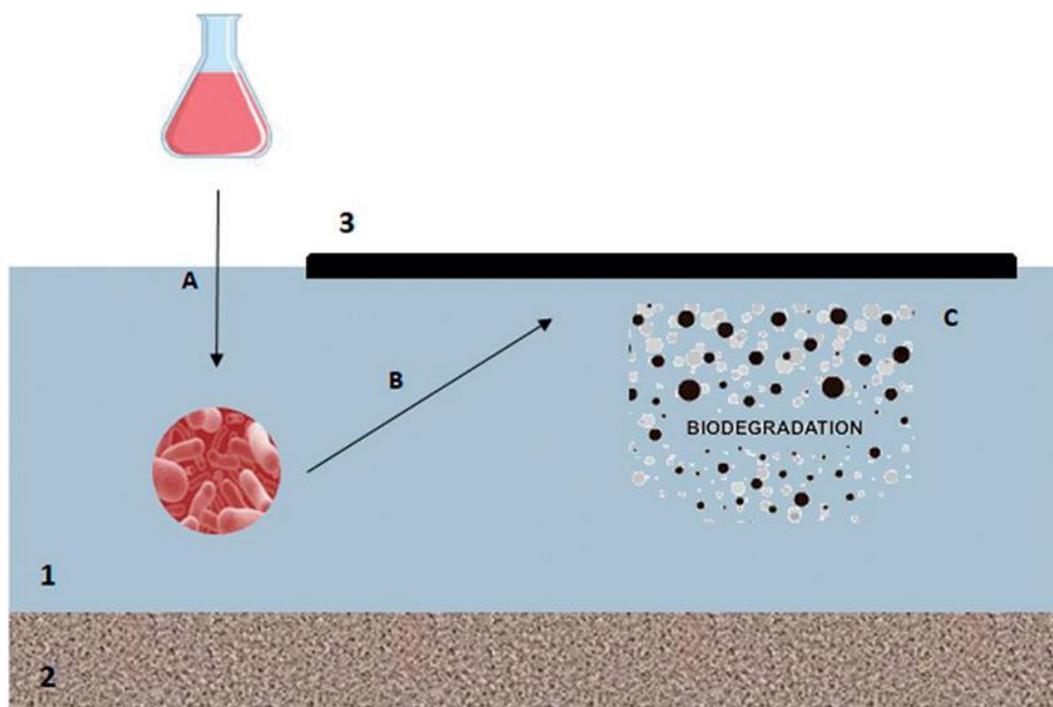


Figure 11 : Description schématique du processus de bioremédiation (biostimulation).
(Mahjoubi *et al.*, 2018).

1 : eau de mer ; 2 : sédiments marins ; 3 : pétrole brut.

4-3- Biosparging :

Cela implique l'injection d'air (oxygène) et de nutriments dans la zone saturée sous pression pour augmenter la concentration en oxygène des eaux souterraines afin de stimuler les activités biologiques des micro-organismes indigènes pour dégrader les contaminants (Costa *et al.*, 2013 ; Singh et Garima, 2015 ; Azubuike *et al.*, 2016). Le biosparging est utilisé pour réduire la concentration de contaminants adsorbés dans le sol et dans la frange capillaire au-dessus de la nappe phréatique, ainsi que les contaminants dissous dans les eaux souterraines Kao *et al.* (2007) ont démontré un biosparging sur un site de déversement de pétrole et ont obtenu une efficacité d'élimination de 70% pour le BTEX en 10 mois de réparation.

4-4- Phycoremédiation :

Il s'agit de l'utilisation d'espèces d'algues (macroalgues ou microalgues) pour séquestrer, éliminer, décomposer, biotransformer ou métaboliser les polluants du milieu aquatique contaminé (Kushwaha *et al.*, 2014 ; Phang *et al.*, 2015 ; Gani *et al.*, 2015). Les algues sont connues pour être très adaptatives et peuvent se développer dans des conditions autotrophes, mixotrophes ou hétérotrophes dans la plupart des environnements.

Les algues mixotrophes sont d'excellents agents de biorestauration et de séquestration du carbone (Subashchandrabose *et al.*, 2013).

L'utilisation des microalgues dans la phycoremédiation des hydrocarbures pétroliers gagne en intérêt car certaines espèces d'algues telles que *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Botryococcus* et *phormidium* peuvent dégrader et oxyder les composants d'hydrocarbures pétroliers en composés moins nocifs (He *et al.*, 2013 ; El-Sheekh *et al.*, 2013). Dans une étude démontrée par Kalhor *et al.* (2017), qui ont étudié le potentiel de *Chlorella vulgaris* dans la phycoremédiation de l'environnement de l'eau contaminée par le pétrole brut. Dans l'étude, différentes concentrations de pétrole brut ont été traitées et l'efficacité d'élimination a été calculée après une période de 14 jours. Le résultat obtenu après la période d'incubation a prouvé que les composés aromatiques (benzène et naphthalène) et l'alcane (nonadécane) ont été corrigés avec une efficacité d'élimination de 89,17% à 10 g / l et 76,53% à 20 g / l par les algues.

Tableau 3 : Exemple de stratégies de biorestauration.

Type de traitement de bioremédiation	Microorganismes/nutriments ajoutés	Type de contaminants	Pourcentage de remédiation(%)	Durée (jours)	Références
Bioaugmentation	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Pétrole brute	43	35	Adams <i>et al.</i>
	<i>Candida tropicalis</i>	Diesel	83	120	Adams <i>et al.</i>
	<i>Pseudomonas arthrobacter</i>	Diesel	32	32	Adams <i>et al.</i>
	<i>Alcanivorax, Marinobacter Cycloclasticus et Thalassolituus</i>	TERHC	79	14	Crisafi <i>et al.</i>
	<i>Acinetobacter</i>	TPH	34	42	Wu <i>et al.</i>
	<i>Alcanivorax et Thalassolituus</i>	Pétrole brute	70	20	Hassanshahian <i>et al.</i>
	<i>Absidia.</i>	Fluorène	90	12	Garon <i>et al.</i>
	<i>Cylindrospora</i>				
	Un consortium bactérien	Diesel	72	84	Adams <i>et al.</i>
	Biostimulation	Azote et phosphore	TPH	60	42
Nutriments inorganiques KH ₂ PO ₄ , NH ₄ Cl et NaNO ₃ .		Pétrole brute	80	20	Hassanshahian <i>et al.</i>
Mélange de (NH ₄) ₂ SO ₄ et K ₂ HPO ₄		Diesel	45	84	Adams <i>et al.</i>
Engrais à libération lente		Pétrole brute	90% des n-alcanes (C ₁₅ – C ₃₀) et 60% des HAP	30	Nikolopoulou et Kalogerakis
Nutriments inorganiques (KNO ₃ et K ₂ HPO ₄)		Pétrole brute	97% des n-alcanes en C ₁₂ à C ₃₅ et 45% des HAP	45	Nikolopoulou et Kalogerakis
Bioaugmentation et biostimulation	<i>Rhodococcus sp.</i> et surfactant chimique et Tween 80	TPH	50	46	Adams <i>et al.</i>

<i>Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis</i> et engrais	TPH	75	70	Adams <i>et al.</i>
Nutriments inorganiques + rhamnolipides et consortiums bactériens autochtones	Pétrole brute	80	30	Nikolopoulou <i>et al.</i>

5-Biodégradation des hydrocarbures par des consortiums microbiens :

Selon Head *et al.*, (2006) la biodégradation totale d'un pétrole n'est possible que grâce à la mise en place d'un consortium microbien comprenant des groupes dont les équipements enzymatiques complémentaires permettent la biodégradation quasi-totale de ces différents types d'hydrocarbures et une grande résistance face à des composés toxiques qu'une culture pure (Marcoux, 1998).

Peterson *et al.*, 2003 ; Yakimov *et al.*, 2004 ; Mascarelli, 2010, ont confirmé qu'après un apport soudain de pétrole, le ratio des bactéries hydrocarbonoclastes augmentait fortement. On assiste en générale à une baisse de la diversité totale des communautés microbienne au profil de certaines espèces avantagées sélectivement par la nouvelle source de matière organique et particulièrement bien adaptées à la présence de certains hydrocarbures. L'élimination conjointe des microorganismes sensibles au pétrole et la stimulation des bactéries hydrocarbonoclastes conduit souvent à une augmentation de l'abondance microbienne et à un regain d'activité globale de la communauté dans les premiers jours après la pollution (Atlas, 1981).

Les microorganismes capables de métaboliser les molécules les plus simples sont sélectionnés en premier. Lorsque ces composés viennent à disparaître, d'autres microorganismes ayant eu le temps de s'acclimater aux molécules les plus complexes (les hydrocarbures aromatiques polycycliques par exemple) prolifèrent à leur tour et prennent l'ascendant sur le reste de la communauté. Cela se traduit par une alternance de différents groupes qui se poursuit jusqu'à l'élimination quasi-complète des hydrocarbures (Head *et al.*, 2006).

En 1995, Trzesicka-Mlynarz et Ward ont obtenu une culture mixte dégradant efficacement le Fluoranthrene et le Benzol (a) pyrène en présence de glucose, d'extrait de levure et de protéase peptone. La culture mixte pouvait aussi dégrader un mélange d'hydrocarbures. Les quatre souches impliquées démontraient une meilleure dégradation des hydrocarbures en cultures mixtes que séparément. Selifonov *et al.*, (1998), ainsi que Tadros et Hughes (1997), ont aussi noté la

performance accrue des bactéries lorsque ces dernières étaient présentes en mélange. Cela signifie donc, entre autres, que les travaux en bioaugmentation devraient se concentrer sur l'addition de cultures mixtes aux sites contaminés et non pas de cultures pures, afin d'obtenir une plus grande efficacité.

Chapitre III :

Étude de cas : Isolement de bactéries marines à partir d'un site contaminé par les hydrocarbures.

1- Échantillonnage :

1-1. Présentation du site de prélèvement :

Le choix du site de prélèvement repose sur la forte contamination en produits pétroliers, essentiellement des huiles de vidange, gasoil et de carburants (tel que les ports de pêche non-règlementer et les Ports de commerce), ce qui augmente la probabilité d'existence des bactéries hydrocarbonoclastes. Le prélèvement des échantillons d'eau et de sédiments se fait à partir de différents points du site choisi et il doit être effectué dans des conditions d'asepsie rigoureuse pour éviter toute contamination accidentelle durant la manipulation.

Nous avons pris comme exemple le port de khemisti-Tipaza- où Dr. Zenati a effectué son échantillonnage. Les figures 12-13 montrent la localisation du site.



Figure 12 : Localisation du site d'échantillonnage du port de Khemisti (Zenati, 2018).

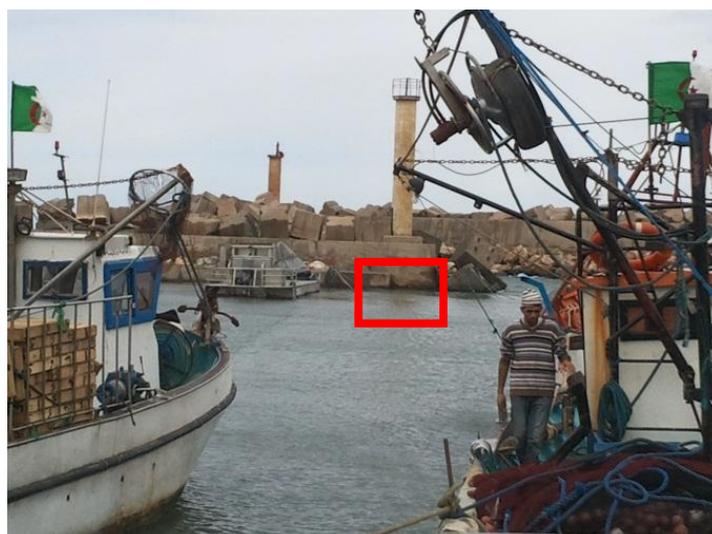


Figure 13 : Présentation de la station de prélèvement des échantillons au niveau du port de khemisti (Zenati, 2018).

1-2. Méthode de prélèvement et matériel utilisé :

(a) Le prélèvement de sédiments du fond de mer, rivières, lacs, etc... à des profondeurs supérieures à 5 m est en général effectué à l'aide de préleveurs de type benne (Van-Veen) (Figure14).

À la surface, les mâchoires sont écartées comme des ciseaux ouverts et maintenues dans cette position par un crochet. Pour garder le crochet en place, la benne "Van Veen" doit être descendue à un rythme lent et régulier.

Les deux mâchoires sont munies de trous pour permettre à l'air de s'échapper pendant la descente. Sans ce dispositif, l'air s'échapperait au moment du prélèvement, ce qui provoquerait une perturbation de l'échantillonnage. Dès que les mâchoires touchent le fond, le crochet se déverrouille, et lorsque la corde est tirée, les mâchoires se referment du fait du rapprochement des bras de leviers.

La quantité d'échantillon emprisonnée dépend de la compacité du fond. Plus la benne est lourde, plus elle collecte d'échantillon.

Il est recommandé de prendre au minimum deux coups de benne à chaque endroit. Les échantillons sont récupérés aseptiquement dans des flacons stériles qui sont ensuite acheminés jusqu'au laboratoire dans des glacières à une température de 4°C.

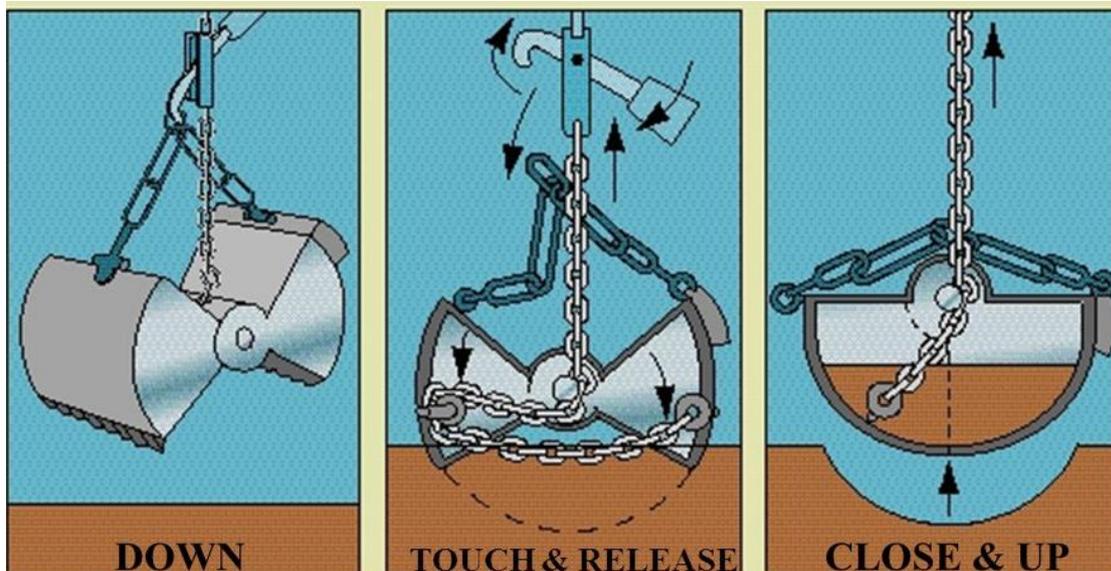


Figure 14 : mode d'action de la benne van-veen (Anonyme, 2020).

(b) Les prélèvements de l'eau de mer sont réalisés en sub-surface avec peu de matériel. Ce prélèvement s'effectue directement avec le flacon destiné à l'analyse en plongeant le flacon dans l'eau à une profondeur de 25 jusqu'à 30cm puis l'ouvrir. Quand le flacon est rempli en eau il doit être refermé sous la surface et sorti de l'eau.

Les flacons sont transportés au laboratoire dans des glacières à une température de 4°C.

1-3. L'étiquetage :

L'étiquetage doit être réalisé à l'aide des feutres et des marqueurs indélébiles.

Les informations principales à mentionner sont :

- La station concernée ou un code permettant d'identifier la station,
- La date et l'heure d'échantillonnage.

2- Isolement des bactéries hydrocarbonoclastes :

Après avoir transporté l'échantillon jusqu'au laboratoire vient l'étape d'isolement sur milieux de culture, le protocole utilisé est le suivant :

2-1 Isolement :

Pour un meilleur isolement le choix du milieu de culture ne doit pas être pris à la légère, pour cela le milieu eau de mer artificielle est fortement requis au niveau de cette étape, ce milieu confère aux bactéries les mêmes conditions que leur environnement naturel et a l'avantage d'être stérile, sa composition pour 1L d'eau distillé est la suivante (Dyksterhouse,1995) :

- 22.79 g de NaCl,
- 11.18 g de MgCl₂- 6H₂O,
- 3.98 g de Na₂SO₄,
- 1,46 g de CaCl₂-2H₂O,
- 1,3g de TAPSO,
- 0,72g de KCl,
- 0,27g de NH₄Cl,
- 89mg de Na₂HPO₄-7H₂O,
- 83mg de NaBr,
- 31mg de NaHCO₃,
- 27mg de H₃BO₃,
- 24mg SrCl₂-6H₂O,
- 2,6mg de NaF,
- 2mg de FeCl₂-4H₂O.

En condition totale d'asepsie devant un bec bunsen ou sous une hotte à flux laminaire :

- Dans un Erlenmeyer de 250ml ou de 500ml aux choix, déposé 5 à 10g de sédiment prélevé à l'aide d'une spatule stérile,
- Rajouté le milieu ONR7a pour compléter les 100ml,
- Incuber à 30°C sous agitation a raison d'une vitesse de 150-200 tr/min pendant 24H (Ne pas dépasser la vitesse recommandée pour éviter les collisions et la perte des cellules bactériennes).

L'agitation permet de libéré les bactéries du sédiment.

2-2 Enrichissement et sélection de bactérie hydrocarbonoclastes :

Après l'incubation de 24H vient l'étape d'enrichissement pour sélectionner les bactéries capables d'utiliser les hydrocarbures comme seule source de carbone : (en condition d'asepsie)

- Incorporer 5ml de l'ancien milieu dans 95ml d'un nouveau milieu ONR7 stérile à l'aide d'une pipette pasteur,
- Ajouter 1% de pétrole (1 ml) stérilisé préalablement à l'autoclave pendant 30 min ou bien à l'aide d'un filtre seringue,
- Incuber à 30°C sous agitation pendant 2 à 3 jours en ajoutant un témoin eau de mer artificielle + pétrole.

Après 2 à 3 jours :

- Mesurer la croissance bactérienne (la densité optique) à l'aide d'un spectrophotomètre à 600nm,

Indicateurs : pour confirmer s'il y'a eu croissance bactérienne, observation de la disparition de la couche de pétrole ou sa diminution comparé au témoin.

Après confirmation de la croissance, une série de trois repiquages successifs de la suspension microbienne à raison de 3% (v/v) se trouve être nécessaire pour s'assurer d'avoir gardé que les bactéries hydrocarbonoclastes, elle est effectuée chaque deux jours dans un milieu ONR7a- pétrole renouvelé tout en mesurant la densité optique après chaque repiquage.

A la fin de cette étape vient la réalisation d'une série de dilution décimale (jusqu'à 10⁻⁶) : (Figure15)

- Prélever 1 mL d'inoculum de la suspension microbienne a l'aide d'une pipette pasteur puis la déversé dans un tube contenant 9 mL d'eau de mer artificielle,

- Prélever 1mL de la dilution 10-1 la déversé dans un autre tube contenant 9mL d'eau de mer artificielle,
- Répéter l'opération jusqu'à obtention d'une dilution de 10-6. (Figure 15).

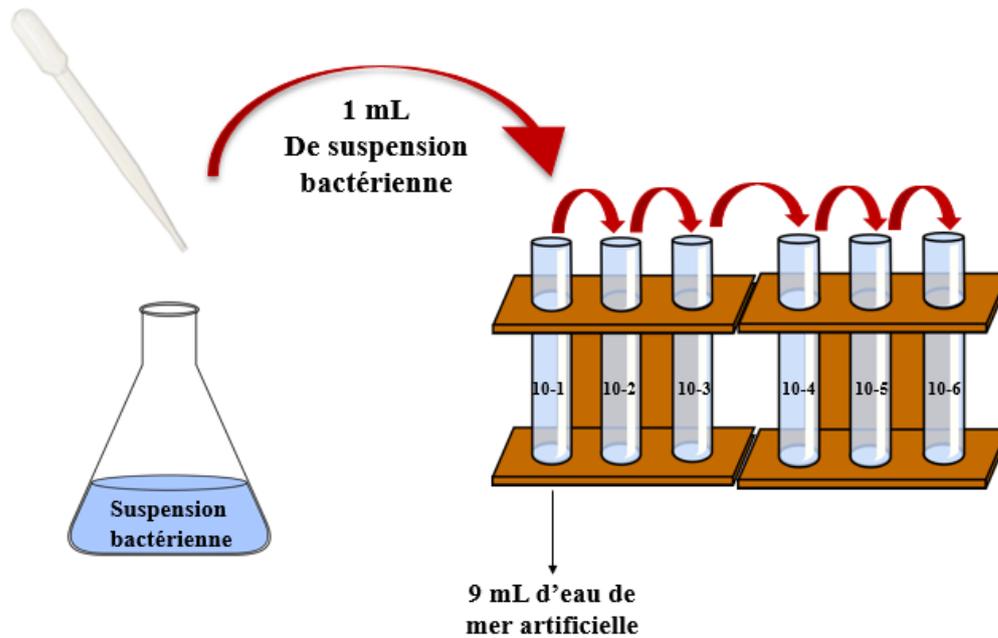


Figure 15 : schéma représentant l'opération de dilution décimale successive.

3-Purification :

3-1. Premières purifications :

Après avoir réalisé les dilutions, vient l'étape d'ensemencement en surface sur deux milieux ONR7a gélosé-Pétrole et LB (Figure 16), dont la composition est la suivante :

- 10 g de peptone,
- 5 g d'extrait de levures,
- 10 g de NaCl.

L'ensemencement en surface se fera comme suivant : (en condition d'asepsie)

- Préparer les milieux LB gélosé et ONR7a gélosé+1% de pétrole, puis ajusté le pH et stérilisé a l'autoclave,
- Attendre que les milieux refroidissent et les coulés sur les boites de Pétri,
- Prélever 100µL -200µL du tube portant la concentration de 10-1 l'aide d'une pipette pasteur,
- Déposer le volume sur les deux boites de Pétri contenant les milieux LB gélosé et ONR7a gélosé-pétrole de façon dispersé,
- Etaler à l'aide d'un étaloir sur toute la surface de la boite
- Après que la quantité étalée sèche, incuber à 30°C pendant 48H,
- Répéter ainsi l'opération pour toutes les concentrations jusqu'à la concentration 10-6.

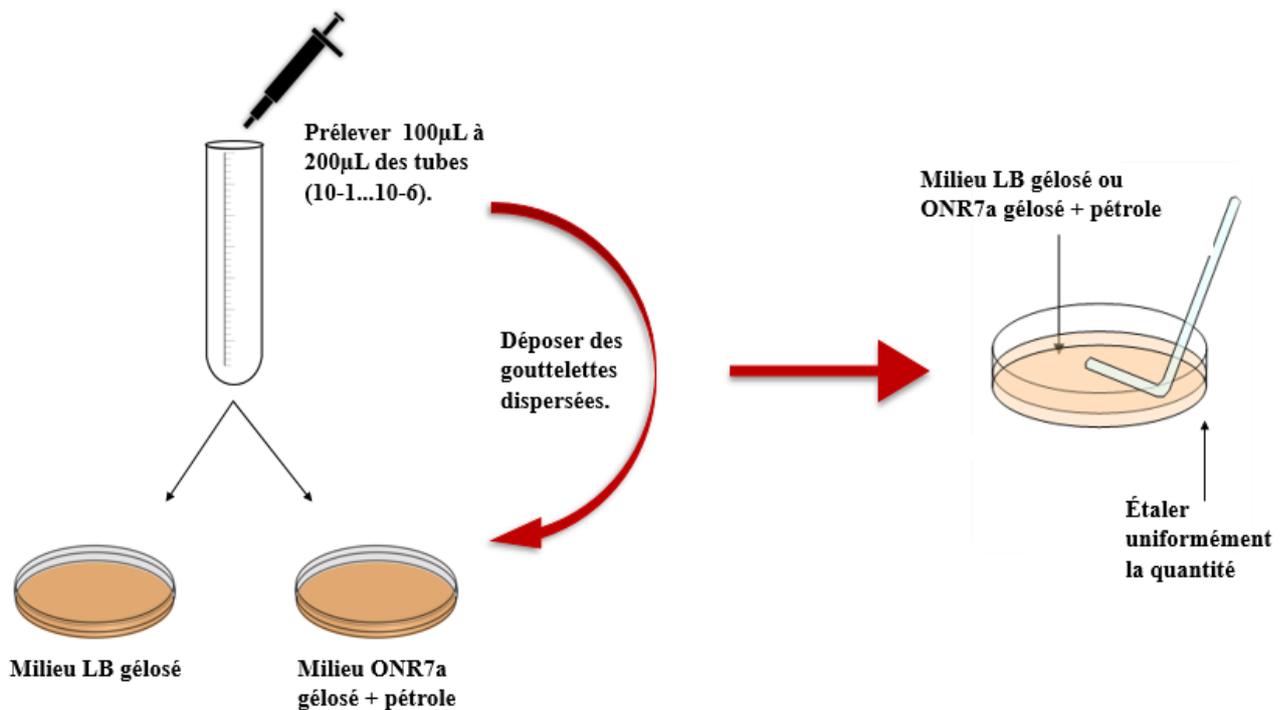


Figure 16 : schéma expliquant la technique du repiquage à partir des différentes concentration (10-1 _ 10-6).

3-2 Seconde purification :

Après incubation de 48H et une observation très minutieuse, les colonies les plus isolées sont repurifiées et repiqués chaque colonie pour deux boîtes contenant le milieu LB gélosé et deux boîtes contenant le milieu ONR7a gélosé-pétrole.

3-2-1 Préparation du milieu ONR7a gélosé-pétrole (Figure 17) : (en conditions d'asepsie)

- Stériliser 0,3mL de pétrole à l'aide d'un filtre seringue,
- Stériliser 0,5mL de Dichlorométhane à l'aide d'un filtre seringue,
- Diluer le pétrole dans 0,5 mL de solvant dichlorométhane (le choix du solvant se fait par rapport à sa capacité à s'évaporer rapidement),
- Etaler le pétrole dilué par le dichlorométhane sur la surface du ONR7a stérile,
- Après évaporation du solvant, prendre une colonie bien isolée à l'aide d'une öse en platine,
- Ensemencer les milieux LB gélosé et ONR7a gélosé-pétrole par cadrant tout en flambant l'öse pour chaque cadrant afin de diminuer la charge bactérienne,
- Incuber à 30°C pendant 24H,
- Donner un nom provisoire aux souches purifiées en attendant de confirmer leurs identités par caractérisation phylogénétique.

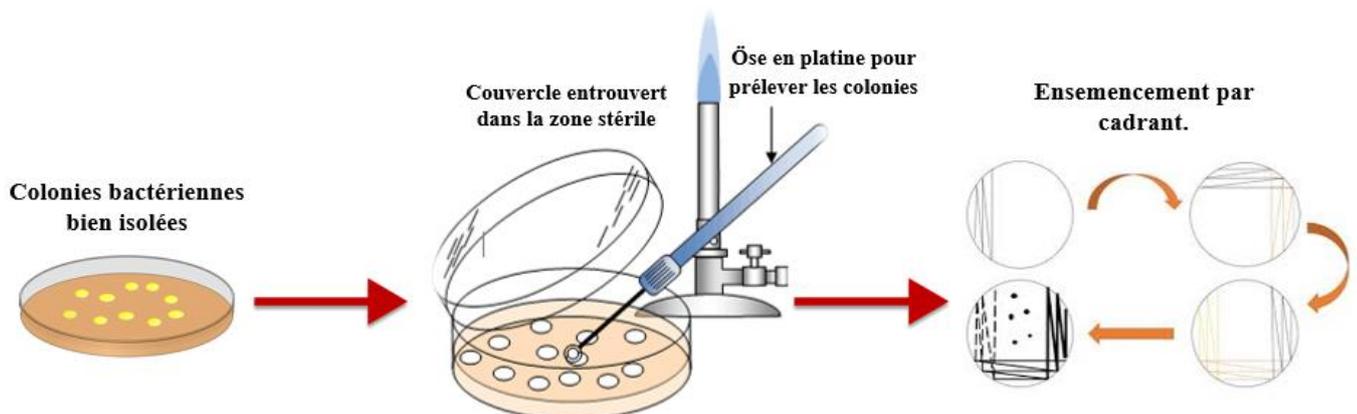


Figure 17 : schéma expliquant le procédé de seconde purification.

4- Conservation des isolats purifiés :

4-1 Conservation à court terme :

Pour une conservation à court terme qui peut durer de 1 jusqu'à 6 mois le protocole est le suivant : (en conditions d'asepsie),

- Dans des tubes à vis contenant un milieu LB solide incliné à pH ajusté, ensemercer des fragments de colonie purifiées à l'aide d'une öse en platine stérile,
- Incuber les tubes à 30°C pendant 48H,
- Conserver à +4°C.

4-2 Conservation à long terme :

Pour une conservation à long terme qui dure de 1 à 4 ans le protocole est le suivant : (en conditions d'asepsie),

- Pour chaque colonie, préparer 5 tubes à vis contenant un milieu LB liquide a pH ajusté,
- Incuber dans un incubateur agitateur toute une nuit à 30°C a raison de 150tr/min,
- Mesurer la densité optique de la croissance bactérienne pour avoir une suspension bactérienne en phase exponentielle valeur entre 0,6 et 0,7
- Déposer 3mL de la suspension bactérienne en phase exponentielle dans des tubes Eppendorf de 5mL,
- Ajouter 1,25mL (25%) de glycérol stérilisé par filtre seringue et préalablement réchauffé pour diminuer de sa viscosité,
- Mettre les tubes dans un vortex a vitesse minimale pour permettre au glycérol de bien enrober toutes les cellules bactériennes afin de les protéger d'une rupture des membranes cellulaires,
- Conserver à -80°C.

5- Caractérisation morphologique des isolats :

5-1. Observation macroscopique :

Après repiquage et incubation (24 h) sur milieu LB solide et milieu ONR7 gélosé +pétrole en boîte de Pétri, des colonies pures subissent une observation à l'œil nu.

Les différents éléments d'identification macroscopiques sont :

- La taille des colonies par la mesure du diamètre : punctiformes ou non. On distingue les petites colonies (< 1mm), les moyennes (1 à 3 mm) et les grandes colonies (> 3 mm).
- La forme des colonies : avec vue de profil (bombée, plate, ombiliquée, à bord soulevés ou en œuf en plat) et avec vue de dessus (rondes, irrégulière, ovoïde).
- L'aspect de la surface (lisse, rugueuse, brillante;).
- L'opacité (opaque, translucide ou transparente).
- La consistance : elle se juge au moment du prélèvement. On distingue des colonies crémeuses des sèches et des muqueuses.
- Couleur ou pigmentation de la colonie : cette description aboutit à distinguer 3 types principaux de colonies :
 - Colonies S (Smooth) : colonies à surface lisse et bords réguliers, bombées de consistance crémeuse. Elles donnent des suspensions homogènes.
 - Colonies R (Rough) : colonies à surface rugueuse et bords souvent dentelés, plates, de consistance sèche. Elles donnent des suspensions hétérogènes.
 - Colonies M (Muqueuse) : colonies à surface lisse et bords réguliers, bombées mais filantes au prélèvement à l'anse. Elles donnent des suspensions hétérogènes.

Nous avons pris comme exemple les résultats de la souche SdK644 trouvée par Dr. Zenati. Les colonies de cette souche ont la forme ronde régulière, d'une taille de 5 mm, plates, lisses, d'une consistance gluante, translucides et d'une coloration marron clair à sécrétion abondante (Figure 18).



Figure 18 : Forme des colonies de la souche SdK644 cultivée dans le milieu LB, après 48 h d'incubation (Zenati, 2018).

5-2. Observation microscopique :

Ce test permet de déterminer forme de la cellule, mode de regroupement, présence de spores et mobilité, présence de spores et l'arrangement des bactéries.

Le frottis est obtenu à partir d'une suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance, agitée et homogénéisée tout en évitant la formation d'un culot au fond du tube.

5-2-1. A l'état frais :

Quelques gouttes de suspension bactérienne sont prélevées et étalées sur lame désinfectée. Après le séchage des gouttes, on recouvre la préparation d'une lamelle désinfectée. L'observation est réalisée au microscope optique à l'objectif 40. L'huile à immersion est utilisée avec le G×100.

5-2-2. Coloration de Gram :

Quelques gouttes de culture de la souche bactérienne sont déposées sur une lame propre et fixée par l'éthanol à 90° (5 minutes) ou par passage par une flamme du bec Bunsen.

La lame est plongée pendant 2 à 3 minutes (en fonction de la concentration) dans la coloration au violet de gentiane. Toutes les bactéries colorées en violet sont rincées à l'eau déminéralisée.

Pour stabiliser la coloration violette, le lugol est étalé sur la lame et laissé agir 20 secondes. La lame est ensuite rincée par une solution de décoloration « DecolorizerCounterstain 3Step GRAM SAFRANINSKit Sigma » pendant 20 à 50 secondes. L'alcool (contenu dans la solution décolorante) pénètre dans la bactérie.

La coloration au violet de Gentiane disparaît. Les bactéries décolorées sont des bactéries Gram-. Si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries Gram+.

La dernière étape est la coloration des cytoplasmes incolores avec la fuchsine ou de la safranine pendant une minute. La lame est ensuite séchée à l'air sec avant l'observation au microscope.

- Les bactéries Gram positive apparaissent en violet foncé.
- Les bactéries Gram négatives sont colorées en rose ou en rouge.

6- Caractérisation biochimique :

6-1. Test de mobilité :

Les tests de mobilité sont réalisés dans des milieux Mannitol-Mobilité.

L'ensemencement de la souche bactérienne est réalisé par piqûre centrale à l'aide d'une pipette Pasteur suivie à une incubation au shaker à une température optimale (30 °C) pendant une nuit (pour chaque colonie bactérienne on réalise 3 tubes).

Les bactéries immobiles ne poussent qu'au niveau de la piqûre central alors que les bactéries mobiles diffusent dans la gélose en synthétisent des flagelles nécessaires à leurs déplacement (Figure19).



Figure 19 : Test de Mannitol-mobilité des bactéries.

6-2. Test d'oxydase :

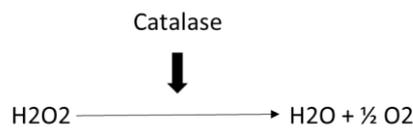
Ce test permet la détection de la phénylène-diamine-oxydase enzyme qui est capable d'oxyder un réactif : le N,N-diméthyl-p-phénylène diamine.

Pour réaliser ce test, un disque de papier filtre ordinaire préalablement imbibé d'une goutte réactif oxydase est déposé sur une lame sèche et mis en contact avec une colonie bactérienne fraîchement cultivée et écrasée avec une pipette Pasteur.

Au bout de 30 secondes l'apparition d'une coloration violette immédiatement indique que le test est positif (Singleton, 1999). Dans le cas contraire l'absence d'une coloration indique que le teste est négative.

6-3. Test de catalase :

La catalase est une enzyme ayant la propriété de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) avec dégagement d'oxygène selon la réaction suivante :



Sur une lame et à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, on dépose une colonie bactérienne en phase exponentielle de croissance à laquelle on ajoute de l'eau oxygénée.

La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles (dégagement gazeux de dioxygène) (Marchal *et al.*, 1991). Dans le cas contraire l'absence des bulles indique que la réaction est négative.

6-4. Galerie API20Eet API20NE :

La galerie API 20E est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif. Elle se compose de 20 micro tubes contenant des substrats sous forme déshydratée qui permettant l'identification de micro-organismes par la réalisation rapide et facile de tests biochimiques (Figure 20).

On inocule chaque tube avec la suspension bactérienne à identifier, les réactions produites après la période d'incubation se traduisent par des virages colorés.

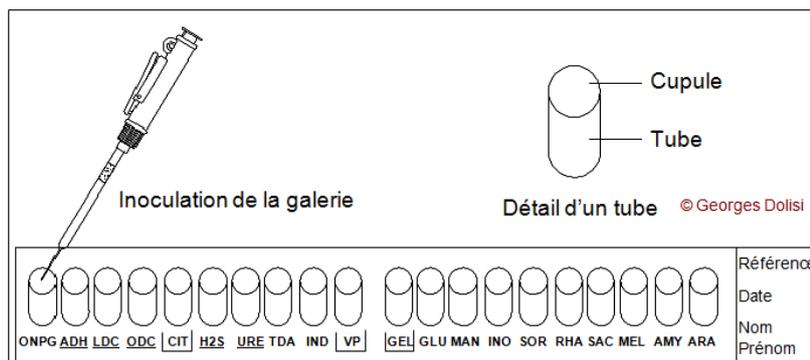


Figure 20 : Profil d'une API test 20 E.

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

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

L'identification de l'espèce bactérienne s'effectue à l'aide du Catalogue Analytique (tableau de lecture) et d'un logiciel d'identification et après incubation durant 24 h et 48 h à 37 °C.

7- Caractérisation phylogénétique des isolats :

L'analyse phylogénétique d'une souche bactérienne est réalisée par comparaison de la séquence du gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARN r16S avec les séquences déposées dans la banque de gènes (GenBank).

Plusieurs étapes sont nécessaires pour cette étude phylogénétique.

7-1. Extraction de l'ADN génomique :

Les ADNs génomiques sont extraits à l'aide du kit « Ultraclean Microbial DNA Isolation » (MoBio) comme décrit dans le manuel d'utilisation. Si la quantité d'ADN souhaitée est plus importante, le protocole décrit par Sambrook et Russell (2001) est alors utilisé.

La technique de Sambrook et Russell est basée sur l'utilisation du phénol : chloroforme : alcool isoamylique (PCI) en proportion 24:1(v/v). Le surnageant obtenu est transféré dans un tube Eppendorf de 1,5 ml propre et stérile en faisant attention de ne pas prendre l'interface blanche. Une deuxième extraction est réalisée avec du chloroforme afin d'éliminer toute trace de phénol dans la préparation d'ADN.

Enfin, l'ADN est précipité avec 2 volumes d'éthanol absolu en présence d'acétate de sodium à 3 mol.L⁻¹ et de pH 5 (ajouté au 1/10 du volume), resuspendu dans de l'eau milliQ stérile puis conservé à -20 °C.

7-2. Electrophorèse de l'ADN :

L'électrophorèse se réalise sur un gel d'agarose à 1% (m/v) dans le tampon TAE 1X (4,84 g de Tris base, 1,14 ml d'acide acétique glacial et 0,74 g d'EDTA-Na₂ par litre d'eau) contenant 4 µl/25 ml de bromure d'éthidium (BET). Afin d'optimiser les dilutions à réaliser de l'ADN génomique pour amplifier le gène de l'ARN ribosomal 16S on utilise un marqueur lambda Hind III dont la taille de bandes varie de 1000 pb à environ 23000 pb.

7-3. Amplification de l'ADNr 16 S, séquençage et analyse phylogénétique :

Le principe de cette technique consiste à amplifier une séquence définie d'ADN du génome (génome la souche SdK644 dans le cas des travaux de monsieur Zenati B) par la réaction en chaîne par polymérase en chaîne (PCR), à l'aide d'un système de PCR Stratagene (gradient Robocycler 96) avec de l'ADN polymérase GoTaq (Promega, Madison, WI, USA).

Les amorces nucléotidiques universelles Fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 1492R (5'- TACGGTTACCTTGTTACGACTT -3') sont utilisées afin d'amplifier le gène de l'ARNr 16S et obtenir un produit PCR de taille suffisante en pb (Winker et Woese, 1991).

Les recherches de similitude entre la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S et les séquences disponibles dans la banque de séquences d'ADNs (GenBank) se font par le programme BLAST pour construire l'arbre phylogénétique, ou le dendrogramme de la souche étudiée en utilisant les bases de données des nucléotides : GenBank/DDBJ/EMBL.

Exemples :

Après consultation sur Blast ncbi de la séquence du gène de l'ARNr 16S (968pb) Dr. Zenati a trouvé que la séquence (1) présente une forte similitude avec plusieurs souches de *Marinobacter spp.*

La comparaison des caractères phénotypiques de la souche SdK644 avec ceux du genre *Marinobacter* et plus spécifiquement l'espèce *M. hydrocarbonoclasticus* montre une forte similarité de 97,5% avec la souche ATCC 49840T (Figure 21). Sur ce et selon l'étude de STACKEBRANDT ET GOEBEL la souche SdK644 appartient à l'espèce *M. hydrocarbonoclasticus*.

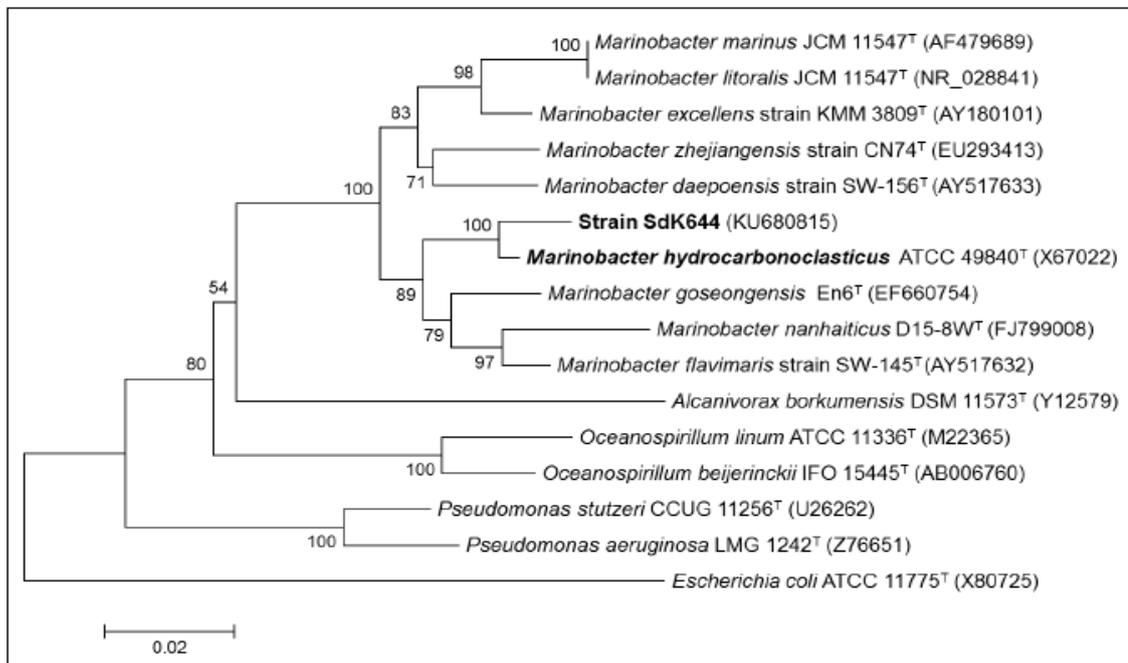


Figure 21 : Arbre phylogénétique de la souche SdK644 (Zenati, 2018).

Selon Hantati (2018). L'analyse phylogénétique de la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche FLU5 constituée de 1478 nucléotides sur la base de données de nucléotides (GenBank) et l'analyse des distances de l'arbre phylogénétique par la méthode de Neighbor-Joining (Jukes et Cantor, 1969), ont montrées que la souche FLU5 appartient la famille des *Bacillaceae*, ordre des *Bacillales*, classe des *Bacilli* et phylum des *Firmicutes*. Cette souche est étroitement liée aux membres du genre *Bacillus*, en particulier à l'espèce *Bacillus stratosphericus* avec une similarité de 99,66% (Figure 22).

Les organismes appartenant à l'espèce *B. stratosphericus* sont largement répandus dans le monde et ont été isolés fréquemment à partir de différents biotopes, tels que : les environnements marins (Siddikee *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2010, Lima *et al.*, 2013, Hentati *et al.*, 2016), le sol (Bezza et Nkhalambayausi Chirwa, 2016), les sédiments estuariens (Zhang *et al.*, 2012), le cérumen humain (Gerchman *et al.*, 2012), les aliments riches en matières grasses (Gricajeva *et al.*, 2016).

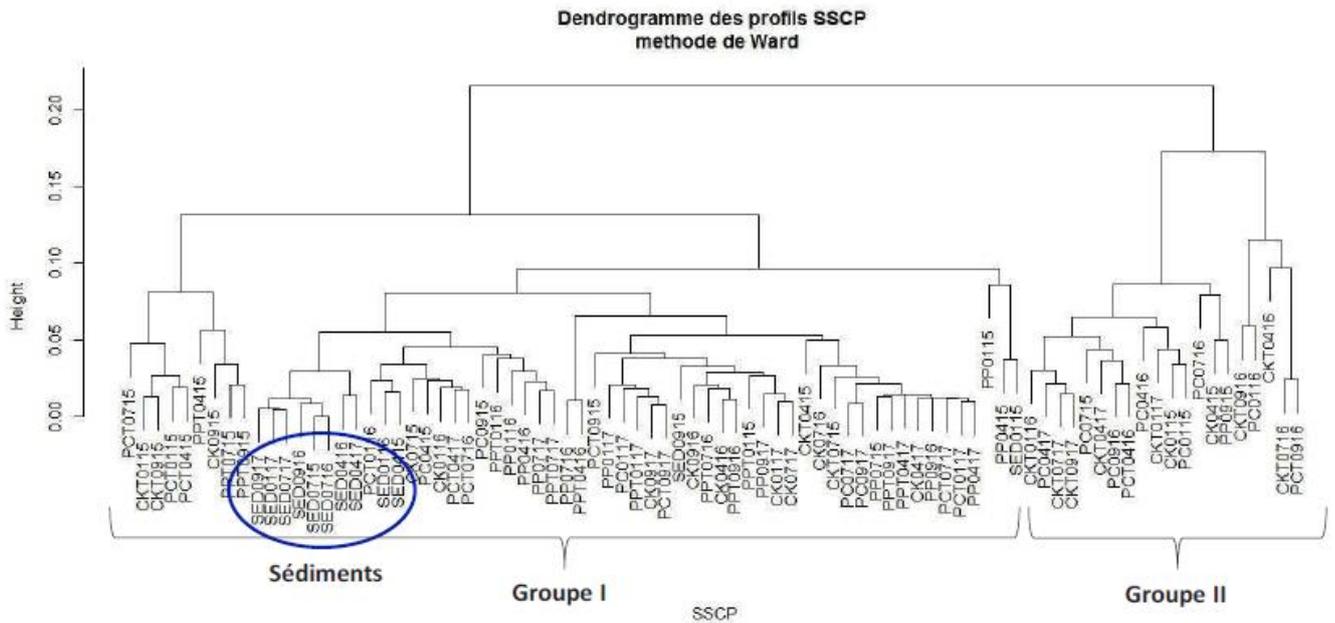


Figure 22 : Arbre phylogénétique de la souche FLU5 (Hantati, 2017).

Conclusion et perspectives :

Les hydrocarbures sont des polluants récalcitrants très toxique en polluant le milieu marin, ces derniers favorisent la prolifération de bactéries hydrocarbonoclastes à pouvoir épurateur qui utilise les hydrocarbures comme seule source de carbone ce processus est appeler la biodégradation, cette biodégradation a été valorisée pour être utilisé comme Bioremédiation contre les déchets pétroliers se trouvant dans les milieux marins.

L'efficacité de la bioremédiation dépend principalement de la structure bactérienne, des sites à décontaminé et des conditions environnementales. Ces facteurs influencent la dégradation le taux et l'activité microbienne. Elle peut être améliorée par deux approches complémentaires : bioaugmentation, biostimulation (Nikolopoulou *et al.*, 2013).

Cette application biotechnologique est considérée comme un outil de décontamination des sites pollués par les hydrocarbures et comme une solution extrêmement efficace associée à des caractéristiques écologiques et relativement à bas prix (Santisi *et al.*, 2015).

Vue l'ampleur de la pollution et des déchets pétroliers retrouver au niveau de nos ports algériens plus précisément les HAPs et BTEX qui sont les composés principaux d'huiles de moteur et de vidange déversés dans les eaux, une large panelle de microorganismes retrouvé dans les endroit contaminé peuvent être utilisé afin de réduire le taux d'hydrocarbure, cette approche de bioremédiation pourrait être très bénéfique en utilisant un consortium de micro-organismes l'efficacité du pouvoir épurateur pourrait augmenté et de ce fait décontaminer nos eaux à petite échelle et pourquoi pas dans un future proche à grande échelle.

Références bibliographiques :

Atlas, R.M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons : an environmental perspective. Microbiological reviews. p. 180.

ANPE, Agence nationale de protection de l'environnement. (2012). Manuel de procédures du pniu pour lutter contre les évènements de pollution marine. Réf : AF 02-10. P 30-59.

Asia, L. (2012). *Analyse des hydrocarbures dans des sédiments superficiels de zones côtières Méditerranéennes (Golfe de Fos, Rade de Marseille et Massif des Calanques)*. Thèse de Doctorat en Chimie Analytique, Université d'Aix-Marseille, France, 175 p

Abbasah F. ; Lockington R. ; Mallavarapu M. ; Naidu R. (2015). *A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria*. Appl. Biochem. Biotechnol. Springer Science + Business Media, New York, p.p.1-30. [En ligne]. Disponible sur : « <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-015-1603-5> » (Consulté le 24-03-2020).

Abbasian, F., et al. (2015). *A Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria*. Vol. 176.

Alain, D ; Francisco, U. (2015). *Analyse documentaire de la toxicologie aquatique des huiles de pétrole : un aperçu des propriétés du pétrole et de ses effets sur le biote aquatique*. Secrétariat canadien de consultation scientifique (SCCS)., 55p. [En ligne]. Disponible sur : « https://www.researchgate.net/profile/Francisco_UcanMarin/publication/273142438_Analyse_documentaire_de_la_toxicologie_aquatique_des_huiles_de_petrole_un_aperçu_des_proprietes_du_petrole_et_de_ses_effets_sur_le_biote_aquatique/links/54f9f6ae0cf21ee4fdedfe31.pdf » (Consulté le 03-06-2020).

Anonyme (2020). [En ligne]. Disponible sur : « <https://www.schoolmouv.fr/cours/l-exploitation-du-petrole/fiche-de-cours> » (Consulté le 24-03-2020).

Bertrand, J-C ; Mille, G. (1989). *Devenir de la matière organique exogène. Un modèle : les hydrocarbures. Microorganismes dans les écosystèmes océaniques*. Masson (Paris), Chapitre13, p.p. 343-385.

Bouchez, M et al. (2006). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Environment. Part Two: Microbial Degradation*. Rev Oil & Gas Science and Technology [en ligne]. Disponible sur : « <https://ogst.ifpenergiesnouvelles.fr/articles/ogst/abs/1996/06/vol51n6p797/vol51n6p797.html> » (Consulté le 06-06-2020), Vol. 51 ,N°.6, p.p. 797-828.

Benchouk, A. (2017). Bioremédiation des sols pollués de pétrole par les microorganismes indigènes et amélioration génétique de leur pouvoir [en ligne]. Thèse de doctorat en microbiologie., Université d'Ibn Badis, Mostaganem. 726p [En ligne]. Disponible sur : < http://e-biblio.univmosta.dz/bitstream/handle/123456789/558/ma%20these%20de%20doctorat_3%20finale%20%283%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (Consulté le 3-06-2020).

Bogdan, C ; Mădăras, D ; Coman, M. (2020). *Causes and Consequences of the Black Sea Ecosystem Pollution with Petroleum Products*. Asian Journal of Geographical Research., Vol 3, p.p. 29-44. [En ligne]. Disponible sur : < <http://www.journalajgr.com/index.php/AJGR/article/view/30103/56488> > (Consulté le 03-06-2020).

Colombano, S ; Guerin, V ; Saada, A ; Hiez, D ; Bomer, H. (2008). *Journée Technique d'information et de retour d'expérience de la gestion des sols pollués. Les Diagnostiques - Objectifs, enjeux & moyens*. In Gouvernement de France. Ministère De l'écologie, du développement durable et de l'énergie.

Clay, S.L., (2014). *Identifying the fate of petroleum hydrocarbons released into the environment and their potential biodegradation using stable carbon isotopes and microbial lipid analysis* (Dissertation). McMaster University.

Chalghmi, H. (2015). *Etude de la pollution marine par les hydrocarbures et caractérisation de leurs effets biochimiques et moléculaires sur la palourde de Ruditapes sp*, Université de Bordeaux.

Chalghmi, H. (2017). *Etude de la pollution marine par les hydrocarbures et caractérisation de leurs effets biochimiques et moléculaires sur la palourde de Ruditapes sp*. [En ligne]. Thèse de géochimie et Eco toxicologie., Université de Badji Mokhtar, Annaba. 189p. Disponible sur : < <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01583022/document>> (consulté le 03-06-2020).

Dyksterhouse.S. E ; Gray, J-P ; Herwig. R-P ; Lara J.C ; Staley, J-T. (1995). *Cycloclasticus pugetii gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments*. International, Journal Systematic Bacteriology Vol. 45, p.p. 116-123.

Ducker, W A., Grant, L M. (1996). *Effect of Substrate Hydrophobicity on Surfactant Surface-Aggregate Geometry*. The Journal of Physical Chemistry, Vol. 100.,p.p. 11507-11511.

Das, N., Chandran, P. (2011). *Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview*. Biotechnology research international.

Duran, R ; Cravo-Laureau, C. (2016). *Role of environmental factors and microorganisms in determining the fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in the marine environment*. FEMS Microbiology Reviews, Vol. 40, n° 6, p.p. 814-830.

Fahem, L. (2013). *Techniques de traitement in situ des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les eaux de surfaces*. Thèse de doctorat en microbiologie, Université de Cherebrooke,70p.

Fitzpatrick, F-A; Boufadel, M -C ; Johnson,R ; Lee, K ; Graan, A -B ; Bejarano, A-C ; Zhu ,Z; Waterman, D.M; Capone, E; Hayter, S.K; Hamilton, T; Deffer, M.H. (2015) . *Oil-particle interactions and submergence from crude oil spills in marine and freshwater environments*. Review of the science and future science needs. U.S. Geological Survey Open-file report, 33 p.

Federation, T. (2018). *Fate of Oil Spills*. [En ligne]. Disponible sur : « <https://www.itopf.org/knowledge-resources/documents-guides/fate-of-oil-spills/>. » (Consulté le 7-06-2020).

Feknous N. (2018). *Essai d'isolement et d'identification de souches bactériennes à pouvoir auto-épurateur vis-à-vis des hydrocarbures*. Thèse de doctorat en microbiologie appliquée, Université Badji Mokhtar, Annaba.

Goeury, C. (2012). *Numerical modelling of oil spill drifts in continental and estuarine waters*, Université Paris-Est.

Guermouch M'rassi, A. (2014). *Caractérisation moléculaire des bactéries impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures* [En ligne]. Thèse de doctorat en microbiologie., Univ d'Oran., 166p.Disponible sur : <https://theses.univ-oran1.dz/document/14201408t.pdf> (consulté le 2 juin 2020).

Harayama, S ; Kasai, Y ; Hara, A. (2004). *Microbial communities in oil-contaminated seawater*. Current opinion in biotechnology., Vol.15, n°3, p.p. 205-214.

Haritash, A.K ; Kaushik, C.P. (2009). *Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*. Journal of Hazardous Materials, Vol.169, n°1, p.p. 1-15.

Hazen, T.C., Dubinsky, E.A., Desantis, T.Z., Andersen, G.L., Piceno, Y.M., Singh, N., Jansson, J.K., Probst, A., Borglin, S.E., et al. (2010). *Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria*. Science ,Vol .330,p.p. 204-615.

Hatti-kaul, R ; Mamo, G ; Mattiasson, B. (2016). *Anaerobes in Biotechnology* [En ligne]. Disponible sur :
« https://books.google.dz/books?id=bdGSDQAAQBAJ&pg=PA257&lpg=PA257&dq=Liu,+C.+and+Z.+Shao,+Alcanivorax+dieselolei+sp.+nov.,+a+novel+alkane-degrading+bacterium+isolated+from+sea+water+and+deep-sea+sediment.&source=bl&ots=m4iIXdC0IK&sig=ACfU3U17P0mEUD7hrOZqecTwqHeFa5h_XQ&hl=fr&sa=X&ved=2ahUKEwjywoG65fDpAhXd8uAKHV4tDMYQ6AEwBXoECAcQAQ#v=onepage&q=Liu%2C%20C.%20and%20Z.%20Shao%2C%20Alcanivorax%20dieselolei%20sp.%20nov.%2C%20a%20novel%20alkane-degrading%20bacterium%20isolated%20from%20sea%20water%20and%20deep-sea%20sediment.&f=false » (Consulté le 20-03-2020).

Hassaine, A. (2016). *Biodégradation des Hydrocarbures (Pétrole brut et Kérosène) par la Microflore Microbienne des Eaux de la région de Skikda* [En ligne]. Thèse de doctorat en biologie végétale., Univ de Badji Mokhtar, Annaba .189p. Disponible sur :<http://biblio.univ-annaba.dz/wp-content/uploads/2017/05/These-Hassaine-Amina.pdf> (Consulté le 03-06-2020).

Hazrati S. ; Rostami R. ; Farjaminezhad M. ; and Fazlzadeh M. (2016). *Preliminary assessment of BTEX concentrations in indoor air of residential buildings and atmospheric ambient air in Ardabil, Iran*. Atmospheric Environment, Vol. 132, p.p. 91-97.

Hentati , D. (2018). *Isolement et caractérisation des bactéries marines hydrocarbonoclastes, production des biosurfactants et étude de la biodiversité microbienne au sein de trois ports de Sfax, Tunisie* [En ligne]. Thèse de Doctorat en Biotechnologie & Microbiologie., Université de Sfax Tunisie. 349p. Disponible sur : < <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02045890/document> > (Consulté le 02-06-2020).

ITOPF. (2011). *Effects of Oil Pollution on the Marine Environment. Technical Information Paper (TIP), n°13*, International Tanker Owners Pollution Federation.

Innocent Chukwunonso, O ; Aziz, A ; Auwalu, H ; Fauziah Shahul, H. (2020). *Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon : A review*. Environmental Technology & Innovation., Vol.17. p.p. 1864-2352.

Joutey, N.T., Bahafid, W., Sayel, H., El-Ghachtouli, N., (2013). *Biodegradation : involved microorganisms and genetically engineered microorganisms*. In : *Biodegradation-Life Science*, Vol. 11, INTECH, pp. 290–320.

Kumar, V ; et al. (2019). *Microbial action on hydrocarbons* [en ligne]. Disponible sur : <https://link.springer.com/book/10.1007%2F978-981-13-1840-5> (Consulté le 23-05-2020).

Marchand, M ; Kantin, R. (1997). *Contaminants chimiques en milieux aquatiques*, (Troisième partie, Présentation de quelques éléments caractéristiques), Océanis, Paris.

Mohamed, S. (2004). *Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes*. Variation en fonction de la source de carbone.

Mirales, G. (2007). *Devenir d'une contamination pétrolière dans des sédiments côtiers infralittoraux et son impact sur les communautés bactériennes*. Thèse de Doctorat, Université de la Méditerranée (Aix-Marseille II), Marseille, France. 231p.

McGenity et al. (2012). *Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions*. *Aquatic Biosystems* [en ligne]. Disponible sur : <https://aquaticbiosystems.biomedcentral.com/articles/10.1186/2046-9063-8-10> (Consulté le 04-06-2020).

Meckenstock, R.U., et al., (2016). *Anaerobic degradation of benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, Vol 26.,p.p. 92-118.

Mahdjoubi, M ; Capello, S ; Souissi, Y. ; Jaouani, A. ; Cherif, A. (2018). *Microbial Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Marine Environments*. [Recent Insights in Petroleum Science and Engineering](#), IntechOpen, Etdited by Mansoor [Zoveidavianpoor](#). p.p. 326-341.

Nikolopoulou, M ; Pasadakis, N ; Kalogerakis, N. (2013). *Evaluation of autochthonous bioaugmentation and biostimulation during microcosm-simulated oil spills*. *Marine Pollution Bulletin*, Vol.72, N°1, p.p.165-173.

Nur Zaida, Z (2018). *Bioaugmentation of petroleum hydrocarbons* in *Microbial action on hydrocarbons*, Springer. Singapore, p.p.415-436. [En ligne]. Disponible sur : « <https://doi.org/10.1007/978-981-13-1840-5> » (Consulté le 07-06-2020).

Ossai, I.C ; Ahmed, A ; Hassan, A ; et al. (2020). *Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review*. *Environmental Technology & Innovation* [En ligne].

Disponible sur : https://www.researchgate.net/publication/337172574_Remediation_of_soil_and_water_contaminated_with_petroleum_hydrocarbon_A_review (Consulté le 05-06-2020).

Parra-Barraza, H ; Montiel D-H ; Lizardi, J ; Hernandez, J ; Herrera, R. (2003). *The zeta potential and surface properties of asphaltenes obtained with different crude oil/n-heptane proportions*. Fuel., Vol. 83, p.p. 869–874.

Prince, R ; Garrett, R-M ; Bare, R. E ; Grossman ; T. Townsend ; J. M. Suflita ; K. Lee ; E. H. Owens ; G. A. Sergy ; J. F. Braddock ; J. E. Lindstrom ET R. R. Lessard. (2003). *The roles of photooxidation and biodegradation in long-term weathering of crude and heavy fuel oils*. Spill Science & Technology Bulletin. Vol. 8, n°2, p.p.145-156.

Prince, R. (2005). *The Microbiology of Marine Oil Spill Bioremediation*, In Ollivier B, Magot M., Edition Petroleum Microbiology. ASM Press, Washington, p 317-335. [En ligne]. Disponible sur : « <https://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555817589.chap16?crawler=true> ». (Consulté le 1-06-2020).

Prince, R ; Walters, C ; Wang Z ; Stout S. A. (2007). *Biodegradation of Oil Hydrocarbons and Its Implications for Source Identification*, Elsevier Academic Press Inc., San Diego, p 349–379.

Perfumo, A., Banat, I M., Canganella, F., Marchant, R. (2010). *Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading Pseudomonas aeruginosa AP02-1*. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol 72,p.p. 132.

Pulgarin, A. (2012). *Méthodes pour la datation des hydrocarbures déversés dans l'environnement*. Université de Sherbrooke, Québec, Canada. p.p.12-16.

Ron, E.Z ; Rosenberg, E. (2014). *Enhanced bioremediation of oil spills in the sea*. Current opinion in biotechnology., Vol. 27 p.p. 191-194.

Rosenberg M., et al. (2015). *Microbial adhesion to hydrocarbons (math)*. Biofouling, Vol. 4, pp. 121-128.

Salleh A.B., et al. (2003). *Bioremediation of petroleum hydrocarbon pollution*. Indian journal of biotechnology, Vol.2, p.p.411-425.

Soltani, M. (2004). *Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes variation en fonction de la source de carbone*. Thèse de Doctorat, Université de Pierre et Marie curie Paris 6. 284 p.

Schwacke, L.H. ; Smith, C.R. ; Townsend, F.I. ; Wells, R.S ; Hart, L.B ; Balmer B.C. ; Collier, T.K. ; De Guise S. ; Fry M.M. ; Guillette L.J. ; Lamb S. ; Lane, S.M. ; McFee W.E. ; Place N.J. ; Tumlin M.C. ; Ylitalo G.M. ; Zolman E.S. et Rowles T.K. (2014). *Health of common bottlenose dolphins (Tursiops truncatus) in Barataria Bay, Louisiana following the Deepwater horizon oil spill*. Environ. Sci. Technol., Vol. 48 p.p.4209-4211.

Speight James G. (2014). *The Chemistry and Technology of Petroleum*. Fifth Edition, New York, 865p. [En ligne]. Disponible sur : « https://books.google.dz/books?hl=fr&lr=&id=Pp_AAQAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Speight,+J.G.,+The+chemistry+and+technology+of+petroleum2014:+CRC+press.&ots=SqYE2nFS7D&sig=HoKgUeJXaWbzvoxXfUe7xHKtOIk&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false » (Consulté le 24-03-2020).

Santisi, S. ; Cappello, S. ; Catalfamo, M. ; Mancini, G. ; Hassanshahian, M. ; Genovese M. ; Giuliano L. and ; Yakimov MM. (2015). *Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium*. Brazilian Journal of Microbiology., Vol.46, n°2, p.p.377-338.

Selmoun, M ; Benkhebeche, D. (2016). *Contribution à l'étude de la biodégradation des hydrocarbures dans les boues de forage par des bactéries productrices de biosurfactants* [en ligne]. Mémoire de master en microbiologie., Université des Frères Mentouri, Constantine. 66p. Disponible sur : « <https://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/biblio/mmf/2016/60.pdf> » (Consulté le 4-06-2020).

Sunita, J. Varjani. (2017). *Microbial degradation of petroleum hydrocarbons*. Bioresource Technology., Vol. 223, p.p. 277-286. [En ligne]. Disponible sur : « <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852416314432> » (Consulté le 24-03-2020).

Tremblay C ; Bouchard M ; Gagnon F ; Cartier J F ; Bégin P ; Larouche L ; Dionne L (2014). *Les hydrocarbures aromatiques polycycliques : exposition et risques dans la population générale* [En ligne]. Disponible sur : <https://www.inspq.qc.ca/es/node/1137> (consulté le 02-06-2020).

Tayssir K ; Tarek R ; Satinder K B ; Maximiliano C ; Saurabhjyoti S ; Mausam (2017). *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes : A review*. Journal of Environmental Sciences., Vol. 51, p.p. 52-74. [En ligne]. Disponible sur : « <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1001074216306167> » (Consulté le 06-06-2020).

Vieira ,P. A.; Vieira, R. B. ; Cardoso, V. L. (2007). *Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline*. Journal of hazardous materials., Vol. 140, p.p. 52-59. [En ligne]. Disponible sur : « <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304389406006856> » (Consulté le 24-03-2020).

Varjani, S.J., et al., (2015). *Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India*. International Biodeterioration & Biodegradation., Vol 103 .,p.p. 116-124.

Wang, J., Mu, B., (2009). *Identification of a biosurfactant producing strain: Bacillus subtilis HOB2*. Protein and peptide letters., Vol 16., p.p. 7-13.

Yakimov, M.M. ; Timmis, K ; Golyshin, N. (2007). *Obligate oil-degrading marine bacteria*. Current opinion in biotechnology., Vol.18, N°3, p.p. 257-266.

Zhang, Z., et al., (2011). *Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated Pseudomonas aeruginosa DQ8*. Bioresource Technology., Vol 102.,p.p. 4111-4116.

Zenati B. (2018). *Etude de la biodégradation des hydrocarbures pétroliers par des bactéries marines : application en traitement des eaux de mer contaminées par le pétrole*. Thèse de doctorat en Chimie Industrielle, Université de Saad Dahleb, Blida.