République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الأخوة منتوري قسنطينة1
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de Microbiologie

قسم علم الأحياء الدقيقة

N° d'ordre : 52/DS/2023
N° de série : 01/MB/2023

THÈSE

Présentée par : **GUERGOURI Derrouiche Ibtissem**

En vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

OPTION : Écologie Microbienne

Intitulée :

Étude comparative de la diversité bactérienne, de la production de biosurfactants et de la caractérisation des sols pollués par le pétrole brut dans les zones littorales et sahariennes d'Algérie.

Soutenue le : 12/10/2023

Devant le jury composé de

Président	Pr. HAMIDECHI M. Abdelhafid	UFMC1, Constantine
Directeur de thèse	Pr. BENHIZIA Yacine	UFMC1, Constantine
Examinateurs	Pr. KITOUNI Mahmoud	UFMC1, Constantine
	Pr. CHERIF ep. SILINI Hafsa	Université Ferhat Abbas Sétif 1
	Pr. SILINI Allaoua	Université Ferhat Abbas Sétif 1
	Dr. TORCHE Esma	Université 8 mai 1945 Guelma
Invité	Pr. BENGUEDOUAR Ammar	UFMC1, Constantine

Année universitaire 2022/2023

بسم الله الرحمن الرحيم

Remerciements

الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي بِنِعْمَتِهِ تَتِمُّ الصَّالِحَاتُ

D'abord je voudrais remercier mon directeur de thèse, le Pr. BENHIZIA Yacine, pour son soutien indéfectible, pour ses conseils et encouragements, pour son dévouement et sa patience tout au long de ce parcours stimulant et enrichissant. Vos engagements envers mon travail ont été vraiment inestimables. Je vous suis reconnaissante de m'avoir donné l'occasion de travailler avec vous.

J'aimerais également remercier les membres du jury, Mr. HAMIDECHI Mohamed Abdelhafid et Mr. KITOUNI Mahmoud, Professeurs à l'université des Frères Mentouri Constantine 1, pour leur temps, leur expertise, leurs commentaires et leur aide précieuse. C'est toujours un plaisir pour moi d'apprendre à vos côtés.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à Mr. SILINI Allaoua et Mme. SILINI CHERIF Hafsa, Professeurs à l'université Ferhat Abbas Sétif 1, ainsi qu'au Dr. TORCHE Esma, MCA à l'université 8 mai 1945 Guelma, pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail et pour avoir consacré votre précieux temps et vous être déplacés afin d'apporter une valeur ajoutée à ma recherche.

Mes vifs remerciements vont également aux Professeurs Mr. BENGUEDOUAR Ammar et Mme. SATTA Dalila, qui n'ont jamais cessé de m'encourager d'aller de l'avant tout au long de ma thèse. Leur soutien constant, ainsi que leur croyance en mes capacités m'ont donné la motivation nécessaire pour persévérer malgré les défis rencontrés.
Votre présence le jour de ma soutenance sera un immense honneur pour moi.

Je voudrais également remercier le Pr LERCHE Thomas et Mme. PANDO Anne de l'IEES-Paris, pour l'accueil et l'assistance tout au long de mon stage à l'IRD.

De tous cœur, j'aimerais remercier mes Professeurs, mes collègues, mes étudiants et tout le personnel du département de la Microbiologie sans exception, qui ont été là pour moi au cours de ce parcours fastidieux. Vos encouragements, vos discussions et votre soutien ont été grandement appréciés. Votre présence a rendu cette expérience plus agréable et enrichissante. Un grand merci à Ouided ABDELAZIZ, pour son encouragement et ses paroles motivantes dans les moments les plus difficiles.
Merci à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin et Hommage aussi à ceux qui nous ont quitté si tôt…

Je dédie cette thèse à

Ma mère

A la mémoire de mon père

Mon mari et mes enfants

Mes frères et beaux frères

Ma sœur et belles sœurs

Mes neveux et nièces

Ma belle-famille

Ma grande famille

Toutes mes chères amies

A ces êtres minuscules qui méritent tout le respect…

…mes jolies bactéries

A moi-même

Ibtissem

RESUME

Les hydrocarbures aromatiques libérés dans les sols des parcs industriels suite à des déversements accidentels de pétrole brut ou ses dérivés constituent des substances toxiques, hydrophobes, ayant tendance à se séquestrer dans la matrice du sol, ce qui les rend persistants et difficiles à éliminer par les microorganismes. Les molécules les plus légères, sont cependant plus réactives et mobiles, capables de rejoindre différents compartiments de l'écosystème, ce qui constitue un risque accru sur la santé humaine et environnementale. En réponse à cette situation, certaines bactéries produisent des biomolécules qui agissent sur les hydrocarbures et entrainent une augmentation de leur solubilité et disponibilité pour la biodégradation, ce sont les biosurfactants (Bs) et les bioémulsifiants (Be). Cette thèse a pour objectif d'explorer la diversité des bactéries telluriques de sols des parcs industriels pollués aux hydrocarbures, en mettant l'accent sur deux environnements distincts : une zone littorale (la raffinerie de Skikda) et une zone saharienne (le champ pétrolier Rhourde el baguel à Ouargla). Notre recherche se concentre sur les bactéries aérobies cultivables, impliquées dans la dégradation des hydrocarbures par production des Bs/Be. L'analyse physicochimique a permis de mettre en évidence des variations dans la texture, le pH, la capacité de rétention d'eau et la matière organique d'un sol à l'autre. La spectrophotométrie-UV a révélée des teneurs élevées en hydrocarbures aromatiques mono et polycycliques atteignant les 7117,83 mg/Kg de sol sec. 94 bactéries ont été isolées sur milieu de culture contenant le pétrole brut comme unique source de carbone et d'énergie. 34 isolats de la zone littorale (S) et 31 de la zone saharienne (R), répartis sur 14 phénogroupes à Gram positif et 10 phénogroupes à Gram négatif, ont donné des réponses positives aux tests d'émulsification du kérosène et de déplacement d'huile, témoignant de la présence de Bs/Be dans la culture bactérienne. Une sélection a porté sur 20 bactéries comme étant les meilleures productrices de Bs/Be représentant leur phénogroupes, en se référant aux valeurs de l'indice d'émulsification E_{24} (3,53-62,42 %) et le diamètre de déplacement d'huile (0,49-4,20 cm). Le séquençage de l'ADNr 16S a conduit à leur attribution aux genres suivants avec leurs abondances relatives respectives : *Bacillus* (40.63%), *Kocuria* (7,81%), *Priestia* (6,25%), *Staphylococcus* (1,56%) et *Streptomyces* sp. (1,56%) pour les bactéries à Gram positif, et *Pseudomonas* (23,44%), *Stutzerimonas* (6,25%), *Pseudescherichia* (6,25%), *Serratia* (1,56%), *Psychrobacter* (1,56%), *Enterobacter* (1,56%) et *Kosakonia* sp. (1,56%) pour les bactéries à Gram négatif. L'analyse statistique par le billet de plusieurs tests a permis de confirmer l'effet combiné d'un ensemble de facteurs comme l'âge de la pollution, la composition du polluant, les conditions climatiques et édaphiques, sur la flore bactérienne qui dégrade les hydrocarbures que ça soit en zone littorale ou en zone saharienne.

Mots-clés : diversité bactérienne, sols pollués, hydrocarbures aromatiques, zone littoral, zone saharienne, biodégradation, biosurfactants, bioémulsifiants.

ABSTRACT

Aromatic hydrocarbons released in the soils of industrial parks as a result of accidental spills of crude oil or its derivatives are toxic, hydrophobic substances that tend to sequester in the soil matrix, which makes them persistent and difficult to eliminate by microorganisms. The lighter molecules, however, are more reactive and mobile, able to reach different compartments of the ecosystem, what constitutes an increased risk to human and environmental health. In response to this situation, some bacteria produce biomolecules that act on hydrocarbons and increase their solubility and availability for biodegradation, namely biosurfactants (Bs) and bioemulsifiers (Be). The aim of this thesis is to explore the diversity of soil bacteria from oil-polluted soils from industrial parks, focusing on two distinct environments: a coastal zone (the Skikda refinery) and a Saharan zone (the oil field Rhourde El baguel in Ouargla). Our research focuses on cultivable aerobic bacteria, involved in the degradation of hydrocarbons by production of Bs/Be. The physicochemical analysis revealed variations in texture, pH, water retention capacity and organic matter from one soil to another. UV spectrophotometry revealed high levels of mono- and polycyclic aromatic hydrocarbons reaching 7117.83 mg/kg dry soil. 94 bacteria were isolated on culture medium containing crude oil as the sole source of carbon and energy. 34 isolates from coastal zone (S) and 31 isolates Saharan from zone (R) spread over 14 Gram-positive and 10 Gram-negative phenogroups gave positive responses to kerosene emulsification and oil displacement tests, indicating the presence of Bs/Be in the bacterial culture. A selection was made of 20 bacteria as the best producers of Bs/Be representing their phenogroups, using the E_{24} emulsification index values (3.53-62.42%) and oil displacement diameter (0.49-4.20 cm). 16S rDNA sequencing led to their attribution to the following genera with their respective relative abundances: *Bacillus* (40.63%), *Kocuria* (7.81%), *Priestia* (6.25%), *Staphylococcus* (1.56%) and *Streptomyces* sp. (1.56%) for Gram-positive bacteria, and *Pseudomonas* (23.44%), *Stutzerimonas* (6.25%), *Pseudescherichia* (6.25%), *Serratia* (1.56%), *Psychrobacter* (1.56%), *Enterobacter* (1.56%) and *Kosakonia* sp. (1.56%) for Gram-negative bacteria. The statistical analysis by several tests confirmed the combined effect of a set of factors such as the age of pollution, the composition of the pollutant, climatic and edaphic conditions, on the bacterial flora that degrades hydrocarbons, whether in the coastal zone or in the Saharan zone.

Keywords: bacterial diversity, polluted soils, aromatic hydrocarbons, coastal zone, Saharan zone, biodegradation, biosurfactants, bioemulsifiers.

ملخص

الهيدروكربونات العطرية المنبعثة في تربة المجمعات الصناعية نتيجة للانسكابات العرضية للنفط الخام أو مشتقاته هي مواد سامة وكارهة للماء تميل إلى الاحتجاز في مصفوفة التربة، مما يجعلها ثابتة ويصعب القضاء عليها بواسطة الكائنات الحية الدقيقة. ومع ذلك، فإن الجزيئات الأخف وزنا أكثر تفاعلية وتنقلًا، وقادرة على الوصول إلى أجزاء مختلفة من النظام البيئي، مما يشكل خطرًا متزايدًا على صحة الإنسان والبيئة. استجابة لهذه الحالة، تنتج بعض البكتيريا جزيئات حيوية فعالة على الهيدروكربونات وتزيد من قابليتها للذوبان وتوافرها للتحلل البيولوجي، وهي المواد الخافضة للتوتر السطحي (Bs) والمستحلبات الحيوية .(Be) الهدف من هذه الأطروحة هو استكشاف تنوع بكتيريا تربة المجمعات الصناعية الملوثة بالنفط، مع التركيز على بيئتين متميزتين: منطقة ساحلية (مصفاة سكيكدة) ومنطقة صحراوية (حقل النفط رورد الباغيل في ورقلة). يركز بحثنا على البكتيريا الهوائية القابلة للزراعة، والتي تشارك في تحلل الهيدروكربونات عن طريق إنتاج Bs/Be. كشف التحليل الفيزيوكيميائي عن اختلافات في قوام التربة، والأس الهيدروجيني، قدرة الاحتفاظ بالمياه والمواد العضوية من تربة إلى أخرى. كشف القياس الطيفي للأشعة فوق البنفسجية عن مستويات عالية من الهيدروكربونات العطرية أحادية ومتعددة الحلقات تصل إلى 7117.83 ملغ/كغ من التربة الجافة. تم عزل 94 بكتيريا في وسط زراعي يحتوي على النفط الخام كمصدر وحيد للكربون والطاقة. 34 عزلة من المنطقة الساحلية (S)و31 عزلة من المنطقة الصحراوية (R) تنتمي إلى 14 نمط ظاهري إيجابي الجرام و10 أنماط ظاهرية سلبية الجرام أعطت استجابات إيجابية لاختبارات استحلاب الكيروسين وإزاحة الزيت، مما يشهد على وجود Bs/Be في المزرعة البكتيرية .تم اختيار 20 بكتيريا كأفضل منتجات لل Bs/Be يمثلن أنماطهن الظاهرية، باستخدام قيم مؤشر الاستحلابE_{24} (3.53-62.42٪) وقطر إزاحة الزيت (0.49-4.20 سم). أدى تحليل تسلسل أحماضها النووية S16rDNA إلى نسبتها إلى الأجناس التالية مع الوفرة النسبية لكل منها على النحو التالي: *Bacillus* (40.63٪)، *Kocuria* (7.81٪) ، *Priestia*(6.25٪) ، *Staphylococcus* (1.56٪) و *Streptomyces* sp. (1.56٪)، للبكتيريا موجبة الغرام و*Pseudomonas* (23,44%) ، *Stutzerimonas* (6,25%) *Pseudescherichia*، *Serratia* (1,56%)، *Psychrobacter* (1,56%) ، *Enterobacter* (% 1,56) و*Kosakonia* sp. (1,56%) للبكتيريا سالبة الغرام. وقد أكد التحليل الإحصائي عبر عدة اختبارات التأثير المشترك لمجموعة من العوامل مثل عمر التلوث، وتكوين الملوثات، الظروف المناخية والعوامل البيئية الأرضية، على التجمعات البكتيرية التي تحلل الهيدروكربونات، سواء في المنطقة الساحلية أو في المنطقة الصحراوية.

الكلمات المفتاحية: التنوع البكتيري، التربة الملوثة، الهيدروكربونات العطرية، المنطقة الساحلية، المنطقة الصحراوية، التحلل البيولوجي، المواد الخافضة للتوتر السطحي، المستحلبات الحيوية.

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Comportement des hydrocarbures suite à un déversement du pétrole sur le sol.	Page 7
Figure 2	Voies et vecteurs d'exposition humaine aux hydrocarbures dans le sol.	Page 12
Figure 3	Arbre phylogénétique inférée par la méthode Neighbour-Joining, représentant les phylums qui comportent des espèces dégradant les hydrocarbures (appart le phylum *Proteobacteria*). La présence de cette capacité est montrée par le caractère gras et les gouttelettes d'huile pour les taxons ordres (Prince et *al*., 2019)	Page 17
Figure 4	Arbre phylogénétique inférée par la méthode Neighbour-Joining, représentant le phylum *Proteobacteria* comportent des espèces dégradant les hydrocarbures. La présence de cette capacité est montrée par le caractère gras et les gouttelettes d'huile pour les taxons ordres (Prince et *al*., 2019).	Page 18
Figure 5	Groupes fonctionnels de bactéries telluriques intervenant dans la dégradation des hydrocarbures	Page 20
Figure 6	Interactions entre hydrocarbures déversés, composantes du sol et bactéries telluriques.	Page 26
Figure 7	Structures cellulaires communes responsables d'adhésion bactérienne aux HA.	Page 28
Figure 8	Stratégies bactériennes impliquées dans l'accession aux HA dans le sol.	Page 29
Figure 9	Détoxification des HA par la monooxygénase bactérienne (adapté de Cerniglia, 1993; Das & Chandran, 2011).	Page 31
Figure 10	Etapes de la dégradation aérobie des hydrocarbures aromatiques (adapté de (Cerniglia, 1993; Pandolfo et *al*., 2023)	Page 32
Figure 11	Etapes de la dégradation anaérobie syntrophique de quelques hydrocarbures aromatiques (adapté de : Andreoni & Gianfreda, 2007; Edwards et *al*., 2021; Fowler et *al*., 2014).	Page 34
Figure 12	Quelques exemples de structure chimique de biosurfactants : Mono-rhamnolipide (a), Di-rhamnolipide (b), Tréhalose-tétraester (c), Glycolipide (d) (adaptée de (Perfumo et *al*., 2010)	Page 42
Figure 13	Quelques exemples de structure chimique de bioémulsifiants : Surfactine (a), Emulsane (b)(adaptée de Perfumo et *al*., 2010).	Page 42
Figure 14	Carte des zones de prélèvement des échantillons de sol pollués dans les wilayas algériennes de Skikda et Ouargla.	Page 50
Figure 15	Spectre d'absorbance d'un extrait de sol après sa déconvolution.	Page 59
Figure 16	Distribution des Ha et des bactéries dans les échantillons de la zone SKIKDA	Page 62
Figure 17	Distribution des Ha et des bactéries dans les échantillons de la zone Rhourde el baguel.	Page 63

Figure 18	Proportion des isolats de la zone (S) produisant les Bs/Be par rapport au nombre total de bactéries et leur répartition selon leur Gram.	Page 69
Figure 19	Proportion des isolats de la zone (R) produisant les Bs/Be par rapport au nombre total de bactéries et leur répartition selon leur Gram.	Page 70
Figure 20	Photographies des observations macroscopiques et microscopiques des différents aspects des bactéries à Gram (+) de la zone (S).	Page 75
Figure 21	Photographies des observations macroscopiques et microscopiques des différents aspects des bactéries à Gram (-) de la zone (S).	Page 76
Figure 22	**P**hotographies des observations macroscopiques et microscopiques des différents aspects des bactéries à Gram (+) de la zone (R).	Page 77
Figure 23	Photographies des observations macroscopiques et microscopiques des différents aspects des bactéries à Gram (-) de la zone (R).	Page 78
Figure 24	Arbres montrant les relations phylogénétiques entre nos séquences d'adnr*16s* des isolats de la zone S (a) et de la zone R (b) et ceux d'espèces apparentées.	Page 89
Figure 25	Abondance des genres bacteriens identifiées dans les échantillons analysés	Page 90
Figure 26	Carte factorielle de l'analyse en composantes principales montrant la variation des paramètres de sol dans les différents échantillons. (a) Le cercle des corrélations indiquant les variables actives, (b) Graphe des observations présentant la distribution des échantillons de sol. Les deux ellipses colorées représentent la zone S (vert) et la zone (R).	Page 100
Figure 27	Cartes factorielles des correspondances multiples entre les genres bactériens et les hydrocarbures aromatiques. (a) carte de la zone S, (b) carte de la zone (R).	Page 103

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Structure et propriétés chimiques des polluants (BETX) et des 16 (HAP) selon l'Agence de protection de l'environnement (EPA) des États-Unis.	Page 4-5
Tableau 2	Concentrations de (HAP) totaux (ng/kg) détectées dans différents échantillons de sol algérien (Mebarka et *al*., 2012)	Page 14
Tableau 3	Classification par l'US-EPA des sols de parcs industriels contaminés en fonction de leur dégrée de contamination par certains hydrocarbures aromatiques (US-EPA, 1996).	Page 15
Tableau 4	Quelques exemples de microorganismes utilisant les hydrocarbures aromatiques appartenant à différents groupes (liste non exhaustive (Haritash and Kaushik 2009; Das and Chandran 2011; Oren 2019).	Page 25
Tableau 5	Quelques exemples d'espèces bactériennes et de leur molécules produites Bs/Be (Pardhi et *al*., 2022)**.**	Page 43
Tableau 6	Codification des échantillons de sol prélevés et analysés	Page 51
Tableau 7	Résultats des analyses chimiques des échantillons de sols provenant des deux zones	Page 58
Tableau 8	Résultats du dosage des hydrocarbures aromatiques dans les échantillons**.**	Page 60
Tableau 9	Résultats du dénombrement bactérien sur milieu solide.	Page 68
Tableau 10	Caractères phénotypiques des bactéries à Gram positif isolées de la zone de Skikda (S).	Page 71-72
Tableau 11	Caractères phénotypiques des bactéries à Gram positif isolées de la zone de Rhourde el baguel (R).	Page 73-74
Tableau 12	Résultats des tests de détection de production de Bs/Be chez les souches bactériennes sélectionnées.	Page 79
Tableau 13	Identité des bactéries isolées de la zone S	Page 87
Tableau 14	Identité des bactéries isolées de la zone R	Page 88
Tableau 15	Résultats de l'analyse de la variance ANOVA entre mesures des trois citernes de la zone S	Page 97
Tableau 16	Résultats des tests post-hoc *Gabriel* et *Dunnett* pour les comparaisons multiples	Page 98
Tableau 17	Résultats des test t de *Student* pour la comparaison de deux moyennes.	Page 98
Tableau 18	Résultats du test de correlation bilatérale de *Spearman* entre les (HA) et le nombre bactérien.	Page 101
Tableau 19	Scores des deux dimensions de l'AFC par rapport aux points colonnes (HA) des deux zones S et R.	Page 102

GLOSSAIRE

Pour bien comprendre le sujet des biosurfactants et bioémulsifiants un certain nombre de termes relatifs doivent être définis. Définitions adaptées de Satpute et *al*., (2010).

Tension superficielle	C'est la force par unité de longueur exercée par un liquide en contact avec un solide ou un autre liquide. Elle peut aussi être considérée comme une mesure de l'énergie libre par unité de surface associée à une surface ou à une interface. L'eau a la valeur TS la plus élevée, soit 72 dyne/cm ou mN/m.
Tension interfaciale	Il s'agit d'une force d'attraction intermoléculaire maintenue entre les molécules d'un liquide. Un liquide ayant une faible TIF est plus facilement émulsifiable.
Émulsion	Il s'agit d'une dispersion colloïdale d'un liquide dans un autre (huile/eau) qui est souvent stabilisée par un surfactant. Les émulsions ne sont pas vraiment stables mais peuvent être métastables.
Microémulsion	La dispersion colloïdale d'une gouttelette de liquide dans un autre liquide (huile/eau) sous forme microscopique conduit à la formation d'une microémulsion. Elle est stabilisée par des tensioactifs, la taille des gouttelettes étant de l'ordre de 10 à 100 nm de diamètre.
Surfactant	Ce sont des molécules amphiphiles (hydrophiles et hydrophobes), classées en fonction de leur structure moléculaire comme non ioniques, anioniques, cationiques ou amphotères. Elles ont une activité de surface c'est-à-dire qu'elles s'adsorbent sur les surfaces ou les interfaces et modifient l'interaction chimique des liquides à la limite de leur surface.
Émulsifiant	C'est un groupe de molécule qui forment une émulsion de deux liquides non miscibles sans pour autant réduire leur tension de surface, simplement en se liant aux substrats insolubles dans l'eau. Par conséquent, les biosurfactants peuvent avoir une activité de réduction de tension et d'émulsification alors qu'un émulsifiant, forme l'émulsion et la stabilise.
Molécule amphiphile	Il s'agit d'une molécule dotée d'une tête hydrophile et une queue hydrophobe qui s'accumule à la surface, aux interfaces et réduit les forces de répulsion entre des phases différentes, ce qui conduit au mélange de phases non miscibles
Concentration micellaire critique	C'est la concentration minimale d'un tensioactif dans une solution à la quelle vont se former des micelles. Chaque agent de surface a sa propre valeur de CMC qui dépend de sa structure chimique. En dessous de la valeur CMC, les molécules de surfactant sont vaguement intégrées dans la structure de l'eau formant un monomère. Mais lorsque la concentration atteint la valeur seuil qui est la CMC, des changements brutaux des propriétés physiques de la TS (solution), de la

	conductivité, de la viscosité, de la densité, de la pression osmotique, de la turbidité et des déplacements chimiques ont lieu. La structure eau-agent de surface s'agrège alors pour former des micelles (forme sphérique/lamellaire).
Micelle	C'est une structure qui se forme lors d'un assemblage spontané de molécules tensioactives amphiphiles, lorsque leur concentration dans le milieu atteint la CMC. Elles sont observées dans un système de dispersion d'huile dans l'eau, ou les groupes hydrophobes seront regroupés à l'intérieur de la micelle vers l'huile alors que les groupes hydrophiles seront orientés à l'extérieur vers l'eau.
Micelle inversée	Ce type de micelle est observé dans le système de solvant non polaire où les groupes de tête hydrophiles d'une molécule de surfactant sont exposés au solvant environnant, ce qui est énergétiquement défavorable et donne lieu à un système d'eau dans l'huile. Dans ces conditions, les groupes hydrophiles sont séquestrés dans le cœur de la micelle et les groupes hydrophobes dépassent du centre

.

.

LISTE DES ABREVIATIONS

ACEc3 : Acénaphtène
ACYc3 : Acénaphtylène
ANTc3 : Anthracène
BAAc4 : Benzo[a]anthracène
BAPc5 : Benzo[a]pyrène
BBFc5 : Benzo[b]fluoranthène
Be: bioémulsifiants
BKFc5: Benzo[k]fluoranthène
BNZc1: Benzène
Bs: biosurfactants
BTEX: Benzène, Toluène, Ethylbenzène et Xylènes
CMC : Concentration micellaire critique
CRE : capacité rétention d'eau
CRYc4 : Chrysène
DBAc5 : Dibenzo [a, h] anthracène
DDH : diamètre de déplacement d'huile
E_{24} : indice d'émulsification
EG : effondrement de la goutte
FLNc4 : Fluoranthène
FLRc3 : Fluorène
GC : chromatographie gazeuse
GHIc6 : Benzo [g, h, i] perylène
HC : hydrocabrures
Ha : hypothèse alternative
H0 : hypothèse nulle
HA : hydrocarbure aromatique
HAM : hydrocarbure aromatique monocyclique
HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique
HPLC : chromatographie liquide à haute performance
HS : hémolyse du sang
IDPc6 : Indéno[1,2,3-cd] pyrène
MO : matière organique
MS : spectrométrie de masse
NAPc2 : Naphthalène
PHNc3 : Phénanthrène
PYRc4 : Pyrène
TS : Tension superficielle
TIF : Tension interfaciale
Dyne/cm : dynes par centimètre
mN/m : millinewtons par mètre

TABLE DES MATIERES

RESUME……I
ABSTACT……II
ملخص……III
LISTE DES FIGURES……IV -V
LISTE DES TABLEAUX……VI
GLOSSAIRE……VII-VIII
LISTES DES ABREVIATIONS……IX
TABLE DES MATIERES……X-XII

INTRODUCTION……1

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. POLLUTION DES SOLS AUX HYDROCARBURES AROMATIQUES 3
1.1 NATURE CHIMIQUE DES POLLUANTS 3
1.1.1 Pétrole brut et hydrocarbures pétroliers *3*
1.1.2 Hydrocarbures aromatiques *3*
1.2 ORIGINE DES HA DANS LE SOL 6
1.2.1 Pollution naturelle *6*
1.2.2 Pollution anthropogénique *6*
1.3 DEVENIR DES HA DANS LES SOLS 6
1.3.1 Evaporation, photooxydation et volatilisation *7*
1.3.2 Dispersion et diffusion *7*
1.3.3 Sorption et désorption *8*
1.3.4 Lessivage et dissolution *8*
1.3.5 Biodégradation *9*
1.4 IMPACTS DE LA POLLUTION DES SOLS AUX (HA) 9
1.4.1 Alteration du fonctionnement du sol *9*
1.4.2 Contamination des nappes phréatiques *10*
1.4.3 Accélération du réchauffement climatique *10*
1.4.4 Perte de la biodiversité *10*
1.4.5 Déséquilibre de la communauté microbienne *11*
1.4.6 Impact sanitaire *11*
1.5 TECHNIQUES D'ANALYSE QUANTITATIVE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES DANS LE SOL 12
1.5.1 Prélèvement des échantillons *12*
1.5.2 Prétraitement des échantillons *13*
1.5.3 Extraction des hydrocarbures *13*
1.5.4 Analyse chimique des extraits *13*
1.5.5 Interprétation des spectres UV *14*

2. DIVERSITE BACTERIENNE DES SITES POLLUES AUX HYDROCARBURES AROMATIQUES 16
2.1 DIVERSITE TAXONOMIQUE DES BACTERIES DEGRADANT LES (HA) 16
2.2 DIVERSITE FONCTIONNELLE DES BACTERIES DEGRADANT LES (HA) 18
2.2.1 Bactéries oxydantes *19*
2.2.2 Bactéries dénitrifiantes *19*
2.2.3 Bactéries de la fermentation *19*
2.2.4 Bactéries réductrices de sulfate *21*
2.2.5 Les méthanogènes *21*
2.2.6 Bactéries réductrices de fer tertiaire *21*
2.3 MECANISMES D'ADAPTATION BACTERIENNE A LA PRESENCE DES (HA) DANS LE SOL 21
2.3.1 Stratégie r/K *22*
2.3.2 Cas particulier des zones arides *22*

3. DEGRADATION BACTERIENNE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES ET PRODUCTION DE BIOSURFACTANTS 24
3.1 MICROORGANISMES, PRINCIPAUX ACTEURS DE LA BIODEGRADATION 24

3.2 DEGRADATION BACTERIENNE DES (HA) 24
3.2.1 Stratégies d'accession bactérienne aux (HA) *25*
3.2.2 Transport transmembranaire *30*
3.2.3 Mécanismes de dégradation bactérienne et voies métaboliques impliquées *30*
3.3 FACTEURS INFLUENÇANT LA DEGRADATION LES HYDROCARBURES AROMATIQUES 34
3.3.1 Influence de la structure, la diversité des populations bactériennes et leurs interactions *34*
3.3.2 Influence du potentiel génétique des bactéries *35*
3.3.3 Influence des facteurs physicochimiques du milieu *37*
3.3.4 Influence des propriétés de l'hydrocarbure *39*
3.4 EXPLOITATION DU POUVOIR DEGRADATIF DES BACTERIES DANS LA BIOREMEDIATION DES SOLS 40

4. BIOSURFACTANTS/BIOEMULSIFIANTS BACTERIENS : DES MOLECULES HAUTEMENT DYNAMIQUES CONTRIBUANT A LA BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES AROMATIQUES 41

4.1 NATURE CHIMIQUE ET PROPRIETES DE SURFACE 41
4.2 CLASSIFICATION DES BS/BE QUELQUES BACTERIES PRODUCTRICES 41
4.3 ROLES NATURELS DES BS/BE 43
4.4 PARTICIPATION DES BS/BE BACTERIENS DANS LA DEGRADATION DES (HA) 44
4.5 PRODUCTION DES BS/BE BACTERIENS ET *QUORUM-SENSING* 45
4.6 TECHNIQUES D'ETUDE DES BACTERIES PRODUCTRICES DES BS/BE 45
4.6.1 Approche conventionnelle *45*
4.6.2 Approche moléculaire et métagénomique *46*

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

PREFACE 47
1. ECHANTILLONNAGE 48

1.1 PRESENTATION DES ZONES ETUDIES 48
1.1.1 Raffinerie de Skikda (RA1K) *48*
1.1.2 Champs pétrolier Rhourde el baguel (REB) *48*
1.2 STRATEGIE DE L'ECHANTILLONNAGE 49

2. CARACTERISATION DES SOLS ET DE LA POLLUTION 52

2.1 PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES SOLS 52
2.2 ANALYSE DE LA TENEUR EN HYDROCARBURES AROMATIQUES DES SOLS 52
2.2.1 Extraction des (HA) *52*
2.2.2 Spectrophotométrie UV *52*

3. ANALYSES MICROBIOLOGIQUES DES SOLS POLLUEES 53

3.1 DENOMBREMENT ET ISOLEMENT DES SOUCHES BACTERIENNES DEGRADANT LE PETROLE BRUT 53
3.2 CRIBLAGE DES SOUCHES PRODUISANT DES BIOSURFACTANTS/ BIOEMULSIFIANTS 53
3.2.1 Indice d'émulsification (E_{24}) *54*
3.2.2 Test de déplacement d'huile *54*
3.2.3 Test de l'effondrement de la goutte *54*
3.2.4 Hémolyse de sang *54*
3.3 CARACTERISATION PHENOTYPIQUE 54
3.4 SEQUENÇAGE DE L'ADNR *16S* 55
3.4.1 PCR sur colonies d'isolats bactériens *55*
3.4.2 Migration électrophorétique des amplicons sur gel d'agarose 1% *55*
3.4.3 Analyse des séquences et traitement des données *55*

4. ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES 56

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

1. CARACTERISATION DE LA POLLUTION AUX HYDROCARBURES AROMATIQUES DES SOLS DE PARCS INDUSTRIELS 57

1.1 PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DES SOLS POLLUES 57
1.1.1 Granulométrie *57*

1.1.2 Potentiel hydrogène ... *57*
1.1.3 Capacite rétention d'eau ... *57*
1.1.4 Matière organique du sol ... *57*
1.2 TENEURS DES SOLS EN HYDROCABRURES AROMATIQUES ... 58
1.3 DISCUSSION ... 65

2. BACTERIES HYDROCARBONOCLASTES ET PRODUCTRICES DE BIOSURFACTANTS/BIOEMULSIFIANTS ISOLEES DES SOLS DE LA RAFFINERIE DE SKIKDA ET DU CHAMPS PETROLIER RHOURDE EL BAGUEL ... 69

2.1 DENOMBREMENT SUR GELOSE DE LA FLORE AEROBIE MESOPHILE DEGRADANT LE PETROLE ... 68
2.2 CARACTERISATION DES BACTERIES PRODUCTRICES DE BS/BE ... 69
2.3 ACTIVITE DE SURFACE ET ACTIVITE D'EMULSIFICATION CHEZ LES SOUCHES SELECTIONNEES ... 79
2.3.1 Chez les bactéries à Gram négatif ... *79*
2.3.2 Chez les bactéries à Gram positif ... *80*
2.4 DISCUSSION ... 82

3. IDENTIFICATION MOLECULAIRE DES SOUCHES SELECTIONNEES ... 86

3.1 IDENTIFICATION MOLECULAIRE DES SOUCHES SELECTIONNEES ... 86
3.2 RECONSTRUCTION DES ARBRES PHYLOGENETIQUES ... 86
3.3 DISCUSSION ... 90

4. ETUDE STATISTIQUE COMPARATIVE DES DONNEES COLLECTEES DES DEUX ZONES POLLUEES ... 96

4.1 ANALYSE DE L'EFFETS 'DISTANCE', 'SITE' ET 'ZONE' SUR LA VARIABILITE DES DONNEES ... 96
4.2 ANALYSE DES COMPOSANTES PRINCIPALES (ACP) ... 99
4.3 CORRELATION ENTRE LES VARIABLES ET LE NOMBRE BACTERIEN ... 101
4.4 ANALYSE FACTORIELLE DES CORRESPONDANCES (AFC) ... 101
4.5 DISCUSSION ... 104

CONCLUSION ... 107

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ... 112

ANNEXES

INTRODUCTION

L'Algérie prédomine dans le secteur des énergies fossiles dû à ses ressources en pétrole et gaz qui continuent à être découvertes à nos jours. L'activité pétrochimique constitue une principale source de revenus pour le pays, mais elle est néanmoins une cause principale de la dégradation des écosystèmes environnementaux avec des répercussions sur la qualité de vie des espèces sensibles.

Chaque année, des milliers de tonnes de pétrole et de ces dérivés sont produits à travers les parcs pétrochimiques (champs pétroliers et les raffineries) Les opérations effectuées dans ces parcs sont associées à des risques de déversement et peuvent entraîner le rejet incontrôlé des hydrocarbures par les machines de forage, l'usine de raffinage, les oléoducs, les barges et les pétroliers, ainsi que les structures de stockage (Iskander et *al*., 2020). La situation peut être aggravée par les pratiques d'exploration anarchiques, la mauvaise gestion des déchets (Adeola et *al*., 2021) et le manque d'entretien des installations vieillissantes, ce qui rend le problème des fuites d'huile assez régulier (Jernelöv, 2017).

Les produits pétroliers sont des mélanges organiques complexes, généralement composés de centaines d'hydrocarbures, dont certains sont hautement toxiques, cancérigènes et mutagènes, même à des concentrations relativement faibles. C'est le cas notamment des hydrocarbures aromatiques dont 16 sont reconnus par l'US-EPA (*United States Environmental Protection Agency*) comme étant les polluants les plus dangereux. Plus ils incorporent d'anneaux de benzène dans leur structure, moins ils deviennent solubles et volatils, et auront tendance à se lier aux particules du sol et aux sédiments (Mebarka et *al*., 2012).

En effet, le sol est un milieu d'accueil qui concentre les éléments en les accumulant dans sa matrice et l'attachement de substances nocives à ses particules minérales et organiques va altérer son potentiel d'autorégulation. Ainsi, ils sont stockés et seront moins disponibles et persisteront pendant des décennies (Minigazimov et *al*., 2021). Leur interaction avec les cellules microbiennes devient alors limitée, car ces dernières préfèrent la matière dissoute (Perfumo et *al*. 2010).

Cependant, on sait que la plupart de ces substances hydrophobes insolubles, des plus légères aux plus lourdes sont dégradées par des microorganismes spécialisés en particulier des bactéries (Popoola & Yusuff, 2021). Ceci est lié aux capacités métaboliques qui leur permettent de résister à ce genre de conditions stressantes et d'utiliser les polluants pour obtenir de l'énergie nécessaire à leur croissance et les incorporer dans la biomasse cellulaire (Varjani, 2017; Yakimov et *al*., 2007).

Ces espèces dégradantes dominent rapidement au sein de la communauté microbienne autochtone (Kapellos, 2017) en raison de leur capacité à réduire l'hydrophobicité des hydrocarbures mais aussi sous l'influence de la structure de cette communauté (Evans et *al*., 2004), des conditions locales comme la pluviométrie (Lemière et *al*., 2001), la température (Liu et *al*., 2017) ainsi que les propriétés du milieu récepteur.

La minéralisation des polluants peut être assurée par différents genres et espèces bactériens en consortium (Ghazali et *al*., 2004). Les produits d'une réaction métabolique catalysée par des enzymes spécialisées (Pi et *al*., 2015) constituent les substrats d'une autre (Varjani, 2017).

Plusieurs mécanismes permettent l'accession des cellules bactériennes aux substrats hydrophobes (Abbasnezhad et *al*., 2011). Beaucoup d'entre elles peuvent modifier leurs propriétés de surface cellulaire pour adhérer à la phase huileuse (Krasowska & Sigler, 2014) ou à des gouttelettes d'hydrocarbures dissoutes (Karlapudi et *al*., 2018). Pour d'autres bactéries, en particulier ceux qui produisent des composés tensioactifs et des émulsifiants (Abbasnezhad et *al*., 2011) l'adhésion cellulaire, n'est pas toujours utile. Ces molécules liées aux cellules ou libérées dans la phase aqueuse (Kapellos, 2017) permettent de former une pseudo-solubilisation des hydrocarbures (Uzoigwe et *al*., 2015) facilitant ainsi leur transfert au cytoplasme pour la dégradation (Khanafer et *al*., 2017).

Dans cet esprit, l'objective de cette recherche est d'isoler et d'identifier des souches bactériennes, capables de dégrader les hydrocarbures en produisant des agents tensioactifs ou émulsifiants. Deux zones polluées ont fait l'objet d'investigation, l'une se situe dans la raffinerie de la wilaya de Skikda au Nord-Est de l'Algérie et l'autre au niveau du champs pétrolier de Rhourde el Baguel près de Hassi Messaoud dans la wilaya de Ouargla.

L'étude des bactéries habitant des sols soumis à une pollution chronique aux hydrocarbures et la compréhension des mécanismes de résistance et de dégradation qu'ils développent sont d'une grande importance puisque ça aidera à choisir les meilleurs agents de bioremédiation et une machinerie à biomolécules actives.

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. POLLUTION DES SOLS AUX HYDROCARBURES AROMATIQUES

1. POLLUTION DES SOLS AUX HYDROCARBURES AROMATIQUES

1.1 Nature chimique des polluants

1.1.1 Pétrole brut et hydrocarbures pétroliers

Le pétrole brut est un mélange complexe d'hydrocarbures pétroliers, en plus de petites quantités de composés organiques non hydrocarbonés (résines et asphaltènes) contenant du soufre, de l'oxygène et de l'azote, des sels, ainsi que des constituants métalliques, en particulier le nickel, le fer et le cuivre (Speight, 2006). Il s'est formé il y'a des millions d'années par décomposition d'organismes aquatiques ou terrestres sous des conditions particulières de température et de pression élevées.

Selon Iskander et *al*. (2020), les hydrocarbures sont des composés formés de carbone et d'hydrogène. Ils peuvent constituer de 50% à 97 % du poids total du pétrole. Ils sont classés en deux catégories : les saturées et les aromatiques.

Les hydrocarbures saturés représentent environ 60 % de la plupart des pétroles bruts reparties sur trois types : les alcanes (linéaires), les cycloalcanes (circulaires) et les alcanes ramifiés.

Les hydrocarbures aromatiques quant à eux, représentent généralement environ 30 % de la masse du pétrole brut et peuvent être classés en deux catégories ; les hydrocarbures monoaromatiques et les hydrocarbures aromatiques polycycliques.

Les résines et les asphaltènes qui sont considérés non hydrocarbonés, constituent environ 10 % seulement du poids du pétrole.

1.1.2 Hydrocarbures aromatiques

Il s'agit d'une classe de composés organiques qui contient au moins un cycle formé d'atomes de carbone liés entre eux par des liaisons simples et doubles alternées, connu sous le nom de cycle ou noyau aromatique ou benzénique. Ce cycle confère aux molécules une stabilité exceptionnelle et une réactivité qui l'implique dans diverses réactions chimiques (Smith & March, 2007) .

L'Agence de protection de l'environnement aux États-Unis (US-EPA, 1996) et l'Union européenne ont identifié certains hydrocarbures aromatiques parmi les HAM comportant un seul noyau ainsi que les (HAP) ayant plusieurs cycles aromatiques liés comme étant des polluants environnementaux et des substances dangereuses en raison de leur toxicité pour la santé humaine et l'environnement.

Tableau 1. Structure et propriétés chimiques des polluants (BETX) et des 16 (HAP) selon l'Agence de protection de l'environnement (EPA) des États-Unis.

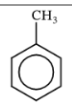
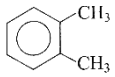
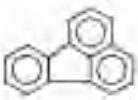
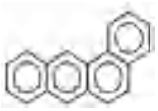
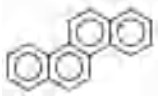
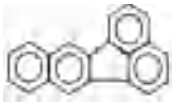
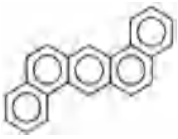
Nom IUPAC	Nombre de cycles	Structure		Masse molaire (g/mol)	Point de fusion (°C)	Point d'ébullition (°C)
Benzène	1	C6H6		78.11	/	80,1
Toluène	1	C7H8		92.14	/	110,6
Xylène	1	C8H10		106.17	/	138-144
Éthylbenzène	1	C8H10		106.17	/	136
Naphtalène	2	C10H8		128.17	80-82	218
Acénaphtène	2+1	C12H10		154.21	93-94	280-281
Acénaphtylène	2+1	C12H8		152.20	80-81	342-344
Fluorène	2+1	C13H10		166,22	114-116	295
Anthracène	3	C14H10		178.23	216-218	340-341
Phénanthrène	3	C14H10		178.23	100-102	340-343
Fluoranthène	3+1	C16H10		202.25	110-112	385-387

Tableau 1. (Suite) Structure et propriétés chimiques des polluants (BETX) et des 16 (HAP) selon l'Agence de protection de l'environnement (EPA) des États-Unis.

Nom IUPAC	Nombre de cycles	Structure		Masse molaire (g/mol)	Point de fusion (°C)	Point d'ébullition (°C)
Pyrène	4	C16H10		202.25	145-147	404-405
Benzo[a]anthracène	4	C18H12		228.29	182-184	480-482
Chrysène	4	C18H12		228.29	250-252	449-450
Benzo[b]fluoranthène	4+1	C20H12		252.32	105-107	515-517
Benzo[k]fluoranthène	4+1	C20H12		252.32	170-172	537-539
Benzo[a]pyrène	5	C20H12		252.32	179-181	495-498
Dibenzo[a,h]anthracène	5	C22H14		278.36	284-285	588-590
Indéno[1,2,3-cd]pyrène	5+1	C22H12		276.34	174-175	525-526
Benzo[ghi]pérylène	6	C22H12		276.34	280-282	590-593

C'est notamment le cas du groupe d'hydrocarbures monoaromatiques désigné par l'acronyme (BETX) constitué de benzène, éthylbenzène, toluène et xylène, qui constituent des polluants de l'air en raison de leur volatilité, mais qui peuvent aussi se trouver dans le sol à de fortes concentrations suite aux accidents de déversement de pétrole. Seize (HAP) ont été aussi identifiés par la même agence comme des polluants prioritaires persistants dans l'environnement. Le tableau ci-dessus (Tableau 1**)** récapitule les principales propriétés et structures de ces polluants.

1.2 Origine des HA dans le sol

La pollution des sols est un phénomène qui s'explique par la présence excessive de produits chimiques ou énergétiques à des taux dépassant la tolerance des organismes vivants dont l'origine est soit naturelle ou anthropogénique (Freedman, 2018).

1.2.1 Pollution naturelle

Les (HA) peuvent être présents naturellement dans le sol à la suite de processus géogéniques ou biogéniques. En effet, lorsqu'il y'a une remontée du pétrole brut provenant des gisements souterrains, suite à des catastrophes naturelles comme les tremblements de terre, les conditions météorologiques défavorables et les ouragans (Ndimele et *al*., 2018), il se répand sur terre ou dans les océans causant ainsi un effet dévastateur. Par ailleurs, des (HA) tels que le benzène, le toluène et le xylène peuvent être libérés par combustion incomplète ou pyrolyse de la matière organique dans le sol (Bidaud, 1998).

1.2.2 Pollution anthropogénique

C'est une pollution engendrée par l'activité humaine qui survient lors d'épandage de produits du aux activités industrielles ou urbaines telles que l'exploration de gisements, le remplissage de wagons, le stockage, le transport et la distribution de produits pétroliers, la mauvaise gestion de déchets résultants du nettoyage des réservoirs de stockage ainsi que les fuites entrainées par le vieillissement des installations telles que les pipelines (Hassan Al-Taai, 2021). Cela pourrait être également la conséquence du vandalisme de pipelines ou d'un acte de terrorisme lors des guerres (Prince & Lessard, 2004)

1.3 Devenir des HA dans les sols

Puisque le sol est un milieu complexe multiphasique (gazeux, solide, liquide et peuplé par des organismes vivants), le comportement des hydrocarbures passant à travers les horizons de celui-ci va varier selon plusieurs facteurs (Hu, 2020).

Suite aux déversements des hydrocarbures dans les sols, ils subissent plusieurs processus naturels qui contribuent à leur transformation ou élimination de l'environnement

(figure 1). Ces processus peuvent être de nature physique (dispersion, volatilisation), chimique (photooxydation), physico-chimique (évaporation, dissolution, sorption et désorption) et biologique (phytodégradation et biodégradation microbienne) (Truskewycz et *al*., 2019).

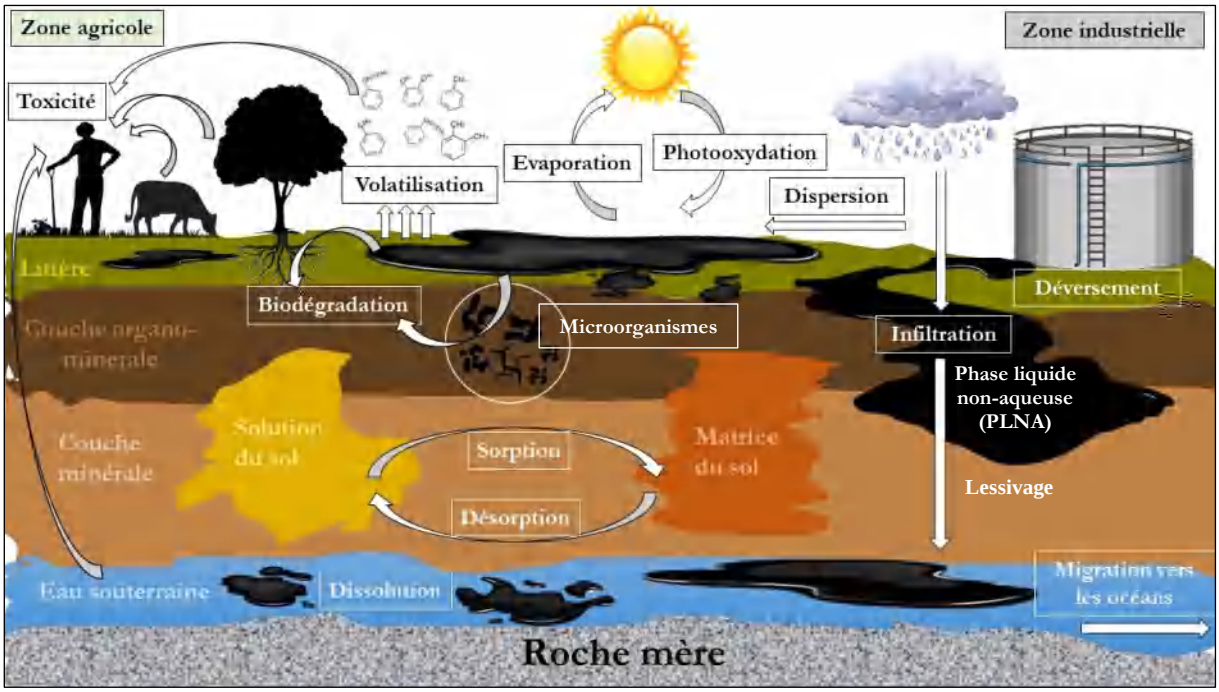


Figure 1. Comportement des hydrocarbures suite à un déversement du pétrole sur le sol.

1.3.1 Evaporation, photooxydation et volatilisation

Dans les horizons supérieurs du sol, 10% à 30% du pétrole (surtout la fraction légère) s'évapore sous chaleur du rayonnement solaire et certains composés aromatiques et asphaltènes subissent une photooxydation par ensoleillement et par combinaison à l'oxygène formant ainsi des résines. Cependant, la volatilisation se produit même à basse température et à partir de la surface du sol ou du sous-sol par exposition à l'air libérant ainsi des gaz et des vapeurs d'hydrocarbures volatiles dans l'atmosphère (c.-à-d., BTEX et autres structures monoaromatiques) (Iskander et *al*., 2020). La volatilisation est le processus d'altération le plus dominant des hydrocarbures à faible poids moléculaire, c'est pourquoi l'atmosphère aux sites de déversements pétroliers sera très pollué (Williams et *al*., 2006).

1.3.2 Dispersion et diffusion

Les (HA) peuvent se propager dans le sol horizontalement ou verticalement. Ils sont soit transportés de façon mécanique par le vent (érosion) ou bien physique, par mouvement non uniforme de l'eau dans les pores du sol, sous effet de gravité ou de forces capillaires, c'est la

dispersion. Soit leur mouvement est régit par leur gradient de concentration de la zone la plus concentrée vers celle qui est la moins concentrée, c'est la diffusion. Généralement, le carburant déversé dans le sol forme des flaques au-dessus des couches de sol imperméables, suite à la migration gravitationnelle vers le bas et la propagation latérale par forces capillaires ; c'est ce qui est connu comme 'liquide en phase non aqueuse' (NAPL). En outre, une fraction du polluant dites 'résiduelle' peut être emprisonnée physiquement dans les pores du sol constituant ainsi une contamination presque permanente (Balseiro-romero et *al*., 2018).

1.3.3 Sorption et désorption

La sorption et la dégradation constituent des mécanismes clés qui contrôlent le devenir et transport des (HA) dans le sol. La matrice du sol, par ces propriétés (compositions, structure), est responsable de la séquestration des (HA) lors de leur passage à travers les différents horizons faisant intervenir plusieurs types d'interactions : liaison hydrogène, interactions polaires, échange d'ions, liaisons covalentes, protonation, échange de ligands et ponts cationiques (Balseiro-romero et *al*., 2018).

La cinétique de sorption-désorption des (HA) est influencée par l'importante contenance du sol en matière organique, la richesse de sa texture en argile et en limon, le piégeage dans les nanopores rendant ainsi les (HA) non disponibles aux microorganismes (Jonsson et *al*., 2007). Par ailleurs, la sorption est de plus en plus forte à mesure que la pollution vieillit, ce qui rend le polluant récalcitrant et réduit sa susceptibilité à la dégradation. La récalcitrance des (HA) est dû aussi à leur hydrophobicité. Selon Łyszczarz et *al*. (2021), plus le nombre de cycles aromatiques et le poids du (HA) sont importants (quatre, cinq et six cycles), plus il est hydrophobe et moins il sera disponible à la biodégradation microbienne.

Cependant, les plantes par leurs racines peuvent séparer les agrégats et libérer les hydrocarbures des nanopores. De plus, elles secrètent, tout comme les micro-organismes, des composés bioactifs qui diffusent et agissent sur les (HA) conduisent à leur désorption des particules de sol. D'autre part, la texture sableuse, la température et l'humidité élevées du sol conduisent aussi à la désorption (Truskewycz et *al*., 2019).

1.3.4 Lessivage et dissolution

Lors des périodes de précipitation, le comportement des polluants peut varier en fonction de plusieurs facteurs liés aux quantités d'eau précipitée, à la nature des milieux traversés (horizons du sol) aussi aux propriétés des polluants mêmes. Ils peuvent être entrainés par le flux d'eau dans les couches de sols les plus profondes (Hu, 2020). Ainsi, les (HA) à fort poids moléculaire sont peu solubles et ont tendance à s'adsorber sur les particules, on les trouve

habituellement en faibles concentrations dans les nappes phréatiques (Hassanshahian et *al*., 2015), tandis que les molécules les plus solubles dans l'eau (1 à 5 % des composés aromatiques) comme le benzène constituent souvent le principal contaminant des eaux souterraines, c'est le lessivage (Williams et *al*., 2006).

En effet, à mesure que la structure de l'hydrocarbure soit plus complexe (longueur ou nombre de cycles aromatiques augmentent), il devient moins soluble dans l'eau. D'autre facteurs comme la présence de substances polaires, la salinité, la température influencent aussi la dissolution (Truskewycz et *al*., 2019).

1.3.5 Biodégradation

Les hydrocarbures déversés dans les sols subissent plusieurs types de dégradation : physique, chimique et biologique, cette dernière étant la plus efficace dans l'atténuation naturelle de la toxicité de ceux-ci au fils du temps (Hu, 2020). Elle est assurée par plusieurs espèces microbiennes formant un consortium microbien doté de vastes capacités enzymatiques et disposant de différentes voies métaboliques pour la multitude de composants constituant ces polluants organiques (Gupta et al., 2016). Toutefois, le taux de biodégradation peut également varier selon la nature de l'hydrocarbure, la présence d'autres polluants et les conditions du sol. Certes, les conditions favorables telles que la température, le pH, l'humidité, les accepteurs terminaux d'électrons et les nutriments aideront les microorganismes à mieux s'adapter à l'utilisation des hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie.

Parallèlement, l'activité des microorganismes dans la rhizosphère est d'autant plus favorisée dû à la richesse de cette zone par des exsudats racinaires comme les sucres, les acides organiques, les flavonoïdes, les terpènes qui ont un effet stimulateur sur la transformation bactérienne des hydrocarbures (Balseiro-romero et *al*., 2018). Cet effet est à la base de la phytodégradation des polluants appliqués comme technique de bioremediation de sites pollués (Henner et *al*., 1997).

1.4 Impacts de la pollution des sols aux (HA)

Il existe plusieurs impacts environnementaux et sanitaires associés à la contamination du sol aux (HA).

1.4.1 Alteration du fonctionnement du sol

Suite à l'épandage de pétrole sur le sol, sa qualité ainsi que ses propriétés physiques (structure) et chimiques (éléments chimiques) sont affectées influençant directement le comportement des composants du sol. En général, la présence des hydrocarbures pétroliers dans le sol conduit à l'endommagement de sa structure poreuse la rendant ainsi plus compacte, ce qui limite la circulation de l'air et de l'eau et réduit sa perméabilité (Jabbarov et *al*., 2019).

D'autre part, le sol subit une modification de sa composition, des changements au niveau du pH, de la capacite d'échange cationique, un déséquilibre des éléments nutritifs (C, N, P…), une salinisation, un appauvrissement en nutriments (Wang et *al*., 2013), conduisant ainsi à la perte de sa fertilité et l'accélération de l'érosion. Il peut même y avoir une perte totale de fonctionnement du sol dans les cas extrêmes, ce qui peut avoir un impact négatif sur l'ensemble de l'écosystème (Lemmel, 2019)

1.4.2 Contamination des nappes phréatiques

Il est fréquent que les vieux sites industriels subissent des fuites et des déversements d'hydrocarbures toxiques qui migrent vers le bas sous les forces gravitationnelles et capillaires et accumulent au fil du temps dans le sous-sol à proximité (Alharbi et *al*., 2018). Les nappes phréatiques seront ainsi contaminées sur une vaste zone, ce qui détériore la qualité des eaux souterraines et prive les êtres vivants d'eau potable (Fallah et *al*., 2015).

1.4.3 Accélération du réchauffement climatique

La pollution aux (HA) à de lourdes conséquences sur le changement climatique actuel, puisqu'une forte émission de gaz à effet de serre (CO_2) accompagne la production, le transport et l'utilisation des produits d'origine pétrolière qui contiennent souvent des composés aromatiques (Kumar et *al*., 2018). Par ailleurs, certains (HA) sont volatils constituent une source potentielle de pollution de l'air. En plus, les cycles biogéochimiques ainsi que le pouvoir régulateur des écosystèmes terrestres et marins sont affectés par cette pollution. (Renforth & Campbell, 2021)

1.4.4 Perte de la biodiversité

Dans un sol sain, un réseau d'interactions écologiques a lieu entre les espèces de microorganismes, d'insectes, d'invertébrés et de plantes qui cohabitent dedans et s'impliquent dans le fonctionnement des sols. Ce dernier repose sur l'activité biologique de ces organismes vivants, qui elle-même dépond de l'équilibre naturel au sein de cet écosystème. En fait, les changements physico-chimiques et structurels par entrée des hydrocarbures toxiques dans les sols modifient leurs propriétés abiotiques et biotiques (Raphaël, 2004). La destruction du sol et de son biote aurait des effets en cascade sur la biodiversité et la capacité à maintenir les services écosystémiques puisque les communautés microbiennes et la faune du sol sont très sensibles aux changements de l'habitat et aux conditions du milieu pollué (Decaëns et *al*., 2006). Les plantes ont du mal à s'adapter et leur population diminue en conséquence. Parallèlement, la diminution des populations de bactéries et de champignons dans le sol peut également contribuer à une aggravation de l'érosion du sol.

1.4.5 Déséquilibre de la communauté microbienne

En réponse aux hydrocarbures déversés, la flore microbienne tellurique subit des changements drastiques dans sa composition (Huang et *al*., 2021). Les microorganismes sensibles et incapables de survivre sous haute pression de sélection sont éliminés, c'est ainsi que la biodiversité microbienne diminue. En parallèle, ceux adaptés à l'utilisation des hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie prolifèrent et dominent l'écosystème, par conséquence, l'activité enzymatique augmente. D'ailleurs, l'analyse de certaines enzymes est utilisée comme paramètre d'estimation de l'ampleur de la pollution du sol. C'est le cas particulier des dioxygénases, de l'uréase et des déshydrogénases (Klamerus-Iwan et *al*., 2015).

Selon la littérature, plusieurs espèces microbiennes ont montré leur capacité à tolérer la toxicité accrue des hydrocarbures et certains se sont avérés aptes à dégrader plusieurs molécules dans un travail collaboratif, grâce à leur versatilité métabolique (Seo et *al*., 2009). Néanmoins, malgré leur activité considérée importante dans l'atténuation naturelle des composés pétroliers, ils peuvent entraîner la production d'intermédiaires toxiques pendant la décomposition. Ces sous-produits peuvent avoir d'autres répercussions sur le sol et présenter des risques sanitaires sur l'Homme et l'environnement (Moreno, 2018).

1.4.6 Impact sanitaire

Parmi les (HA) polluant le sol, plusieurs molécules sont associées à des effets très nocifs sur la santé des organismes vivants. La gravité des effets sanitaires dépend de la voie, de la durée et de l'intensité d'exposition à un hydrocarbure (ATSDR, 1995).

Chez l'Homme, ils peuvent être absorbés via plusieurs voies d'exposition (figure 2): par ingestion de la nourriture, par inhalation ou par voie cutanée (Damas et *al*., 2018) et peuvent de ce fait, entrainer l'apparition de plusieurs maladies (problèmes respiratoires et neurologiques et immunologiques, malformations congénitales, effet sur la reproduction, génotoxicité et cancers).

De plus, une exposition de courte durée à de fortes concentrations peut entraîner des effets immédiats, tandis qu'une exposition à long terme à de faibles concentrations peut avoir des effets cumulatifs. En effet, les (HA) s'accumulent dans les maillons de la chaine alimentaire (végétaux, animaux, humains) constituant ainsi une menace à grande échelle (Howard et *al*., 2021).

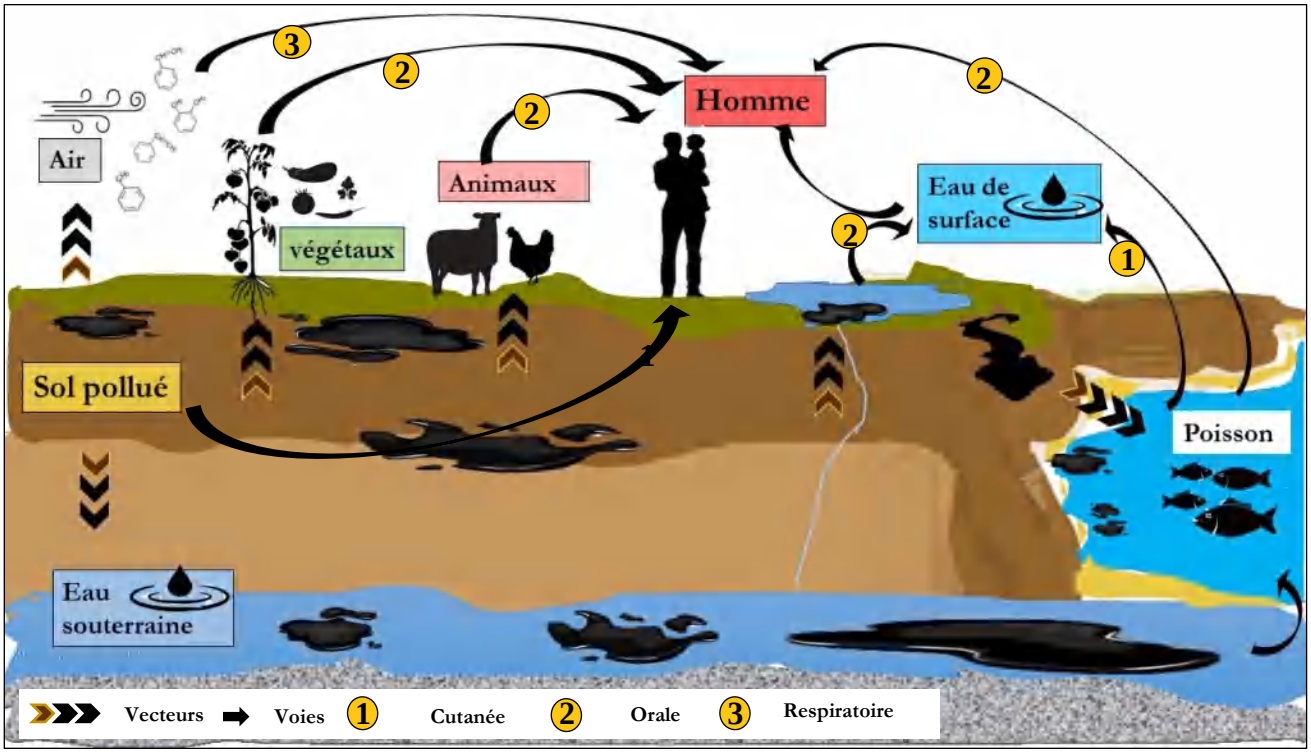


Figure 2. Voies et vecteurs d'exposition humaine aux hydrocarbures dans le sol.

1.5 Techniques d'analyse quantitative des hydrocarbures aromatiques dans le sol

Afin d'évaluer la gravité de la contamination du sol par les (HA) et de prédire les risques qu'elle présente, des analyses chimiques sont nécessaires. Généralement, la procédure à suivre dans ce type d'analyses, passe par un nombre d'étapes importantes. Elles seront brièvement expliquées ci-dessous.

1.5.1 Prélèvement des échantillons

Avant de procéder à l'échantillonnage, un plan doit être mis en place selon l'historique du site (âge de la pollution, fréquence de déversements…) et les objectifs de la recherche. Il doit contenir la période du prélèvement, les points de prélèvement, la profondeur et la répétition en termes de temps et d'espace. Cependant, la représentativité d'un échantillonnage dans le contexte des sols pollués est quelque part biaisée (Brewer et *al*., 2017), puisque le sol est un milieu hétérogène, la contamination peut montrer une grande variabilité selon la nature du produit déversé, la nature du sol, et les activités industrielles menées.

Apres prélèvement des échantillons de sol et acheminement au laboratoire de manière adéquate, ils doivent être conservés de manière appropriée jusqu'au moment de l'analyse, afin d'obtenir des résultats fiables.

1.5.2 Prétraitement des échantillons

Selon Khan et *al*., (2005), l'analyse des (HA) peut être effectuée sur sol secs ou humides, mais il est préconisé d'utiliser des sols secs (choix de la période de prélèvement), afin d'éviter le risque de perte importante engendrée par l'une des techniques de séchage des prélèvements (air ambiant, dessication…). Les sols doivent être broyés, tamisés et homogénéisés, avant de prélever l'aliquote qui va subir l'extraction.

1.5.3 Extraction des hydrocarbures

Plusieurs techniques d'extraction peuvent être appliquées comme par exemple l'agitation mécanique, l'extraction aux solvants organiques, la méthode Soxhlet, la sonication et les micro-ondes (Crone, 2013). Le choix détermine non seulement la précision des résultats mais aussi le temps et le cout de l'analyse.

1.5.4 Analyse chimique des extraits

L'US-EPA ainsi que les organismes de normalisation internationaux (ISO, AFNOR) préconisent l'emploie des méthodes chromatographiques dans le dosage des (HA), comme la chromatographie liquide à haute performance avec une détection UV (HPLC-UV) ou fluorescence (HPLC-fluorescence), et la chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CG-FID), ou à une spectroscopie de masse (CG-MS).

Dans le tableau qui suit (tableau 2), un exemple de résultats d'une recherche menée par Mebarka et *al*., (2012) pour déterminer les concentrations des (HAP) dans des échantillons de sol superficiel prélevés sur un certain nombre de sites du nord-ouest de l'Algérie. La technique de dosage été une chromatographie en phase gazeuse, couplée à une spectroscopie de masse (GC/MS).

Il existe également, d'autres méthodes analytiques, telles que la chromatographie sur couche mince (CCM), l'électrophorèse capillaire et la spectrophotométrie UV qui donnent des résultats intéressants. En effet, (Crone, 2013) a essayé, par sa recherche, de mettre en place une méthode simple et rapide qui permet de doser de manière efficace les (HAP) (particulièrement la liste des 16 (HAP) prioritaires de l'US-EPA et le benzène) dans le sol. Sa méthode s'est basée sur les spectres générés par la mesure de l'absorbance des (HAP) dans le domaine UV-Visible. Ça a permis de discriminer les différents hydrocarbures aromatiques monocycliques (benzène) et polycycliques (HAP) et de les quantifier après. L'auteur a contrôlé la qualité des résultats de cette technique en les comparant à ceux d'analyse chromatographiques des mêmes échantillons.

Tableau 2. Concentrations de (HAP) totaux (ng/kg) détectées dans différents échantillons de sol algérien (Mebarka et *al*., 2012).

(HAP)	Sol industriel	Sol urbain	Sol céréalier	Sol rural
Naphthalène	83,6	41,8	358,4	141,2
Acénaphthalène	133366,6	1619,3	732,1	<19,3
Acénaphtène	2252,4	<19,1	<19,1	1071,9
Fluorene	3634,6	750,5	1201,1	1623,0
Phenanthrene	399088,0	50721,3	40013,4	36726,7
Anthracene	251370,8	7533,3	3135,9	1493,5
Fluoranthene	2513462,4	139817,8	62424,2	33025,5
Pyrene	2342651,8	172504,5	132557,1	142276,8
Benzo[a]anthracene	1920015,6	110668,8	24556,1	5109,0
Chrysene	482928,0	49593,5	13833,2	4432,4
Benzo[b]fluoranthene	720570,2	50389,3	18713,5	3216,6
Benzo[k]fluoranthene	421556,4	32092,1	12408,2	1859,2
Benzo[a]pyrene	506484,8	39921,1	11763,2	2189,0
Indeno [1,2,3, cd] pyrene	345669,6	23848,5	19005,9	2827,0
Dibenzo[a,h]anthracene	81331,8	5915,4	3693,9	1204,8
Benzo[g,h,i]perylene	280340,2	22637,4	17448,9	2550,0
Dibenzo[a,e]pyrene	195749,8	15678,1	12409,9	3385,9
Dibenzo[a,h]pyrene	91355,4	8988,2	8164,3	3137,9
Dibenzo[a,i]pyrene	19152,0	4996,9	3203,2	<192,9
Dibenzo[a,l]pyrene	13442,4	3884,2	<190,8	<192,9
(HAP) totaux	10724506,4	741602,1	385622,5	<246270,4

1.5.5 Interprétation des spectres UV

Les spectres d'absorption résultant de la spectrophotométrie UV permettent de quantifier la concentration des composés aromatiques dans les échantillons analysés par une déconvolution spectacle. Il s'agit d'une détection et une détermination des concentrations individuelles de différents hydrocarbures présents dans un échantillon par séparation des bandes d'absorption ou d'émission contenues dans le spectre global (Thomas et *al*., 1993). Ceci est rendu possible par des logiciels qui font appel à des algorithmes mathématiques. L'expression finale des concentrations se fait en parties par million (ppm) ou en milligrammes par kilogramme (mg/kg).

Ainsi, les données obtenues vont servir à l'estimation des risques associés à la présence des (HA) dans le sol. Ceci demande de plus des recherches écotoxicologiques basées sur des modèles et des outils d'évaluation pour prédire les effets potentiels sur la santé humaine et environnementale.

Le tableau ci-dessous (tableau 3) est donné à titre d'exemple, indiquant la classification de sols en plusieurs niveaux selon le dégrée de leur contamination par certains HA.

Tableau 3. Classification par l'US-EPA des sols de parcs industriels contaminés en fonction de leur dégrée de contamination par certains hydrocarbures aromatiques (US-EPA, 1996).

Hydrocarbures aromatiques	**Concentration (mg/kg)**	**Classification des sols**
Benzène	5 - 50	Classe 2
Toluène	10 - 200	Classe 2 à Classe 3
Xylènes	20 - 500	Classe 2 à Classe 3
Naphtalène	10 - 200	Classe 2 à Classe 3
Phénanthrène	20 - 400	Classe 2 à Classe 3
Anthracène	30 - 600	Classe 2 à Classe 3
Pyrène	40 - 800	Classe 2 à Classe 3
Benzo[a]pyrène	5 - 50	Classe 2

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2. DIVERSITE BACTERIENNE DES SITES POLLUES AUX HYDROCARBURES AROMATIQUES

2. DIVERSITE BACTERIENNE DES SITES POLLUES AUX HYDROCARBURES AROMATIQUES

De façon générale, la présence d'hydrocarbures dans les sols suscite plusieurs types de comportements de la part des microorganismes en fonction des propriétés de chacun, dans le but de maximiser leurs chances de survie. Certains vont les dégrader afin de les utiliser comme source de carbone, tandis que d'autres tolèrent leur présence mais sans dégradation.

2.1 Diversité taxonomique des bactéries dégradant les (HA)

En 2019, Prince et *al*. ont compté près de 300 genres bactériens avec leurs représentants, capables d'utiliser les hydrocarbures comme unique ou principale source de carbone, repartis sur les phylums suivants (figures 3 et 4) ;

a) Phylum *Actinobacteria*, comportant des bactéries omniprésentes dans les écosystèmes terrestres, avec leur structure souvent mycélienne. Deux ordres *Corynebacteriales* et *Micrococcales* contiennent les individus plus caractérisés dans ce type de processus.

b) Phylum *Bacteroidetes*, avec bactéries aérobies, des trois ordres *Cytophagales, Flavobacteriales* et *Sphingobacteriales,* capables de dégrader les polymères complexes.

c) Cyanobactéries, Leur capacité à dégrader les hydrocarbures est débattue, mais leur contribution par la fourniture d'oxygène et d'azote aux hétérotrophes est très importante dans le processus de dégradation.

d) Phylum *Deinococcus-Thermus*, qui contient une seule espèce, *Thermus brockii,* qui dégrade l'hexadécane et un large spectre d'(HAP).

e) Phylum Firmicutes dont la majorité sont des organismes sporulés.les trois ordres *Bacillales, Lactobacillales*, et *Clostridiales* incluant des genres comme *Bacillus, Paenibacillus et Brevibacillus*. Les genres Desulfotomaculum, Desulfosporosinus et Desulfitobacterium qui sont anaérobies et *Sarcina, Peptococcus* et *Lactobacillus* qui sont anaérobies fermentatives ou microaérophiles.

f) Proteobacteria est un gros phylum qui contient la majorité des genres officiellement décrits qui dégrade les hydrocarbures dans des conditions d'aérobiose et d'anaérobies, les bactéries méthanotrophes, les hydrocarbonoclastes strictes. Quatre classes (sauf epsilon) contiennent des genres de dégradation des hydrocarbures

g) Phylum *Verrucomicrobia* est un phylum à Gram négatif qui contient des méthanotrophes acidophiles.

h) Phylum *Candidat*, qui désigne des microorganismes non cultivables qui ont été caractérisées par des études métagénomiques comme étant impliqués dans la dégradation des hydrocarbures, mais leur physiologie reste incertaine.

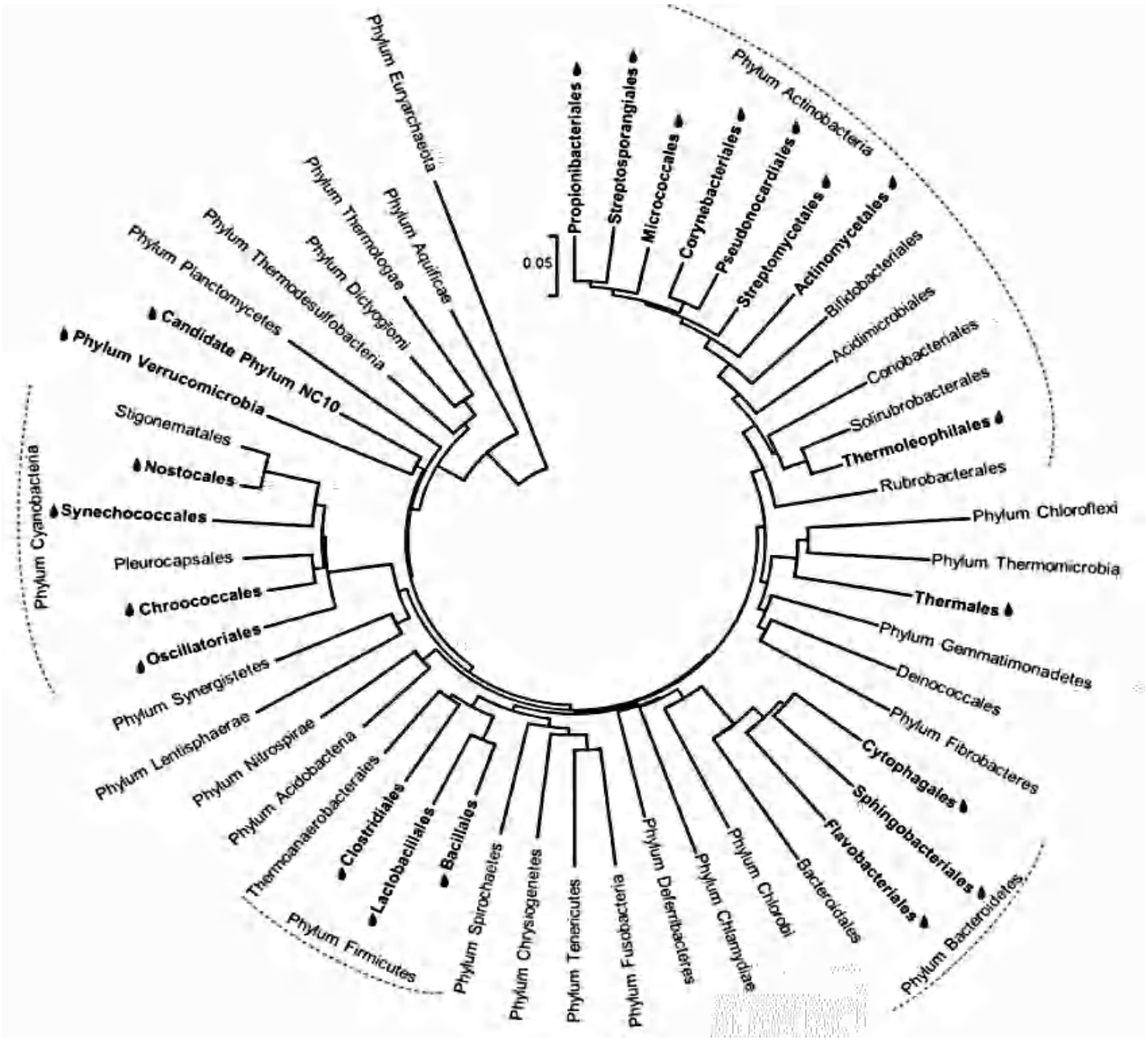


Figure 3. Arbre phylogénétique inférée par la méthode Neighbour-Joining, représentant les phylums qui comportent des espèces dégradant les hydrocarbures (appart le phylum *Proteobacteria*). La présence de cette capacité est montrée par le caractère gras et les gouttelettes d'huile pour les taxons ordres (Prince et *al*., 2019)

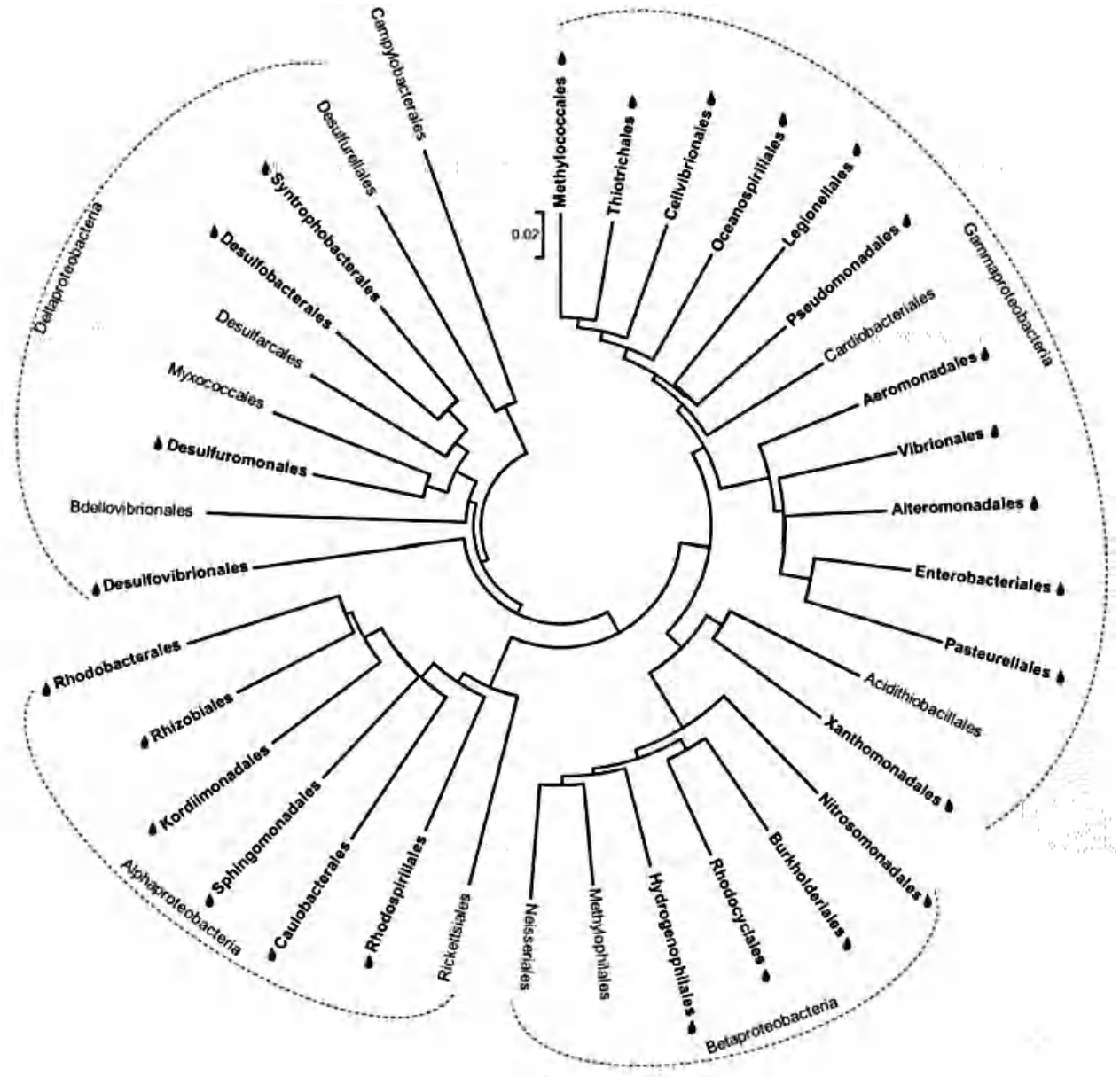


Figure 4. Arbre phylogénétique inférée par la méthode Neighbour-Joining, représentant le phylum *Proteobacteria* comportent des espèces dégradant les hydrocarbures. La présence de cette capacité est montrée par le caractère gras et les gouttelettes d'huile pour les taxons ordres (Prince et *al*., 2019).

2.2 Diversité fonctionnelle des bactéries dégradant les (HA)

La diversité structurelle et fonctionnelle de la communauté bactérienne telluriques est essentielle dans le maintien de la qualité globale du sol, puisqu'elle participe activement aux grandes fonctions écologiques telles que : la décomposition de la matière organique, les cycles biogéochimiques des éléments en plus de leur rôle crucial dans la résistance et la résilience face aux conditions stressantes comme la présence des polluants (Balland-bolou-bi, 2010).

La structure de la communauté bactérienne des sols contaminés est diversifiée et comprend plusieurs groupes nutritionnels et physiologiques montrant ainsi une versatilité métabolique qui permet leur survie et action envers les polluants. On en trouve des aérobies et des anaérobies, des hétérotrophes (organotrophes ou lithotrophes), des mésophiles ou des thermophiles ainsi que des halophiles. Selon Pandolfo et *al*. (2023), le pouvoir épurateur du milieu repose sur les voies métaboliques périphériques et centrales impliquées dans la dégradation des (HA) et qui sont catalysées par des enzymes clés codées par des gènes spécifiques. Les bactéries peuvent être classées selon leurs activités biologiques en plusieurs groupes : les bactéries oxydantes, les dénitrifiantes, les bactéries de la fermentation, les bactéries qui réduisent le sulfate, les méthanogène et les bactéries qui réduisent le fer III (figure 5), mais sans frontières rigides entre les groupes puisque certaines bactéries peuvent avoir à la fois plusieurs voies métaboliques.

2.2.1 Bactéries oxydantes

C'est le groupe le plus impliqué dans la dégradation des différents (HA), puisque ces membres possèdent le système enzymatique initiateur de la dégradation (les enzymes dioxygénases), codé par des gènes spécifiques présents aussi bien chez les bactéries à Gram négatif (comme *Pseudomonas, Burkholderia, Alcaligenes* sp.) que celles à Gram positif (*Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Gordonia* sp.) (Shahsavari et *al*., 2019).

2.2.2 Bactéries dénitrifiantes

La dénitrification peut être aérobie ou anaérobie. Les bactéries assurant ce processus utilisent l'oxygène comme accepteur final d'électrons et peuvent s'attaquer aux (HA) ou à leurs dérivés comportant des molécules d'azote. Tandis qu'en absence d'oxygène, et en conditions dénitrifiantes, les nitrate constituent l'accepteur d'électrons (Andreoni & Gianfreda, 2007). C'est le cas de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa.* D'ailleurs, selon (Bouwer & Zehnder, 1993) l'utilisation des nitrate en anaérobiose fournis le taux d'énergie libre le plus élevé durant le transfert d'électrons.

2.2.3 Bactéries de la fermentation

Il s'agit de bactéries qui peuvent utiliser des hydrocarbures, des sucres et des protéines comme donneurs d'électrons et il en résulte des acides organiques, l'acétate, l'éthanol et les gaz (H_2 et le CO_2) On peut citer ici le genre *Thermotoga* sp. (Victor et *al*., 2020).

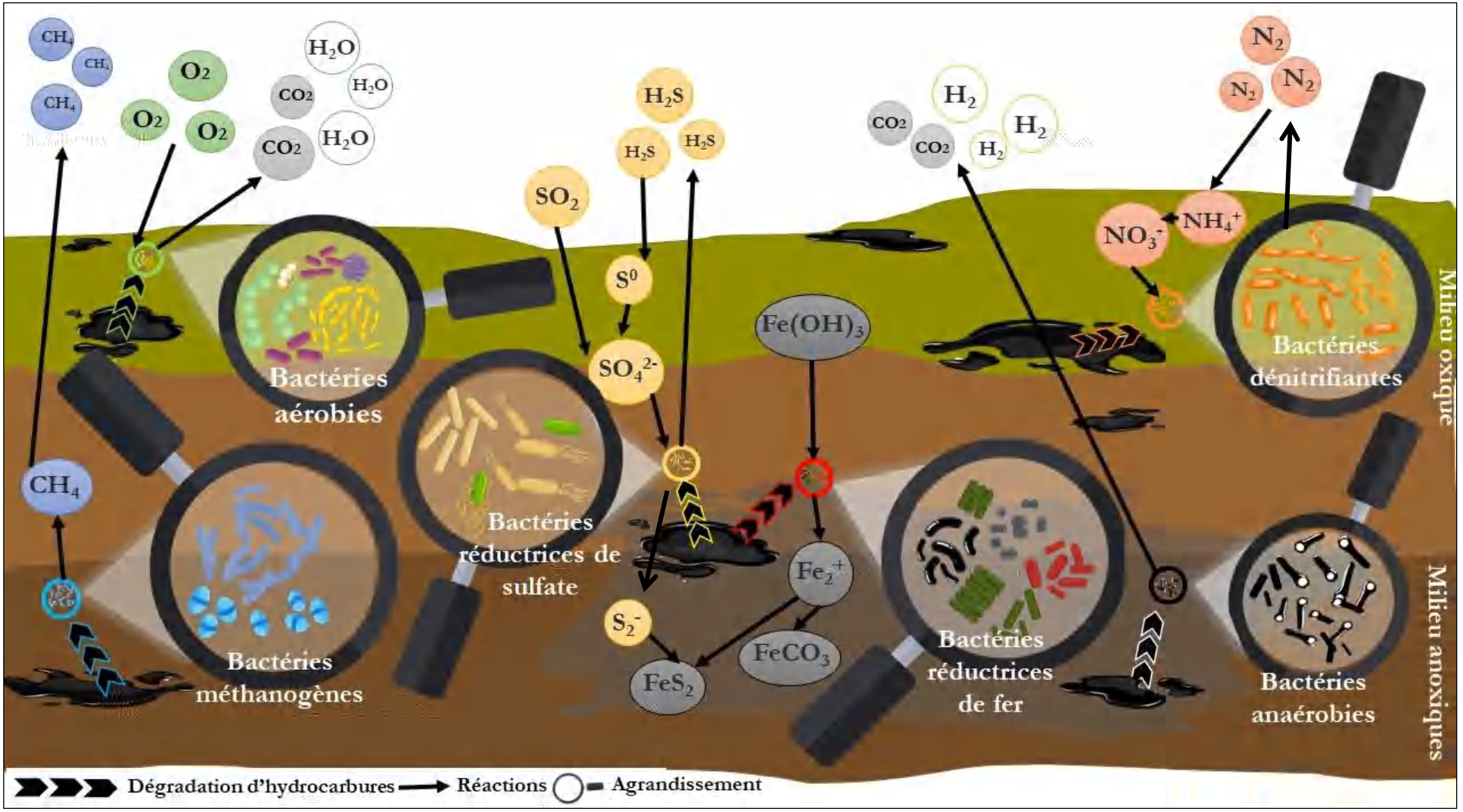


Figure 5. Groupes fonctionnels de bactéries telluriques intervenant dans la dégradation des hydrocarbures.

2.2.4 Bactéries réductrices de sulfate

Ce sont des hétérotrophes anaérobies stricts, qui se trouvent dans des environnements anoxiques riches en sulfates ainsi que d'autres composés soufrés oxygénés utilisés comme accepteurs d'électrons finaux. Ces espèces oxydent partiellement les composés organiques en acétate et utilisent l'énergie de l'oxydation de l'hydrogène, du lactate et de l'acide pyruvique. On cite les genres *Desulfovibrio* sp., *Desulfotomaculum* sp. (Victor et *al*., 2020).

2.2.5 Les méthanogènes

Les méthanogène est un groupe de microorganismes qui produisent le méthane à partir d'intermédiaires de la dégradation des hydrocarbures sous l'influence de plusieurs facteurs comme la température, la teneur en sel et le pH. Il s'agit le plus souvent d'archées, mais des bactéries syntrophiques peuvent se développer dans ces conditions méthanogènes et améliorer la dégradation des (HA). *Desulfatibacillum alkenivorans* AK-01 est un exemple de bactérie réductrice de sulfate qui dégrader le toluène et produit le méthane (Gieg et *al*., 2014).

2.2.6 Bactéries réductrices de fer tertiaire

Ces bactéries réduisent le fer et parallèlement le soufre élémentaire, les sulfites et les thiosulfates en sulfures. Le donneur d'électrons est soit du H_2 ou du formate et les accepteurs sont des hydroxydes et des oxydes de fer. La source d'énergie est l'hydrogène et de nombreux acides organiques. *Shewanella* sp. et *Deferribacter* sp. en font partie (Victor et *al*., 2020).

2.3 Mécanismes d'adaptation bactérienne à la présence des (HA) dans le sol

Les bactéries constituent la classe de microorganismes les plus actifs et performants dans la dégradation des (HA). Plusieurs genres bactériens peuvent utiliser le pétrole brut, ces dérivés, les sucres, les alcools et les acides gras comme sources de carbone et d'énergie. Il y'a même des bactéries qui se nourrissent exclusivement d'hydrocarbures (Das & Chandran, 2011), elles sont qualifiées d'hydrocarbonoclastes. La plupart d'entre elles sont isolées de sites subissant des pollutions à long terme, témoignant ainsi de leur fort pouvoir adaptatif aux conditions hostiles et à l'utilisation de sources de carbone hydrophobes pour leur croissance.

L'ancienneté de la pollution joue un rôle important dans l'adaptation de ces bactéries aux (HA) (Haritash & Kaushik, 2009). Selon Leahy et Colwell, (1990), la vitesse de dégradation des hydrocarbures est d'autant plus rapide que la communauté a été préalablement exposée à ces polluants. Ceci est probablement lié aux mécanismes mis en œuvre par les bactéries pour faire face à la toxicité du polluant. Selon les mêmes auteurs, plusieurs mécanismes corrélés permettent l'adaptation :

a) L'enrichissement sélectif des bactéries aptes à la dégradation d'un ou plusieurs composés en raison de la grande spécificité de certaines populations microbiennes pour ces polluants

b) La régulation de l'expression génique par l'induction /répression enzymatique

c) L'acclimatation croisée, stimulant la biodégradation d'un composé par la présence antérieure d'autres composés structuralement similaires à celui-ci, expliquée par l'existence de voies communes pour le catabolisme des (HAP)

d) Les modifications (mutation, réarrangement) et transferts génétiques horizontaux permettant d'acquérir de nouveaux gènes qui codent pour des enzymes de dégradation.

2.3.1 Stratégie r/K

Plusieurs facteurs peuvent agir sur l'adaptation des populations bactériennes à la contamination du milieu et sur la prévalence de chacune au sein de la communauté hétérotrophe. Des différences sont perçues dans le même site suivant différents épisodes de l'évènement de contamination ou entre sites présentant des conditions nutritionnelles et climatiques différentes.

Effectivement, d'après Somee et *al*., (2022), ces différences peuvent être expliquées, par un concept écologique proposé par les écologues Robert MacArthur et Edward Osborne Wilson, en 1967 : les stratégies de type r et K, selon lesquelles les bactéries se divisent en deux catégories : celles qui sont copiotrophes, à croissance rapide et abondante mais de courte vie (r-stratégistes) et celles qui sont oligotrophes, à croissance lente et faible biomasse mais qui vivent à long terme (K-stratégistes). Les deux catégories hébergent des gènes de dégradation des hydrocarbures, mais ce sont les r-stratégistes qui contribuent le plus à ce processus lors du déversement, par leur action rapide. D'ailleurs, la plupart des bactéries hydrocarbonoclastes sont classées comme r-stratégistes. Ces bactéries appartiennent principalement au phylum *Proteobacteria* et sont souvent isolées à partir d'échantillons marins. Blaud et *al*., (2012) pensent que les bactéries à Gram négatif sont généralement des organismes de type r-stratégistes/copiotrophes, alors que les Actinobactéries et la plupart des bactéries à Gram positif sont considérées comme des organismes de type K-stratégistes/oligotrophes. Il est maintenant clair pourquoi la population bactérienne dégradant les hydrocarbures est dominée par les bactéries copiotrophes en zones humide et subhumide, qui se caractérisent par de meilleures conditions de vie (disponibilité d'eau, richesse en matière organique, températures adéquates) alors que les oligotrophes ont tendance à dominer en zones à faibles concentrations de substrat, sèches et hostiles comme les zones sahariennes arides (Guo et *al*., 2022).

2.3.2 Cas particulier des zones arides

Dans les régions à climat aride, en plus du stresse exercé par la présence des hydrocarbures, toxiques et hydrophobes, s'ajoute l'agressivité des conditions

environnementales comme la haute sécheresse, les radiations UV élevées, la faible humidité et la forte salinité limitant toute forme de vie. Pourtant, les sols désertiques abritent une flore bactérienne variée, dominée par des phylums comme *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, caractérisés par leur ubiquité assurée par la tolerance aux différents stresses (Amin et *al*., 2020).

Ces ont une flexibilité physiologique importante permettant l'utilisation des sources en fonction de leur disponibilité. Elles peuvent synthétiser des enzymes résistantes, actives même dans des conditions extrêmes. Selon Karabi et *al*., (2016), le stresse salin, est parmi les facteurs abiotiques ayant le plus d'impact sur la structure et les fonctions de la communauté microbienne dans ces régions. En effet, les sols fortement salins, auront un effet négatif sur la capacite du sol à retenir l'eau, sur la richesse en matière organique diminuée par la mauvaise croissance des plantes. Ceci va priver les microorganismes de substrats adéquats pour leur croissance (C, N…), et d'enzymes enrichissant la matière organique en décomposition.

L'études menée par Abed et *al*., (2015), sur la diversité bactérienne de sols arides du désert d'Oman pollués au pétrole, a montré d'importantes différences dans la distribution et l'abondance des phylums bactériens résidant ces sols. Des sols aères ont présenté une dominance des Protéobactéries des classes *Alpha, Beta* et *Gammaproteobacteria* qui regroupent des membres très actifs dans la dégradation des (HA) comme : *Marinobacter*, *Alcanivorax, Novosphingobium, Sphingopyxis, Ochrobactrum, Acidovorax, Acinetobacter* et *Psuedomonas.* Les classes *Bacilli* et *Actinobacteria* incluant les genres : *Bacillus, Paenibacillus, Microbacterium* et *Micrococcus* ont été détectés dans tous les sols peu importe leur concentration en hydrocarbures, témoignant de leur forte capacite adaptative.

Cependant, un sol très pollué en pétrole a montré la dominance de bactéries anaérobies strictes de la classe *Deltaproteobacteria* capables de cataboliser plusieurs (HAP). Les auteurs ont expliqué ceci par les conditions anoxiques dû aux concentrations élevées du polluant d'une part et d'autre part, les hautes températures du désert, dépassant les 50°C et favorisant le processus de réduction de sulfate. Cela stimulant les bactéries du métabolisme anaérobie, spécifiquement le groupe des réductrices de sulfate comme : *Desulfococcus, Desulfosalsimonas* et *Desulfovermiculus* sp., dont certains sont en plus halophiles. D'autres bactéries strictement anaérobies, appartenant aux *Thermotogae* (*Petrotoga* sp.) qui sont thermo-halophiles, *Chloroflexi* (*Anaerolineae*) et Firmicutes (*Haloanaerobium*) qui sont halophiles, partageant la niche avec les réductrices de sulfate. Elles jouent un rôle important dans le cycle du soufre, par réduction de soufre élémentaire ou des thiosulfates en sulfure d'hydrogène.

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

3. DEGRADATION BACTERIENNE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES ET PRODUCTION DE BIOSURFACTANTS

3. DEGRADATION BACTERIENNE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES ET PRODUCTION DE BIOSURFACTANTS

3.1 Microorganismes, principaux acteurs de la biodégradation

La dégradation des hydrocarbures dans le sol est souvent, l'œuvre des microorganismes. Généralement, les organismes supérieurs (plantes et les animaux) sont indirectement impliqués, en favorisant l'action microbienne sur les polluants soit par stimulation de la flore rhizosphérique via les exsudats racinaires des plantes (Alotaibi et *al*., 2021), soit par modification de la structure et des propriétés physiques du sol par les vers de terre par exemple (Lipiec et *al*., 2016). Quelques plantes sont cependant, dotées de pouvoir épurateur du milieu, elles sont utilisées dans un processus appelé la phytoremédiation (Nedunuri et *al*., 2000).

Plusieurs auteurs ont rapporté des listes de microorganismes largement documentés dans la littérature scientifique pour leur pouvoir catabolique des (HA) (Haritash and Kaushik 2009; Das and Chandran 2011; Oren 2019). Le tableau 4 présente quelques exemples. Parmi les microorganismes, les bactéries, les levures, les moisissures, les archaea ainsi que les algues sont les principaux acteurs de la dégradation primaire des hydrocarbures, alors que les protozoaires semblent jouer un rôle moins important dans ce processus qui se résume à leur pouvoir prédateur vis-à-vis des bactéries assurant la dégradation (Rogerson & Berger, 1981).

Lorsqu'un déversement de pétrole se produit dans l'environnement, la présence simultanée d'un mélange de produits chimiques nécessite souvent l'intervention d'un consortium microbien ayant de capacités enzymatiques variées et spécifiques pour son élimination efficace.

En effet, le co-métabolisme, essentiel pour décomposer certains hydrocarbures, nécessite souvent une coopération interspécifique des microorganismes. Par exemple, quelques bactéries produisent des enzymes de dégradation tandis que d'autres fournissent les cofacteurs nécessaires à ces réactions enzymatiques, c'est la syntrophie à bénéfice mutuel (Prince et *al*., 2019).

3.2 Dégradation bactérienne des (HA)

Pour qu'une cellule bactérienne puisse dégrader les molécules des (HA), ces dernières doivent d'abord être disponibles et accessibles, permettant un contact physique avec la membrane cellulaire afin d'enclencher une série de réactions biochimiques assurées par la machinerie catabolique qui se trouve à l'intérieur de la cellule bactérienne (Hua & Wang, 2014).

Selon Moreno, (2018) la biodisponibilité signifie la quantité d'hydrocarbures disponibles dans le sol après une déversement, pour une utilisation par les organismes vivants, tandis que la bioaccessibilité se réfère à la proportion d'hydrocarbures dans le sol qui peut être

libérée par différentes actions (comme la dissolution, la désorption et la diffusion) et mise à disposition des organismes vivants.

Tableau 4. Quelques exemples de microorganismes utilisant les (HA) appartenant à différents groupes (liste non exhaustive (Haritash and Kaushik 2009; Das and Chandran 2011; Oren 2019)

Bactérie	**Cyanobactéries et algues**	**Archées**	**Champignons**	
Aeromonas	*Anabaena*	*Halobacterium,*	*Aspergillus*	*Panaeolus*
Alcaligenes	*Amphora*	*Haloarcula,*	*Basidiobolus*	*Penicillium*
Arthrobacter	*Aphanocapsa*	*Halococcus,*	*Bjerkandera*	*Pestalotia*
Bacillus	*Chlorella.*	*Haloferax,*	*Candida*	*Phanaerochaete*
Beijerinckia	*Chlamydomonas*	*Halorubrum*	*Chrysosponum*	*Phycomyces*
Corynebacterium	*Coccochloris*	*Natrialba*	*Claviceps*	*Ramaria*
Flavobacterium	*Cylindrotheca*		*Conldiobolus*	*Rhizoctonia*
Micrococcus	*Dunaliella*		*Cunninghamella*	*Rhizophlyctis*
Moraxella	*Microcoleus*		*Emencellopsis*	*Rhizopus*
Mycobacterium	*Navicula*		*Epicoccum*	*Saccharornyces*
Nocardia	*Nitzschia*		*Gilbertella*	*Saprolegnia*
Pseudomonas	*Nostoc*		*Gliocladium*	*Smittium*
Rhodococcus	*Oscillatoria*		*Helicostylurn*	*Sordaria*
Staphylococcus	*Porphyridium*		*Hyphochytriurn*	*Syncephalastrum*
Streptomyces	*Selenastrum*		*Linderina*	*Tharnnidium*
Vibrio	*Synedra*		*Mortierella*	*Trametes*
Gordonia	*Ulva*		*Mucor*	*Trichoderma*
Brevibacterium	*Scenedesmus,*		*Neurospora*	*Zygorhynchus*
Aeromicrobium	*Prototheca*		*Yarrowia,*	*Cephalosporium*
Dietzia			*Pichia,*	*Amorphoteca,*
Burkholderia			*Rhodotorula,*	*Neosartorya*
Sphingomonas			*Geotrichum*	*Talaromyces,*
			Trichosporon	*Graphium,*

3.2.1 Stratégies d'accession bactérienne aux (HA)

3.2.1.1 Biodisponibilité et bioaccessibilité des (HA) aux bactéries

Dans le sol, les molécules d'hydrocarbures interagissent avec les phases du sol ce qui entraîne leur présence sous différents états. Ils peuvent être dissouts dans la phase aqueuse du sol, adsorbés à la surface de la phase minérale (particules de limon, sable, argile), comme ils peuvent être emprisonnés dans la matrice ; soit dans les agrégats, ou dans les micro- et macropores ou fortement attachés à la phase organique du sol (humus) (Figure 6). De plus, lorsqu'un obstacle imperméable (structure rigide) empêche leur migration vers les nappes phréatiques, ils sont capturés dans les couches profondes du sol, formant ainsi une phase liquide non aqueuse (NAPL). Les hydrocarbures de cette phase sont relativement disponibles, par comparaison à ceux attachés et emprisonnés dans la matrice du sol (Balseiro-romero et *al*., 2018).

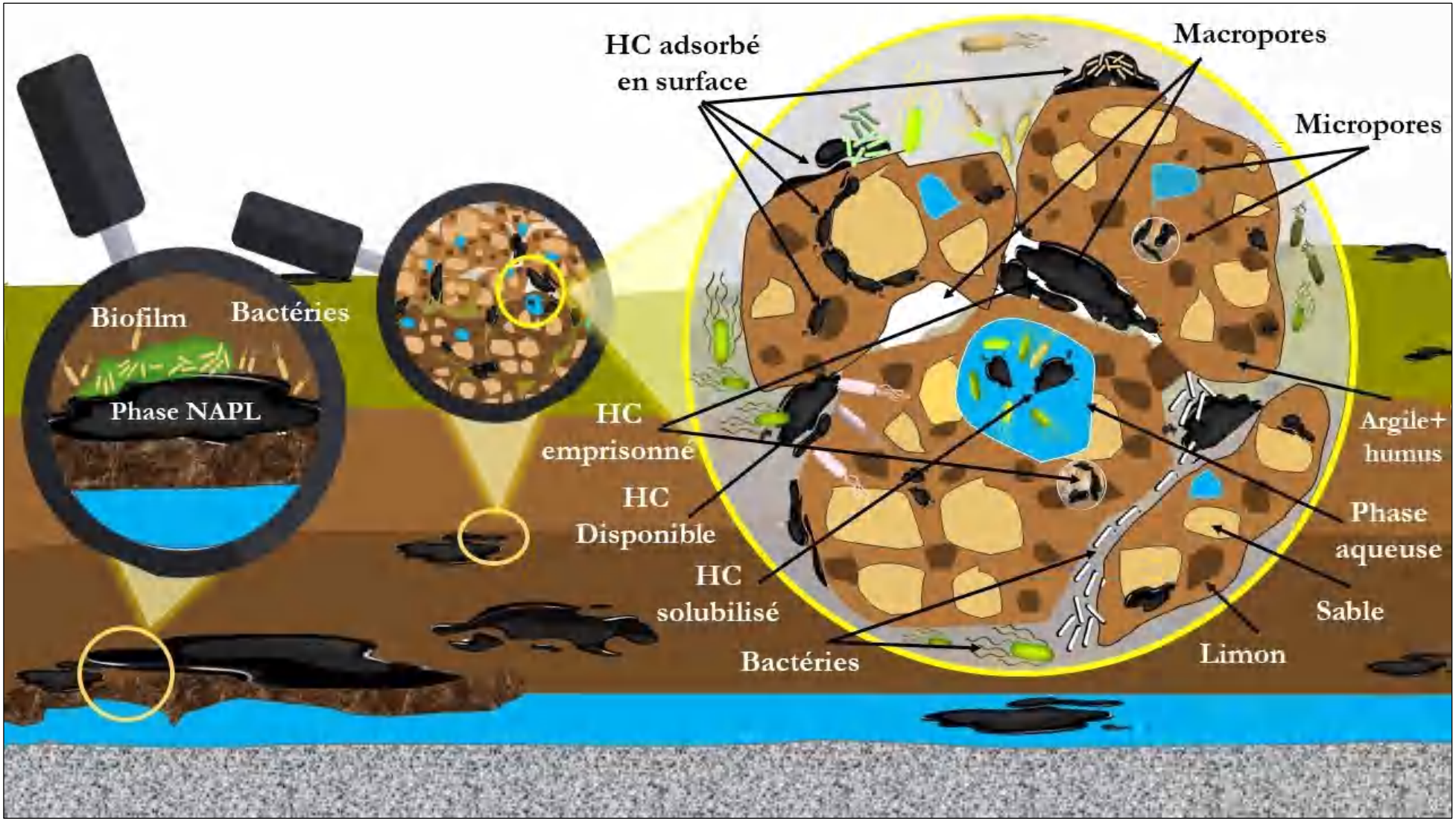


Figure 6. Interactions entre hydrocarbures déversés, composantes du sol et bactéries telluriques.

Toutefois, la biodisponibilité des (HA) dans le sol est très faible à cause de leur hydrophobicité qui augmente avec le nombre de cycles aromatiques qu'ils possèdent et donc du poids moléculaire (Ghosal et *al*., 2016) l'hydrophobicité de la membrane cellulaire bactérienne, ainsi que la forte sorption à la matrice du sol. Face à cela, les microorganismes se trouvent obligés d'adopter, selon leurs capacités, des changements qui permettent d'augmenter cette disponibilité et d'accéder à ces substrats. Ces changements peuvent être comportementaux comme : le chimiotactisme, morphologiques comme : la modification de composition ou de la charge de surface cellulaire ou encore physiologiques tel que : l'attachement directe aux (HA), la formation de biofilms, la production et la libération d'enzymes ou de biosurfactants (Ren et *al*., 2018).

3.2.1.2 Chimiotactisme

Les (HA) sont toxiques pour la vie bactérienne puisqu'ils désintègrent leur membrane cellulaire conduisant ainsi à leur mort. Les cellules mobiles par flagelles soumises à une contamination aux (HA), adoptent des comportements chimiotactiques spécifiques en réponse à ces composés. Elles sont soit attirées vers ces substances par la chimioattraction, ou encore repulsées par ce qu'on appelle une chimiorépulsion. Un équilibre entre l'effet nutritif et l'effet toxique de ceux-ci dois être assuré par la régulation génétique (Lacal et *al*., 2013).

3.2.1.3 Modification de la surface cellulaire

Plusieurs changements au niveau de la membrane et de la paroi cellulaire ont lieu comme réponse adaptative de certaines bactéries à la présence de sources de carbone hydrophobes comme les (HA). Il peut y avoir modifications de la composition en acides gras ou en protéines de la membrane, les modifications des lipopolysaccharides (LPS) de la membrane externe, des modifications dans la charge et la réticulation de la paroi…etc. Il peut même y avoir une accumulation de particules hydrophobes dans la paroi des cellules, tous cela dans l'objectif de faciliter le contact avec les (HA) (Moreno, 2018).

3.2.1.4 Adhésion cellulaire

Plusieurs facteurs influencent l'adhésion cellulaire aux surfaces biotiques ou abiotiques. On peut citer les mouvements browniens, les forces d'attraction (Van der Waals) et de gravité, les charges électrostatiques de surface ainsi que l'hydrophobicité. L'hydrophobicité de la surface cellulaire est modulée de sorte à permettre un attachement ou un détachement des cellules des substrats auxquelles elles adhèrent. Des bactéries hydrophiles

vont s'attacher aux substrats hydrophiles et celles qui sont hydrophobes s'attachent fortement aux substrats hydrophobes.

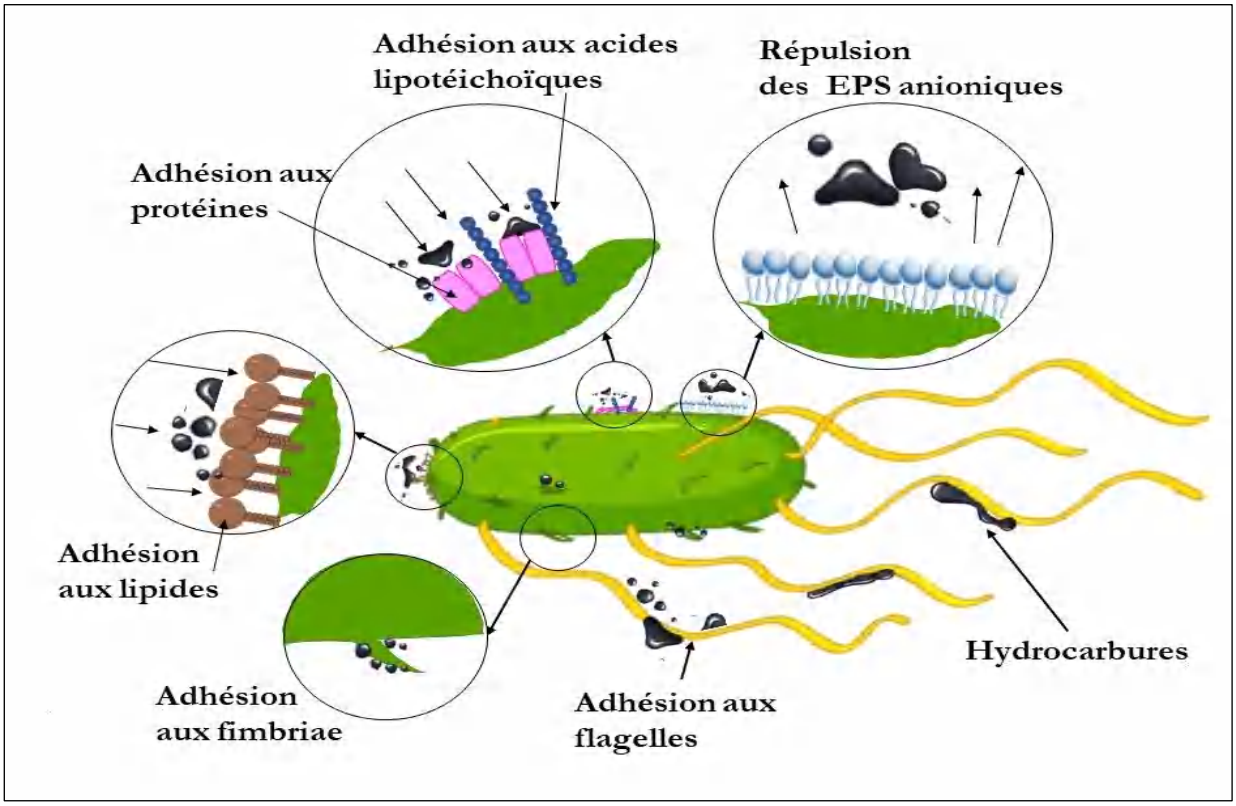


Figure 7. Structures cellulaires communes responsables d'adhésion bactérienne aux (HA).

Il existe aussi des bactéries qui sont capables de permuter entre les deux sous l'influence des conditions du milieu environnant (Krasowska & Sigler, 2014). Malgré l'existence de structures spécifiques propres à chaque espèce bactérienne, le processus d'adhésion cellulaire est assuré par les structures communes suivantes : les protéines et lipides membranaires, les acides lipotéichoïques, les flagelles et les fimbriae (figure 7).

3.2.1.5 Formation de biofilms

Dans les écosystèmes dynamiques et sous certaines contraintes comme le déversement d'hydrocarbures, les bactéries peuvent former un regroupement matriciel qui s'appelle un biofilm. Il s'agit un micro-environnement protecteur, qui retient l'eau et les nutriments et permet aux bactéries de résister en groupe à l'agression qui s'est imposée (Dash et *al.*, 2013). Sa formation est initiée par l'adhésion cellulaire à la surface huileuse, suivie par une production excessive de biopolymères extracellulaires de nature polysaccharidique ou protéique. Des recherches ont trouvé que grâce à ce mécanisme la solubilité des (HA) dans la phase biofilm était jusqu'à dix fois plus élevée que dans la phase aqueuse (Kapellos, 2017).

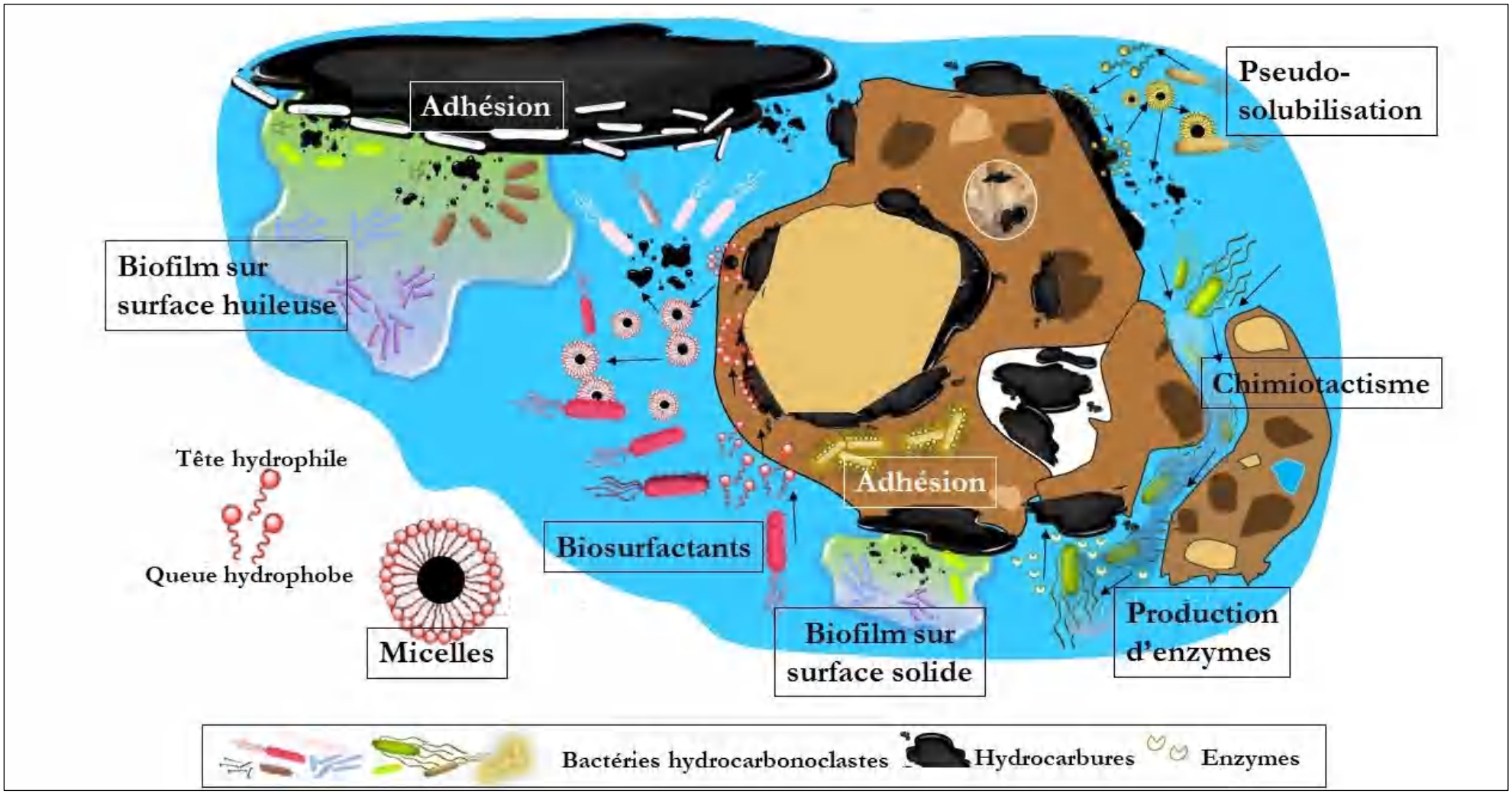


Figure 8. Stratégies bactériennes impliquées dans l'accession aux (HA) dans le sol.

3.2.1.6 Production de d'enzymes et de biosurfactants

Certaines bactéries ont la capacite d'utiliser non seulement la fraction d'hydrocarbures dissoute dans la phase aqueuse, mais aussi celle qui est attachée aux particules du sol, soit en produisant des enzymes extracellulaires qui vont directement dégrader ces (HA), ou bien en synthétisant des biosurfactants qui agissent de différentes manières rendant ainsi les (HA) assimilables (Ren et *al*., 2018). Plusieurs travaux de recherche ont prouvé que la présence de pétrole brut dans le sol stimule la synthèse d'enzymes cataboliques des (BETX) et des (HAP) (Huang et *al*., 2021).

D'un autre côté, plusieurs stratégies sont basées sur la production de biosurfactants ayant une activité superficielle et interfaciale particulière, comme la pseudo-solubilisation assurée par des BS à faible masse moléculaire, la formation d'une mini-capsule de biosurfactants qui couvre la cellule et permet son attachement/détachement des (HA), ou bien en formant une émulsion par les bioémulsifiants à haut poids moléculaire qui augmente la solubilité apparente des particules des (HA) ce qui favorise leur dégradation (Perfumo et *al*., 2010).

3.2.2 Transport transmembranaire

Chez certaines bactéries, les (HA) subissent une dégradation extracellulaire par des oxygénases libérées dans le milieu. D'autres par contre, les dégradent dans le cytoplasme et nécessitent ainsi un transfert transmembranaire. D'après (Hua & Wang, 2014) il existe plusieurs mécanismes qui permettent le transport des (HA) à travers la membrane cellulaire : la diffusion passive qui permet le déplacement des particules selon le gradient de concentration de l'extérieur de la cellule à son intérieur sans énergie et le transport actif ATP-dépendant, qui est inductible, dépendant de la force proton-motrice et assuré par des transporteurs spécifiques comme les protéines membranaires (porines). Il se fait généralement lorsque la concentration des (HA) dans le milieu est faible. Enfin, des inclusions lipidiques peuvent être formés à l'intérieur de la cellule servant de moyens de stockage des (HA) pour une dégradation ultérieure.

3.2.3 Mécanismes de dégradation bactérienne et voies métaboliques impliquées

La biodégradation des (HA) est un processus accompli par les microorganismes grâce à un ensemble d'enzymes catalysant des réactions biochimiques successives qui réduisent les formes complexes des (HA) en forme plus simples et moins toxiques. Deux voies principales sont impliquées : la voie aérobie et la voie anaérobie, précédées par une étape d'activation de

l'hydrocarbure (Das & Chandran, 2011). Il existe aussi un processus qui s'appelle le co-métabolisme qui sera décrit ultérieurement.

3.2.3.1 Dégradation aérobie

Cette voie de dégradation se caractérise par sa rapidité et son rendement énergétique plus élevé liés à la disponibilité d'oxygène comme accepteurs final d'électrons, substrat ou cofacteur enzymatique (Somee et *al*., 2022).

Le processus de dégradation est initié par une étape clé, c'est l'activation de l'hydrocarbure aromatique le rendant ainsi plus réactif, moins hydrophobe et susceptible à la dégradation bactérienne. En aérobiose, il s'agit d'une oxydation par incorporation d'une ou deux molécules d'oxygène dans les (HA) après leur assimilation à l'intérieur de la cellule, ce qui augmente leur solubilité. Elle est assurée par des monooxygénases (comme la P450) ou par un système enzymatique multicomposants formé essentiellement de dioxygénases (Pandolfo et *al*., 2023). La cytochrome P450 monooxygénase est une enzyme produite par plusieurs espèces de champignons, quelques bactéries et cyanobactéries. Les bactéries qui ne possèdent que cette voie enzymatique, peuvent seulement détoxifier les (HA) mais elles sont incapables de les dégrader (figure 9). Elles les transforment en oxydes d'arènes puis en *trans*-dihydrodiols (par l'époxyde-hydrolase) et en phénols (par réarrangement) (Wick et *al*., 2011). Ceci explique l'existence de deux types de bactéries sur sites pollués celles qui tolèrent les hydrocarbures et celles qui les dégradent.

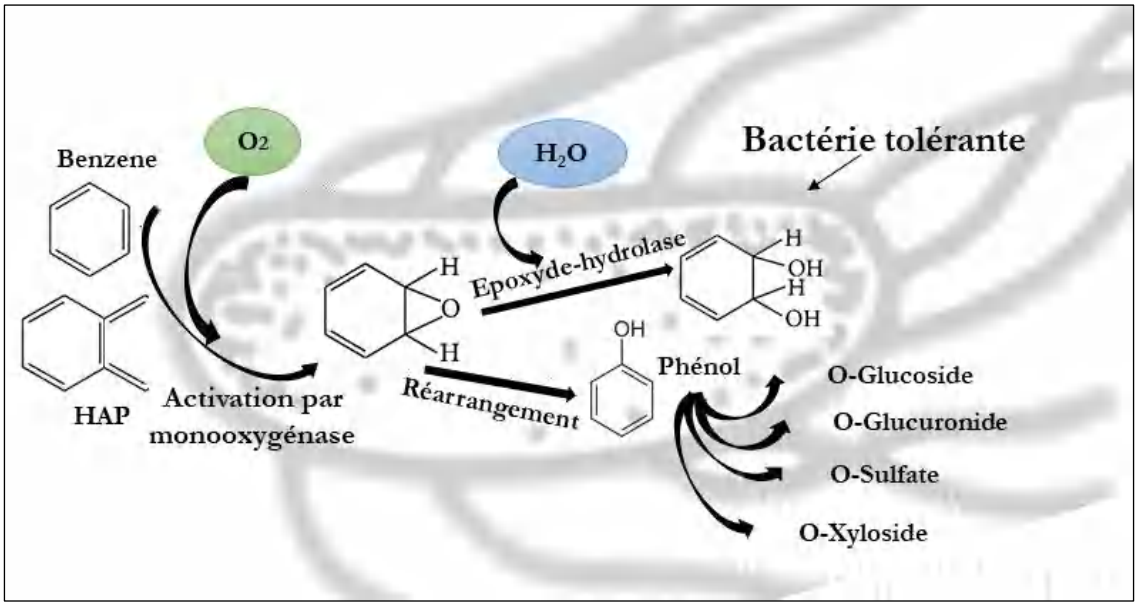


Figure 9. Détoxification des (HA) par la monooxygénase bactérienne (adapté de (Cerniglia, 1993; Das & Chandran, 2011).

De son côté, l'oxydation assurée par le système enzymatique multicomposants, spécifiquement les dioxygénases, se fait à deux niveaux. La première oxydation donne des intermédiaires dihydroxylés (*cis*-dihydrodiols), qui subissent l'action d'une déshydrogénase pour aboutir à des catéchols. Une deuxième oxydation provoque un clivage du noyau aromatique (*méta*- ou *ortho*) produisant ainsi des métabolites qui rejoignent les voies du métabolisme central intermédiaire comme la β-oxydation et le cycle de Krebs (figure 10). Des précurseurs nécessaires aux synthèses de la biomasse cellulaire sont alors fournis (Das & Chandran, 2011). Ces étapes se répètent autant de fois que de nombre de cycles aromatiques du substrat.

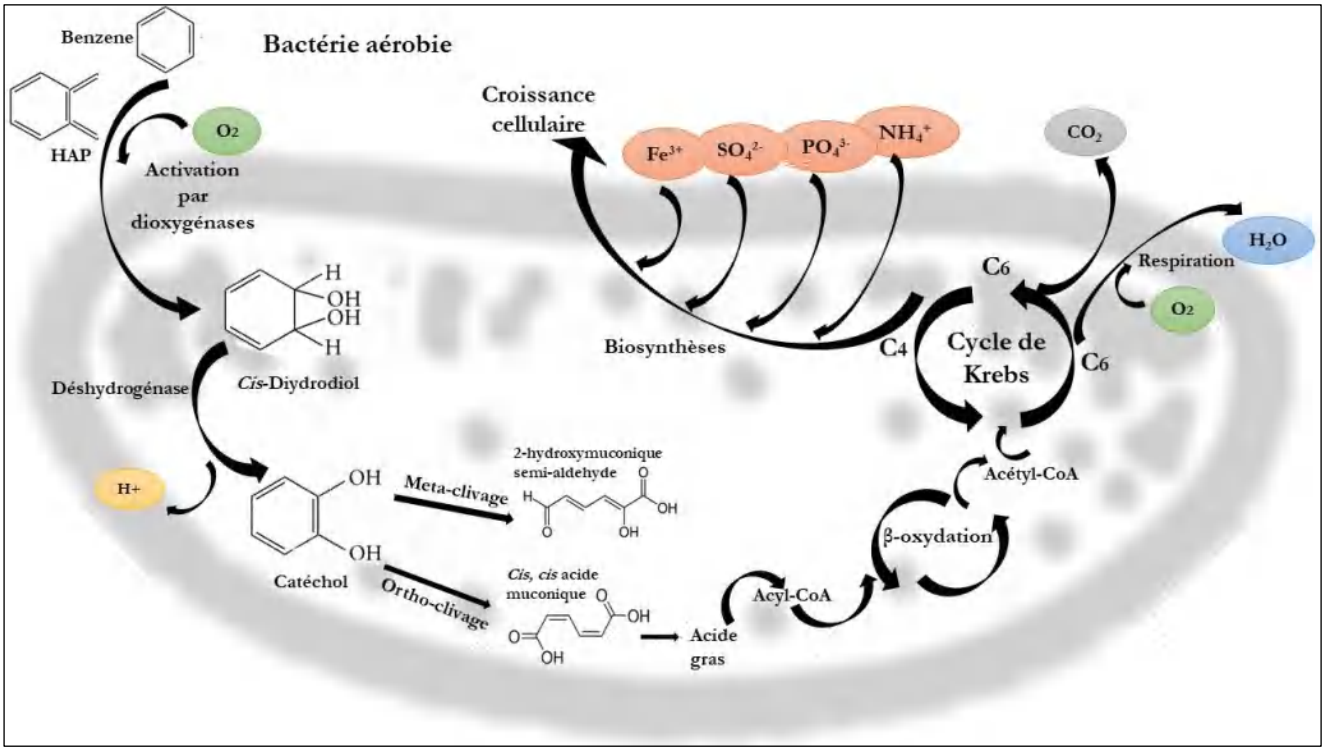


Figure 10. Etapes de la dégradation aérobie des hydrocarbures aromatiques (adapté de (Cerniglia, 1993; Pandolfo et *al*., 2023).

Plusieurs bactéries ont montré leur capacite à utiliser une large gamme des (HA), qui varient dans leur structure chimique et le nombre de cycles aromatiques allant des monoaromatiques aux polyaromatiques. Selon Peng et *al*., (2008), de nombreuses bactéries ayant été cultivées sur différents substrats ont montré la production de dioxygénases classées en fonction de leur spécificité pour ceux-ci, comme par exemple la toluène-dioxygénase (TDO), la naphtalène-dioxygénase (NDO) et la biphényle-dioxygénase (BPDO). Malgré la spécificité de ces enzymes, elles ont exhibé une capacite à transformer plusieurs (HA) : la TDO agit aussi

bien sur les (HA) à un ou deux cycles benzène, la NDO sur les bicycliques et tricycliques et la BPDO par contre, agit sur les polyaromatiques tétracycliques et plus.

3.2.3.2 Dégradation anaérobie

Contrairement aux bactéries aérobies, les bactéries anaérobies ont développé des voies métaboliques spécifiques aux conditions anoxiques. Dans ces environnements, les (HA) ont tendance à persister puisque la dégradation est souvent lente et dépend de la disponibilité d'accepteurs d'électrons et de l'action de plusieurs microorganismes pour une minéralisation complète (Wick et *al*., 2011). Un nombre limité de genres bactériens anaérobies capables de catalyser les réactions de dégradation des (HA) ont été identifiés puisque leur mise en culture constitue un défi.

L'utilisation des cultures mixtes de bactéries dans la dégradation a fait preuve de son efficacité. Plusieurs substrats seront alors utilisés comme oxydants : le sulfate, le nitrate, le chlorate, les ions ferriques et manganiques et le dioxyde de carbone (réduits respectivement en en sulfure, azote, chlorure, ions ferreux et manganeux et en méthane) (Prince & Lessard, 2004). L'activation de l'hydrocarbures peut se faire de plusieurs façons : par un hydroxylation avec de l'eau, un ajout de fumarate ou une carboxylation (Sierra-Garcia & Oliveira, 2013). D'autres réactions peu connues peuvent aussi avoir lieu comme la méthanogenèse inverse (Boll et *al*., 2020).

Parmi les voies métaboliques anaérobies les plus connues, on trouve celle du toluène. Elle est initiée par l'ajout de fumarate par l'enzyme benzyl-succinate synthase qui conduit à la formation du benzyl-succinate. Ensuite, l'action de la benzyl-succinate déshydrogénase donnera du benzoyl-CoA qui va subir une déaromatisation réductrice, un clivage des noyaux benzène, puis une β-oxydation et le cycle de Krebs pour enfin donner du CO_2 (figure 11).

3.2.3.3 Co-métabolisme

Vue la complexité de la structure des (HA), leur dégradation fait appel à une multitude de mécanismes, entre autres celui du co-métabolisme. Dans ce contexte, les hydrocarbures servent de cosubstrats, comme par exemple le toluène qui est souvent utilisé ainsi pour dégrader parallèlement un hydrocarbure récalcitrant (Galazka et *al*., 2018).

En effet, certaines bactéries ont la capacité de à métaboliser simultanément des substrats organiques, dont un seul sera utilisé comme source de carbone et d'énergie. Ceci libère dans la matrice du sol, une variété de métabolites qui sont utilisés par les autres microorganismes permettant ainsi une dégradation séquentielle grâce à différents groupes de microorganismes (Wick et *al*., 2011).

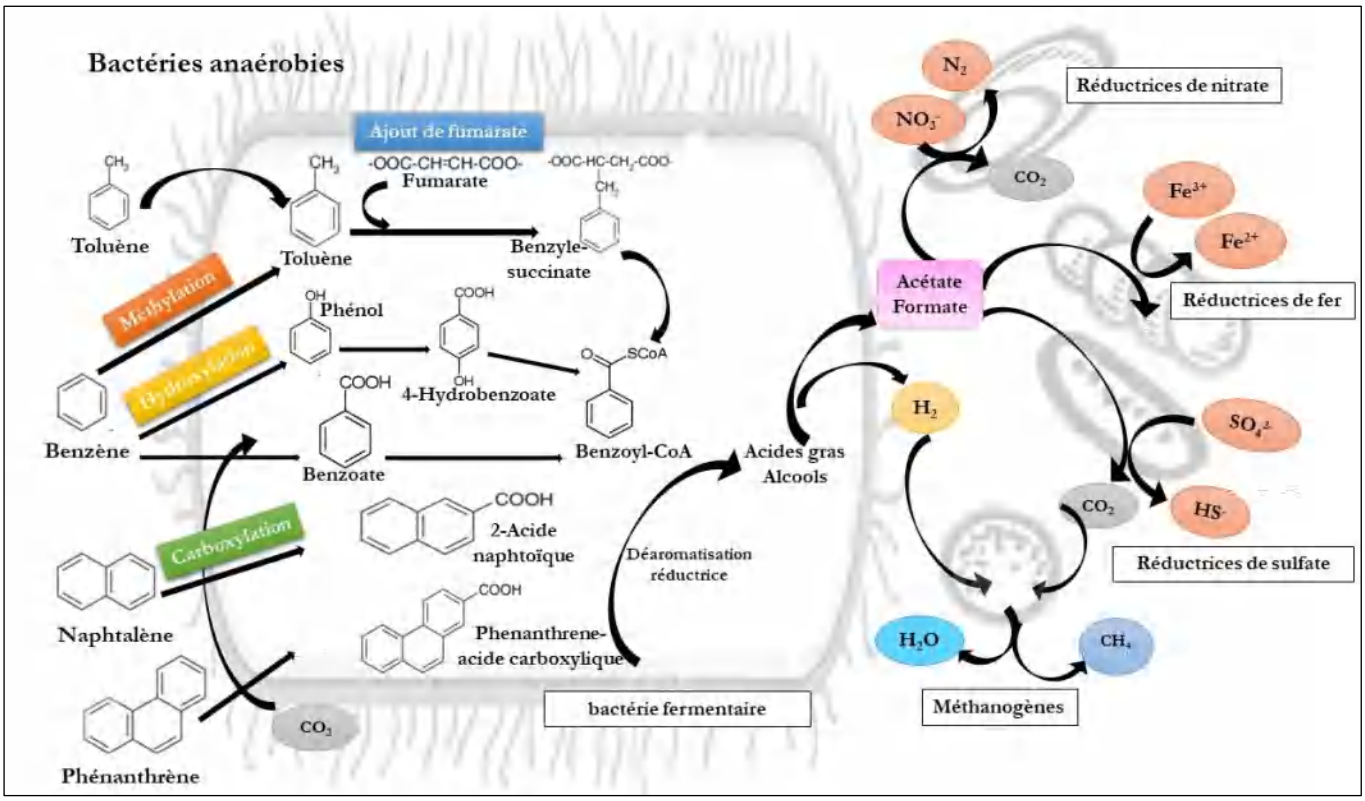


Figure 11. Etapes de la dégradation anaérobie syntrophique de quelques hydrocarbures aromatiques (adapté de : Andreoni & Gianfreda, 2007; Edwards et *al*., 2021; Fowler et *al.*, 2014).

D'un autre côté, la présence simultanée d'(HA) dans le sol peut stimuler de manière plus efficace leur dégradation, c'est aussi une forme de co-métabolisme. Ceci a été prouvé par (Yuan et *al*., 2002) dans leur recherche sur la dégradation de l'acénaphtène, le fluorène, le phénanthrène, l'anthracène et le pyrène, ce qui peut être du a la disponibilité de sources de carbone variées, ou bien par l'acclimatation croisée comme mode d'adaptation (Haritash & Kaushik, 2009).

3.3 Facteurs influençant la dégradation les hydrocarbures aromatiques

En général, les mécanismes, la vitesse et l'étendue de la biodégradation d'un hydrocarbure sont déterminés par plusieurs facteurs essentiels notamment, des facteurs biotiques et abiotiques

3.3.1 Influence de la structure, la diversité des populations bactériennes et leurs interactions

Comme tout écosystème, le sol pollué abrite une flore totale se composant de microorganismes autochtones et allochtones. La première flore est très stable dû à sa forte

adaptation physiologique, s'impliquant ainsi dans la minéralisation des polluants, la flore allochtone est cependant transitoire, incapable de résister aux conditions stressantes.

Sous l'effet d'une pollution, la communauté microbienne subit une restructuration ou les espèces les plus sensibles disparaissent immédiatement, alors que celles adaptées, se développent et deviennent plus abondantes en nombre. Une diminution de la richesse et la diversité microbienne est alors observée.

Plusieurs études des sites anciennement pollues aux HC, ont montré que les bactéries dégradantes sont distribuées dans les groupes taxonomiques suivant en ordre décroissant : *Chlamydiae, Elusimicrobia, Thermi, Cyanobacteria, Verrucomicrobia, Chloroflexi, Acidobacteria, Gemmatimonadetes, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes,* et *Proteobacteria.*

Par ailleurs, pour une minéralisation efficace et totale des HC, il faut l'intervention de groupes microbiens chacun avec son pouvoir catabolique, puisqu'un seul candidat ne peut dégrader qu'un nombre limité de substrats. Ceci témoigne d'un type d'interaction positive entre les populations microbiennes (interspécifique), ou au sein d'une même population (intraspécifique), c'est la synergie, qui améliore le taux de dégradation des polluants.

Cependant, il existe aussi des interactions concurrentielles négatives, ou certains microorganismes peuvent libérer des substances qui inhibent la croissance et le développement d'autres espèces bactériennes dégradantes d'hydrocarbures ce qui conduit au ralentissement de la vitesse de dégradation (Kebede et *al*., 2021).

3.3.2 Influence du potentiel génétique des bactéries

Un sol non contaminé abrite des bactéries telluriques qui n'ont pas toutes les capacités cataboliques requises pour la dégradation des hydrocabrures. Une fois la contamination se produit, une pression de sélection s'exerce et les bactéries qualifiées de 'zymogènes' c'est-à-dire aptes à synthétiser les enzymes cataboliques, réagissent rapidement. Certaines possèdent les gènes des voies métaboliques mais qui ne s'expriment pas et du fait d'une mutation ou d'un réarrangement de bases nucléotidiques, ces gènes s'activent. Celles qui ne tolèrent, ni dégradent les (HA) vont acquérir par transfert génétique, les gènes qui codant pour les enzymes dégradatives, sinon elles seront éliminées (Al-Kaabi et *al*., 2022). En général, les gènes de dégradation des (HA) se situent sur les plasmides (Peng et *al*., 2008)

En outre, les gènes codant pour les différentes enzymes dégradantes ont été identifiés par plusieurs recherches scientifiques. L'étude récente de (Pandolfo et *al.*, 2023) a classe les gènes qui régulent tous le métabolisme aérobie des (HA) comme suit :

a) Les gènes codant les dioxygénases et les monooxygénases impliquées dans les voies métaboliques périphériques, qui activent les (HA), puis les transforment en catéchol : *bphAa, bphC, benA, pobA, carAa, antA, nahAa, nahAb, nahC, nagG, poxA, bAa, nidA, phdF, pht3, phtAa, tphA2, cmtAb, cmtC, hcaE*, et *mhpB.*

b) Les gènes des voies centrales tels que : *catAE, pcaG, ligA, hmgA, chqB, badA*, et les gènes *box ABCD* qui codent pour des enzymes transformant le catéchol en intermédiaires de la β-oxydation et du cycle de Krebs.

Andreoni & Gianfreda, (2007), ont recensé dans leur article de synthèse, les gènes qui codent pour les monooxygénases et les dioxygénases. Ces enzymes qui diffèrent par leur structure, leur mécanisme d'action et leurs cofacteurs, s'impliquent fortement dans la dégradation des (HAP) et des (BETX) particulièrement par la voie aérobie. Ils ont cité les suivants :

a) Les gènes portés par les gros plasmides NAH, autotransmissibles, codant pour la première oxygénation du naphtalène : gènes (*ndo)* de *P. putida* NCIB9816, (*nah)* de *P. putida* G7 et NCIB 9816-4, gènes (*dox)* dérivés de *Pseudomonas* sp., gènes (C18) et (*pah)* de *P. putida* OUS82 et *P. aeruginosa* PaK1 respectivement.

b) Les gènes codant pour les monooxygénases : par exemple les gènes (*tmo)* chez *Pseudomonas mendocina* KR1 et gènes (*tbm)* chez *Pseudomonas* sp. souche JS150, (*phh)* de *Pseudomonas putida* P35X, (*dmp)* de *P. putida* CF600) et (*xyl)* chez *P. putida* mt-2.

c) Les gènes qui codent pour des enzymes assurent les premières étapes de dégradation de phénanthrène et naphtalène chez des bactéries à Gram négatif autres que *Pseudomonas* et celles à Gram positif, comme : les gènes (*phd)* de *Comamonas testosteroni* souche GZ39, (*nag)* de *Ralstonia* sp. U2, (*phn)* de *Burkholderia* sp. RP007, *Alcaligenes faecalis* AFK2 et *Sphingomonas aromaticovorans* 177.

d) Les gènes (*nar)* et (*phd)* ont été identifiés chez la souche *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 et chez *Nocardioides* sp. KP7 respectivement. Le gène (*nid)* qui code une nouvelle dioxygénase pouvant minéraliser le pyrène, le 1-nitropyrène, le phénanthrène, l'anthracène, le fluoranthène et le benzo(α)pyrène, chez *Mycobacterium* sp. PYR-1.

e) Les gènes qui codent pour les dioxygénases qui s'attaquent au biphényle et aux HAM chez des bactéries à Gram négatif et à Gram positif, comme les gènes (*tod, bed, ipb, tcb* et *bph)* pour la dégradation de toluène, benzène, isopropylbenzène, chlorobenzène et biphényle respectivement.

f) Enfin, une famille de gènes variés, qui se trouvent principalement sur des plasmides, codant un groupe d'enzymes (catéchol 2,3-dioxygénase) responsables du clivage des cycles aromatiques de plusieurs (HA).

Pour les gènes qui régulent le métabolisme anaérobie, les mêmes auteurs ont cité le (*bssA)*, associé à la première étape de la dégradation anaérobie du toluène et du xylène chez les souches *Thauera aromatica* et *Azoarcus* sp.

3.3.3 Influence des facteurs physicochimiques du milieu

Il est important de tenir compte de l'influence des facteurs abiotiques, qui sont perturbés par la présence de polluants organiques et constituent de ce fait une source de variation des conditions de vie et de la capacite métabolique des bactéries créant ainsi des changements au niveau de la structure des communautés microbiennes dans ces sites.

3.3.3.1 Texture du sol

Le rôle que joue la texture du sol est crucial dans sa richesse en eau et en matière organique native. En générale, ces deux ont tendance à se fixer sur les particules de sol fines comme l'argile, plutôt qu'aux grosses particules comme le sable (El-kamali et *al*., 2017).

Les hydrocarbures aussi s'adsorbent fortement à l'argile et au limon (Łyszczarz et *al*., 2021), mais les agrégats formés dans un sol argileux sont stables et riches en carbone, en azote, et en enzymes aussi, ce qui facilite le travail des bactéries de dégradation lors d'une contamination. Tandis que les sols sableux ont une texture particulaire grossière, qui a tendance à s'appauvrir ce qui rend les conditions moins favorables à la biodégradation.

3.3.3.2 Matière organique du sol

La matière organique du sol est formée de (58%) de carbone organique en moyenne. Le stock du sol en C organique évolue selon l'équilibre entre la minéralisation et l'apport en matière organique fraiche (plantes et animaux morts) (CAO-LR, 2011). Le microbiote tellurique génère l'énergie nécessaire pour dégrader les hydrocarbures par l'oxydation de matière organique native du sol fournissant des substrats facilement assimilables comme le glucose, les acides aminés…etc . Cependant, le déséquilibre dans la balance, provoqué par l'apport excessif de polluants organiques, va réduire la biomasse puisque la décomposition bactérienne sera partiellement inhibée par une forte toxicité des HC (Mykhailova et *al*., 2018). Seule la flore capable d'utiliser le polluant comme source de carbone et d'énergie pourra alors croitre. Toutefois, cette flore va affronter un autre souci : puisque les (HA) peuvent aussi altérer la structure de la matière organique humique en se fixant sur ses particules et en s'accumulant

dans le sol. Par conséquent, le carbone organique disponible dans le sol sera épuisé et les polluants vont persister pour longtemps.

3.3.3.3 Eléments nutritifs

Généralement, les polluants organiques en concentrations excessives ont tendance à fixer les nutriments qui se trouvent dans le sol, ce qui conduit à son appauvrissement ainsi qu'au déséquilibre des interactions entre les communautés microbiennes telluriques. Ça conduit à une compétition entre les microorganismes sur les sources.

La disponibilité des nutriments est importante pour la croissance bactérienne et la formation de la biomasse cellulaire, ainsi que leur rôle comme accepteur final d'électrons dans la dégradation de certains hydrocarbures (Truskewycz et *al*., 2019).

La concentration de phosphore et d'azote par exemple, est un facteur limitant l'activité enzymatique. Plusieurs recherches ont prouvé que l'addition de fertiliseurs N-P-K au sol pollué accélère la biodégradation des hydrocarbures (Leahy & Colwell, 1990).

3.3.3.4 Eau et oxygène

Les propriétés physiques qui sont essentielle dans l'architecture du sol, comme la porosité et la perméabilité sont affectées par la présence d'hydrocarbures réduisant ainsi le mouvement de l'eau et augmentant la capacite du sol à le retenir. La saturation des pores du sol aura aussi un impact sur l'infiltration d'eau ainsi que l'aération du sol, ce qui augmente sa densité apparente, il sera alors compact, imperméable et de plus en plus anoxique (Klamerus-Iwan et *al*., 2015). L'importance de l'eau du sol pour les bactéries dégradantes réside dans le fait qu'elle soit incluse dans toutes les réactions cellulaires vitales et elle constitue le milieu d'échange entre les différentes bactéries et entre chacune et son environnement. Son manque aura un effet négatif sur le nombre et la diversité des flores microbiennes (Truskewycz et *al*., 2019).

De son côté, l'oxygène est nécessaire pour l'activité enzymatique des oxygénases, qui sont les enzymes clés du catabolisme aérobie des (HA). Son épuisement du milieu va freiner les réactions enzymatiques voir les arrêter et de nouvelles conditions vont s'installer dans le milieu qui devient alors anaérobie, favorisant les microorganismes qui disposent des voies cataboliques en question, conduisant à une faible efficacité d'élimination (Kebede et *al*., 2021).

3.3.3.5 Salinité

La forte concentration des hydrocarbures dans le sol engendre sa salinisation ce qui va altérer l'équilibre osmotique entre la cellule bactérienne et son milieu, conduisant à la perte de

l'eau cellulaire et la réduction de la disponibilité et la solubilité des substrats organiques dans le sol. Les conditions deviennent alors défavorables pour l'activité bactérienne en générale. Seules les bactéries halophiles seront aptes à croitre dans ces conditions et à métaboliser les (HA). C'est le cas par exemple des espèces des genres *Halomonas* sp., *Dietzia* sp. (Truskewycz et *al*., 2019).

3.3.3.6 Température

La vitesse de biodégradation d'un produit pétrolier est très faible à basses températures. Des valeurs ambiantes vont alors améliorer cette vitesse, tandis que des valeurs très élevées réduisent l'activité catabolique (Leahy & Colwell, 1990). En effet, à des températures dépassant les 40 °C, le métabolisme des bactéries aérobies diminue à cause de la diminution de la solubilité de l'oxygène et la diminution de la résistance membranaire face à la toxicité des hydrocarbures. Inversement, lorsque les températures sont très basses, l'hydrocarbure devient visqueux et moins soluble et les fractions légères seront moins volatiles ce qui va réduire le taux de sa dégradation (Kebede et *al*., 2021).

3.3.3.7 Potentiel hydrogène

La neutralité du pH du sol est un paramètre très important dans l'activité enzymatique. La majorité des bactéries sont active dans la gamme des pH neutres, malgré l'adaptation de certaines espèces au valeur extrêmes d'acidité et d'alcalinité (Leahy & Colwell, 1990).

Le changement de pH du sol suite à un déversement d'hydrocarbures peut se faire de différentes manières. Dans certains cas, il a été trouvé qu'en présence d'hydrocarbures les valeurs du pH sont alcalines, comme indiqué par (Wang et *al*., 2013), cela pourrait être le résultat de la salinisation et de l'accumulation de bases échangeables (comme Ca2+, Na+).

L'étude de Ahmadi et *al*., (2021) a montré le contraire, le pH baisse et devient acide ce qui revient à l'accumulation des composants acides retrouvés dans le pétrole brut (soufre, azote et métaux lourds). Ceci laisse supposer que les valeurs de pH dépendent de la concentration et le type de l'hydrocarbure, de la capacite tampon du sol, de la salinité etc.

3.3.4 Influence des propriétés de l'hydrocarbure

Selon Leahy & Colwell, (1990a), les caractéristiques propres aux hydrocabrures ont un effet sur la vitesse de leur biodégradabilité comme : la structure et composition chimique (les aromatiques légers plus sensibles que les aromatiques lourds) et l' hétérogénéité et l'impureté (la richesse en soufre ou résine par exemple freine le dégradation), la concentration (de fortes

concentrations inhibent les réactions métaboliques) ainsi que l'état physique des hydrocarbures (la phase dispersée ou émulsionnée est plus dégradable qu'une phase continue).

Kapellos, (2017) explique que l'état physique des hydrocarbures détermine l'aire interfaciale pour la dissolution microbienne. Cette aire est d'autant plus large lorsque les bactéries synthétisent les biosurfactants, qui ont pour rôle de réduire la (TS) de la phase huileuse et l'émulsifier. En plus la solubilité, la densité et la viscosité des hydrocarbures sont des caractères très importants dans l'efficacité de la biodégradation.

3.4 Exploitation du pouvoir dégradatif des bactéries dans la bioremédiation des sols

La bioremediation est une approche prometteuse, basée sur le pouvoir dégradatif des microorganismes vis-à-vis une variété de produits polluants entre autres les HA, permettant de combattre la pollution environnementale. L'emploie de souches bactériennes indigènes seules ou en consortium dans ce procédé permet d'éliminer les polluants de manière plus efficace à cause de la remarquable adaptation de ces dernières aux conditions locales des sites, même aux plus extrêmes (Al-Kaabi et al., 2022). Cependant, plusieurs défis sont associés à ces méthodes de dépollution, certains sont liés aux interactions négatives au sein du consortium qui peuvent freiner l'activité bacteriénne, d'autres au faible pouvoir adaptatif face à l'émergence continue des polluants avec l'industrialisation rapide sans qu'il n'y soit de cadres réglementaires qui protègent l'environnement et les espèces sensibles. En effet, chaque écosystème est unique et la compréhension des spécificités des sites pollués permet d'accomplir cette approche avec succès. De ce fait, un certain nombre de critères doivent être remplis pour une bioremediation efficace comme l'existence de microorganismes spécialisés, la non-toxicité des sous-produits issus de la dégradation des substances polluantes, l'absence d'inhibiteurs chimiques, la biodisponibilité des polluants ainsi que le cout de ces opérations qui ne doit pas être excessif (Andreoni & Gianfreda, 2007).

Avant, la bioremédiation été essentiellement basée sur la bioaugmentation et la biostimulation qui consistaient à introduire des microorganismes dépolluants à l'écosystème à assainir, ou à stimuler la flore indigène par des additions d'éléments nutritifs pour améliorer leur rendement. Alors qu'actuellement, de nouvelles voies de recherches ont permis de développer des approches novatrices comme la remédiation électrocinétique, la vermiremédiation, la remédiation assistée par biocatalyseurs et la nanoremédiation (Shahsavari et al., 2019). Néanmoins, l'utilisation de systèmes de culture cellulaire mixte (bactéries, bactéries-fungi, bactéries-algues), le lavage avec des biosurfactants et les techniques transgéniques ont toujours leur importance primordiale dans l'atténuation des polluants complexes (Kuppusamy et al., 2017).

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

4. BIOSURFACTANTS/BIOEMULSIFIANTS BACTERIENS : DES MOLECULES HAUTEMENT DYNAMIQUES CONTRIBUANT A LA BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES AROMATIQUES

4. BIOSURFACTANTS/BIOEMULSIFIANTS BACTERIENS : DES MOLECULES HAUTEMENT DYNAMIQUES CONTRIBUANT A LA BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES AROMATIQUES

Les bactéries interagissent de différentes manières avec toute sorte de surfaces, d'interfaces et de substrats dans leur milieu. En réponse à des exigences nutritionnelles, sur des substrats peu solubles, certaines bactéries ont développé des mécanismes d'adaptation physiologique qui leur permettent de les assimiler pour une éventuelle dégradation intracellulaire (Perfumo et *al*., 2010). C'est le cas notamment de la synthèse des biosurfactants (Bs) ou de bioémulsifiants (Be) bactériens. Il s'agit de biomolécules libérées dans le milieu ou attachées à la surface cellulaire, permettant ainsi le contact entre la cellule bactérienne et le substrat hydrophobe comme les (HA).

4.1 Nature chimique et propriétés de surface

Les biosurfactants sont des molécules ayant une structure polaire (ou amphotère) : une tête hydrophile et une queue hydrophobe (Sałek & Euston, 2019). Cela les aide à occuper l'interface entre deux phases liquides non miscibles. Elles ont la capacite d'induire des perturbations dans les forces qui maintiennent les deux phases à l'équilibre (séparées) en réduisant leur (TS) ou (TIF) ce qui donne une émulsion (Perfumo et *al*., 2010).

Les bioémulsifiants, quant à eux, sont aussi de nature amphotère, mais n'ayant pas cette caractéristique de réduire la (TS). Ça constitue une méthode utile de distinction entre les deux (Uzoigwe et *al*., 2015). Ils peuvent agir comme agents émulsifiants et stabilisateurs d'émulsion en se liant fortement aux hydrocarbures dispersés sous forme de gouttelettes empêchant ainsi leur coalescence (Ferreira et *al*., 2020).

Dans la littérature scientifique, il a été montré qu'un quart des Bs/Be caractérisés à nos jours se compose en majorité de glucides (mono ou oligosaccharides) ou de lipides en pourcentages respectives de 24,8 % et 23,8 %. Les polysaccharides, les acides aminés/peptides et les protéines sont les constituants mineurs avec des pourcentages respectifs de : 13,4%, 9,9% et 15,8%. Ils peuvent contenir aussi des acides gras ou des dérivés alkylés 8,9%, ainsi que des constituants inconnus 3,5% (Markande et *al*., 2021).

4.2 Classification des Bs/Be quelques bactéries productrices

Les molécules à activité de surface sont classées selon leur poids moléculaire en deux groupes : ceux à faible poids moléculaire et ceux ayant un poids moléculaire élevé. Leur nature chimique les divise plutôt en : glycolipides, (rhamnolipides, sophrolipides, tréhalolipides) ou des lipopeptides (surfactine, iturine) (Uzoigwe et *al*., 2015).

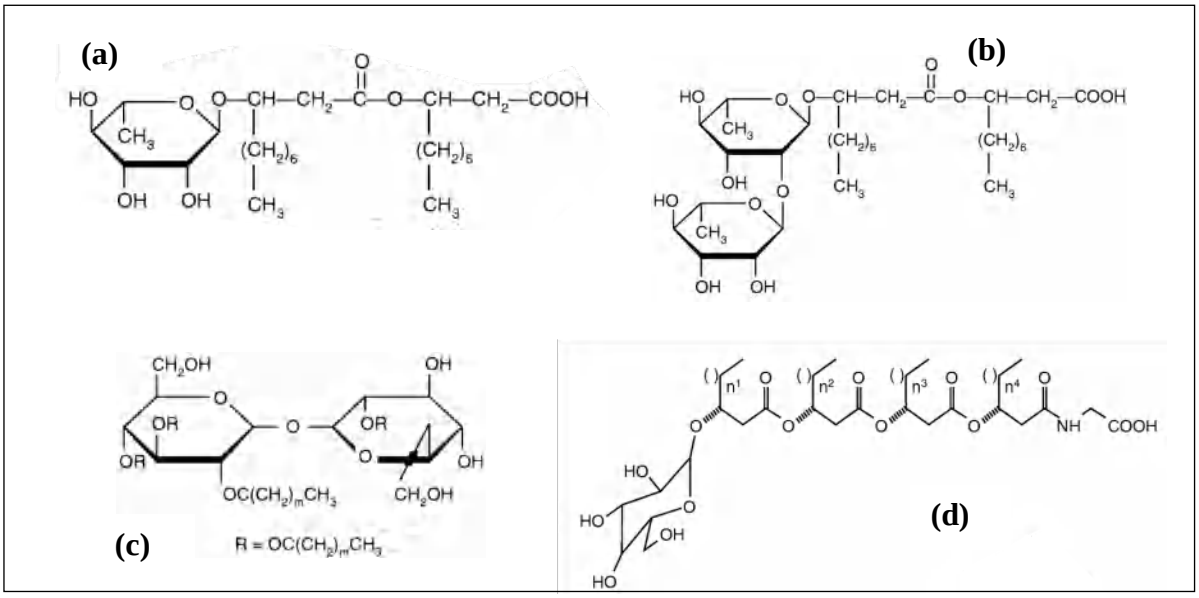


Figure 12. Quelques exemples de structure chimique de biosurfactants : Mono-rhamnolipide (a), Di-rhamnolipide (b), Tréhalose-tétraester (c), Glycolipide (d) (adaptée de Perfumo et *al*., 2010).

Les bioémulsifiants, aussi appelés biopolymères ou exopolysaccharides (EPS), sont habituellement des protéines ou des polysaccharides dans des mélanges complexes (Sałek & Euston, 2019). Certaines espèces utilisent des acides gras, des lipides neutres et des phospholipides, d'autres libèrent des vésicules particulières ou utilisent les fimbriae comme biosurfactants (Rahman & Sekhon Randhawa, 2015).

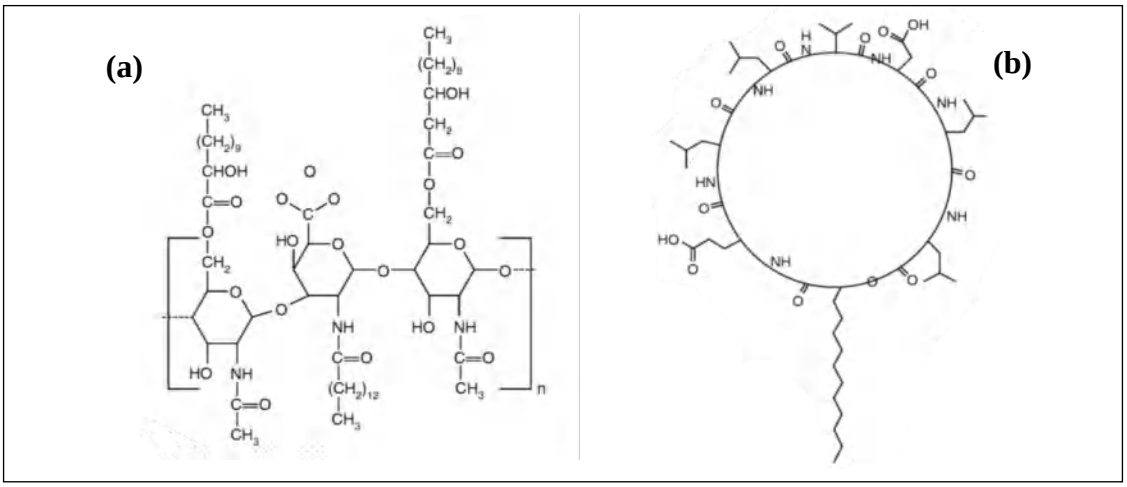


Figure 13. Quelques exemples de structure chimique de bioémulsifiants : Surfactine (a), Emulsane (b). (adaptée de Perfumo et *al*., 2010).

Tableau 5. Quelques exemples d'espèces bactériennes et de leur molécules produites Bs/Be (Pardhi et *al*., 2022)**.**

Biosurfactants	**Bactéries**
***Pseudomonas* sp.**	
Lipopeptide	*Pseudomonas guguanensis D30*
Rhamnolipides	*Pseudomonas aeruginosa OG1*
Polymérique	*Pseudomonas stutzeri*
***Bacillus* sp.**	
Iturine	*Bacillus subtilis*
Phospholipides	*Bacillus sphaericus EN3,*
Lipopeptide	*Bacillus subtilis*
Surfactine	*Bacillus subtilis*
Other genera	
Trehalose-2,3,4,2'-tetraester	*Bordetella hinzii-DAFI*
Phospholipides	*Klebsiella pneumoniae IVN51*
Glycolipides	*Ochrobactrum anthropi HM-1,*
Polymérique	*Serratia marcescens UCP 1549*
Lipopeptides	*Virgibacillus salarius*
Exopolysaccharides (EPS)	*Gordonia polyisoprenivorans CCT 7137*
Rhamnolipides	*Burkholderia thailandensis*
Bioemulsane	*Gordonia sp. BS29*

4.3 Rôles naturels des Bs/Be

Selon (Ron & Rosenberg, 2001), la diversité structural des biosurfactants leur permet de jouer plusieurs rôles physiologiques et écologiques propres à chacun et qu'on ne peut pas trouver chez tous les microorganismes au même temps. Ils sont résumés comme suit :

a) Augmentation de la surface des substrats hydrophobes insolubles en augmentant l'aire de contact entre les cellules et la phase huileuse par émulsification de celle-ci.

b) Accroître la biodisponibilité des substrats hydrophobes insolubles dans l'eau en favorisant leur solubilisation et leur dispersion dans la phase aqueuse.

c) Fixation des métaux lourds, en formant des complexes qui permettent leur élimination.

d) Facteurs de virulence qui contribuent à la pathogénicité du microorganisme par invasion et multiplication chez l'hôte.

e) Activité antimicrobienne, via la libération de ces molécules dans le milieu et leur action inhibitrice contre les autres microorganismes

f) Attachement et détachement des surface en conférant aux cellules une flexibilité dans l'hydrophobicité de leur surface

g) Formation de biofilms et leur suppression.

4.4 Participation des Bs/Be bactériens dans la dégradation des (HA)

Les cellules microbiennes sont des entités dynamiques qui contrôlent le mécanisme d'accès aux (HA) hydrophobes et leur assimilation (Abbasnezhad et *al*., 2011). Plusieurs d'entre elles peuvent produire des Be polymériques, attachés à la surface cellulaire ou libérés modifiant ainsi ses propriétés afin d'établir une connexion hydrophobe directe avec le substrat (Perfumo et *al*., 2010). Ceci permettra à la cellule de se déplacer de la phase aqueuse à la grande phase huileuse (Krasowska & Sigler, 2014) suivant une réponse chimiotactique (Balseiro-romero et *al*., 2018) ou à utiliser des particules d'hydrocarbures dissoutes dans l'eau grâce à des enzymes extracellulaires (Karlapudi et *al*., 2018).

Malgré cela, l'adhésion cellulaire reste inutile pour certains microorganismes, en particulier ceux qui produisent les Bs (Abbasnezhad et *al*., 2011). Ces molécules permettent la formation d'une pseudo-solubilisation des hydrocarbures (Uzoigwe et *al*., 2015). Les micelles formées sont ensuite emballées à la surface hydrophobe de la cellule et le (HA) est transféré à son cytoplasme pour la dégradation (Khanafer et *al*., 2017). En parallèle, un rôle crucial que jouent aussi bien les Bs que les Be, consiste à former une émulsion d'huile dans l'eau qui signifie selon Santos et *al*., (2016) « un système hétérogène constitué d'un liquide non miscible dispersé dans un autre liquide sous forme de gouttelettes dont le diamètre dépasse généralement 0,1 mm ». La taille des gouttelettes d'huile émulsionnées est un facteur important, qui est inversement proportionnel à l'interface entre l'eau et le (HA), ce qui accroît l'efficacité de la biodégradation (Brakstad et *al*., 2015).

Après l'absorption, vient l'étape suivante qui est la dégradation intracellulaire. Il ne faut pas oublier que la mission première des bactéries dans ces conditions hostiles n'est pas l'assainissement de l'environnement, mais plutôt l'utilisation de polluants non disponibles en tant que source unique d'énergie et de carbone, permettant ainsi leur croissance et leur survie et soutenant davantage le micro-organisme (Maletic et *al*., 2013).

4.5 Production des Bs/Be bactériens et *Quorum-sensing*

D'après la littérature, la production de Bs, débute avec la phase stationnaire de la croissance bactérienne. Il s'agit donc de métabolites secondaires dont la synthèse est régit pas des signaux moléculaires visant à mobiliser un nombre important de bactéries. C'est ce qu'on appelle le *Quorum-sensing* (Qs). Il a été trouvé que la biodégradation bactérienne des HC en générale, est améliorée par l'expression des gènes codant pour les molécules du Qs.

En effet, la production des molécules tensioactives et émulsifiantes, permettant l'accès au sources hydrophobes est un processus qui nécessite une densité cellulaire importante, témoignant d'un travail coopératif entre les résidents d'une même niche. Le signal moléculaire produit et émis (autoinducteurs) va susciter une réponse de la part de plusieurs flores coexistant sous les mêmes conditions de pollution, ce qui va améliorer l'atténuation naturelle des polluants dans ce site (Mangwani et *al.*, 2017).

Selon Ron & Rosenberg, (2002), ce mécanisme s'applique à la synthèse des Bs comme aux Be, puisque l'émulsification dépend aussi de la densité cellulaire proportionnelle à la concentration des molécules du Be produites. Il est également responsable de la régulation d'un certain nombre de processus très importants dans la dégradation des HC comme : la mobilité, la formation de biofilm, la production d'EPS, de facteurs de virulence, l'expression des gènes cataboliques ainsi que le transfert horizontal des gènes.

4.6 Techniques d'étude des bactéries productrices des Bs/Be

Dans le contexte de la pollution des sols, plusieurs approches peuvent être suivies pour la caractérisation de bactéries telluriques impliquées dans la dégradation des (HA) et la production de Bs/Be, permettant chacune la compréhension d'aspects spécifiques qu'il faut combiner pour une meilleure connaissance de la diversité de ces écosystèmes qualifiés d'extrêmes. Mais le choix peut se heurter à la disponibilité limitée des ressources, aux aléas de l'expérimentation au laboratoire ainsi qu'aux limites imposées par les techniques utilisées.

4.6.1 Approche conventionnelle

Il s'agit là d'étudier l'aspect phénotypique de ces bactéries à travers l'emploie de techniques classiques de mise en culture et la panoplie de tests de caractérisation de la morphologie, la physiologie, l'écologie, la chimiotaxinomie... ainsi que l'observation de l'activité de surface et d'émulsification des biomolécules synthétisées par ces bactéries. Il peut aussi être question de suivre la dégradation d'un substrat hydrocarboné *in vitro*, pour l'étude de l'activité métabolique bactérienne. De ce fait, cette approche est considérée très enrichissante en

termes de connaissances, puisqu'elle nous permet de découvrir ces bactéries de près, et d'exploiter leur potentiel pour des productions de molécules d'intérêt vaste.

Toutefois, malgré les avantages que présente l'étude de l'aspect phénotypique, le progrès de la technologie ne fait que confirmer l'ampleur des lacunes cumulées dans notre compréhension des résidents bactériens de ces niches écologiques. En effet, les scientifiques suggèrent que <10% des phylums bactériens comportent des représentants cultivables (Prince et *al*., 2019), c'est-à-dire que >90% des bactéries sont non cultivables, ce qui constitue un obstacle devant notre conception du métabolisme bactériens. Il faut alors, développer cet aspect de culture par de nouvelles techniques innovantes, afin d'explorer la partie de l'iceberg immergée.

4.6.2 Approche moléculaire et métagénomique

Les recherches menées par Carl Woese dans les années 90, ont ouvert la porte vers la découverte de l'ancienne structure du monde procaryote, en cherchant les liens de parenté et en retraçant l'histoire évolutive des taxons actuels, par analyse des gènes ribosomaux, particulièrement l'ADNr*16s*, considérés comme des chronomètres moléculaires. Depuis ce temps, d'importants progrès dans les études de la diversité bactérienne des écosystèmes pollués ont vu le jours. Par exemple, les bactéries *Alcanivorax* et *Cycloclasticus,* considérées actuellement comme les plus dominantes et actives dans la dégradation, n'ont pas détectées que récemment (Prince et *al*., 2019). Plusieurs techniques moléculaires ont servi à l'identification bactérienne et à la richesse des Bases de données avec les séquences nucléotidiques. Ces techniques vont de l'extraction des acides nucléiques et leur purification, à l'amplification des gènes d'ARNr 16S par PCR et leur séquençage, aux empreintes moléculaires (fingerprinting), ainsi que la métagenomique, qui analyse d'ADN total du sol permettant ainsi une vision globale des communautés microbiennes ainsi que la détection de nouveau gènes, de la dégradation ou bien de la production.

D'autres techniques plus sophistiquées, permettant d'avoir en peu de temps une quantité énorme d'information à traiter sur les séquences, il s'agit de techniques de séquençage à haut débit. Permettant de réduire le temps du test.

Cependant, même ces techniques se trouvent limitées par un certain nombre de facteurs, par exemple : la conservation des gènes au sein d'une même espèce, rendant difficile l'identification et la distinction des individus, le transfert horizontal des gènes comme ceux de la dégradation des (HA) portés souvent sur des plasmides transmissibles, il peut même y a voir un passage de ces genres vers des taxons éloignées occupât le même sol.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

PREFACE

Ce travail de recherche qui prospecte l'existence d'une vie microbienne dans des écosystèmes hautement pollués, est réalisé sur des sols de parcs industriels dans deux régions algériennes, caractérisées par des conditions écoclimatiques différentes.

La première zone se trouve à Skikda, une ville littorale méditerranéenne et la deuxième est située à Ouargla, qui est une ville saharienne.

L'étude de la diversité bactérienne du sol pollué s'est basée sur la technique classique de mise en culture ciblant la flore aérobie cultivable dominant ces écosystèmes. Des méthodes conventionnelles ont été employées pour caractériser les isolats bactériens d'un point de vue phénotypique. Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire (BMC) de l'Université des Frères Mentouri Constantine 1

Les échantillons de sol ont fait l'objet d'une analyse chimique des hydrocarbures aromatiques par spectroscopie UV. Ceci a été fait au sein du laboratoire de Chimie des matériaux de la même Université.

L'identification moléculaire de quelques souches isolées via le séquençage des ADN*r 16S* après amplification en chaine d'un fragment de ce gène a été effectuée dans l'institut d'écologie et des sciences de l'environnement (IEES-Paris).

Une partie de ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue « *Archives of Microbiology* ».

Guergouri I et *al*. 2022. Identification of cultivable bacterial strains producing biosurfactants/bioemulsifiers isolated from an Algerian oil refinery. *Arch Microbiol*.; 204(10):649. DOI: 10.1007/s00203-022-03265-2. PMID: 36171503

1. ECHANTILLONNAGE

1.1 Présentation des zones étudiés

1.1.1 Raffinerie de Skikda (RA1K)

Elle compte parmi les plus grandes raffineries de pétrole africaines. Elle est située à l'Est de la région, à 7 Km du centre de la ville et à 2 Km de la mer et occupe une superficie de 1200 ha (Tahar et *al*., 2021) (Figure 14).

Les échantillons de sol proviennent de l'une de ses unités : le complexe de transport des hydrocarbures par canalisation (RTE) (36°51'16.7"N 6°57'40.1"E), qui constitue un parc accueillant de nombreuses citernes de stockage de pétrole mis en service depuis 1972.

Selon la base de données mondiale harmonisée sur les sols (FAO-Unesco, 1977), ainsi que l'atlas des sols d'Afrique (Jones et *al*., 2013), cette zone côtière se caractérise par des luvisols albiques à texture sablonneuse et argileuse et un climat méditerranéen subtropical avec un été sec et chaud (> 35 °C), un hiver plus froid (10 °C) et des précipitations hivernales allant de 400 à 700 mm.

Le réseau hydrique de la région se caractérise par trois rivières, l'une traversant la zone industrielle (la rivière Saf-Saf). Mézédjri et al., (2008) ont démontré l'impact négatif de l'activité pétrolière sur cette rivière. La nappe phréatique de la région est aussi vulnérable à la contamination, à cause de la perméabilité du sol, et les fuites de pétrole au niveau de la zone industrielle (Labar et *al*., 2012).

1.1.2 Champs pétrolier Rhourde el baguel (REB)

Le deuxième site se trouve à la wilaya de Ouargla, région Nord-Est du Sahara algérien. Découvert en 1962 dans le bassin de Ghadames, à environ 100 km à l'Est du champ géant Hassi Messaoud (31°23'21.5"N 6°56'19.3"E) (Mitra & Leslie, 2003), le champs pétrolier Rhourde el baguel s'étend sur une superficie de 16405 ha (Said Belarbi & Rezaiguia, 2018).

La région a un climat désertique subtropical chaud. La moyenne des précipitations annuelles est d'environ 20 mm et la température diurne pendant l'été peut atteindre plus de 50 °C, tandis que la nuit il peut geler. Le sol est défini comme des dunes de sable à texture de loam sableux (Toth, 1965a) et classé comme arenosols (Jones et *al*., 2013).

La région se caractérise par des ressources hydrogéologiques non renouvelables qui doivent être préservées de toute contamination aux produits pétroliers, en particulier la nappe phréatique faisant partie du bassin hydrogéologique d'Oued Mya, appartenant aux aquifères du Sahara septentrional (Bensenane, 2010).

1.2 Stratégie de l'échantillonnage

Depuis leur première exploitation (en 1971 et 1963 pour RA1K et REB respectivement) par Sonatrach et ses partenaires, ces deux zones industrielles connaissent des incidents fréquents de déversements d'hydrocarbures sur les sols, en particulier dans les parcs de stockage, en raison des activités de transport et de dépôt d'hydrocarbures (pétrole brut et sous-produits), réhabilitation des réservoirs de stockage etc.

Selon une étude rétrospective menée par (Chettouh, 2021) sur les accidents survenus au cours de la période (2003-2018) dans les différentes unités de la raffinerie de Skikda, sur 59 accidents, 13 dispersions de produits ont été signalées. Selon eux, la défaillance de l'équipement étant la principale cause. D'autre part, très peu de données bibliographiques sont disponibles sur les accidents survenus dans le centre de stockage du pétrole brut à Rhourde el baguel, donc l'âge de la dernière pollution est difficile à estimer.

Il est important de dire que les terrains choisis dans le cadre de cette investigation ont présenté plusieurs difficultés qui ont empêché de mettre en place un plan d'échantillonnage suivant l'une des stratégies statistiques référencées comme l'échantillonnage stratifié aléatoire, l'échantillonnage systématique ou par profil, qui sont appliquées dans ce contexte (IAEA, 2004; McCaul, 2012). Dû à des considérations de sécurité interne, on n'a pas pu adopter une stratégie qui considère les critères importants comme le nombre de points de prélèvement, l'horizon, la quantité de sol prélevé et la saison de prélèvement, L'échantillonnage dans le champs pétrolier REB a été effectué par un agent HSE (suivant nos consignes) à cause de la restriction d'accès au site.

Toutefois, jusqu'à l'heure, aucune approche n'est universelle et le choix est fonction de l'objectif de l'analyse (Crumbling, 2014).

Lors de l'échantillonnage du sol, une prospection visuelle pour la recherche d'éventuelles auréoles du contaminant sur les sols des districts de stockage a été faite. L'odeur particulière des hydrocarbures se dégageant du terrain a été ressentie sans traces apparentes de ceux-ci. Donc nous avons opté pour un échantillonnage aléatoire et ponctuel (discret) à partir de trois sites qui se trouvent dans un terrain d'une superficie d'un hectare :

- A Skikda, A et C représentent le sol autours de citernes de stockage d'hydrocarbures pétroliers et B représente un dépotoir de sol pollué ramassé après déversement.
- A Rhourde el baguel, A, B et C sont des sols entourant des citernes de stockage.

Le plan d'échantillonnage et les codes des échantillons sont résumés dans le tableau 6.

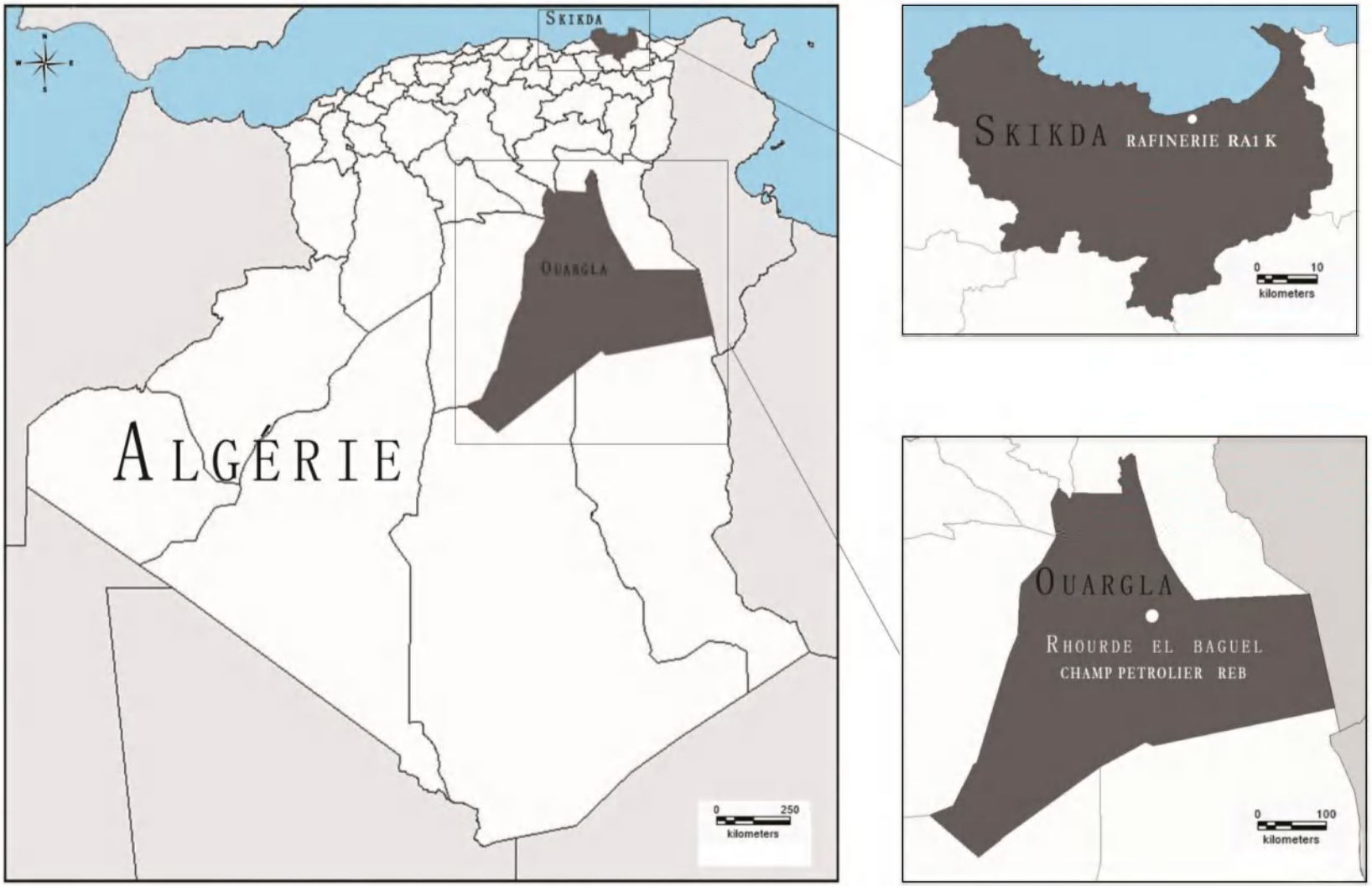


Figure 14. Carte des zones de prélèvement des échantillons de sol pollués dans les wilayas algériennes de Skikda et Ouargla.

Tableau 6. Codification des échantillons de sol prélevés et analysés.

Zone	Site	Distance	Echantillon
Skikda (S)	A	1m	SAE1
		5m	SAE2
		8m	SAE3
	B	1m	SBE1
		5m	SBE2
		8m	SBE3
	C	1m	SCE1
		5m	SCE2
		8m	SCE3
Rhourde el baguel (R)	A	1m	RAE1
		5m	RAE2
		8m	RAE3
	B	1m	RBE1
		5m	RBE2
		8m	RBE3
	C	1m	RCE1
		5m	RCE2
		8m	RCE3

Les prélèvements ont été fait près de la surface (jusqu'à 10 cm de profondeur) après avoir écarté les cinq premiers centimètres. La collection des sols a été faites en mois d'Avril 2014 pour les sols de Rhourde el baguel et en mois de Mars 2015 pour les sols de Skikda. Ils ont ensuite été transférés aseptiquement dans des flacons stériles et transportés au laboratoire, codés et entreposés à 4 °C jusqu'à l'analyse.

2. CARACTERISATION DES SOLS ET DE LA POLLUTION

2.1 Propriétés physico-chimiques des sols

Avant l'analyse, les sols ont été séchés à 20 °C pendant 72 heures, débarrassés des cailloux, broyés au mortier et pilon puis tamisés sur un tamis de 2 mm (diamètre des pores).

La granulométrie des sols de Skikda a été déterminée par un laboratoire d'analyse privé. Celui de Rhourde el Baguel n'a pas été analysé pour des raisons de quantités insuffisantes de sols.

Le pH du sol a été déterminé conformément à la norme ISO 10390 pour laquelle une suspension sol dans l'eau distillée (1 :5) a été préparée, agitée et laissée pendant 1 min avant la mesure.

Afin de déterminer la capacité de rétention d'eau (CRE), la méthode décrite par Naeth et *al*. (1991) a été appliquée avec quelques modifications. Les pots en plastique ont été remplis avec 5 grammes de terre puis émergés dans un récipient contenant de l'eau distillée pendant 24h afin de ramener les sols à leurs capacite au champ, ils ont été ensuite placés sur un support pour drainer. Après le drainage, les sols ont été séchés au four pendant 48h à 105 °C. La CRE est la différence entre le poids du sol humide avant et après le dessèchement.

La détermination de la matière organique totale (OM) a été faite en mesurant la perte au feu des sols après avoir été chauffés dans un four à moufles à 500 °C pendant 6 heures (Goldin, 1987).

2.2 Analyse de la teneur en hydrocarbures aromatiques des sols

2.2.1 Extraction des (HA)

Le seuil de contamination des échantillons a été estimé par dosage d'une fraction des hydrocarbures qui sont les aromatiques mono- et polycycliques, suivant la méthode d'extraction proposée par Chen et *al*. (1996) avec quelques modifications. La spectrophotométrie UV décrite par Crone (2013), a été utilisée pour l'analyse des extraits.

Une suspension de chaque sol dans l'acétonitrile (2g dans 15 ml d'acétonitrile pour HPLC, LiChrosolv®) a subi une sonication pendant 1 h à 35 °C à l'aide d'un bain ultrason (J. P. Selecta) et a été laissée pour décantation. Le surnageant a été récupéré après la filtration et la sonication a été répétée deux fois pour chaque échantillon pour une meilleur extraction.

2.2.2 Spectrophotométrie UV

Après dilution appropriée, la mesure de l'absorbance a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis (JASCO V-660) (vitesse de balayage : 1800 nm / min, largeur de

bande : 2 nm) dans une cellule de quartz de 10 mm de longueur de trajet. Le spectre d'absorbance a été obtenu pour chaque extrait organique du sol dans le domaine UV-visible entre 200 et 600 nm. Généralement, les (HA) absorbent des longueurs d'onde courtes comprises entre 200 et 300 nm.

La concentration de chaque (HA) ainsi que celle du mélange ont été déterminées par déconvolution spectrale. Des spectres de référence définis de 17 (HA) pures, correspondant à des concentrations comprises dans le rang de linéarité (Crone, 2013) ont été utilisés pour obtenir le spectre UV de ces composés dans nos échantillons inconnus et en déduire leurs concentrations respectives. Cette méthode se base sur la loi de Beer Lambert, qui établit une relation proportionnelle entre la concentration du composé et son absorbance mesurée.

3. ANALYSES MICROBIOLOGIQUES DES SOLS POLLUEES

3.1 Dénombrement et isolement des souches bactériennes dégradant le pétrole brut

Un enrichissement sélectif de chaque échantillon a été fait en mettant dix grammes de sol en suspension dans 90 ml du milieu minimum (Margaritis et *al*., 1979), additionné de pétrole brut (Arabian light, Sonatrach) à 2 % (V/V), incubés sous agitation à 150 tr/min pendant 48 heures (annexe 1). Des boites de contrôle de stérilité du pétrole sont réalisées par culture sur gélose et incubation avec une lecture journalière. Après décantation des particules du sol, 1 ml du surnageant a été dilué en série (jusqu'à la dilution 10^{-5}) dans une solution saline (0,85 %) et 100 µL ont été étalés sur le même milieu gélosé et incubés pendant 96 heures à 28 °C.

Les souches bactériennes ont été isolées directement des boites de dénombrement. Les colonies bien séparées et morphologiquement distinctes ont été repiquées sur gélose stérile au moins trois fois à des fins de purification. La pureté a été vérifiée à l'aide d'une observation microscopique après la coloration de Gram. Les cultures pures ont été conservées à - 20 °C dans un bouillon nutritif au glycérol stérile à une concentration finale de 30 %.

3.2 Criblage des souches produisant des biosurfactants/ bioémulsifiants

Plusieurs tests permettant la sélection des isolats ayant la capacité de produire des molécules à activité de surface ont été réalisés avec des répétitions (trois fois chacun), notamment le test d'émulsification du kérosène et le test de déplacement d'huile ainsi que des tests qualitatifs qui sont le test d'effondrement de la goutte et l'hémolyse de sang. Le bouillon stérile a été utilisée comme témoin négatif pour tous les tests.

3.2.1 Indice d'émulsification (E_{24})

La méthode décrite par Cooper et Goldenberg (1987) a été utilisée pour détecter l'activité émulsifiante. Un volume de bouillon de culture bactérienne fraiche a été ajouté à un volume égal de kérosène coloré en rouge, agité au vortex à haute vitesse pendant 2 min et laissé au repos pendant 24 h sur la paillasse. Des mesures ont été effectuées et l'indice d'émulsion (E_{24}) a été calculé comme étant la hauteur de la partie émulsifiée, divisée par la hauteur totale de la colonne, multipliée par 100. La durée de stabilité de l'émulsion a aussi été notée.

3.2.2 Test de déplacement d'huile

Cette méthode mise au point par Morikawa et *al*. (1993), sur la base de la particularité du biosurfactant à changer la (TIF) entre l'eau et l'huile en exerçant une pression de répulsion menant ainsi à un déplacement des particules d'huile. 15 µl de pétrole brut ont été mis sur la surface de 40 ml d'eau distillée dans une boîte de Petri à 90 mm de diamètre. Il forme immédiatement une fine couche d'huile au-dessus de l'eau. Ensuite, 10 µl du bouillon de culture de chaque isolat sans et avec centrifugation (10000 rpm/10 min/4 °C) a été doucement mis sur le centre de la couche d'huile. Un halo clair formé dont le diamètre a été mesuré, indique la production de biosurfactant par la souche. La comparaison des deux résultats permet de dire s'il s'agit d'un Bs/Be extracellulaire libéré dans le milieu ou cellulaire.

3.2.3 Test de l'effondrement de la goutte

C'est une méthode proposée par Jain et al. (1991) sur une surface huileuse et modifiée par la suite en remplaçant l'huile par le parafilm M ayant une surface hydrophobe (Kuiper et al., 2004). 25 µL du surnageant de chaque bouillon des isolats ont été placés à la surface du parafilm M. Si la souche produit le biosurfactant, il y aura une réduction de la (TIF) entre le liquide et la surface hydrophobe du parafilm M et conduisant à l'effondrement de la goutte.

3.2.4 Hémolyse de sang

La recherche de l'activité hémolytique est considérée comme une technique qualitative de détection de la production de biosurfactants. Décrite par Mulligan et al. (1984), elle consiste à ensemencer les isolats par spot sur gélose au sang de mouton (annexe 1), et incuber pendant 48 heures à 37 °C. L'observation d'halos incolores autour des colonies peut indiquer l'hémolyse sanguine par les Bs/Be bactériens.

3.3 Caractérisation phénotypique

Les bactéries isolées et sélectionnées par les tests précédents ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique suivant les techniques taxonomiques standards du manuel de

Bergey de bactériologie déterminative afin de s'orienter vers les genres bactériens. Les propriétés étudiées comprennent la réaction de Gram, la morphologie des colonies, le type respiratoire, la motilité, la production de catalase, d'oxydase et de la nitrate réductase. En plus, pour le groupe des bacilles à Gram positif, la recherche de spore de résistance, d'amylase, lécithinase et caséinase ainsi que la tolerance au sel ont été effectuées, tandis que pour les bacilles à Gram négatif, l'amylase, la gélatinase, l'arginine dihydrolase, le test de levane ainsi que les pigments spécifiques ont été recherchés.

3.4 Séquençage de l'ADN*r 16S*

3.4.1 PCR sur colonies d'isolats bactériens

Afin d'identifier les bactéries sélectionnées, une réaction d'amplification en chaine de l'ADN*r 16S* a été effectuée directement sur colonies pures à l'aide d'un couple d'amorces universelles : FAM63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') et HEX1389R (5'-ACGGGCGGTGTACAAG-3') (Osborn et al., 2000). Le mélange réactionnel contenait 5,45 µl (ddH_2O), 7,5 µl du Taq PCR Master Mix de QIAGEN (contenant l'ADN polymérase Taq, le tampon PCR de QIAGEN, l'$MgCl_2$ et les dNTP ultrapurs à des concentrations optimisées) et 0,375 µl de chaque amorce décrite précédemment. Une petite quantité de chaque colonie a été raclée à l'aide d'embouts stériles et transférée directement dans le puit correspondant sur une plaque PCR (96 puits) contenant 13,8 µl du mélange réactionnel.

Le programme d'amplification a été exécuté sur un thermocycleur (T100 Bio-Rad). Il s'agissait d'un cycle de dénaturation initiale de 2 minutes à 94 °C, suivi de 30 cycles de 30 secondes à 94 °C (dénaturation), de 45 secondes à 57 °C (hybridation d'amorces), de 90 secondes à 72 °C (élongation) et d'un cycle d'extension final de 10 minutes à 72 °C.

Par la suite, les produits de la PCR sont stockés à 4 °C.

3.4.2 Migration électrophorétique des amplicons sur gel d'agarose 1%

Deux microlitres de chaque produit PCR ont été mélangés à deux microlitres de colorant de charge (bleu de bromothymol) déposés dans les puits du gel d'agarose à 1 % et séparés sous une tension de 100 V pendant 25 min, au même temps que le marqueur de taille moléculaire (*Ladder 1 KB*). A la fin de la migration, le gel a été visualisé et scanné sur un système d'imagerie (Bio-Rad) sous lumière ultraviolet, relié à un logiciel sur ordinateur permettant d'avoir une photo du gel qui montre les bandes d'ADN amplifié.

3.4.3 Analyse des séquences et traitement des données

Les produits PCR obtenus ont été séquencés par la société Beckman Coulter Genetics (France). Les séquence obtenues (d'une taille approximative de 1200 pb pour la majorité) ont

été comparées à celles disponibles dans deux bases de données NCBI GenBank en utilisant *Basic Local Alignment and Search Tool nucleotide* (BLASTn) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) et *EZ-BioCloud database* (Yoon et al., 2017) à des fins taxonomiques.

Des analyses moléculaires et phylogénétiques ont été effectuées à l'aide de la version 11 du logiciel MEGA (Kumar et al., 2018). L'alignement des séquences partielles d'ADN*r 16S* a été effectué à l'aide du programme ClustalW (Thompson et al., 1994) contre des séquences d'espèces apparentées. La reconstruction des arbres phylogénétiques a été faite selon la méthode du maximum de vraisemblance (Felsenstein, 1981). La robustesse des arbres inférés a été évaluée à l'aide de la méthode de rééchantillonnage bootstrap (Felsenstein, 1985) avec 1000 répétitions.

Les séquences obtenues (Annexe 7) peuvent être récupérées sous les numéros d'accès GenBank MW229030-MW229046 et MW231892-MW231893.

4. ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES

Les données collectées des échantillons pollués ont fait l'objet de plusieurs analyses statistiques en utilisant le logiciel SPSS de l'IBM (version 29.0.0.0 -241-).

- Une analyse de la variance (ANOVA à un facteur)
- Une analyse des composantes principales (ACP)
- Une analyse de la corrélation
- Une analyse factorielle des correspondances (AFC)

Un chapitre entier dans la section Résultats est consacré à cette analyse.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

1. CARACTERISATION DE LA POLLUTION AUX HYDROCARBURES AROMATIQUES DES SOLS DE PARCS INDUSTRIELS

1. CARACTERISATION DE LA POLLUTION AUX HYDROCARBURES AROMATIQUES DES SOLS DE PARCS INDUSTRIELS

Ce chapitre est structuré en deux parties traitant quelques propriétés physicochimiques des échantillons de sol ainsi que les résultats du dosage des (HA) par Spectrophotométrie-UV.

1.1 Paramètres physico-chimiques des sols pollués

1.1.1 Granulométrie

L'analyse des différentes fractions constituant les échantillons de sol de la zone (S) a donné les valeurs suivantes : sable (69.33%-74.45%), limon (3.42%-3.87%) et argile (20.92%- 25.96%) ce qui révèle une texture modérément fine de type limon sablo-argileuse dans les trois sites en se référant au triangle des textures (USDA, n.d.).

La détermination de la texture des sols de la zone (R) n'a pas été effectuée (quantités de sol insuffisantes). Plusieurs investigations faites dans la région de Ouargla ainsi qu'à Hassi Messaoud ont rapporté une texture à dominance sableuse (Djidel, 2008; Koull, 2007; Toth, 1965b).

Les données obtenues de l'analyse des paramètres chimiques des échantillons sont indiquées dans le tableau 7.

1.1.2 Potentiel hydrogène

Les pH des échantillons prélevés autours des citernes A et C en zone S se trouvent dans la gamme des pH alcalins (7,82 -8,45) tandis que les pH des échantillons B sont légèrement acides à neutres (6,25- 6,62). Les pH des échantillons de la zone R se trouvent réparties entre des valeurs légèrement acides (6.15 dans RBE2) et des valeurs légèrement basiques (8,05 dans RCE3).

1.1.3 Capacite rétention d'eau

Les valeurs de la capacite de rétention d'eau (capacité au champs) des échantillons en zone S varient de 32% à 55%, tandis que celles de la zone R sont comprises entre 17% et 35%. Il est toujours utile de ramener les sols à la saturation avant cette mesure afin d'éviter la sous-estimation engendrée par l'évaporation d'eau qui a lieu entre le temps de prélèvement et le temps d'analyse.

1.1.4 Matière organique du sol

Les pourcentages de matière organique des échantillons S sont compris entre 2.1% et 5.6% ce qui indique des sols moyennement pourvus à assez riches en cette matière qui

habituellement, ne constitue que 10% de la masse du sol. Pour les échantillons R, les pourcentages ont été très variables allant de teneurs faibles de l'ordre de 0,5% à des teneurs importantes de 20,70 %.

Tableau 7. Résultats des analyses chimiques des échantillons de sols provenant des deux zones

Zone	Site	Echantillon	pH	CRE	MO
S	**A**	**SAE1**	8.05	55	5.6
		SAE2	7.96	35	3.0
		SAE3	8.45	40	3.8
	B	**SBE1**	6.62	45	4.2
		SBE2	6.25	40	3.7
		SBE3	6.34	44	4.0
	C	**SCE1**	8.15	39	4.0
		SCE2	7.82	41	3.7
		SCE3	8.19	32	2.1
R	**A**	**RAE1**	6.50	17	15.30
		RAE2	6.56	20	10.48
		RAE3	7.19	32	4.50
	B	**RBE1**	7.48	19	7.90
		RBE2	6.15	23	22.70
		RBE3	8.01	27	0.50
	C	**RCE1**	7.92	35	1.60
		RCE2	6.88	35	3.60
		RCE3	8.05	28	0.60

CRE : capacité rétention d 'eau (%), MO : matière organique (%)

1.2 Teneurs des sols en hydrocabrures aromatiques

Cette analyse a consisté à déterminer une partie seulement de la concentration globale du polluant formé d'un mélange complexe d'hydrocarbures pétroliers : c'est la fraction aromatique (mono et polycycliques) qui ne constitue que 10 à 20 % seulement de la totalité du polluant en masse. Le dosage des (HA) a été effectué par méthode spectrophotométrique UV après l'étape de l'extraction.

Des spectres bruts ont été obtenus pour chaque extrait de sol, présentant une forêt de pics en relief, nécessitant une déconvolution spectrale afin de déterminer les différents pics correspondant à la présence de différents (HA) dans l'extrait. Un exemple d'un spectre déconvolué est présenté en figure 15. La totalité des spectres bruts ainsi que ceux des 17 (HA) références sont dans l'annexe 2.

D'après les résultats obtenus, présentés dans le tableau 8, on peut classer nos échantillons selon la concentration globale des (HA) en trois catégories :

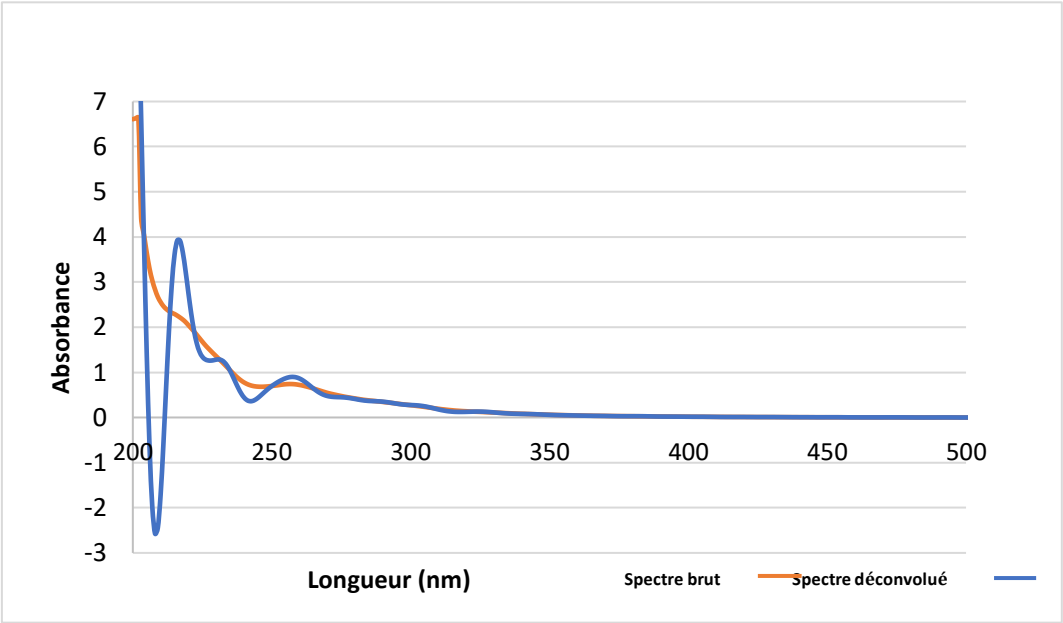


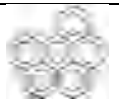
Figure 15. Spectre d'absorbance d'un extrait de sol après sa déconvolution.

- **Sols avec Σ(HA)> 1000 mg/Kg** : SAE1, SBE1, RAE1, RAE2 et RBE2
- **Sols avec Σ(HA) entre 1000 et 100 mg/Kg** : SAE2, SAE3, SBE2, SBE3, RBE1, RCE1 et RCE3
- **Sols avec Σ(HA)< 100 mg /Kg** : SCE1, SCE2 et SCE3, RAE3, RBE3 et RCE2

Des concentrations très élevées des HAM représentés uniquement par le benzène ont été détectées. Les autres hydrocarbures monocycliques du groupe (BETX) (Ethylbenzène, Toluène, Xylène) n'ont pas été repérés.

Les échantillons SAE1, SBE1 ont présenté les plus fortes concentrations (5614,08 mg/kg et 4983,26 mg/kg, soit une abondance relative de 95,24% et 78,87% respectivement). Tous les autres échantillons en contenaient aussi, les valeurs variaient de 5,25 à 333,92 mg/Kg (l'abondance relative variant de 43,37% à 75,56% comme indiqué sur le tableau I en annexe 3).

Tableau 8. Résultats du dosage des hydrocarbures aromatiques dans les échantillons de sol.

(HA) (mg/Kg)	BNZc1	NAPc2	ACEc3	ACYc3	FLRc3	PHNc3	FLNc4	PYRc4	BAAc4	CRYc4	BBFc5	BAPc5	DBAc5	GHIc6	Σ(HA)
															/
SAE1	4983.26	0.00	48.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	72.81	0.00	16.77	111.01	5232.35
SAE2	53.21	0.00	8.88	0.00	19.77	9.37	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.07	23.08	117.38
SAE3	225.45	38.64	36.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	58.45	0.00	14.67	85.94	459.29
SBE1	5614.08	410.43	393.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	581.31	0.00	118.44	0.00	7117.83
SBE2	333.92	49.71	48.65	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	84.23	58.16	0.00	0.00	683.59
SBE3	58.67	11.61	11.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	21.53	0.00	7.40	0.00	131.93
SCE1	45.56	0.00	9.77	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.42	3.55	0.00	0.00	0.00	60.30
SCE2	18.95	0.00	2.74	0.00	5.81	0.00	0.00	0.00	0.00	2.31	5.00	0.00	1.83	5.94	42.59
SCE3	5.29	0.52	0.00	0.00	1.69	0.00	0.80	0.42	0.31	0.27	0.66	0.50	0.00	1.72	12.19
RAE1	869.29	148.34	145.55	0.00	295.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	246.99	0.00	48.87	0.00	1754.33
RAE2	829.59	142.38	138.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	242.55	0.00	46.43	322.20	1721.24
RAE3	40.36	6.13	6.06	0.00	12.84	4.85	0.00	0.00	0.00	0.00	7.94	4.25	0.00	13.61	96.02
RBE1	274.24	0.00	31.91	0.00	160.67	0.00	0.00	0.00	15.53	0.00	38.21	0.00	0.00	80.00	600.55
RBE2	1656.53	0.00	270.10	0.00	563.65	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	484.51	0.00	78.90	621.49	3675.18
RBE3	15.80	0.00	0.00	3.12	5.35	2.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	26.72
RCE1	91.59	0.00	0.00	77.12	13.38	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	97.25	0.00	19.87	129.17	428.39
RCE2	59.29	0.00	0.00	6.63	0.00	0.00	0.00	4.79	0.00	0.00	8.87	0.00	2.38	13.30	95.27
RCE3	361.87	0.00	56.69	0.00	130.83	44.03	0.00	0.00	0.00	16.40	0.00	0.00	0.00	147.65	757.48

Légende : BNZc1(Benzene), NAPc2(Naphtalène), ACEc3 (Acénaphtène), ACYc3 (Acénaphtylène), FLRc3 (Fluorène), PHNc3(Phénanthrène), FLNc4 (Fluoranthène), PYRc4 (Pyrène), BAAc4 (Benzo[a]anthracène), CRYc4(Chrysène), BBFc5 (Benzo[b]fluoranthène), BAPc5 (Benzo[a]pyrène), DBAc5(Dibenzo[a,h]anthracène), GHIc6 (Benzo[g h i]perylène).

Pour les sols de la zone (R), l'échantillon RBE2 est le plus chargé (1656,53 mg/kg, soit une abondance relative de 45,07%). Les autres échantillons contenaient des teneurs allant de 15,80 à 869,29 mg/Kg (l'abondance relative varie de 21,38% à 62,24%, tableau I, annexe 3).

Ces molécules volatiles, ont tendance à disparaitre en quelques heures dans le sol soit en migrant rapidement vers l'eau souterraine, chose qui sera encore plus favorisée par une texture sableuse du sol (en zone saharienne par exemple), soit en se volatilisant à température ambiante. Ils peuvent être aussi biodégradés par une flore microbienne spécifique et leur taux se trouve souvent inferieur aux autres (HA) à structure plus complexe sauf en cas d'accident industriel ou de grandes quantités de pétrole sont déversées (Kuykendall, 2008).

Par ailleurs, l'abondance des (HAP) dosés dans l'ensemble des échantillons de la zone (S) en fonction du nombre de noyaux aromatiques se trouve dans l'ordre décroissant suivant : (HAP) 5 cycles >3 cycles > 2 cycles > 6 cycles > 4 cycles (figure 16). Leur abondance relative varie dans l'intervalle 1,71% - 32,39%

De son cote, l'abondance des (HAP) dans la zone (R) est comme suit : (HAP) 3 cycles> 6 cycles> 5 cycles> 2 cycles > 4 cycles (figure 17) avec une abondance variant de 2,15% à 30,15% (tableau I annexe 3).

En comparant nos résultats aux seuils des concentrations admissibles d'HA dans les sols, élaborées par l'USEPA (tableau IV en annexe 5) qui varient entre 0,2 et 2 mg/Kg de sol sec, nous constatons que les concentrations détectées dans nos échantillons sont nettement supérieurs allant de 6,90 à 2018,65mg/Kg de sol sec.

Plusieurs travaux et articles ont rapporté l'existence de fortes concentrations des (HA) dans des sols industriels. Par exemple Crone (2013) avait rapporté 21310 mg/Kg sur un ancien site industriel de distillation du goudron et 32,78 à 53,22 mg/Kg dans une usine à gaz. Wick et al. (2011) indiquent un taux des (HAP) total de 821 mg/kg dans un site pétrochimique. Wang et al. (2018) ont trouvé 1,01 mg/Kg à 18,07 mg/Kg dans la couche du sol allant de 0 à 10 cm dans des zones contaminées au pétrole brut et Howard et al. (2021) ont indiqué 23,46 mg/kg à 89,89 mg/kg dans une zone de raffinage du pétrole brut.

Les figures 16 et 17 qui representent le Log_{10} des concentraions des HA par catégorie dans les differents échantillons de sol, classés selon le nombre de cycles benzène qu'ils contiennent, montrent globalement que les sols les plus pollués présentent des nombres bactériens faibles par comparaison à ceux qui sont moins pollués, ce qui va être detaillé dans la prochaine partie du chapitre.

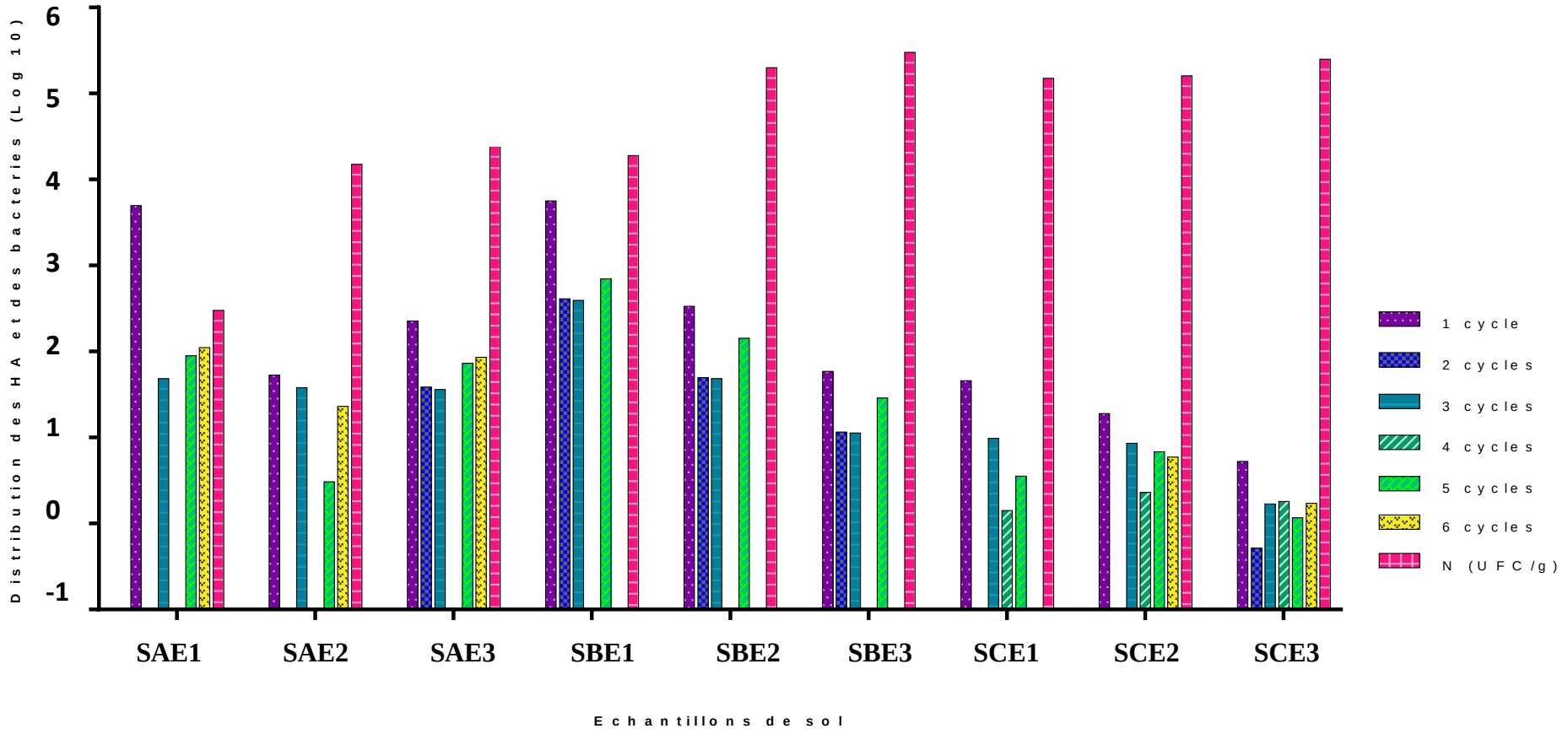


Figure 16. Distribution des (HA) et des bactéries dans les échantillons de la zone SKIKDA

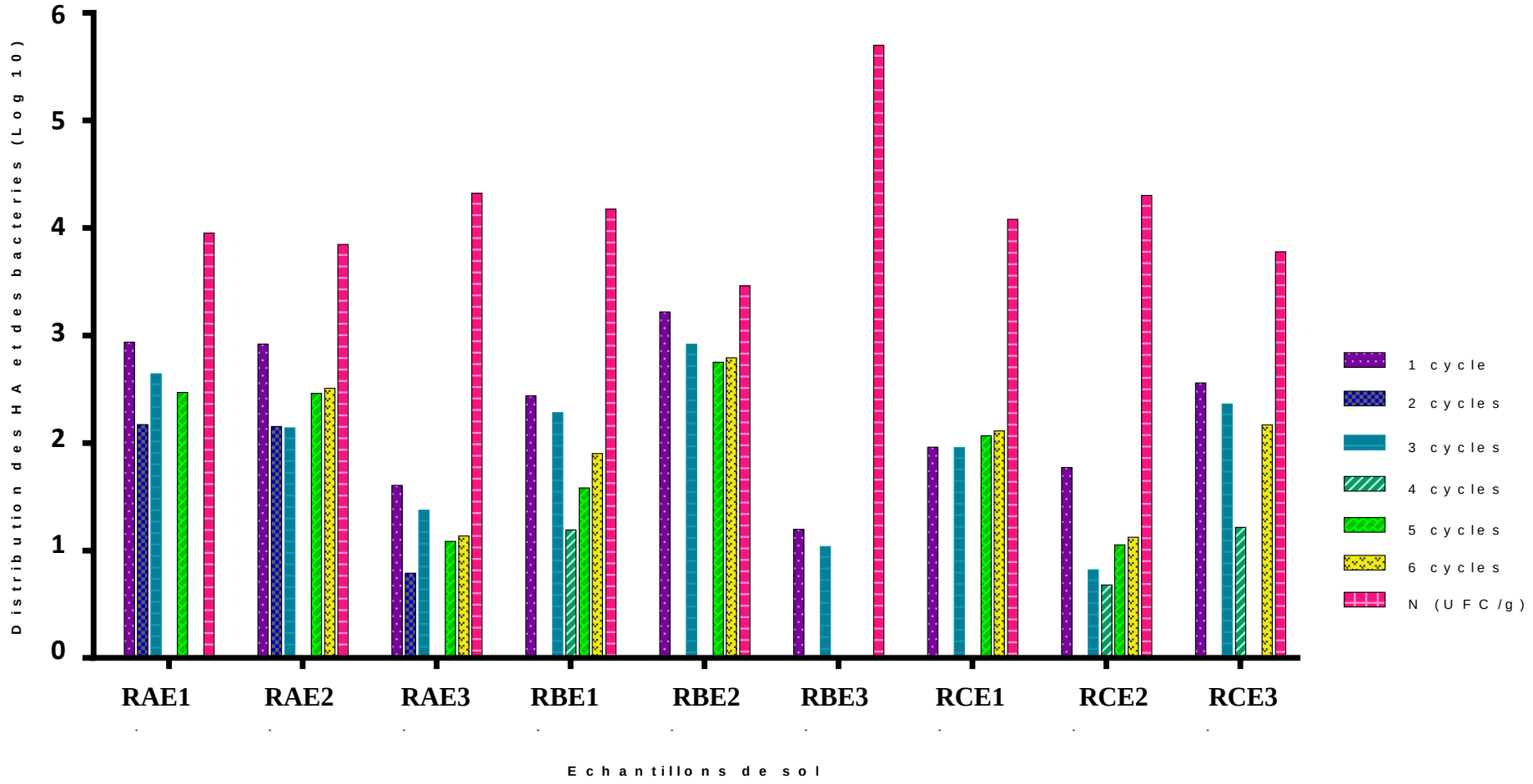


Figure 17. Distribution des (HA) et des bactéries dans les échantillons de la zone Rhourde el baguel

1.3 Discussion

La texture

La texture du sol est considérée comme un facteur clé dans sa réponse à la pollution (Ahmadi et al. 2021). Les sols ayant une texture à dominance argileuse ou limoneuse, ont tendance à retenir beaucoup d'eau, deviennent humides, puis durs et compacts au séchage (Lemière et al., 2001). À juste titre, dans la zone Skikda, les sols autours des citernes de stockage sont compact, durs et fissurés, alors que les sols désertiques en générale, présentent une texture particulaire et une structure très fragile.

Le pH du sol, joue un rôle crucial dans la mobilité et disponibilité des polluants et il est influencé par sa texture (Boekhold & Meeussen, 1993). En effet, les sols argileux ont un pouvoir tampon stabilisant le pH en cas de fluctuation, alors que le pH des sols sableux est instable, variant entre l'acidité et l'alcalinité selon les conditions environnantes (USDA, 2014).

De plus, la charge négative des minéraux argileux est responsable de la structure floculée du sol ce qui augmente la CRE en cas d'une légère pollution (Burckhard et *al*., 2004) et la réduit lorsque les quantités de polluants sont importantes. Ceci va rendre le sol hydrophobe exerçant une répulsion de l'eau (Wei & Li, 2018).

Par ailleurs, les sols à texture fine (riche en argile surtout et en limon) stockent la matière organique (El-kamali et *al*., 2017) agissant ainsi sur la sorption des hydrocarbures à la matrice du sol, qui vont s'accumuler et devenir inaccessibles. Avec le temps, les nutriments s'épuisent dans le milieu et la charge microbienne diminue (Łyszczarz et *al*., 2021).

Au contraire, lorsque le sol est plus grossier (sableux) et pauvre en argile, la matière organique native ou pétrogénique sera plus disponible aux microorganismes (Tourinho et *al*., 2012) mais qui reste dépendante des pluies et du lessivage.

De son côté, l'association des microorganismes aux particules du sol est aussi influencée par sa texture. Sessitsch et *al*. (2001) ont démontré que les particules fines supportaient plus de microorganismes que celles à grande taille. Seaton et *al*. (2020) ont constaté que les microorganismes ont plus d'affinité pour l'argile alors que Chau et *al*. (2011) ont trouvé que la richesse bactérienne augmente avec l'augmentation de la texture grossière ce qui prouve que les particules de sable sont importantes pour certains taxons microbiens, mais les particules d'argile et de limon attirent plus de microorganismes.

Le pH

Des études antérieures ont montré que la contamination du sol par le pétrole brut entraîne une alcalinisation de ce dernier, c'est le cas notamment de la recherche menée par Wang et *al*., (2013) sur l'effet du pétrole brut sur les sols du parc national de Momoge en Chine.

Ceci peut être du soit à la nature hydrophobe du pétrole, qui rend la couche superficielle du sol potentiellement sèche et saline, soit à l'accumulation des bases échangeables (comme le Ca^{2+} ou Na^{+}) et la réduction de la capacite d'échange cationique (CEC). La détermination de la CEC et des cations échangeables dans notre expérience aurait apporté plus d'information à ce propos.

En zone S, les pH sont majoritairement alcalins sauf dans le site B, puisqu'il s'agit d'un dépôt qui recevait périodiquement des sols contaminés durant quelques années. Il semble que le processus de vieillissement de la pollution (âge), son degré et le type de produits déversés jouent un rôle important dans les changements que subissent les sols. Des valeurs de pH acides ont été enregistrées et qui peuvent être expliquées selon Ahmadi et *al*., (2021) par une accumulation de composés acides provenant du pétrole comme l'azote, le soufre et les métaux lourds ou des métabolites acides issus de la biodégradation microbienne des hydrocarbures pétroliers comme l'explique Alharbi et *al*., (2018b). Les données rapportées sur ce dernier article ont montré que le pH a tendance à augmenter au début de la pollution, mais au fils du temps (après 60 jours de l'expérience) les valeurs diminuent et deviennent acides dû à l'activité microbienne.

Les pH enregistrés dans les sols de la zone R été variables et pas homogènes. La nature géologique des sites sahariens arides et la texture sableuse de leurs sols influent sur le pouvoir tampon de ceci, rendant les pH instables.

La présence de carbonate de calcium peut être à l'origine de l'alcalinité de certains échantillons de sol (Karabi et *al*., 2016). Les pH alcalins peuvent aussi refléter une accumulation des ions Na^{+}, c'est le cas notamment des sols de la région saharienne de Oued Righ près de Ouargla, étudiés par Boumaraf, (2015). Le climat sec, l'évaporation d'eau sous hautes températures et vents, la salinisation (Hamdi-Aissa et *al*., 2004) ainsi que l'introduction de polluants et les variations chimiques et biologiques engendrées par celle-ci sont aussi des phénomènes qui peuvent changer les valeurs de pH vers l'acidité.

La capacité de rétention d'eau

Les données bibliographiques indiquent que la capacité de rétention d'eau d'un sol propre varie en fonction de sa texture, par exemple un sol limon argilo-sableux présente une CRE avoisinant 24% (pourcentage massique) (Massenet, 2012). Des valeurs allant jusqu'à 31% ont été détectées par Brakorenko et Korotchenko (2016) dans leur travail sur un sol de type limoneux. Cependant, ces valeurs ont tendance à augmenter lorsqu'il s'agit d'un sol pollué.

En effet, l'introduction d'hydrocarbures dans la matrice du sol va changer ses propriétés hydrauliques. Selon Burckhard et *al*. (2004), si le volume introduit est relativement faible,

l'huile va inhiber la mobilité de l'eau qui sera de plus en plus retenus et des faibles forces attractives de Van der Waals vont relier l'argile à l'eau.

En revanches, la rétention de l'eau par le sol est dépendante aussi de plusieurs autres facteurs, comme la quantité d'argile entrant dans sa composition, ainsi que sa richesse en matière organique. D'après les travaux de Ahmadi et *al*. (2021), les particules fines d'argile remplissent les pores entre les particules de sable, modifiant ainsi la structure du sol qui devient alors floculée en plus de l'affinité élevée entre la matière organique et l'eau. Contrairement, si le sol reçoit de fortes teneurs d'hydrocarbures, ils vont occuper les pores et expulser l'eau réduisant ainsi la CRE.

De plus, la saison, la température et les précipitations sont une source importante de la variation de l'eau d'un sol (Wang et *al*., 2013).

Néanmoins, les sols sahariens à dominance sableuse sont filtrants, ayant tendance à ne pas retenir de grandes quantités d'eau vu leur texture particulaire grossière. Selon Cornei (1980), la prédiction des caractéristiques hydriques d'un sol sableux se base sur la détermination de sa teneur en particules fines et en matière organique. Malgré cela, la présence du pétrole peut favoriser la rétention d'eau par le sol quand sa concentration n'est pas très excessive. Cela peut être le cas observé dans nos échantillons puisque les valeurs de CRE les plus importantes sont enregistrées dans les sols les moins pollués (de 27% à 35%) et elles deviennent de plus en plus faibles dans les sols les plus pollués (< 23%).

La matière organique

Pour sa part, l'analyse de la matière organique, en particulier des sols sahariens, a montré que les sols extrêmement pollués sont ceux qui contiennent de grandes quantités de matière organique à savoir ; RBE2, RAE1, RAE2 et RBE1(22.70%, 15.30%, 10.48% et 7.90% respectivement). Ceci laisse penser que l'origine de la matière organique dans ces échantillons est probablement la masse solide pétrogéniques. Des valeurs de 0.5% et 2.23% ont été déterminées dans l'étude de Karabi et *al*. (2016) sur deux sols de la région aride de Ouargla. Nguemté et *al*., (2022) avait détecté un taux de 5,3% de matière organique dans un sol sablo-limoneux pollué aux hydrocarbures.

Selon Yadete (2006), la teneur en matière organique d'un sol varie selon sa texture de 0,344% dans les sols très sableux arides à plus de 86% dans les tourbes.

En outre, les différents horizons du sol ne présentent pas tous la même contenance en matière organique. Nos échantillons sont prélevés en surface (5 et 15 cm) qui se distingue par l'absence d'une couverture végétale importante (quelques herbes en périphérie). Ces taux peuvent alors être attribués en majorité aux hydrocarbures déversés sur ces sols, qui constituent

un apport important de matière organique et par conséquent de carbone organique, mais ceci ne sera confirmé que par une analyse détaillée de ses composantes. Selon Fallah et *al*. (2015), les sols recevant un déversement ou des déchets pétroliers présentent une augmentation importante dans le taux de carbone organique total et donc de matière organique. Les résultats des travaux de Arocena et Rutherford (2005) confirment cette hypothèse.

Les teneurs en (HA) des sols

Les (HAP) sont peu solubles dans l'eau, ils ont tendance à persister longtemps en se liant fortement aux particules solides comme le sol et les sédiments (Genies, 2013) et cette persistance est d'autant plus grande que le nombre de cycles benzéniques est grand et leur poids moléculaire est élevé. Tel est le cas pour les (HAP) dont seize considérés par l'US-EPA, comme étant des polluants prioritaires dû aux caractères mutagène et cancérigène de certains d'entre eux (selon le centre international de recherche sur le cancer-CIRC). Ils sont aussi classés comme polluants organiques persistants (POP) (Wang et *al*., 2018).

Parmi eux, 12 ont été détectés dans chacune des zones étudiées, en fortes teneurs dépassant les normes mais dont la somme reste généralement inférieure à celle du benzène, qui est monocyclique. En résume, les (HAP) à toxicité aigüe (BAAc4, BAPc5 et DBAc5), les cancérigènes probables (PYRc4, BAAc4, CRYc4, BBFc5, BAPc5, DBAc5) ou mutagènes confirmés pour l'Homme (FLrc3, PYRc4, BAAc4, CRYc4, BAPc5 et DBAc5) ont été détectés. Il est donc important de mettre l'accent sur les concentrations des (HAP) qui se trouvent dans nos échantillons indiquant donc leur forte pollution et les risques de toxicité en cas d'exposition.

Le type de parcelle et l'activité pratiquée là-dessus déterminent les critères auxquels il faut se référer, les seuils et les voies d'exposition des humains à ces polluants ainsi que les conséquences qui en découlent. Par exemple un sol urbain est plus susceptible de contenir des taux élevés d'hydrocarbures et sera donc plus pollué qu'un sol agricole. Encore plus s'il s'agit d'un sol industriel comme les zones pétrochimiques, ou l'origine de ces polluants sera essentiellement pétrogénique.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

2. BACTERIES HYDROCARBONOCLASTES ET PRODUCTRICES DE BIOSURFACTANTS/BIOEMULSIFIANTS ISOLEES DES SOLS DE LA RAFFINERIE DE SKIKDA ET DU CHAMPS PETROLIER RHOURDE EL BAGUEL

2. BACTERIES HYDROCARBONOCLASTES ET PRODUCTRICES DE BIOSURFACTANTS/BIOEMULSIFIANTS ISOLEES DES SOLS DE LA RAFFINERIE DE SKIKDA ET DU CHAMPS PETROLIER RHOURDE EL BAGUEL

Cette partie du chapitre est consacrée à l'analyse microbiologique des échantillons de sol pollués, allant d'une mise en culture et d'une caractérisation phénotypique des bactéries aérobies, au criblage de celles qui produisent les biosurfactants/bioémulsifiants avec l'identification par séquençage d'un fragment du gène ADNr 16S, de quelques isolats.

2.1 Dénombrement sur gélose de la flore aérobie mésophile dégradant le pétrole

Le dénombrement de la flore cultivable aérobie mésophile sur gélose contenant le pétrole brut comme unique source de carbone a donné des nombres compris entre $3x10^2$ et $3x10^5$ UFC/g de sol des échantillons de la zone (S). Pour les échantillons de la zone (R), des nombres allant de $2,9x10^3$ à $5x10^5$ UFC/g de sol ont été obtenues (tableau 9). Ces nombres sont inférieurs à ceux d'un sol non pollué qui peut contenir jusqu'à 10^9 UFC/g (Bhattarai, 2015).

Tableau 9. Résultats du dénombrement bactérien sur milieu solide.

Zone	Echantillon	N (UFC/g)
S	**SAE1**	3.00E+02
	SAE2	1.50E+04
	SAE3	2.00E+04
	SBE1	1.90E+04
	SBE2	2.00E+05
	SBE3	3.00E+05
	SCE1	1.50E+05
	SCE2	1.60E+05
	SCE3	2.50E+05
R	**RAE1**	9.00E+03
	RAE2	7.00E+03
	RAE3	2.10E+04
	RBE1	1.50E+04
	RBE2	2.90E+03
	RBE3	5.00E+05
	RCE1	1.20E+04
	RCE2	2.00E+04
	RCE3	6.00E+03
	RAE1	9.00E+03

D'autres études réalisées sur des sols pollués par des hydrocarbures ont montré des résultats proches des nôtres, d'environ $1x10^5$ UFC/g (Ghazali et *al.*, 2004), $3,5x10^3$ UFC/g

(Chikere et *al*., 2009), 4,41x10^4 à 2,40x10^6 UFC/g (Alrumman et *al*., 2015), environ 1,70x10^5 (Olukunle, 2020) et 1,71 x 10^6 à 1,35x10^6 UFC/g (Okafor et *al*., 2021).

2.2 Caractérisation des bactéries productrices de Bs/Be

A partir des échantillons de sols pollués des deux premiers sites A et B de chaque zone, ensemencés sur un milieu contenant 2 % de pétrole brut comme seule source de carbone, un total de 50 isolats de la zone (S) et de 44 isolats de la zone (R) ont été isolés après 72h d'incubation, à l'exception d'un isolat ayant pris cinq jours pour pousser. Après leur purification par repiquage successifs sur gélose nutritive et coloration de Gram, les tests de détection de Bs/Be ont été réalisés.

Parmi ces isolats, 34 de la zone (S) et 31 de la zone (R) ont montré une production positive à travers l'émulsification du kérosène (E_{24}) et le déplacement de la couche de pétrole (DDH) en surface de l'eau. Des résultats positifs ont également été observés pour les tests qualitatifs de l'effondrement de la goutte (EG) à la surface hydrophobe du parafilm M ainsi que l'hémolyse du sang (HS) (tableaux II et III en annexe 4).

Le pourcentage global de bactéries produisant les Bs/Be était presque pareil dans l'ensemble des échantillons des deux zones (68% dans S et 70% dans R) (figure 18). Les bactéries ayant donné des réponses négatives ont été estimées à 16 isolats dans la zone S et 13 isolats dans la zone R. Ceci laisse penser qu'elles peuvent avoir d'autres mécanismes pour accéder aux sources hydrophobes ou bien aux sous-produits résultant de leur catabolisme.

Sur 34 bactéries productrices issues de la zone S, 74% sont Gram positives et 26% sont Gram négatives, tandis que sur les 31 isolats de la zone R, le pourcentage des Gram négatives est supérieur (58% Gram négatives et 42% Gram positives) (figure 19).

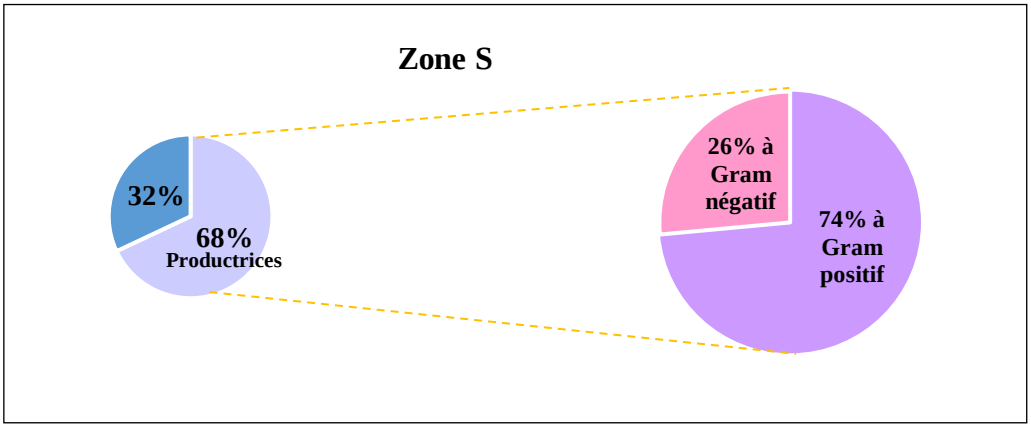


Figure 18. Proportion des isolats de la zone (S) produisant les Bs/Be par rapport au nombre total de bactéries et leur répartition selon leur Gram.

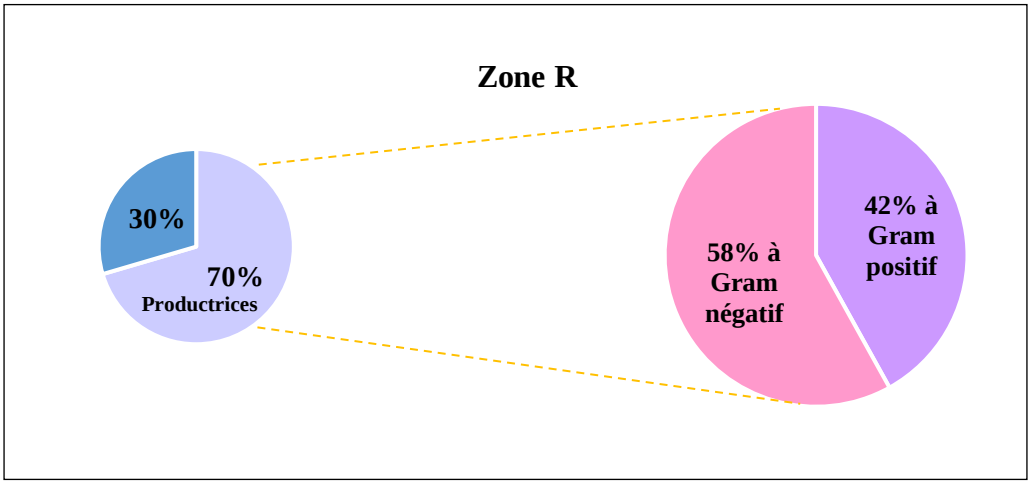


Figure 19. Proportion des isolats de la zone (R) produisant les Bs/Be par rapport au nombre total de bactéries et leur répartition selon leur Gram.

Les résultats de la caractérisation de quelques propriétés phénotypiques selon les protocoles décrits par les auteurs Delarras, (2007) et Joffin & Leyral, (2009) dans leur ouvrages sur les techniques d'analyses microbiologiques (milieux de culture en annexe I) ont permis de classer les isolats en phénogroupes qui différent par leurs caractères morphologiques et biochimiques et de les assigner à plusieurs taxons. Les tableaux 10 et 11, recapitulent les données phénotypiques établies.

En zone (S), six phénogroupes à Gram positif et cinq à Gram négatif ont été identifiés appartenant à deux principaux embranchements à savoir : *Bacillota* et *Pseudomonadota*. Comparativement, dans la zone R, il y a eu huit phénogroupes à Gram positif et cinq à Gram négatif. Les isolats appartiennent à trois embranchements : *Actinomycetota*, *Bacillota* et *Pseudomonadota*.

Nous avons constaté que la population bactérienne aérobie est plus diversifiée dans la zone saharienne R par rapport à la zone humide S, inversement au nombre bactérien qui est de plus en plus important en zones tempérées. Toutefois, la mise en culture ne permet de détecter qu'une faible proportion des bactéries qui tolèrent ou dégradent les hydrocarbures dans les sols. Le criblage de bactéries ayant la capacité de produire des molécules leur permettant de rendre accessibles les sources de carbone hydrophobes, va encore réduire le nombre de taxons détectés, soit pour des raisons d'absence de cette capacité, soit à cause des limites qu'imposent les techniques de détection de ces molécules. Les figures 20, 21, 22 et 23 illustrent les différentes observations macroscopiques et microscopiques de nos isolats.

Tableau 10 : Caractères phénotypiques des bactéries à Gram positif isolées de la zone de Skikda (S).

Phénogroupes et genre suspecté	Isolat	Caractères morphologiques						Caractères biochimiques							
		Gr.	Forme de colonie	Pig.	Forme et mode regroupement	Mob.	Spr de resistance	O_2	Nit.	Oxy.	Cat.	Amy.	Lec.	Cas.	NaCl
Bacillus sp.	SA1 SA3 SB7	+	Mucoïde lobée opaque	-	Bacilles isolés	+	+	AS	+	+	+	+	+	+	6%
Bacillus sp.	SA2 SA9 SA10 SB5 SA7	+	Rugueuse irrégulière opaque	-	Gros bacilles isolés ou en chaine	+	+	AAF	+	-	+	+	+	+	6%
Bacillus sp.	SA4 SA6 SA12 SA13 SA16	+	Grosse colonie irrégulière opaque	-	Gros bacilles isolés ou en chaine	+	+	AAF	+	+	+	+	+	+	6%
Bacillus sp.	SA17	+	Grosse colonie irrégulière opaque	-	Gros bacilles isolés ou en chaine	+	+	AAF	+	-	+	+	+	+	6%
Bacillus sp.	SA11 SB8 SB11 SB14	+	Ronde bossue crémeuse opaque	-	Très gros bacilles isolés	+	+	AS	-	+	+	+	+	+	9%
Bacillus sp.	SA8 SA15 SB1 SB6 SB10 SB12 SB13	+	Ondulée irrégulière opaque	-	Bacilles isolés	+	+	AS	+	-	+	+	+	+	6%

Tableau 10 (suite) : Caractères phénotypiques des bactéries à Gram négatif isolées de la zone de Skikda (S).

Phénogroupes et taxon suspecté	Isolat	Caractères morphologiques					Caractères biochimiques									
		Gr.	Forme de colonie	Pig.	Forme et mode regroupement	Mob	0_2	Nit.	Oxy.	Cat.	Gel.	ADH	Amy.	Lec.	Lev.	T(°C)
Pseudomonas sp.	SA5 SA14 SB2	-	Circulaire ondulée, rugueuse irisée	Jaune verdâtre diffusible	Bacilles isolés	+	AS	+	+	+	+	+	+	+	-	41°C (+) 4°C (-)
Pseudomonas sp.	SA18 SB3 SB4	-	Circulaire ondulée, rugueuse irisée	Bleu verdâtre diffusible	Bacilles isolés	+	AS	+	+	+	+	+	+	-	-	41°C (+) 4°C (-)
Serratia sp.	SA19	-	Convexe, ronde lisse opaque	Rouge non diffusible	Bacilles courts	+	AAF	+	-	+	/	-	/	/	/	41°C (+) 4°C (+)
Enterobacteriaceae	SB9	-	Entière ronde lisse irisée	-	Bacilles isolés ou en paire	+	AAF	+	-	+	-	-	-	-	+	41°C (+) 4°C (+)
Enterobacteriaceae	SB15	-	Ronde lisse irisée	-	Coccobacilles isolés ou en paire	+	AAF	+	-	+	-	+	-	-	-	41°C (+) 4°C (+)

Couleur grise : indique les souches sectionnées comme représentatives de chaque phénogroupe.

Tableau 11 : Caractères phénotypiques des bactéries à Gram positif isolées de la zone de Rhourde el baguel (R).

Phénogroupes et taxon suspecté	Isolat	Caractères morphologiques						Caractères biochimiques							
		Gr.	Forme de colonie	Pig.	Forme et mode regroupement	Mob.	Spr. de résistance	0_2	Nit.	Oxy.	Cat.	Amy.	Lec.	Cas.	Caractère Supp.
Bacillus sp.	**RA4**	+	Irrégulière, rugueuse, plate, opaque	-	Gros bacilles isolés ou streptobacilles	+	+	AAF	+	-	+	+	+	+	Pousse à 6% d'NaCl
Bacillus sp.	**RA5**	+	Irrégulière ondulée opaque	-	Baciles isolés ou en paire	+	+	AS	+	-	+	+	+	+	Pousse à 6% d'NaCl
Staphylococcus sp.	**RA11**	+	Punctiforme opaque	-	Diplocoques ou tétrade	-	-	AAF	+	-	+	-	/	/	Croissance et acidification sur Chapman
Micrococcaceae	**RB2 RB3 RB4 RB5 RB6 RB14**	+	Punctiforme convexe, lisse opaque	Jaune	Gros Cocci isolés, diplocoques ou en amas	-	-	AS	+	-	+	/	/	/	/
Bacillus sp.	**RB7**	+	Entière circulaire lisse opaque	-	Bacilles isolés ou en chaine	+	+	AAF	+	-	+	/	/	/	/
Bacillus sp.	**RB8**	+	Rhizoïde, sèche	-	Gros bacilles en chaine	-	+	AAF	+	-	+	/	/	/	/
Bacillus sp.	**RB9**	+	Irrégulière, rugueuse, plate, opaque	-	Gros bacilles isolés ou en chaine	+	+	AAF	+	+	+	/	/	/	/
Actinomycetes	**RB13**	+	Irrégulière adhérente couverte de mycélium aérien blanc	-	Réseau filamenteux	-	-	AS	+	+	+	/	/	/	Croissance lente (5 jours)

Tableau 11 (suite) : Caractères phénotypiques des bactéries à Gram négatif isolées de la zone de Rhourde el baguel (R).

Phénogroupes et taxon suspecté	Isolat	Caractères morphologiques					Caractères biochimiques									
		Gr.	Forme de colonie	Pig.	Forme et mode regroupement	Mob.	0_2	Nit.	Oxy.	Cat.	Gel.	ADH	Amy.	Lec.	Lev.	Caractère Supp.
Pseudomonas sp.	**RA1 RA2 RA6 RA7 RA12 RA13 RA14 RA16 RA17**	-	Ondulée circulaire rugueuse Translucide Irisée	Bleu verdâtre pigment diffusible	Baciles isolés ou en paire	+	AS	+	+	+	+	+	+	+	-	41°C (+) 4°C (-)
Enterobacteriaceae	**RA3 RA9 RA10 RA15**	-	Entière, irrégulière, lisse et opaque	-	Coccobacilles isolés	+	AAF	+	-	+	-	+	-	-	+	41°C (+) 4°C (+) Ferment. lac. avec gaz
Genre inconnu Bactérie a Gram négatif	**RA8 RB11**	-	Incrustée dans la gélose, opaque sèche irrégulière	Jaune	Coccobacilles isolés, en paire ou groupés	+	AS	+	+	+	-	-	+	/	/	41°C (+) 4°C (-)
Moraxellaceae	**RB1**	-	Circulaire convexe lisse opaque	-	Coccobacilles isolés ou en paire	-	AS	+	+	+	/	/	/	/	/	/
Pseudomonas sp.	**RB10 RB12**	-	Plissée butyreuse plate adhérente	Rouge-brun pigment diffusible	Bacilles courts	+	AS	+	+	+	-	-	/	/	/	41°C (+) 4°C (-)

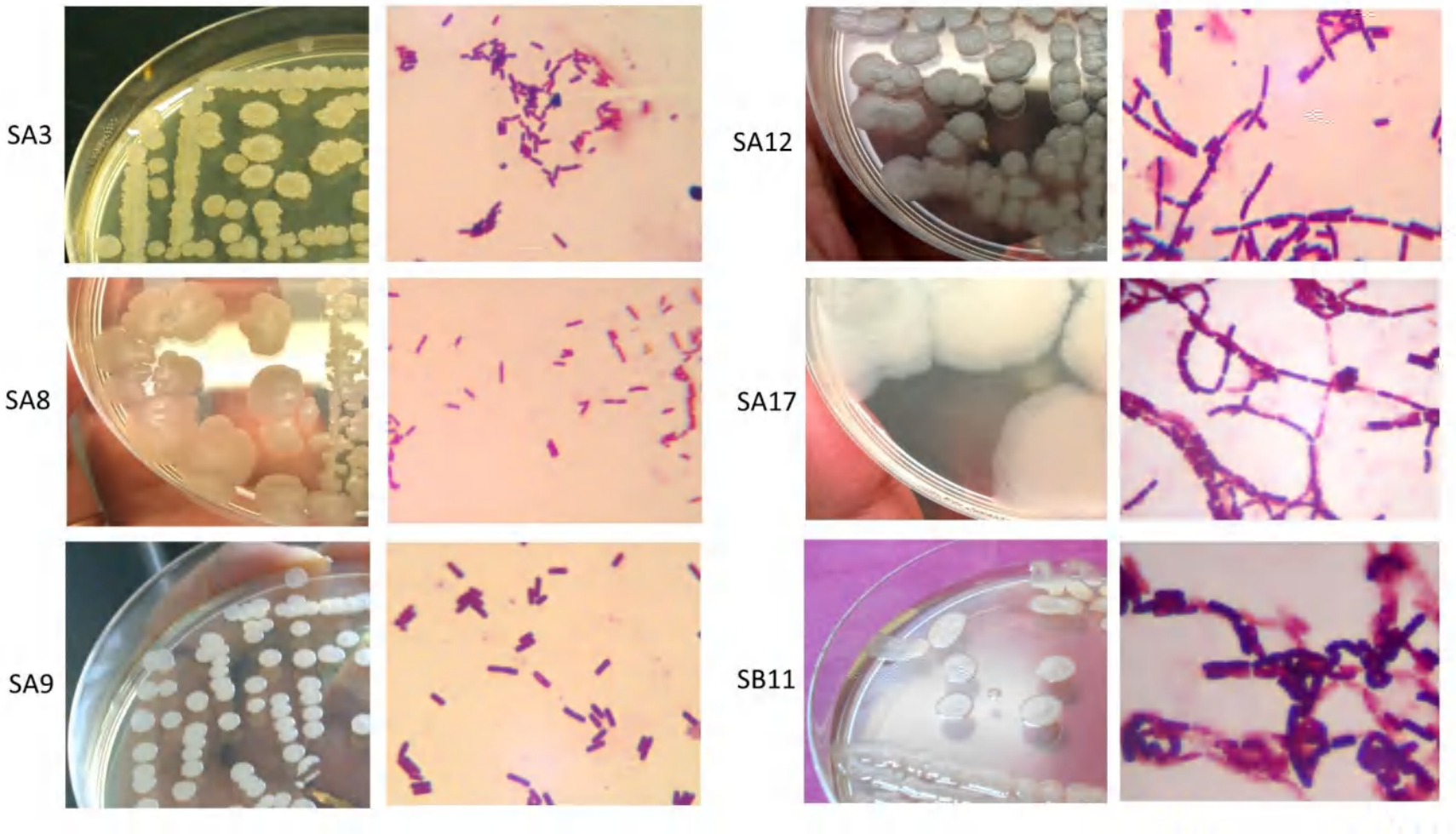


Figure 20. Photographies des observations macroscopiques et microscopiques des différents aspects des bactéries à Gram (+) de la zone (S).

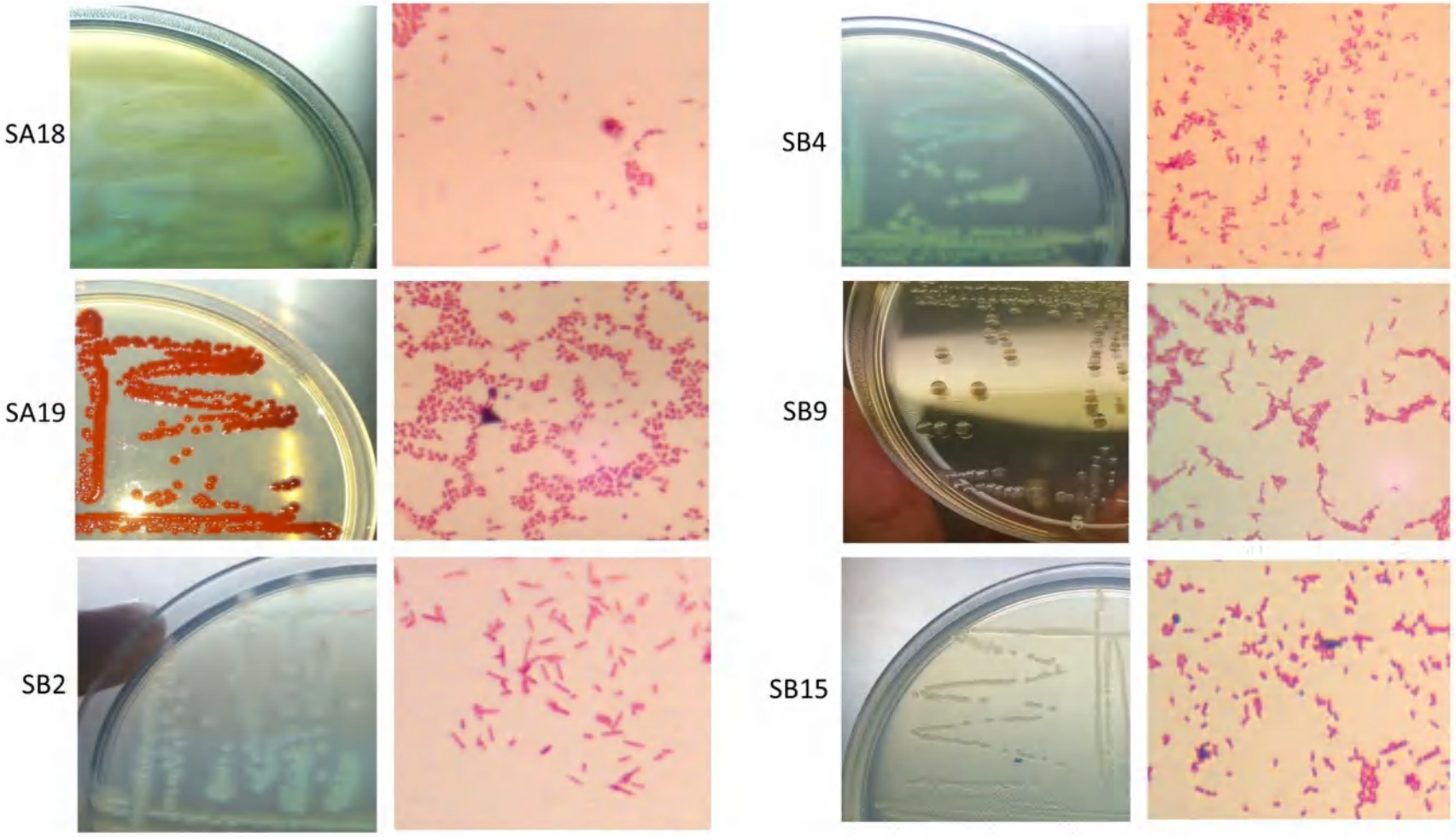


Figure 21. Photographies des observations macroscopiques et microscopiques des différents aspects des bactéries à Gram (-) de la zone (S).

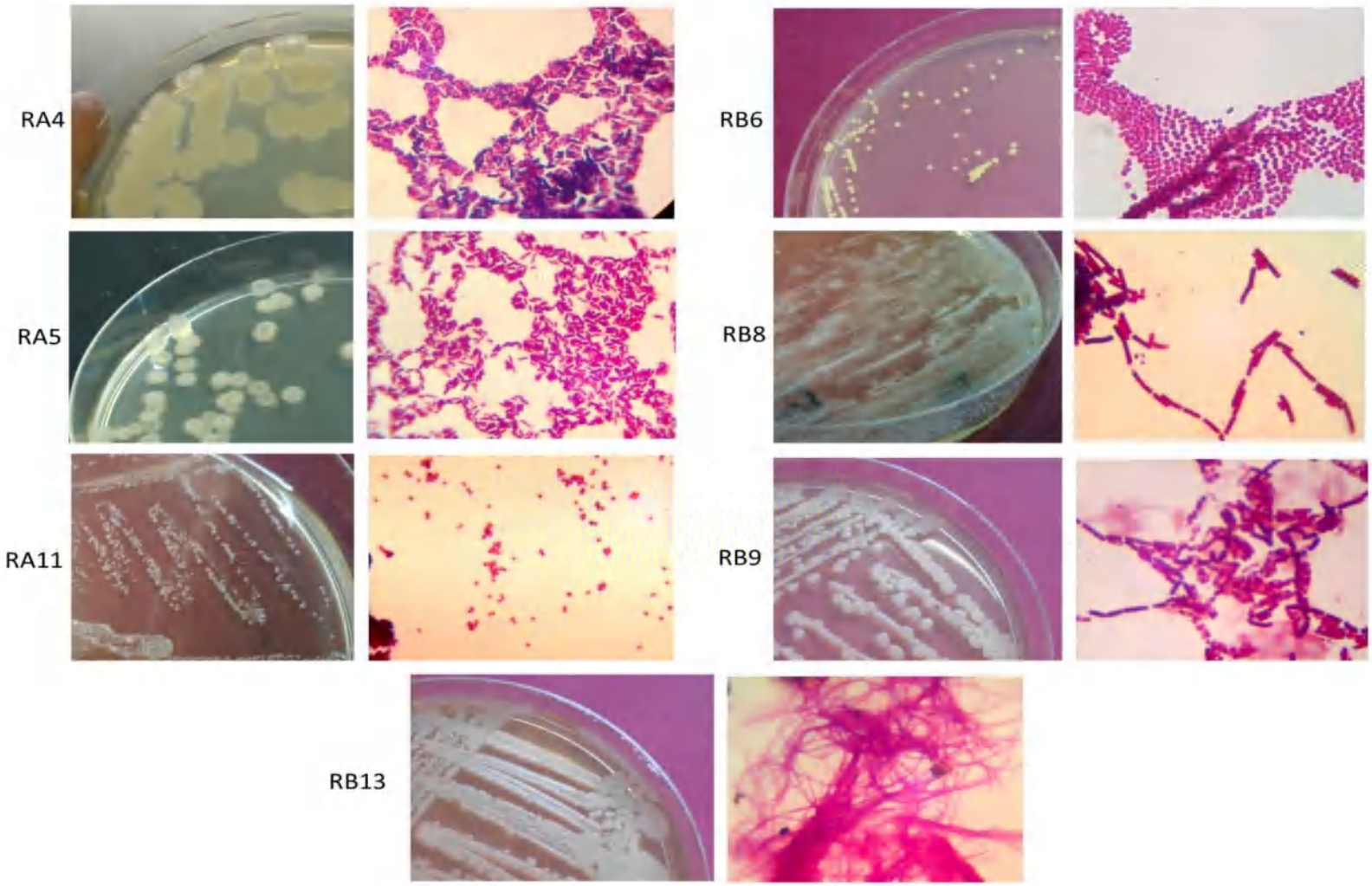


Figure 22. Photographies des observations macroscopiques et microscopiques des différents aspects des bactéries à Gram (+) de la zone (R).

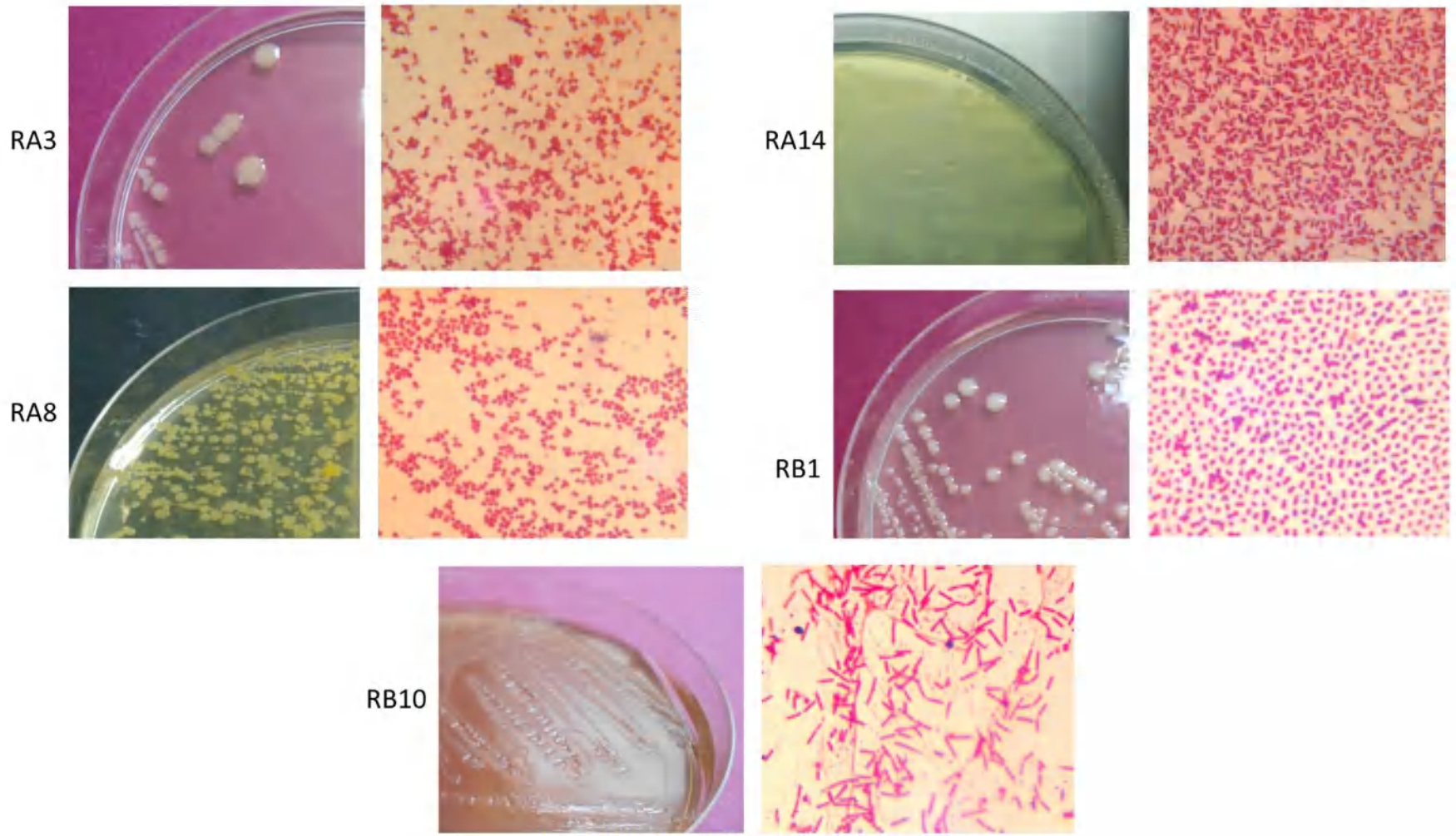


Figure 23. Photographies des observations macroscopiques et microscopiques des différents aspects des bactéries à Gram (-) de la zone (R).

2.3 Activité de surface et activité d'émulsification chez les souches sélectionnées

Onze bactéries de la zone (S) et neuf de la zone (R) ont été sélectionnées comme meilleures souches productrices en se basant sur les résultats des tests de détection des Bs/Be (tableau 12). Quelques photographies des résultats positifs des différents tests sont en annexe 8.

Tableau 12. Résultats des tests de détection de production de Bs/Be chez les souches bactériennes sélectionnées.

Zone	Souche	Gram	E_{24} (%)		DDH (cm)		HS		EG
			Moy.	ET	Moy.	ET	Niveau	Type	Niveau
S	SA3	Positif	3.53	3.56	4.20	0.00	++++	β	++++
	SA8		52.22	20.51	3.90	0.00	+++	β	+++
	SA9		51.28	10.63	3.20	0.00	++++	β	+++
	SA12		27.29	17.90	2.60	0.00	++++	β	+
	SA17		19.96	31.43	2.47	0.12	++++	β	+
	SB11		38.40	18.57	2.80	0.00	+	α	+
	SA18	Négatif	58.18	14.43	3.37	0.06	++	β	++
	SA19		58.18	9.09	2.60	0.00	+	α	+
	SB4		62.42	7.35	3.40	0.00	++	β	++
	SB9		36.86	24.42	2.57	0.06	+	α	+
	SB15		33.02	24.59	3.23	0.06	+	α	+
R	RA3	Négatif	56.97	11.11	2.73	0.12	++	β	+
	RA8		56.29	10.84	2.50	0.20	+++	β	+
	RA14		31,62	1,23	3,70	0,10	+	β	+++
	RB10		10.87	4.00	3.30	0.20	+	β	/
	RB1		6,92	0,45	0,49	0,04	-	γ	/
	RB6	Positif	10.83	1.12	2.22	0.81	++	β	/
	RB8		16.00	4.95	1.26	0.05	+++	β	/
	RB9		3.76	1.18	2.80	0.10	++	β	/
	RB13		6.79	0.74	1.21	0.02	++	β	/
	Control		0	0	0	0	-	/	-

Échelle des niveaux : Fort (+++), bon (+++), moyen (++), faible (+), nul (-), ET : Écart-type, E_{24} : Indice d'émulsification, DDH : Diamètre de déplacement d'huile, HS : Hémolyse de sang, EG : Effondrement de goutte, Ø : Diamètre.

2.3.1 Chez les bactéries à Gram négatif

En zone (S), Les meilleures valeurs de E_{24} ont été obtenues pour les souches *Pseudomonas* sp. SB4 et SA18, suivies de la souche *Serratia* sp. SA19 puis le s*Enterobacteries* sp. SB9 et SB15 avec des valeurs de E_{24} (%) de : (62,42±7,35>58,18±14,43>58,18±9,09>36,86±24,42 >33,02±24,59 respectivement).

En parallèle, de forts DDH ont été observés pour les deux souches *Pseudomonas* sp. SB4 et SA18 suivies des entérobactéries SB15, SA19 et enfin SB9 avec des valeurs respectives de DDH (Ø en cm) comme suit : (3,40±0,00>3,37±0,06>3,23±0,06>2,60±0,00>2,57±0,06).

D'un autre côté, les pseudomonades ont montré une activité β-hémolytique sur gélose au sang tandis que les entérobactéries avaient toutes une activité α-hémolytique (tableau 12).

En zone (R), la souche Gram négative RA3 parmi les entérobactéries a montré la meilleure valeur de E_{24} suivie des souche RA8, puis. RA14, RB10, et enfin RB1 avec une très faible activité. Les valeurs de E24 (%) sont comme suit : (56.97±11,11>56.29±10,84>31,62 ±1,23>10.87±4,00>6,92±0,45).

Parallèlement, *Pseudomonas* sp. RA14, avait montré le meilleur DDH, suivie de RB10, RA3, RA8,. RB1 avec des valeurs (en cm) dans l'ordre qui suit : (3,70±0,10>3,30±0,20>2,47±0,05>2.42±0,06>0,49±0,04).

Toutes ces bactéries ont donné une β-hémolyse du sang à l'exception de *Psychrobacter* sp. qui est non hémolytique. Un résultat positif pour le test d'effondrement de la goutte a été observé chez la majorité des bactéries.

La mesure de l'activité de surface au moyen des tests quantitatifs d'émulsification et de déplacement d'huile a fait l'objet de différentes études ayant noté des valeurs de E_{24} variables. Voici quelques exemples chez des bactéries à Gram négatif : Patowary et *al*. (2017) avaient trouvé 88% pour *P. aeruginosa* PG1, Mnif et *al*. (2011) ont détecté 77 % pour *P. aeruginosa* (FJ948174) et 50% pour *P. stutzeri* (AJ295681) alors que Li et *al*. (2021) ont trouvé E_{24}= 22,1% pour *P. aeruginosa* DM3. Nayarisseri et *al*., (2018) ont détecté un E_{24}=15% pour *Escherichia coli*. En ce qui concerne le déplacement d'huile, cette dernière souche a donné un DDH=7,39 cm, alors que Rani et *al*., (2020) ont trouvé un DDH=2,2 cm pour *Pseudomonas sp*. E14.

En revanche, nous avons constaté que l'émulsion formée par certaines souches à Gram négatif reste stable pour une durée d'une semaine (chez *Serratia* sp. SA19, *les souches* RA8 et RB10, et la *Pseudomonas* sp.RA14) et pendant plus d'un mois pour d'autres (*Pseudomonas* sp. SB4 et SA18). Nous pensons ainsi que ces bactéries produisent les deux molécules. Lovaglio et *al*. (2011) ont aussi trouvé une émulsion stable de la souche *P. aeruginosa* LBI qui a duré 30 jours. Ceci est probablement dû à l'action stabilisante du Be qui recouvre les gouttes d'huile émulsionnées empêchant ainsi leur coalescence (Ron & Rosenberg, 2002).

2.3.2 Chez les bactéries à Gram positif

Divers résultats ont été obtenus au sein du groupe des bactéries Gram positives de la zone (S). Pour l'indice d'émulsification, les souches *Bacillus* sp. SA8 et SA9, suivies de

SB11 puis *Bacillus* sp. SA12 et SA17 et enfin *Bacillus* sp. SA3, ont montré des valeurs de E24% dans l'ordre décroissant suivant : (52,22±20,51>51,28±10,63>38,40±18,57>27,29±17,90>19,96±31,43 et enfin 3,53±3,56%).

Pour les DDH : *Bacillus* sp. SA3, avait montré la meilleure valeur suivie de *Bacillus* sp. SA8 et SA9, SB11, *Bacillus* sp. SA12 et SA17 (Ø=4,2± 0,00cm>3,90±0,00>20±0,00>3,23±0,06>2,60±0,00 et 2,47±0,12 respectivement). (Tableau 12).

Une activité β-hémolytique a été notée pour toutes à part *Priestia* sp. ayant présenté une activité α-hémolytique.

En zone (R), le pouvoir émulsifiant était faible. Les souches *Bacillus* sp. RB8, *les Micrococcaceae* RB6, Bacillus sp. RB9 et l'actinomycète RB13 ont montré des indices d'émulsification décroissants ainsi : (16±4,95%>10,83±1,12>6,79±0,74 et 3,76±1,18) respectivement.

Les valeurs de DDH ont aussi été faibles suivant un ordre décroissant de (2,83±0,12>2,22±0,81>1,28±0,05 et 1,21±0,02) chez RB9, RB6, RB8 et RB13 respectivement. Toutes ces souches ont exprimé une activité β-hémolytique. La souche *Staphylococcus* sp RA11, a par contre, été perdue.

Par comparaison de nos résultats à d'autres travaux ayant mesuré ces activités sur des bactéries à Gram positif, des valeurs supérieurs ou avoisinant les nôtres ont été enregistrées. Joy et *al*. (2017) avaient trouvé des valeurs de E_{24}= 65,23% pour *Bacillus* sp. SLDB1 et 61,35% pour *Bacillus* sp. SB2. Nayarisseri et *al*., (2018) ont trouvé un E_{24}= 87% pour *B. subtilis* ANSKLAB03. Pour le test de déplacement d'huile, Rani et *al*., (2020) ont indiqué des valeurs de DDH variant de 1,6 à 3,8 cm pour plusieurs espèces du genre *Bacillus*. Nayarisseri et *al*. (2018) ont trouvé un DDH = 2,5 cm pour *Bacillus* sp. Une étude récente par Ayoib et *al*. (2023) sur un ensemble de souches d'actinomycètes a montré des valeurs de E_{24} très variées allant de 3 à 61%.

2.4 Discussion

Reduction de la biomasse et de la diversité bactérienne

Des études ont prouvé que la biomasse microbienne et l'activité enzymatique sont réduites par l'introduction de divers hydrocarbures dans la matrice du sol et par conséquent, la diversité de la population. Saadoun et *al.*, (2008) ont constaté une réduction de la population microbienne d'environ 50 à 92 % dans les sols gravement pollués par rapport à la charge initiale. Alarcón et *al.*, (2019) ont également considéré l'effet négatif des hydrocarbures pétroliers agissant ainsi comme des molécules toxiques sélectives. Leur présence massive réduit la disponibilité de l'eau, des nutriments et de l'énergie, générant des interactions concurrentielles entre micro-organismes. Il semble que les nouvelles conditions physicochimiques et la disponibilité des hydrocarbures favorisent des microorganismes bien adaptés et contrôlent la capacité et le rendement de la dégradation bactérienne par la flore indigène (Aizhong et *al.*, 2013).

Les caractéristiques physicochimiques et microbiennes des sols arides sont différentes de celles des régions humides et subhumides. Comparativement à d'autres recherches menées dans des écosystèmes pareils, les résultats du dénombrement bactériens qu'on a effectué s'avèrent inférieurs ou supérieurs à leurs résultats.

Une étude de la flore bactérienne des sols du désert d'Atacama par Lester et *al.* (2007), avait montré de faible nombres bactériens allant 10^2 à 10^4 UFC/g. Bodour et *al.*,(2003) ont trouvé que des sols propres de texture sableuse, issus de régions arides, non perturbés par des polluants peuvent contenir jusqu'à 10^5 UFC/g de sol sec, tandis que des sols pollués aux hydrocarbures de la même région, ont montré des résultats allant de $1{,}5x10^6$ à $8{,}1x10^7$ UFC/g de sol sec selon le type de polluants détectés. Saadoun et *al.*,(2008) avait aussi trouvé des nombres bactériens qui peuvent aller jusqu'à $2{,}37x10^7$ UFC/g.

La communauté microbienne change sous l'effet de plusieurs conditions à savoir ; le pH, la salinité, le carbone organique total et l'azote. Cependant, les principales variations dans les climats chauds sont dû aux précipitations et aux températures moyennes annuelles. En effet, selon l'article de synthèse de Vásquez-Dean et *al.* (2020) basée sur 66 recherches sur des échantillons de sols issus de 327 sites arides du monde entier, il a été conclu que ce type d'écosystèmes se caractérise par une faible précipitation, une forte évapotranspiration, un fort rayonnement solaire et une pauvre couverture végétale ce qui contribue au stress hydrique et module la flore microbienne en termes de nombre et de diversité.

Efficacité des tests de détection Bs/Be produits

L'activité de surface et l'activité d'émulsification assurées par la production de Bs et/ou Be, sont d'importantes propriétés chez les bactéries hydrocarbonoclastes. En fait, les Bs et les Be sont deux groupes de molécules différentes, ceci a été confirmé par plusieurs études entre autres celle de Uzoigwe et *al*. (2015) qui ont insisté sur l'importance de distinguer les techniques de détection pour chaque molécule et comment le test de dépistage pourrait détecter une et ignorer la seconde par manque de spécificité. Selon les mêmes auteurs, les Bs réduisent la (TS) et al (TIF) des liquides non miscibles et peuvent les émulsionner, tandis que les Be ont seulement un pouvoir émulsifiant et un pouvoir stabilisant de l'émulsion formée. Ainsi, les résultats des tests de déplacement d'huile et d'effondrement de la goutte sont liés à la production de (Bs) par les bactéries, alors que l'activité d'émulsification des huiles peut indiquer la présence de (Bs) et/ou de (Be).

Toutefois, l'hémolyse sanguine, malgré son utilisation dans plusieurs recherches comme méthode de quantification de (Bs) spécifique de surfactine et de rhamnolipides (Moran et *al*., 2002; Tuleva et *al*., 2002), elle pourrait être liée aussi bien aux deux molécules (Bs et Be) qu'à d'autres molécules complétement différentes telles que les facteurs de virulence, les toxines et les enzymes lytiques qui donneront alors de faux positifs (Walter et *al*., 2010). Pourtant, ce test constitue selon Aao et Oa (2021) un essai biologique sensible et fiable, facile à appliquer dans le cadre de surveillance des candidats microbiens choisis pour produire des biosurfactants sans danger et respectueux de l'environnement.

Par ailleurs, il est bien évident que les techniques appliquées présentent différentes limites de détection et que la réponse à un test est régie aussi par la concentration minimale des molécules synthétisées nécessaire pour qu'il soit positive. Par exemple, le test de l'émulsification du kérosène et le test d'effondrement de la goutte sur parafilm M, peuvent donner de faux négatifs lorsque la concentration de Bs est faible (Youssef et *al*., 2004), contrairement au test de déplacement d'huile dont la plage dynamique est plus grande permettant la détection de très faibles concentrations de Bs (Walter et *al*., 2010).

En effet, la formation d'une émulsion est un phénomène qui dépend de la concentration micellaire critique (CMC) qui diffère d'un Bs à un autre. Pour certains Bs, cette concentration n'est obtenue que par la mobilisation d'une population cellulaire spécifique, dans un phénomène collectif appelé « quorum-sensing » (Perfumo et *al*., 2010). C'est un mode de régulation génétique, médié par des molécules signales appelées autoinducteurs qui lorsqu'elles atteignent une concentration seuil critique, déclenchent une

série de réactions qui pourraient réguler les promoteurs pour activer l'ensemble de gènes impliqués dans la production du biosurfactant (Peele, 2017).

C'est pour cette raison que le test d'émulsification peut donner des résultats négatifs si la concentration du biosurfactant est faible et inferieur à la CMC et ne constitue pas de ce fait un test à 100% fiable pour le criblage des bactéries productrices de Bs/Be (Afshar et *al*., 2008). Cependant, ce test reste très utile dans la visualisation du phénomène d'émulsification, la stabilité de l'émulsion formée ainsi que la détection du phénomène d'adhésion cellulaire aux sources de carbone hydrophobes qui caractérise quelques bactéries en milieu pollué aux hydrocarbures.

Le chimiotactisme, l'adhésion cellulaire et la formation de biofilm

Pour la souche *Serratia* sp. SA19, nous avons constaté qu'après une agitation vigoureuse de son bouillon en présence du kérosène, une émulsion s'est formée et les cellules se sont fixées aux goulettes de celle-ci. Le bouillon est devenu clair et incolore alors qu'il présentait une couleur rouge dû à la production de la prodigiosine par cette bactérie. Rosenberg (2006) avait observé le même phénomène dans ces travaux sur l'adhésion microbienne de *Serratia marcescens*. En plus, les travaux de Semai et *al*. (2021) sur la souche *Serratia* sp. Tan611, ont montré sa capacité à émulsionner les hydrocarbures et à former un biofilm.

Le pouvoir d'adhésion cellulaire a été largement documenté dans la littérature scientifique. En fait, certaines souches ont tendance à modifier leur surface cellulaire afin d'adhérer aux hydrocarbures pour pouvoir les dégrader. Une fois qu'elles détectent leur gradient de concentration dans le milieu, ces bactéries généralement mobiles, sont orientées et attirées par un phénomène de chimiotactisme qui facilite ainsi le contacte entre les deux. Ça leur confère aussi la capacité de former des biofilms qui d'une part contribuent à la dégradation des hydrocarbures et d'autre part les protègent contre les conditions de stresse et fournit un microenvironnement riche en nutriments.

De leur côté, Grimm et Harwood (1997) ont découvert que la souche *P. putida* possédant des chimiorécepteurs spécifiques (La protéine NahY codée par des plasmides) était attirée par le naphtalène. Ils ont signalé que les flagelles et les chimiorécepteurs hébergés à la surface cellulaire sont des caractéristiques qui aident les bactéries mobiles à localiser et se déplacer vers l'hydrocarbure métabolisable. Lacal et *al*. (2011) ont également signalé une réaction chimiotactique envers le naphtalène par *P. putida* DOT-T1E, qu'ils ont expliqué par la capacité des bactéries à détecter le gradient de concentration

d'un large éventail de produits chimiques. Ils ont également stipulé que les (HA) sont pour certaines bactéries chimio-attractifs et pour d'autres chimio-répulsifs.

En outre, le genre *Pseudomonas* sp. est très connue par sa capacité à former des biofilms sur des substrats hydrophobes suite à un chimiotactisme exercé par ces derniers sur les cellules (Dasgupta et *al*., 2013). Cette performance tous comme la synthèse des biosurfactants, dépend de la densité cellulaire (quorum-sensing). De plus, les biofilms libèrent des exopolysaccharides (EPS) qui contribuent ainsi à la solubilité des (HA) et à la stabilisation de l'émulsion formée (Kumari et *al*., 2016).

Il en va ainsi pour les Entérobactéries, qui généralement possèdent des fimbriae ou secrètent des exopolymères qui vont médier ce processus (Bhatti et *al*., 2017) tel est particulièrement le cas pour *Kosakonia* sp. (Shahid et *al*., 2022) et *Enterobacter* sp. (Kim & Joo, 2018).

La souche *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 appartenant aux *Moraxellaceae,* étudiée par Rosenberg et Rosenberg (1985), libère le polysaccharide émulsan dans le milieu afin d'augmenter son hydrophobicité cellulaire et pouvoir adhérer à l'hexadécane . *Psychrobacter* sp. SW5 est une bactérie marine qui s'est montré apte aussi à former des biofilms (Dalton & March, 2000).

Il s'agit également du cas pour les actinomycètes (El Othmany et *al.*, 2021), comme *Streptomyces* sp.(Claessen et *al*., 2003), *Kocuria* sp.(Mohsen et *al*., 2022) et des espèces du genre *Bacillus* (Auger et *al*., 2009).

Selon les scientifiques, ces propriétés sont très importantes pour l'accès aux sources hydrophobes dans l'environnement qui constitue un système ouvert ou l'huile sera dispersé rendant difficile son contact avec les cellules ou bien lié à la matrice du sol le rendant récalcitrant et persistant.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

3. IDENTIFICATION MOLECULAIRE DES SOUCHES SELECTIONNEES

3. IDENTIFICATION MOLECULAIRE DES SOUCHES SELECTIONNEES

3.1 Identification moléculaire des souches sélectionnées

Vingt isolats représentant la majorité des phénogroupes précédemment caractérisés, sélectionnés en se basant sur les résultats des tests de production de Bs/Be, ont fait l'objet d'une identification moléculaire.

L'amplification d'une séquence partielle du gène codant pour l'ARNr*16S* a été effectuée en présence d'un couple d'amorces (63F et 1389R), directement sur colonies pures. La longueur des fragments amplifiés a été autours de 1200 pb. Après alignement de ces séquences sur la base de données NCBI de *GenBank*, les séquences valides présentant les pourcentages de similitude les plus importants avec les nôtres ont été retenues (tableaux 13 et 14), en se référant aux valeurs seuils pour l'identification au niveau du genre et de l'espèce (pourcentage de similitude >95% pour le taxon genre et >98,65% pour le taxon espèce) (Stackebrandt et Goebel 1994; Kim et *al*. 2014). Dans notre étude, nous ne tenons compte que des genres puisque l'identification des espèces nécessite des techniques plus fiables telle que l'hybridation ADN/ADN (>70% d'homologie entre la séquence requête et la séquence de l'espèce connue).

D'après les résultats de l'identification, les bactéries des zone S et R ont été attribuées à deux lignées taxonomiques principales : les embranchements *Bacillota* et *Pseudomonadota* (anciennement *Firmicutes* et *Proteobacteria*), en plus de quelques bactéries du site R appartenant à l'embranchement *Actinomycetota* (anciennement *Actinobacteria*) (Oren et Garrity 2021).

3.2 Reconstruction des arbres phylogénétiques

Afin de retracer les liens évolutionnaires entre les gènes/souches appartenant à une même niche écologique, les séquences requêtes et les séquences d'espèces types apparentées ont été utilisées pour la génération de deux arbres phylogénétiques des deux zones (S) et (R) séparément. La séquence d'une bactérie externe (hors-groupe) a été utilisée pour enraciner les arbres inférés selon la méthode du maximum de vraisemblance, reflétant au mieux la relation phylogénétique entre les séquences. Le bootstrap a été conduit 1000 fois et les valeurs sur les branches de l'arbre indiquent leur robustesse.

Tableau 13. Identité des bactéries isolées de la zone S.

Isolat	Identité phénotypique	Fréquence d'isolement	Longueur de fragment amplifié	Base de données NCBI		
				Correspondance la plus proche	Numéro d'accession	% de similarité
SA3	*Bacillus* spp.	3	1225	*Bacillus mojavensis* ifo 15718	MW229045	98.13%
SA9	*Bacillus* spp.	5	1255	*Bacillus cereus* IAM 12605	MW229046	95.88%
SA8	*Bacillus* spp.	7	469	Aucune correspondance		
SA12	*Bacillus* spp.	5	1241	*Bacillus cereus* IAM 12605	MW229042	97.20%
SA17	*Bacillus* spp.	1	1229	*Bacillus sanguinis* BML-BC004	MW229039	97.97%
SA18	*Pseudomonas* spp.	3	1233	*Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071	MW229040	97.33%
SA19	*Serratia* spp.	1	663	*Serratia surfactantfaciens souche YD25*	MW231892	98.21%
SB4	*Pseudomonas* spp.	3	1230	*Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071	MW229041	97.26%
SB9	*Enterobacteriaceae*	1	1233	*Enterobacter ludwigii* EN-119	MW229043	98.02%
SB11	*Bacillus* spp.		1266	*Priestia megaterium* ATCC 14581	MW231893	96.40%
SB15	*Enterobacteriaceae*	1	1221	*Kosakonia oryzae* Ola 51	MW229044	97.45%

Tableau 14. Identité des bactéries isolées de la zone R.

Isolat	Identité phénotypique	Fréquence d'isolement	Longueur de fragment amplifié	Base de données NCBI		
				Correspondance la plus proche	Numéro d'accession	% de similarité
RA3	*Enterobacteriaceae*	4	1239	*Pseudescherichia vulneris* souche NBRC 102420	MW229032	100.00%
RA8	*Pseudomonadaceae*	2	1266	*Stutzerimonas chloritidismutans* souche AW-1 16S	MW229033	96.58%
RA14	*Pseudomonadaceae*	9	1229	*Pseudomonas aeruginosa* souche DSM 50071	MW229034	95.86%
RB1	*Moraxellaceae*	1	1219	*Psychrobacter pulmonis souche CCUG 46240*	MW229035	96.71%
RB6	*Micrococcaceae*	6	1218	*Kocuria palustris* souche TAGA27	MW229030	97.79%
RB8	*Bacillus* sp.	1	1226	*Bacillus pseudomycoides* souche NBRC 101232	MW229031	97.39%
RB9	*Bacillus* sp.	1	1239	*Bacillus toyonensis* souche BCT-7112	MW229036	97.88%
RB10	*Pseudomonadaceae*	2	1233	*Stutzerimonas stutzeri* souche CCUG 11256	MW229037	97.24%
RB13	Actinomycète	1	1233	*Streptomyces geysiriensis* souche NBRC 15413	MW229038	98.11%

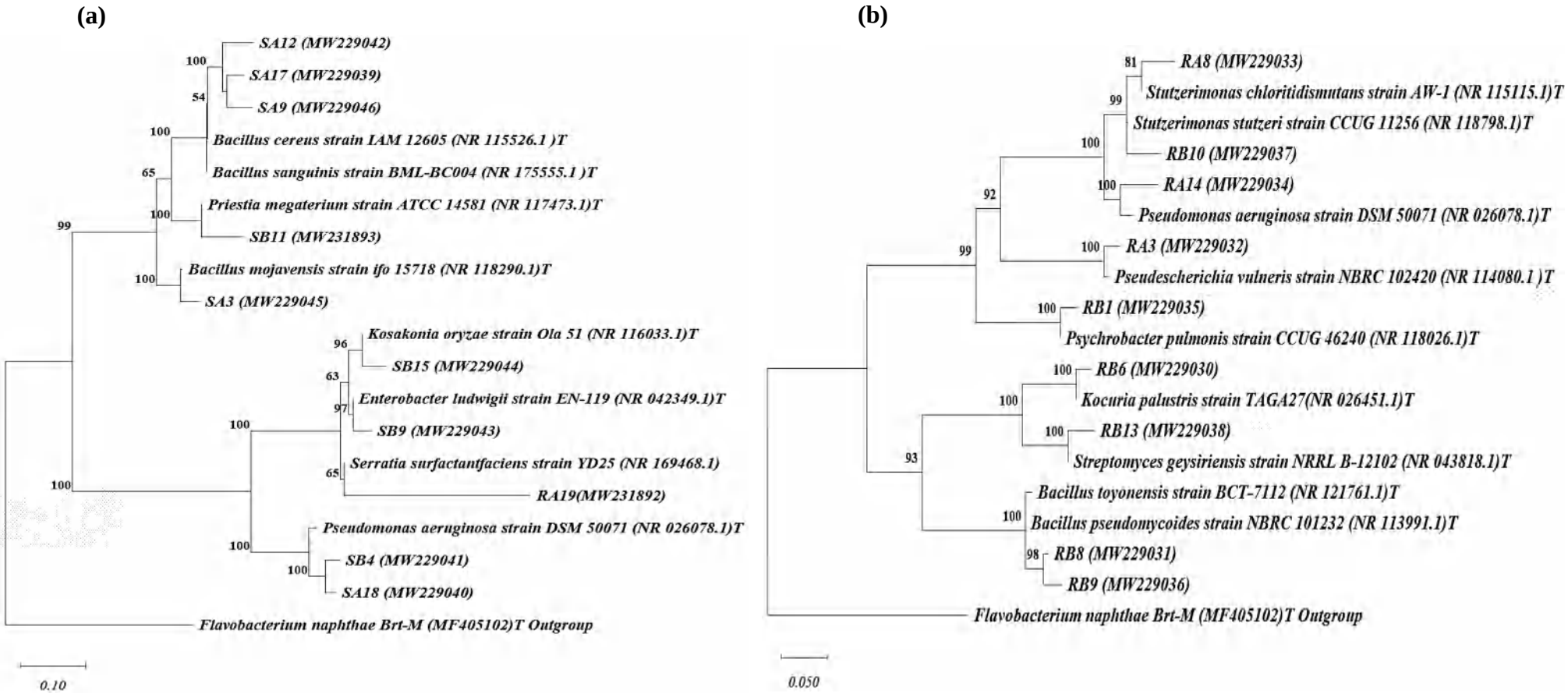


Figure 24. Arbres montrant les relations phylogénétiques entre nos séquences d'ADNr*16S* des isolats de la zone S (a) et de la zone R (b) et ceux d'espèces apparentées. La séquence de *Flavobacterium naphthae* Brt-M (NR 159280.1) a été utilisée comme groupe externe pour l'enracinement des arbres. Les valeurs sur les branches représentent le bootstrap avec 1000 répétitions (>50 %). La barre d'échelle indique 10% et 5% de divergence des séquences pour les deux arbres respectivement.

3.3 Discussion

Le graphique à barres horizontales indique la fréquence des genres bactériens isolés de l'ensemble des échantillons (figure 25). Plusieurs espèces affiliées à ces genres ont été documentées dans la bibliographie comme étant des bactéries dégradant le pétrole et ses dérivées et produisant des biomolécules impliquées dans ce processus.

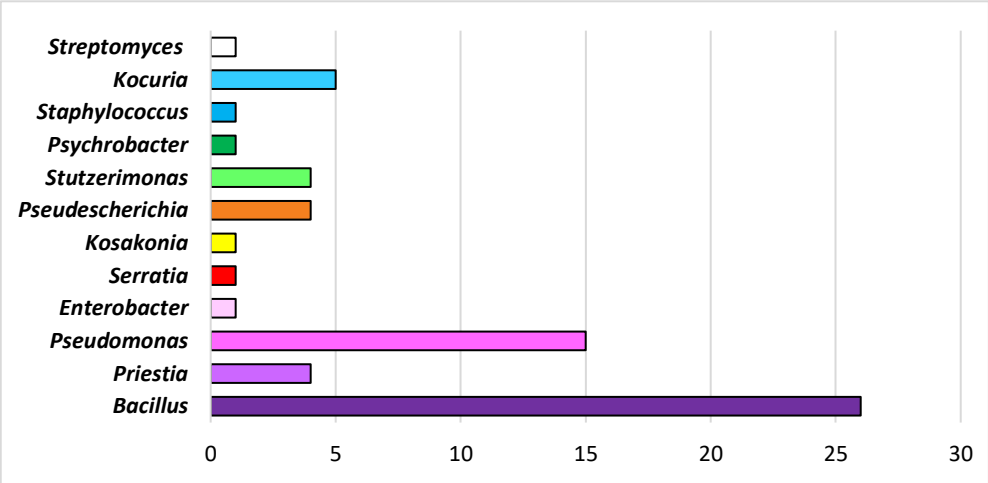


Figure 25. Abondance des genres bacteriens identifiés dans notre recherche regroupant des bacteries hydrocarbonoclastes et productrices de Bs/Be.

Bactéries à Gram négatif dégradant les (HA) et produisant les Bs/Be

***Pseudomonas* spp.**

D'après la littérature, le genre *Pseudomonas*, abrite de nombreuses espèces très connues comme agents de dépollution, grâce à leur fort potentiel catabolique des hydrocarbures pétroliers et importante diversité de Bs/Be synthétisés. Dans les travaux de Patowary et *al*. (2017), le pétrole brut et des (HAP) récalcitrants étaient utilisés comme seule source de carbone et d'énergie par l'espèce *P. aeruginosa* PG1 avec la synthèse de rhamnolipides. Darvishi et *al*. (2011) avaient employé le consortium ERCPPI-2, formé de deux bactéries telluriques issus de sites pollués : *Enterobacter cloacae* et *Pseudomonas sp*. pour produire un mélange de biosurfactants dont les propriétés de résistance aux conditions défavorables (températures, pH, et salinité) sont intéressantes pour la biorestauration de sites contaminés en conditions extrêmes. Ceci peut expliquer la prédominance des bactéries appartenant à ce genre, observée dans les sols désertiques R. D'autres chercheurs ont trouvé aussi des résultats similaires. On peut citer la recherche de Saadoun et *al*. (2008) dans les sols pollués du désert de la Jordanie et l'Iraq.

***Stutzerimonas* spp.**

D'autres bactéries considérées avant comme des *Pseudomonas sp.* mais reclassées actuellement dans un nouveau genre qui est *Stutzerimonas* sp. (Gomila et *al*., 2022; Lalucat et *al*., 2022), ont été détectées dans les sols polluées de la zone aride R. Une étude très récente faite par Nejidat et *al*. (2023) a examiné l'émergence d'espèces bactériennes dégradant le pétrole dans le sol d'une zone hyperaride du désert du Néguev, au sud palestinien. Exposés à un grand déversement de pétrole, ces sols ont montré l'existence de bactéries apparentées à l'espèce *Stutzerimonas stutzeri*.

***Psychrobacter* spp.**

Certaines espèces du genre *Psychrobacter* sp., sont connues pour leur osmotolérance et leur capacite à croitre dans des environnements froids (Bowman, 2006). Des études ont bien montré que des espèces de ce genre, isolées de l'antarctique sont capables de pousser sur milieux contenant le pétrole brut comme source de carbone unique et de produire des biosurfactants de type sophrolipides et rhamnolipides, à basse température de 4°C (Trudgeon et *al*., 2020). Cette bactérie a été aussi détectée dans notre analyse des sols arides et pollués de la zone R. Très rares sont les études ayant mis en évidence cette bactérie dans des environnements chauds. On peut citer celle de Jianping et *al*. (2004) qui a porté sur le dénombrement et l'identification de bactéries cultivables isolées des sols du bassin de la rivière Heihe dans le Nord-Ouest de la Chine, une région extrêmement aride.

Entérobactéries

Par ailleurs, Plusieurs genres d'entérobactéries ont fait l'objet d'études par divers chercheurs qui se sont intéressés à leur pouvoir de production de Bs utiles dans plusieurs domaines d'application entre autres la bioremédiation. L'article de synthèse de Cortés-sánchez et *al*. (2015) a recensé de nombreux travaux portant sur les genres suivants : *Klebsiella* sp, *Proteus* sp., *Serratia* sp., *Providencia* sp., *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Escherichia* sp. et *Pantoea* sp.

***Enterobacter* spp.**

Le travail de Toledo et *al*. (2008) sur la souche *Enterobacter* sp. 214 et celui de Ejaz et *al*. (2021) sur la souche *Enterobacter cloacae* S4 (PMEL-79) ont prouvé leur capacité à synthétiser des exopolysaccharides et émulsifier plusieurs substrats hydrophobes comme le pétrole brut ou un mélange d'hydrocarbures.

***Kosakonia* spp.**

Par rapport aux membres du genre *Kosakonia* sp., constituant une reclassification de quelques espèces qui appartenaient autrefois au genre *Enterbacter* sp. elles ont été étudiées en tant que bactéries promotrices de croissance des plantes (Berger et *al.*, 2017) et comme étant des fixatrices d'azote atmosphérique grâce à leur nitrogénase (Bergottini et *al*., 2015).

Elles ont été aussi utilisées en tant qu'agents de dégradation des pesticides, isolés à partir la de la rizière dans les travaux de Dash et Osborne (2020), comme agents dégradant l'huile de cuisson isolés des déchets de cuisine (Ren et *al*., 2020) et également dégradant un mélange de plastiques (polyéthylène et de polystyrène) avec le genre *Citrobacter* sp. dans les intestins des larves de l'insecte Ténébrion meunier (*Tenebrio molitor*) dans les travaux de Brandon et *al*. (2018). Cependant, très peu d'articles traitent *Kosakonia* spp. en tant que bactéries dégradant les hydrocarbures. Nous pouvons citer celui de Chen et *al.* (2020) qui a montré la capacité de l'espèce *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A, à dégrader les HAM (TEX).

Escherichia spp.

Le genre *Escherichia* comprend des espèces reconnues comme saprophytes provenant de la flore intestinale ou pathogènes humains notamment *E. coli*, mais très peu d'espèces ont été rencontrées dans les sols comme bactéries dégradant les hydrocarbures. L'émergence de nouvelles souches en tant que productrices de biosurfactants avec des applications environnementales de biorestauration a été constatée par des recherches comme celle de Sriram et *al*. (2011), qui ont signalé l'isolement de la souche *E, fergusonii KLU01* d'un sol contaminé au pétrole, capable de dégrader les hydrocarbures, de tolérer les métaux lourds et de synthétiser les émulsifiants de type lipopeptides. Une autre étude menée par Pasumarthi et *al*. (2013) avait montré le potentiel de dégradation des hydrocarbures pétroliers par deux bactéries *P. aeruginosa* et *E. fergusonii* issues de sédiments de la côte de Goa en Inde. Elles ont pu éliminer en 45 jours les (HAP) suivants : l'anthracène, le fluorène, le pyrène, le naphtalène, le fluoranthène, le dibenzothiophène et le phénanthrène.

Cependant, aucune recherche n'a été trouvée sur le pouvoir de dégradation de pétrole ou ses dérivés par la bactérie *Pseudescherichia sp.* (anciennement *Escherichia vulneris*).

Bactéries à Gram positif dégradant les (HA) et produisant les Bs/Be

Bacillus spp

Les bactéries Gram positives en particulier les espèces du genre *Bacillus* ont été amplement étudiées comme étant hydrocarbonoclastes. Liu et *al*. (2010) avait montré la capacite de trois souches de ce genre à dégrader le benzène et l'efficacité de cette dégradation été meilleure lorsque ces souches étaient utilisées en consortium. Mukherjee et Bordoloi (2012) ont trouvé qu'un consortium formé d'espèces productrices de biosurfactants : *B. subtilis* DM-04 associée à *deux P. aeruginosa*, était capable de dégrader efficacement le benzène, le toluène et le xylène (BTX). La même espèce était étudiée par Parthipan et *al*. (2017) dans la dégradation du pétrole brut et la production de bioémulsifiants puissants. L'étude menée par Patowary et *al*. (2015) a montré que la souche *Bacillus pumilus* KS2, isolée de sol pollué par le pétrole brut a pu dégrader les (HAP) suivants : naphtalène, acénaphtène, acénaphtylène, 2-bromonaphthalène, fuorine), benzo[a]pyrène et dibenzo[a, h]anthracène, indeno[1,2,3-c,d]pyrène et benzo[g,h,i]perylène. Elle a produit un Bs glycolipidique qui a amélioré la disponibilité des hydrocarbures et leur dégradation.

Priestia spp.

Concernant l'espèce *Priestia megaterium* (anciennement *B. megaterium*), l'article de Syakti et *al*., (2013) a mis l'accent sur sa capacité à éliminer le fluorène, le fluoranthène, le phénanthrène et le pyrène dans un microcosme huileux tout en synthétisant des biosurfactants qui augmentent la solubilité de ceux-ci et modifient l'hydrophobicité cellulaire, ce qui contrôle leur attachement et détachement des substrats hydrophobes. Une étude très récente par Siddiquia et *al*., (2023) avait montré que cette souche été apte aussi à cataboliser les hydrocarbures aliphatiques (alcanes). Une autre espèce de ce genre *P. aryabhattai* était, selon Esikova et *al*., (2021) capables de dégrader le benzoate, un dérivé de composés aromatiques.

***Staphylococcus* spp**.

Par ailleurs, les espèces du genre *Staphylococcus* sp., ont bien été étudiées comme bactéries à fort pouvoir dégradatif des hydrocarbures, intervenant parmi les utilisateurs primaires grâce aux mécanismes d'adhésion et d'émulsification (Nweke et Okpokwasili 2003). Ibrahim et *al*. (2015) ont rapporté que la souche *S. aureus* S1, isolée de sols pollués à Dammam, une région désertique chaude de l'Arabie saoudite, a pu dégrader expérimentalement le pétrole brut. La souche *S. xylosus* STF1 étudiée par San Keskin et *al*. (2015) a été capable d'émulsifier le benzène et le kérosène en produisant un biosurfactant de type lipopeptidique. Une autre

souche *S. haemoliticus* 10SBZ1A, étudiée par Nzila et *al*. (2021), était apte à dégrader le pyrène, le phénanthrène, l'anthracène, le naphtalène ainsi que le benzo[a]pyrène à haut poids moléculaire en présence de fortes concentration d'NaCl, indiquant qu'elle est halophile et capable de vivre dans des sols salins.

***Streptomyces* spp.**

Le dernier groupe de bactéries isolées des sols pollués de la zone aride R est constitué d'actinomycètes. Ces bactéries caractérisées par leur diversité génétique, leur potentiel métabolique ainsi que leur pouvoir de sporulation assurant leur omniprésence même dans des conditions extrêmes de pH, de sècheresse, de hautes température et salinité (Trenozhnikova et Azizan 2018). D'après Makhalanyane et *al*. (2015), les actinobactéries prédominent souvent les autres flores dans les recherches menées sur la diversité bactérienne des sols désertiques. Bien que bon nombre de celles-ci sont ubiquitaires dans tous les types de sol, comme pour *Streptomyces* sp., certains genres comme le genre *Kocuria* sp. sont moins communs.

Selon Brzeszcz et Kaszycki (2018), les *Streptomyces* ne sont pas considérées efficaces en tant qu'agents de décomposition d'hydrocarbures. Malgré leur contribution à l'élimination de certains hydrocarbures aliphatiques et aromatiques, les scientifiques ont trouvé que ces bactéries emploient des mécanismes et des voies métaboliques différentes de celles des autres bactéries. En effet, Ferradji et *al*. (2014) ont isolé trois souches, qui peuvent dégrader le naphtalène *Streptomyces* spp. AB1, AH4 et AM2 en produisant les biosurfactants, mais dont les métabolites de dégradation et par conséquent les voies métaboliques sont spécifiques. Toutefois plusieurs études ont bien confirmé que des souches isolées de sols pollués sont très efficaces dans l'élimination du pétrole ou de ses dérivés aromatiques. C'est le cas notamment de la souche *Streptomyces* sp. ERI-CPDA-1 qui a pu utiliser les hydrocarbures suivants en tant que seule source de carbone ; le pétrole, le kérosène, le benzène, le xylène, le toluène le naphtalène et le phénanthrène (Balachandran et *al*., 2012).

Une autre recherche très pertinente, a mis en évidence des souches endophytiques de plantes issues de zones polluées au pétrole dans la région de Ouargla. Ces souches appartenant au genre *Streptomyeces* ont bien pu dégrader le pétrole brut tout en produisant des Bs (Baoune et *al*., 2018). En même temps, plusieurs auteurs ont montré la production de différents biosurfactants par les espèces de ce genre, par exemple la souche *Streptomyces* sp. R1, a synthétisé un lipopeptide (Zambry et *al*., 2017), la souche *Streptomyces griseoplanus* SM1 a produit un biosurfactants polymériques contenant trois fraction : glucidique, lipidique et protéique

(Elkhawaga, 2018) et la souche *Streptomyces* sp. MAB36, isolée des sédiments marins été capable de produire un glycolipide (Manivasagan et *al*., 2014).

***Kocuria* spp.**

De son côté, le genre *Kocuria* sp., comporte plusieurs espèces hydrocarbonoclastes caractérisées par la synthèse de biosurfactants. Une étude de dynamique de populations microbiennes lors de la bioremediation d'un sol désertique contaminé au pétrole, avait montré que le genre *Kocuria* sp., était minoritaire au début de la pollution, mais ses espèces ont prévalu au fils du temps (Ali et *al*., 2020). Selon Alotaibi et *al*. (2021), aucune espèce bactérienne ne peut agir seule et décomposer complètement tous les hydrocarbures. *Kocuria* sp. est considérée parmi les 79 genres isolés à nos jours, pouvant dégrader les (HAP), mais avec une efficacité variable en fonction des mécanismes d'accès aux sources de carbone hydrophobes et des enzymes catalytiques dont elle dispose.

La souche *Kocuria marina* BS-15, isolée sur milieu contenant le pétrole brut a pu produire un Bs lipopeptidique (Gontia-Mishra et *al*., 2017). Deux souches isolées de la côte tunisienne près d'une raffinerie à partir des eaux et des sédiments marins pollués, ont été identifiées en tant que *K. polaris* et *K. rosea*. Elles ont produit des Bs avec un fort pouvoir d'émulsification et de déplacement d'huile (Brzeszcz et *al*., 2018). Parallèlement, une étude de Sakshi et *al*. (2021) a montré l'activité de plusieurs enzymes (des dioxygénases, déshydrogénases et des peroxydases) chez la souche *K. flava* durant la dégradation de phénanthrène, anthracène et fluorène.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

4. ETUDE STATISTIQUE COMPARATIVE DES DONNEES COLLECTEES DES DEUX ZONES POLLUEES

4. ETUDE STATISTIQUE COMPARATIVE DES DONNEES COLLECTEES DES DEUX ZONES POLLUEES

Il est important de rappeler que les zones d'étude sont localisées dans deux domaines qui diffèrent par leur nature géologique et conditions climatiques : le domaine méditerranéen et le domaine désertique, ce qui peux constituer une importante source de la variabilité des données microbiologiques, en plus des autres sources liées à l'activité anthropique, au type de pollution et à la nature et taux de polluants présents.

Dans cet esprit, le présent chapitre est consacré à l'analyse statistique comparative entre les jeux de données obtenus des deux zones industrielles étudiées, dont les objectifs principaux sont de répondre aux questions suivantes :

1) Est-ce qu'il y a des différences statistiquement significatives entre les paramètres mesurés sur les sols prélevés à différentes distances d'une citerne ? autour de trois citernes d'une zone ? et entre les sols des deux zones d'étude ?
2) Parmi ces paramètres étudiés (physicochimiques et teneurs en (HA), lesquelles contribuent le plus à la variabilité des données des deux zones ? et sont-elles corrélées aux nombres des bactéries aérobies cultivables ?
3) Est-ce qu'il existe des correspondances entre les taxons bactériens détectés et les différents (HA) mesurés sur les échantillons de sol ?

Pour répondre à ces questions, plusieurs analyses statistiques ont été utilisées, allant des statistiques descriptives (tableau VIII annexe 6) aux inférentielles (tests d'hypothèse nulle et alternative) aux exploratoires via différentes représentations graphiques.

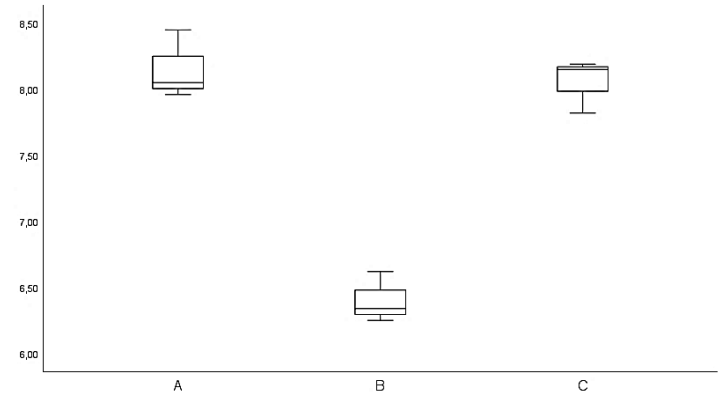
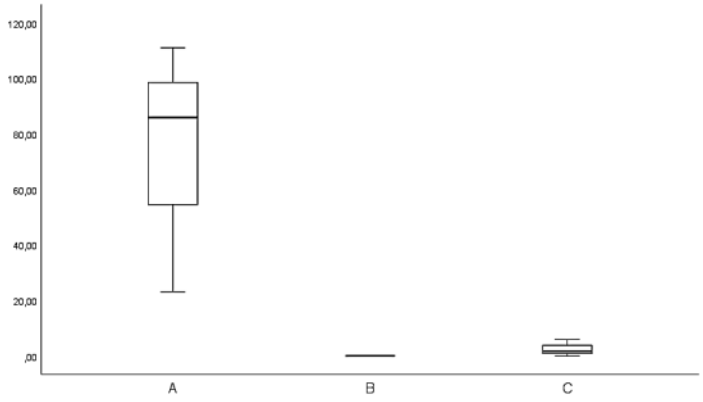
4.1 Analyse de l'effets 'distance', 'site' et 'zone' sur la variabilité des données

Afin de voir s'il existe des différences significatives entre les mesures effectuées (pH, CRE, MO, HA, et N bactérien) sur les échantillons de sols prélevés à différentes distances d'une citerne (modalités : E1, E2, E3), autours de citernes dans trois sites (modalités : A, B, C) et dans deux zones (modalité S et R), le test de l'ANOVA à un facteur pour échantillons indépendants a été conduit. Il permet de tester l'hypothèse nulle (H_0) selon laquelle, les variables mesurées ne diffèrent pas en fonction des modalités de chaque facteur et l'hypothèse alternative (Ha) sur l'existence de différences qui ne sont pas dus au hasard, au seuil de risque (α=0,05).

Les résultats de la comparaison des variances (Tableaux VI, VII, VIII et IX en annexe 6) n'ont montré aucune différence significative entre les trois échantillons (E1, E2

et E3) de chaque citerne des zones (S) ou (R) (p>0,05). Ainsi, on peut dire qu'il n'y a pas d'effet 'distance de prélèvement' sur la variabilité des propriétés du sol, des teneurs des (HA) et des nombres de bactéries aérobies. Par contre, des différences ont été détectées dans la zone (S) entre les trois citernes, par rapport aux variables : pH et GHI (tableau 15). Contrairement, en zone (R), aucune différence significative n'a été observée.

Tableau 15. Résultats de l'analyse de la variance ANOVA entre mesures des trois citernes de la zone S.

Zone S	Boites à moustaches* par citerne	F	P
pH		59,334	<,001
GHI		7,566	,023

* Les boîtes à moustaches des valeurs de pH et GHI des trois citernes de la zone S. Le rectangle indique les valeurs comprises entre le premier quartile et le troisième quartile, la ligne à l'intérieur désigne la médiane et les deux moustaches de part et d'autre de la boîte montrent la valeur minimale et la valeur maximale.

Afin de révéler les groupes qui diffèrent, un test *post hoc* est conduit, après vérification de l'homogénéité des variances par le test de comparaisons multiples *Levene*. Ses résultats ont montré que pour le pH, l'homogénéité est assumée (p>0,717, H_0 acceptée), donc le test post-hoc de *Gabriel* pour les petits effectifs a été conduit, tandis que pour la

variable GHI (concentration du Benzo (g,h,i) perylène), les variances ne sont pas homogènes ($p<0,018$, H_0 rejetée) donc le test sera plutôt celui de *Dunnett* T3.

Le premier test a révélé deux groupes différents par rapport aux valeurs de pH, un formé des sites A et C et le deuxième du site B alors que le deuxième test n'a pas montré les groupes qui diffèrent puisque la concentration du GHI été de 0 autours de la citerne A (tableau 16).

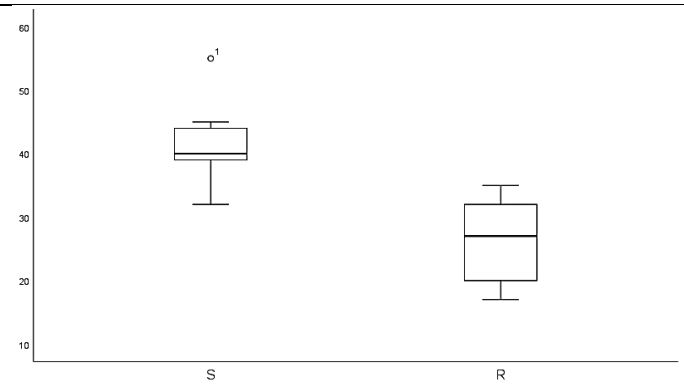
Tableau 16. Résultats des tests post-hoc *Gabriel* et *Dunnett* pour les comparaisons multiples

Variable dépendante		(I) Site	(J) Site	Différence moyenne (I-J)	Erreur standard	Sig.
pH	**Gabriel**	A	B	**1,75000***	,18043	**<,001**
			C	,10000	,18043	,922
		B	A	**-1,75000***	,18043	**<,001**
			C	**-1,65000***	,18043	**<,001**
		C	A	-,10000	,18043	,922
			B	**1,65000***	,18043	**<,001**
GHI	**T3 de Dunnett**	A	B	73,34333	26,15294	,216
			C	70,79000	26,21240	,228
		B	A	-73,34333	26,15294	,216
			C	-2,55333	1,76463	,529
		C	A	-70,79000	26,21240	,228
			B	2,55333	1,76463	,529

*. La différence moyenne est significative au niveau 0.05. Le gras indique les différences significatives.

Donc on peut conclure qu'il existe un effet 'site de prélèvement' sur la variation du pH en zone S et ces différences ne sont pas aléatoires.

Tableau 17. Résultats des test *t* de *Student* pour la comparaison de deux moyennes.

CRE	Boites à moustaches* par zone	t/ F	P
t de Student		4,740	<0,001

* Les boîtes à moustaches des valeurs de CRE dans les deux zones étudiées S et R. Le rectangle indique les valeurs comprises entre le premier quartile et le troisième quartile, la ligne à l'intérieur désigne la médiane et les deux moustaches de part et d'autre de la boîte montrent la valeur minimale et la valeur maximale. Le sigle (°) indique une valeur extrême.

Dans le but de voir la différence entre les échantillons des zones S et R, une comparaison des moyennes par le test t de Student a été effectuée (Tableau X annexe 6). Selon le résultat, seule la CRE diffère significativement entre les zones S et R (tableau 17).

4.2 Analyse des composantes principales (ACP)

Cette méthode d'analyse multivariée permet la réduction du nombre de variables à considérer dans un jeu de données, en mettant l'accent sur celles qui contribuent le plus à la variabilité créant ainsi une nouvelle structure des données selon deux à trois axes. Elle met aussi en évidence les corrélations et les groupes homogènes d'observations qui se forment. Avant de procéder à l'ACP, il est important de vérifier la convenance du jeu de données à ce genre d'analyse par la mesure de l'indice de *Kaiser-Meyer-Olkin* (KMO doit être >0,5) sur la qualité de l'échantillonnage des données et par le test de sphéricité de *Bartlett* qui vérifie la correlation des variables entre elles (Sig. <0,05). Il est important d'éliminer les variables qui sont faiblement corrélées et mal représentées par les axes de l'ACP afin d'améliorer la qualité de l'analyse et la crédibilité de l'interprétation. Ces tests ont été effectués et les résultats sont sur les tableaux XI en annexes 6. Deux facteurs sont retenus pour l'ACP, présentant des valeurs propres de variance > 1. La considération des données provenant des deux zones ensembles sur le même graphe a permis une meilleure répartition selon leur origine. Les deux premiers facteurs CP1 et CP2 ont expliqué 79,32% de l'inertie (54,31% et 25,01% respectivement). Le graphique des corrélations en figure 26 (a), a illustré une forte relation positive entre le premier axe et les (HA) : BBFc5 et DBAc5 et ACNc3, et une correlation négative moins forte avec le pH. Tandis que le deuxième axe, a été moyennement corrélé à la CRE et faiblement au BNZc1 et NAPc2 du côté positif et à l'FLRc3, puis au GHIc6 et la MO du côté négatif.

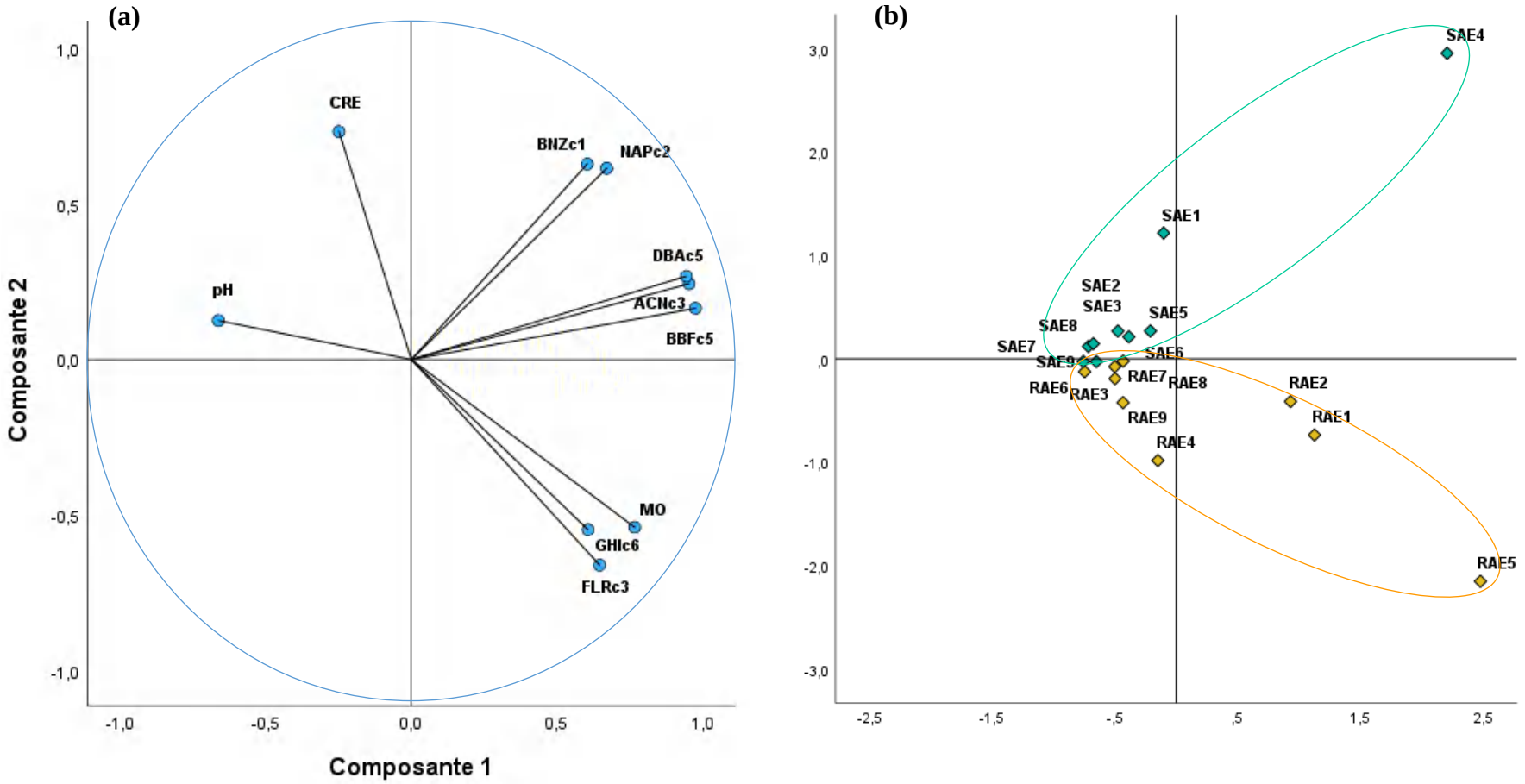


Figure 26. Carte factorielle de l'analyse en composantes principales montrant la variation des paramètres de sol dans les différents échantillons. (a) Le cercle des corrélations indiquant les variables actives, (b) Graphe des observations présentant la distribution des échantillons de sol. Les deux ellipses colorées représentent la zone S (vert) et la zone R (orange).

4.3 Correlation entre les variables et le nombre bactérien

Dans le but de déceler les relations statistiquement puissantes entre les variables élus (paramètres physicochimiques, teneurs en hydrocarbures mono et polyaromatiques) et les nombres bactriens, une matrice de correlation a été générée (Tableau XII annexe 6) grâce au calcul du coefficient de Spearman (r).

Les résultats ont montré l'existence de moyennes à fortes corrélations négatives entre le N et les hydrocarbures : BNZc1, ACNc3, DBAc5 et GHIc6 en calculant le de Spearman (tableau 18).

Tableau 18. Résultats du test de correlation bilatérale de *Spearman* entre les (HA) et le nombre bactérien.

Coefficient de corrélation (r) de *Spearman*				
	BNZc1	**ACNc3**	**DBAc5**	**GHIc6**
N (UFC/ml)	-,777**	-,582*	-,475*	-,650*
Sig. (Bilatérale)	0,000	0,011	0,047	0,047

**La corrélation est significative au niveau 0.01 (bilatéral), * au niveau 0.05 (bilatéral).

4.4 Analyse factorielle des correspondances (AFC)

Cette analyse géométrique a été conduite dans l'intention de voir l'association entre deux variables qualitatives : 'genre bactérien' et 'hydrocarbure aromatique'. Elle se base sur le tableau de contingence contenant les fréquences formées par ces deux variables. Le test de khi2 permet d'évaluer l'existence de dépendance significative entre les variables en lignes et en colonnes et la représentation en nuages de points dans un espace à plusieurs dimensions permet de visualiser graphiquement ces associations. Les résultats du test Khi2 sont significatives (tableaux XIII, XV en annexe 6), ce qui indique l'existence de rapports entre les (HA) et les bactéries, classées ultérieurement dans six genres bactériens en zone S et huit genres en zone R (tableaux XIV, XVI en annexe 6).

Pour la zone S, les deux premières dimensions dégagent 91,4% de l'inertie totale (74,9% et 16,5% pour l'axe 1 et 2 respectivement).

Les hydrocarbures FLRc3, PHNc3 du côté positif et le BNZc1, l'ACNc3 et le NAPc2 du côté négatif de l'axe 1 contribuent fortement à l'explication de sa variabilité. Tandis que pour l'axe 2, son inertie est majoritairement expliquée par le DBAc5 et le GHIc6 du côté positive et du BAPc5 du côté négatif. On note que les points du nuage sont distants de l'origine du biplot, ce qui suggère une bonne représentation des données par les deux dimensions

sélectionnées (figure 27 a), avec une bonne présentation des points colonnes par chacun des axes 1 et 2 (HA en gras sur tableau 19).

Tableau 19. Scores des deux dimensions de l'AFC par rapport aux points colonnes (HA) des deux zones S et R.

Présentation des points colonnes					
Zone S			Zone R		
Hydrocarbures	Scores de la dimension		Hydrocarbures	Scores de la dimension	
	Axe 1	Axe 2		Axe 1	Axe 2
BNZc1	**-,913**	-,177	BNZc1	-,079	,495
NAPc2	**-,704**	-,104	NAPc2	-,410	**-,819**
ACNc3	**-,913**	-,177	ACNc3	**-,755**	,396
FLRc3	**,940**	-,013	ACYc3	**,679**	,194
PHNc3	**,940**	-,013	FLRc3	**,800**	,379
BBFc5	**-,808**	-,119	PHNc3	**1,234**	-,566
BAPc5	,311	**-,834**	BAAc4	,020	**,824**
DBAc5	-,330	**,809**	BBFc5	-,**755**	,396
GHIc6	,340	**,678**	BAPc5	,171	-,322
/	/	/	DBAc5	-,400	**-,920**
/	/	/	GHIc6	-,**865**	,179

Les membres des genres *Bacillus* sp., *Priestia* sp., et *Pseudomonas* sp. ont été corrélés aux BNZc1, ACNc3 et NAPc2. Ceux du genre *Enterobacter* sp. se sont associées aux (HA) plus lourds DBAc5 et GHIc6, pareil pour *Serratia* sp. qui s'est liée au BAPc5 alors que le genre *Kosakonia* sp. a été corrélé aux PHNc3 et FLRc3. Les bactéries ont formé ainsi trois groupes distincts.

Parallèlement, 67,7% de l'inertie totale a été expliquée par les deux premières dimensions sélectionnées pour l'analyse de la zone R (avec 35,4% pour l'axe 1 et 32,3% pour l'axe 2). Sur l'axe 1, la variabilité est liée en majorité aux PHNc3 et FLRc3 du côté positif et aux GHIc6, BNZc1, BBFc5 et ACNc3 du côté négatif. Pour l'axe 2, la variabilité s'explique par le BAAc5 du côté positif et par le DBAc5 et NAPc2 du côté négatif. Par contre, le BAPc5 est mal représenté et proche de l'origine (figure 27 b).

Le biplot a montré que les bactéries de la zone R ont été associées différemment aux hydrocarbures : *Pseudomonas* sp., *Pseudescherichia sp.*, *Bacillus* sp. et *Stutzerimonas sp.* ont formé un seul groupe corrélé au BNZc1 et au BAAc5, *Staphylococcus* sp. relié au FLRc3 et ACYc3, *Streptomyces* au GHIc6, ACNc3 et BBFc5 et *Kocuria* sp avec le DBAc5 et le NAPc2 et enfin *Psychrobacter* sp. au BAPc5 et au PHNc3.

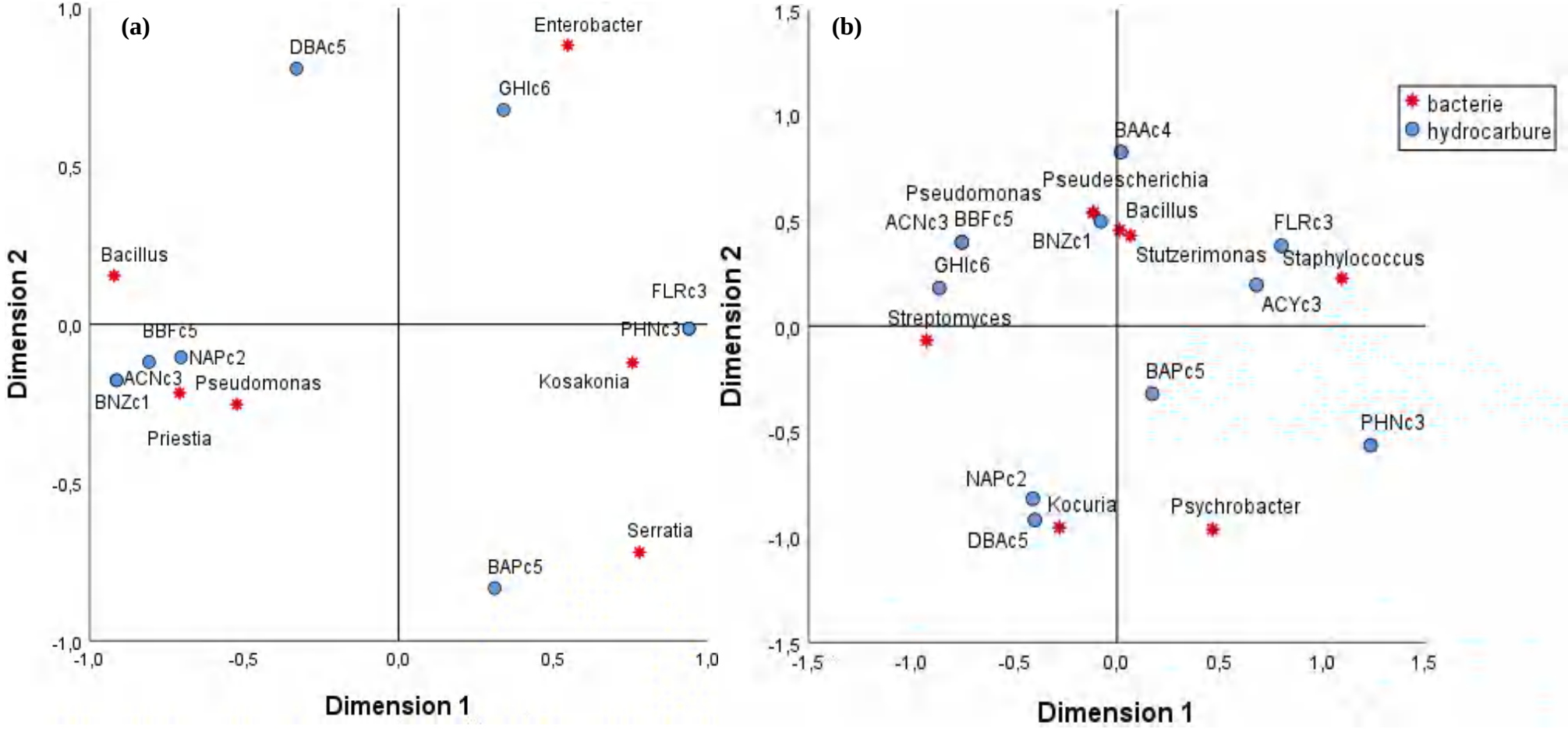


Figure 27. Cartes factorielles des correspondances multiples entre les genres bactériens et les hydrocarbures aromatiques. (a) carte de la zone S, (b) carte de la zone (R).

4.5 Discussion

Dans notre enquête sur les interactions et échanges ayant lieu entre les hydrocarbures comme polluants, le sol comme étant le milieu accueillant et les bactéries qui constituent des acteurs de la biodégradation, plusieurs tests ont été réalisés au laboratoire. Pour mieux expliquer les données qui en découlent, la biostatistique fournit des outils qui permettent d'interpréter les résultats obtenus de manière plus objective et plus crédible.

Analyse de la variance intrazone et interzones

En premier lieu, une comparaison, de la variance des mesures effectuées (pH, CRE, MO, nombre bactérien, HA) sur les trois échantillons (E1, E2 et E3) de chaque site a été faite. Elle n'a montré aucune différence statistiquement significative ce qui peut être liée à la complexité d'interactions ayant lieu entre tous les facteurs édaphiques, climatiques, biologiques et ceux en rapport avec le polluant, rendant difficile d'isoler l'effet de l'un des facteurs. En effet, le sol constitue un milieu irrégulier par sa structure et ces propriétés variables d'un endroit à l'autre. De son côté, le pétrole brut, est un mélange complexe d'hydrocarbures variant énormément en termes de taille et de structure. La microflore, quant à elle, est distribuée dans le sol, de manière très hétérogène.

En deuxième lieu, une comparaison des données des trois sites (A, B et C) de chaque zone a montré des différences significatives pour les valeurs de pH dans la zone S. Les sols prélevés autours des citernes A et C étaient alcalins alors que ceux prélevés dans le dépotoir B, étaient légèrement acide.

La combinaison de plusieurs facteurs comme la nature du site et de l'activité associée, la composition du polluant, mais surtout l'âge de la pollution sont probablement responsables de cette différence significative. En effet, le dépotoir été soumis à une pollution permanente, puisqu'il recevait périodiquement des sols contaminés durant quelques années. Par contre dans la zone R, la variation de tous les paramètres y compris celle du pH est aléatoire.

Par ailleurs, les résultats du test t de Student, pour la comparaison des moyennes des variables, issues des deux zones S et R ont montré une seule différence au niveau de la capacite des sols à retenir l'eau.

A vrai dire, ce paramètre est très sensible à plusieurs facteurs, variant entre les deux étages bioclimatiques caractérisant les deux zones d'étude.

La zone méditerranéenne qui se distingue par des sols argileux, plus compactes, des précipitations modérées et un taux d'humidité relativement élevée. Tous ces facteurs contribuent à la rétention en eau des sols. Par contre, en zone saharienne, les sols sont lâches, à

dominance sableuse, avec une faible précipitation, de fortes températures, favorisant l'évaporation, ce qui limite de plus en plus la capacite des sols à retenir l'eau.

Analyse des composantes principales

L'analyse des composantes principale a réduit le nombre de paramètres a ceux qui ont le plus d'influence sur les jeux de données et qui peuvent expliquer au mieux la variabilité. Elle a permis d'établir selon la première composante (CP 1), une répartition des sols en deux groupes distincts par leur dégrée de pollution : les sols fortement pollués en particulier par les DBAc5, BBFc5 et ACNc3, ayant une teneur élevée en MO et un pH légèrement acide et du côté gauche de l'axe, ceux à faible dégrée de pollution, faible contenance en MO et pH alcalin. D'un autre côté, la deuxième composante (CP 2) distingue clairement deux groupes d'échantillons variant par leur capacite à retenir l'eau : ceux provenant de la zone S caractérisés par une CRE importante et une teneur élevée en BNZc1 et NAPc2, des échantillons qui proviennent de la zone R ayant-au contraire-une faible CRE et une forte contenance en GHIc6 et FLRc3.

Ces résultats ne font que confirmer ce qui a été dit auparavant, sur le rapport entre la teneur en hydrocarbure aromatiques, le nombre de cycles, la matière organiques, les variations de pH ainsi que la capacite de rétention d'eau des sols.

Correlation entre les paramètres du sol, les (HA) et le nombre bactérien

Le coefficient de Spearman a été calculé afin de déceler d'éventuels rapports entre le nombre de bactéries aérobies hydrocarbonoclastes dans les différents échantillons de sols et les paramètres élus par l'ACP. Il a montré qu'effectivement, il existe une correlation négative reliant le nombre de bactéries aux (HA) suivants : BNZc1, ACNc3, DBAc5 et GHIc6. Compte tenu de la bilatéralité des corrélations étudiées, on peut – de manière hypothétique- les interpréter de deux façons : soit par un effet toxique et inhibiteur des hydrocarbures cités sur les bactéries exerçant ainsi une forte pression de sélection ce qui va réduire alors les nombres bactériens, ou bien par la prolifération de bactéries résistantes à cette toxicité, munies d'un équipement enzymatique leur permettant de cataboliser les hydrocarbures ce qui réduit leur concentration en milieu.

Associations entre bactéries identifiées et les (HA) détectés dans les sols pollués

A travers une analyse factorielle des correspondances, prenant en compte les genres bactériens identifiés et les (HA) détectés dans les échantillons des deux zones S et R séparément, plusieurs associations ont été mis en évidence. Par exemple, certaines bactéries comme *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Pseudescherichia* sp., et *Stutzerimonas* sp. sont associées à des (HA) de faible poids moléculaire (BNZc1, NAPc2 et ACNc3) tandis que

d'autres comme *Enterobacter* sp., *Serratia* sp. *Streptomyces* sp. et *Kocuria* sp. sont associées aux (HA) plus lourds (DBAc5, BAPc5 et GHIc6).

Ces résultats suggèrent que des associations d'une part entre bactéries de différents taxons, et d'autre part entre bactéries et (HA) de structure variée, sont possibles dans les sols pollués. En général, la nature aromatique et la complexité de la structure chimique des hydrocarbures correspondent à la présence de populations microbiennes distinctes. Evidemment, des molécules simples et facilement dégradables peuvent constituer un bon repas aux bactéries. Parallèlement, les molécules présentant un nombre de cycles aromatiques important seront plus récalcitrantes à cause de leur hydrophobicité élevée et leur attachement au particules organiques les rendant ainsi moins disponibles aux cellules bactériennes.

Cependant, il est difficile de juger de l'existence d'une relation directe et spécifique entre le (HA) et le genre bactérien en se basant uniquement sur leur association sur le graph. Ceci n'est confirmée que par des recherches complémentaires sur les mécanismes d'association et rôle précis dans la dégradation.

CONCLUSION

Le principal objectif de cette thèse consistait à explorer la diversité bactérienne d'écosystèmes terrestres soumis à une pollution par le pétrole brut et ses dérivés à travers une approche polyphasique.

Tenant compte des fuites et des déversements accidentels ayant souvent lieu dans les parcs d'industrie pétrochimique, nous avons choisi d'effectuer des prélèvements de sol au niveau de deux parcs : celui de la raffinerie de Skikda, située au Nord-Est de l'Algérie dans une région méditerranéenne humide. L'autre se situe à Ouargla, une région saharienne aride du Sud algérien, plus exactement dans le champ pétrolier Rhourde el baguel. Ces deux régions diffèrent énormément d'un point de vue bioclimatique et donc microbiologique aussi. L'approche analytique été comparative.

La détermination des paramètres physicochimiques des sols a permis une meilleure compréhension du devenir des hydrocarbures et de l'activité microbienne. La texture du sol est un facteur clé qui influence énormément sa réponse à la pollution. D'ailleurs, les sols de texture limon sablo-argileuse prélevés à Skikda, ont un pH stable grâce à leur pouvoir tampon, ils retiennent plus d'eau et de matière organique et par conséquent, ils piègent les polluants dans leur matrice qui deviennent alors moins disponibles à la biodégradation. En revanche, les sols sableux caractérisant le Sahara algérien, sont moins structurés à cause de cette texture grossière, pauvres en matière organique, ne retenant pas de grandes quantités d'eau. Leur pH n'est pas stable et la sorption des polluants est réduite donc ils auront tendance à migrer vers le bas.

En vue de déterminer les teneurs des hydrocarbures contenus dans les échantillons de sol et d'évaluer le degré de leur contamination, une analyse par spectrophotométrie UV a été réalisée précisément sur la fraction aromatique mono et polycyclique. Elle a montré de fortes concentrations globales des (HA) dépassant les 1000 mg/Kg de sols sec, et la présence de molécules à toxicité aigüe, probablement cancérigènes ou mutagènes (comme par exemple les BAAc4, BAPc5 et DBAc5) qui présentent un risque sur la sante publique en cas d'exposition même à de faibles concentrations. Il convient de noter que cette fraction ne constitue qu'approximativement 30% seulement de la totalité des hydrocarbures déversés, les 70% qui restent doivent être aussi considérés pour une estimation plus raisonnable de l'ampleur du phénomène.

Face à la toxicité de ces substances et leur accumulation dans le sol, qui agit souvent comme un réservoir, certains microorganismes ont développé différentes attitudes leur permettant de franchir la barrière de l'hydrophobicité, pour réduire la toxicité de ces molécules nocives ou encore les cataboliser pour en tirer les nutriments et l'énergie nécessaires à leur

survie dans ces conditions. Les mécanismes employés peuvent varier d'un microorganisme à l'autre. C'est pourquoi une action collective est requise pour la résistance et le développement des populations microbiennes indigènes. Les contributions de chaque taxon par une ou plusieurs voies métaboliques va assurer la minéralisation des molécules complexes et la détoxification du milieu, c'est le travail d'un consortium microbien. Parmi ces populations, celles qui produisent des biomolécules facilitant l'assimilation des hydrocarbures à l'intérieur des cellules sont au cœur du processus biologique, puisqu'elles sont parmi les premières qui initient à la biodégradation, et facilitent également la tâche aux autres bactéries du milieu en créant un environnement propice à leur activité ; elles fournissant des nutriments moins toxiques et plus assimilables.

D'autres mécanismes peuvent être mis en jeux par les bactéries, en réponse à la présence d'hydrocarbures dans le milieu comme le déplacement à travers le gradient de concentration de ces substrats appelé communément chimiotactisme, la modification de surface cellulaire à des fin d'adhésion ou encore la formation de biofilms bactériens qui contribuent à l'efficacité de la dégradation des hydrocarbures.

A partir des échantillons de sols les plus polluées, nous avons procédé par un enrichissement sélectif de la flore hydrocarbonoclaste, en mettant le pétrole brut comme unique source de carbone et d'énergie dans le milieu de culture, suivi d'un dénombrement bactérien puis d'un isolement des bactéries aérobies. Les résultats du dénombrement n'ont pas montré, de différences entre la charge bactérienne des sols de la zone S et ceux de la zone R. En effet, la réduction de la charge bactérienne suite à l'introduction des hydrocarbures dans le sol est compensée par la croissance des bactéries qui prennent en charge la dégradation de ceux-ci. Elles prédominent grâce à leur potentiel enzymatique et génétique spécifiquement adaptés aux conditions environnantes.

Notre recherche a abouti à l'isolement et l'identification de souches bactériennes, capables de dégrader les hydrocarbures en produisant des biosurfactants et bioémulsifiants. Ces molécules qui réduisent la tension superficielle des hydrocarbures, augmentent la surface de contact entre les cellules et la phase huileuse en réduisant les masses importantes de l'hydrocarbure en gouttelettes, forment des émulsions dans la phase aqueuse et stabilisent ces émulsions empêchant ainsi la coalescence et la séparation des phases non miscibles, toutes ces réactions favorisent énormément l'activité de dégradation.

Le criblage de ces bactéries s'est basé essentiellement sur des tests simples comme l'émulsification du kérosène, l'effondrement de la goutte ou encore l'hémolyse de sang, qui fournissent une réponse visuelle rapide indiquant la présence de molécules tensioactives

ou/émulsifiantes dans la culture bactérienne, mais qui restent cependant, limitées par certains facteurs comme la concentration micellaire critique, ou encore la spécificité. Au contraire, le test de déplacement d'huile, malgré sa simplicité, s'est avéré efficace, permettant de détecter de faibles concentrations de biosurfactants.

Les bactéries sélectionnées par ces tests, appartiennent à plusieurs genres bactériens réputés par leur efficacité dans la dégradation d'une large gamme d'hydrocarbures aromatiques et aliphatiques. Ceux de la zone S appartiennent au embranchements *Bacillota* et *Pseudomonadota*, avec les genres : *Bacillus, Priestia, Pseudomonas, Serratia, Enterobacter* et *Kosakonia* sp. Parallèlement, les genres isolés de la zone R appartiennent à trois embranchements *Bacillota*, *Pseudomonadota*, ainsi que *Actinomycetota*, avec les genres *: Bacillus, Pseudescherichia, Stutzerimonas, Pseudomonas, Psychrobacter, Kocuria,* et *Streptomyces* sp. Bien qu'il puisse paraitre à travers ces résultats, que la flore bactérienne de zone R est plus diversifiée que celle de la zone S, on ne peut rien conclure sur la diversité réelle de ces deux biotopes, puisque la proportion des bactéries qu'on peut mettre en culture au laboratoire est très faible.

De son côté, l'analyse statistique fournis des outils d'appui et d'aide à l'interprétation des phénomènes biologiques sur des échantillons, qui seront par la suite généralisés sur des populations. La limite majeure à cette démarche étant la représentativité de l'échantillonnage. Dans le contexte précis de la pollution des sols, il est très difficile de parler d'un échantillon représentatif, vu la complexité du sol d'un point de vue structure, l'hétérogénéité de sa composition et celle des hydrocarbures déversés, ainsi que l'ensemble d'interactions et de processus ayant lieu à son niveau et qui contrôlant le devenir des polluants après leur déversement. S'ajoutant à cela, l'hétérogénéité des déversements ayant lieu et le processus de vieillissement qui engendrent beaucoup de différences spatiotemporelles. Il est donc important d'interpréter avec prudence les résultats des analyses statistiques.

Dans le cadre de notre recherche, portant sur des échantillons de petite taille, quelques tests ont été utilisés pour relier les données obtenues sur les sols (physicochimiques), les hydrocarbures (teneurs) et les bactéries (nombre, taxons et leur fréquence) et faire ressortir d'éventuelles différences entre les deux biotopes étudiés : littorale et saharien. Les tests effectués avaient comme objectifs de comparer les moyennes et les variances des mesures effectuées, de réduire le nombre des variables à celles ayant le plus d'impact sur les données microbiologiques et de déceler des associations entre bactéries et hydrocarbures.

Parmi les paramètres étudiés, seulement deux ont varié de manière statistiquement significative : les valeurs de pH dans les sols de la même zone S, qui diffèrent en termes

d'activité pratiquée là-dessus et d'âge de la pollution. Le deuxième paramètre étant la capacite rétention d'eau qui diffère entre la zone littorale et la zone saharienne et qui dépend probablement de plusieurs autres paramètres comme la texture, le degré de pollution des sols et les conditions climatiques locales.

L'ACP de toutes les données provenant des deux zones sur un même biplot a fait paraitre des groupes homogènes de variables corrélées : les sols fortement pollués ayant une teneur élevée en MO et un pH légèrement acide et ceux à faible dégré de pollution, faible contenance en MO et pH alcalin. Deux groupes d'échantillons variant par leur capacite à retenir l'eau : ceux provenant de la zone S ayant une CRE importante et ceux de la zone R ayant-au contraire-une faible CRE.

Des corrélations négatives bilatérales entre le nombre de bactéries hydrocarbonoclastes et les (HA) suivants : BNZc1, l'ACNc3, le DBAc5 et le GHIc6, suggèrent soit la présence d'un effet toxique de ces derniers sur les nombres bactériens ou bien inversement la prolifération des bactéries dégradant ces (HA) conduisant à leur élimination du milieu. En fin, l'analyse factorielle des correspondances a montré des associations entre certains genres bactériens et certains hydrocarbures aromatiques, suggérant des relations complexes dans les sols pollués qui nécessitent plus d'expérimentation pour approfondir nos connaissances là-dessus.

En conclusion, la pollution des sols aux hydrocarbures, en particulier les aromatiques constitue un souci environnemental majeur qui nécessite une attention particulière et une prise en charge urgente à cause des lourdes conséquences que peuvent entrainer ces molécules sur la sante de l'Homme et des écosystèmes.

L'analyse de la diversité bactérienne de sols pollués aux hydrocarbures, dans différents biotopes, constitue une voie de recherche qui peut résoudre ces problèmes environnementaux puisque ces bactéries font preuve d'adaptation non seulement à la toxicité des hydrocarbures mais aussi aux conditions du milieu qui varient d'une région à l'autre, devenant plus hostiles dans le désert.

Par ailleurs, l'étude des bactéries telluriques productrices de Bs/Be est très importante parce qu'elles favorisent la disponibilité des molécules hydrophobes facilitant ainsi leur dégradation. On peut dire que la sélection faite par notre étude porte sur des outils biologiques très intéressants dans le processus de bioremediation de sols sévèrement pollués, puisqu'elles seront prêtes à répondre rapidement et efficacement à différents signaux de stresse nutritionnel ou toxique engendrés par la présence des hydrocarbures.

Toutefois, les efforts fournis pour estimer la véritable taille des populations bactériennes et leur diversité par les techniques classiques de mise en culture resteront insuffisants, en particulier au sein d'un écosystème sophistiqué tel qu'un sol pollué. Certes, ces techniques sont essentielles dans l'étude de la physiologie et du potentiel métabolique de ces bactéries, mais de nouvelles voies de recherches sont à explorer permettant de mieux comprendre la complexité de ces d'écosystèmes.

Il sera alors souhaitable de :

- Utiliser des techniques comme la métagenomique, ou le séquençage à haut débit, pour pouvoir étudier de manière plus détaillée la diversité bactérienne de ces sols.
- Analyser les gènes directement impliqués dans la dégradation des différents hydrocarbures.
- Explorer le potentiel de ces bactéries dans la bioremediation de milieux pollués aux hydrocarbures.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aao, O., & Oa, F. (2021). The Intriguing Extrapolations of Haemolysis Assay as Screening Criterion for Selecting Biosurfactant-Producing Microorganisms in Petroleum Industries Process-Conditions. *J Pet Environ Biotechnol*, *12*(8), 431. https://doi.org/DOI: 10.35248/2157-7463.21.12.431

Abbasnezhad, H., Gray, M., & Foght, J. M. (2011). Influence of adhesion on aerobic biodegradation and bioremediation of liquid hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *92*(4), 653–675. https://doi.org/10.1007/s00253-011-3589-4

Abed, R. M. M., Al-Kindi, S., & Al-Kharusi, S. (2015). Diversity of Bacterial Communities Along a Petroleum Contamination Gradient in Desert Soils. *Microbial Ecology*, *69*(1), 95–105. https://doi.org/10.1007/s00248-014-0475-5

Adeola, A. O., Akingboye, A. S., Ore, O. T., Oluwajana, O. A., Adewole, A. H., Olawade, D. B., & Ogunyele, A. C. (2021). Crude oil exploration in Africa: socio-economic implications, environmental impacts, and mitigation strategies. In *Environment Systems and Decisions* (Vol. 42, Issue 1, pp. 26–50). Springer. https://doi.org/10.1007/s10669-021-09827-x

Afshar, S., Lotfabad, T. B., Roostaazad, R., Najafabadi, A. R., & Noghabi, K. A. (2008). Comparative approach for detection of biosurfactant-producing bacteria isolated from Ahvaz petroleum excavation areas in south of Iran. *Annals of Microbiology*, *58*(3), 555–559. https://doi.org/10.1007/bf03175557

Ahmadi, M., Abbaspour, M., Ebadi, T., & Maknoon, R. (2021). Effects of crude oil contamination on geotechnical properties of sand-kaolinite mixtures. *Engineering Geology*, *283*(November 2020), 106021. https://doi.org/10.1016/j.enggeo.2021.106021

Aizhong, D., Yujiao, S., Junfeng, D., Lirong, C., Lin, J., Dan, Z. and, & Xiaohui, Z. (2013). Characterizing Microbial Activity and Diversity of Hydrocarbon-Contaminated Sites. In *Hydrocarbon* (p. 13). https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/50480

Al-Kaabi, N., Disi, Z. Al, Al-Ghouti, M. A., Solling, T. I., & Zouari, N. (2022). Interaction between indigenous hydrocarbon-degrading bacteria in reconstituted mixtures for remediation of weathered oil in soil. *Biotechnology Reports*, *36*(June), e00767. https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00767

Alarcón, A., García-Díaz, M., Hernández-Cuevas, L. V., Esquivel-Cote, R., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz-Suarez, J. J., & Ferrera-Rodríguez, O. (2019). Impact of crude oil on functional groups of culturable bacteria and colonization of symbiotic microorganisms in the Clitoria-Brachiaria rhizosphere grown in mesocosms. *Acta Biologica Colombiana*, *24*(2), 343–353. https://doi.org/10.15446/abc.v24n2.64771

Alharbi, B. H., Pasha, M. J., Alhudhodi, A. H., & Alduwais, A. K. (2018). Assessment of soil contamination caused by underground fuel leakage from selected gas stations in Riyadh, Saudi Arabia. *Soil and Sediment Contamination*, *27*(8), 674–691. https://doi.org/10.1080/15320383.2018.1503228

Ali, N., Dashti, N., Khanafer, M., Al-Awadhi, H., & Radwan, S. (2020). Bioremediation of soils saturated with spilled crude oil. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–9. https://doi.org/10.1038/s41598-019-57224-x

Alotaibi, F., Hijri, M., & St-Arnaud, M. (2021). Overview of Approaches to Improve Rhizoremediation of Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soils. *Applied Microbiology*, *1*(2), 329–351. https://doi.org/10.3390/applmicrobiol1020023

Alrumman, S. A., Standing, D. B., & Paton, G. I. (2015). Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. *Journal of King Saud University - Science*, *27*(1), 31–41. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2014.10.001

Amin, A., Ahmed, I., Khalid, N., Khan, I. U., Ali, A., Dahlawi, S. M., & Li, W. J. (2020). Insights on comparative bacterial diversity between different arid zones of Cholistan Desert, Pakistan. *3 Biotech*, *10*(5), 1–13. https://doi.org/10.1007/s13205-020-02204-6

Andreoni, V., & Gianfreda, L. (2007). Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *76*(2), 287–308. https://doi.org/10.1007/s00253-007-1018-5

Arocena, J. M., & Rutherford, P. M. (2005). Properties of hydrocarbon- and salt-contaminated flare pit soils in northeastern British Columbia (Canada). *Chemosphere*, *60*(4), 567–575. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.12.077

ATSDR. (1995). Toxicological Profile for Fuel Oils. In *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*. https://doi.org/10.1201/9781420061888_ch88

Auger, S., Ramarao, N., Faille, C., Fouet, A., Aymerich, S., & Gohar, M. (2009). Biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and nonpathogenic strains of the Bacillus cereus group. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(20), 6616–6618. https://doi.org/10.1128/AEM.00155-09

Ayoib, A., Gopinath, S. C. B., Yahya, A. R. M., & Zakaria, L. (2023). Coal-vitamin medium for improved scheme of isolating biosurfactant-producing actinomycetes of rare species from soil samples. *Biomass Conversion and Biorefinery*, *January*. https://doi.org/10.1007/s13399-022-03691-8

Balachandran, C., Duraipandiyan, V., Balakrishna, K., & Ignacimuthu, S. (2012). Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in Streptomyces sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. *Bioresource Technology*, *112*, 83–90. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.059

Balland-bolou-bi, C. (2010). *Caractérisation expérimentale des relations entre les bactéries des sols , les phyllosilicates et les solutions : Modélisation et Rôle des Paramètres Environnementaux* [Université de Lorraine (Nancy)]. https://hal-enpc.archives-ouvertes.fr/tel-01498344

Balseiro-romero, M., Monterroso, C., & Casares, juan j. (2018). Environmental Fate of Petroleum Hydrocarbons in Soil: Review of Multiphase Transport, Mass Transfer, and Natural Attenuation Processes. *Pedosphere*, *28*(6), 833–847. https://doi.org/10.1016/S1002-0160(18)60046-3

Baoune, H., Ould El Hadj-Khelil, A., Pucci, G., Sineli, P., Loucif, L., & Polti, M. A. (2018). Petroleum degradation by endophytic Streptomyces spp. isolated from plants grown in contaminated soil of southern Algeria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *147*(September 2017), 602–609. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.013

Bensenane, F. K. (2010). *Ecole Nationale Polytechnique Etude de la vulnérabilité de la nappe phréatique à Hassi-Messaoud aux rejets inhérents à l ' activité de forage* [Ecole Nationale Polytechnique]. http://repository.enp.edu.dz/jspui/handle/123456789/9318

Berger, B., Baldermann, S., & Ruppel, S. (2017). The plant growth-promoting bacteria Kosakonia radicincitans improves fruit yield and quality of Solanum lycopersicum Running. *JJ Sci Food Agric*, *97*(14), 4865–4871. https://doi.org/DOI: 10.1002/jsfa.8357

Bergottini, V. M., Otegui, M. B., Sosa, D. A., Zapata, P. D., Mulot, M., Rebord, M., Zopfi, J., Wiss, F., Benrey, B., & Junier, P. (2015). Bio-inoculation of yerba mate seedlings (Ilex paraguariensis St. Hill.) with native plant growth-promoting rhizobacteria: a sustainable alternative to improve crop yield. *Biology and Fertility of Soils*, *51*(6), 749–755. https://doi.org/10.1007/s00374-015-1012-5

Bhattarai, B. (2015). Variation of Soil Microbial Population in Different Soil Horizons. *Journal of Microbiology & Experimentation*, *2*(2), 75–78. https://doi.org/10.15406/jmen.2015.02.00044

Bhatti, M. D., Kalia, A., Sahasrabhojane, P., Kim, J., Greenberg, D. E., & Shelburne, S. A. (2017). Identification and whole genome sequencing of the first case of Kosakonia radicincitans causing a human bloodstream infection. *Frontiers in Microbiology*, *8*(JAN), 1–5. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00062

Bidaud, C. (1998). *Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques . Approche microbiologique et application au traitement d ' un sol pollué* [Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne]. https://theses.hal.science/tel-00841329

Blaud, A., Lerch, T. Z., Chevallier, T., Nunan, N., Chenu, C., & Brauman, A. (2012). Dynamics of bacterial communities in relation to soil aggregate formation during the decomposition of 13C-labelled rice straw. *Applied Soil Ecology*, *53*(1), 1–9. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.11.005

Bodour, A. A., Drees, K. P., & Maier, R. M. (2003). Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(6), 3280–3287. https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3280-3287.2003

Boekhold, A. E., & Meeussen, J. c. l. (1993). Relevance of soil-ph in view of risk assessment of soil pollution. In H.J.P. EiJsackers and T. Hamers (Ed.), *Integrated Soil and Sediment Research: A Basis/or Proper Protection* (Vol. 1, Issue 1, pp. 50–58). Kluwer Academic Publishers. https://doi.org/10.2134/jeq1996.00472425002500010028x

Boll, M., Estelmann, S., & Heider, J. (2020). Anaerobic Degradation of Hydrocarbons: Mechanisms of Hydrocarbon Activation in the Absence of Oxygen. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (p. 404).

Boumaraf, B. (2015). *Caractéristiques et fonctionnement des sols dans la vallée d'Oued Righ, Sahara nord oriental, Algerie*.

Bouwer, E. J., & Zehnder, A. J. B. (1993). Bioremediation of organic compounds - putting microbial metabolism to work. *Trends in Biotechnology*, *11*(8), 360–367. https://doi.org/10.1016/0167-7799(93)90159-7

Bowman, J. P. (2006). The Genus Psychrobacter. In E. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, KH., Stackebrandt (Ed.), *Prokaryotes* (pp. 920–930). Springer. https://doi.org/doi: 10.1007/0-387-30746-X_35

Brakorenko, N. N., & Korotchenko, T. V. (2016). Impact of petroleum products on soil composition and physical-chemical properties. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *33*(1). https://doi.org/10.1088/1755-1315/33/1/012028

Brakstad, O. G., Nordtug, T., & Throne-Holst, M. (2015). Biodegradation of dispersed Macondo oil in seawater at low temperature and different oil droplet sizes. *Marine Pollution Bulletin*, *93*(1–2), 144–152. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.02.006

Brandon, A. M., Gao, S. H., Tian, R., Ning, D., Yang, S. S., Zhou, J., Wu, W. M., & Criddle, C. S. (2018). Biodegradation of Polyethylene and Plastic Mixtures in Mealworms (Larvae of Tenebrio molitor) and Effects on the Gut Microbiome. *Environmental Science and Technology*, *52*(11), 6526–6533. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02301

Brewer, R., Peard, J., & Heskett, M. (2017). A Critical Review of Discrete Soil Sample Data Reliability: Part 2—Implications. *Soil and Sediment Contamination*, *26*(1), 23–44. https://doi.org/10.1080/15320383.2017.1244172

Brzeszcz, J., Kaszycki, P., Mahjoubi, M., Jaouani, A., Guesmi, A., Ben Amor, S., Jouini, A., Cherif, H., Najjari, A., Boudabous, A., Koubaa, N., Cherif, A., Shelyakin, P. V., Semenkov, I. N., Tutukina, M. N., Nikolaeva, D. D., Sharapova, A. V., Sarana, Y. V., Lednev, S. A., … Kaszycki, P. (2018). Aerobic bacteria degrading both n-alkanes and aromatic hydrocarbons: an undervalued strategy for metabolic diversity and flexibility. *Biodegradation*, *29*(4), 359–407. https://doi.org/10.1007/s10532-018-9837-x

Burckhard, S. R., Pirkl, D., Schaefer, V. R., Kulakow, P., & Leven, B. (2004). A study of soil water-holding properties as affected by TPH contamination. *Proceedings of the 2000 Conference on Hazardous Waste Research*, *December 2013*, 356–359.

CAO-LR. (2011). Les matières organiques du sol La nature des constituants organiques. In *Les produits organiques utilisables en agriculture en Languedoc-Roussillon* (pp. 17–28).

Cerniglia, C. E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, *4*(2), 331–338. https://doi.org/10.1007/978-94-011-1672-5_16

Chau, J. F., Bagtzoglou, A. C., & Willig, M. R. (2011). The Effect of Soil Texture on Richness and Diversity of Bacterial Communities. *Environmental Forensics*, *12*(4), 333–341. https://doi.org/10.1080/15275922.2011.622348

Chen, C. S., Rao, P. S. C., & Lee, L. S. (1996). Evaluation of extraction and detection methods for determining polynuclear aromatic hydrocarbons from coal tar contaminated soils. *Chemosphere*. https://doi.org/10.3/JQUERY-UI.JS

Chen, Y., Huang, Z., Li, J., Su, G., & Feng, B. (2020). Complete Genome Sequence of Kosakonia radicincitans GXGL-4A, a Nitrogen-Fixing Bacterium with Capability to Degrade TEX. *Current Microbiology*, *77*(8), 1848–1857. https://doi.org/10.1007/s00284-020-01942-3

Chettouh, S. (2021). Proposition d'une démarche de Retour d'Expérience pour l'évaluation et la prévention des accidents industriels. *Algerian Journal of Environmental Science and Technology March Edition*, *7*(1). www.aljest.org

Chikere, C., Okpokwasili, G., Chikere, C. B., Okpokwasili, G. C., & Chikere, B. O. (2009). Bacterial diversity in a tropical crude oil-polluted soil undergoing bioremediation. *African Journal of Biotechnology*, *8*(11), 2535–2540. http://www.academicjournals.org/AJB

Claessen, D., Rink, R., De Jong, W., Siebring, J., De Vreugd, P., Boersma, F. G. H., Dijkhuizen, L., & Wösten, H. A. B. (2003). A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in Streptomyces coelicolor by forming amyloid-like fibrils. *Genes and Development*, *17*(14), 1714–1726. https://doi.org/10.1101/gad.264303

Cooper, D. G., & Goldenberg, B. G. (1987). Surface-active agents from two Bacillus species. *Applied and Environmental Microbiology*, *53*(2), 224–229. https://doi.org/10.1128/aem.53.2.224-229.1987

Cornei, A. (1980). Observations sur la capacité de rétention , ses relations avec les valeurs de potentiel et la texture des sols sableux du Nord Sénégal. *ORSTOM*, *42*, 59–59.

Cortés-sánchez, A. D. J., Diaz-ramirez, M., Hernández-álvarez, A. J., García-Ochoa, F., Villanueva-carvajal, A., León-lópez, L., & Martín-Azocar, A. L. S. (2015). Bio surfactants produced by enterobacterial. *Global Advanced Research Journal of Microbiology*, *4*(9), 103–112. http://garj.org/garjm

Crone, M. (2013). *Diagnostic de sols pollués par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) a l'aide de la spectrophotométrie UV* [Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne; INSA de Lyon,]. https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00837762

Crumbling, D. (2014). *Hot Spots: Incremental Sampling Methodology (ISM) FAQs-USEPA*.

Dalton, H. M., & March, P. E. (2000). Molecular Genetics of Bacterial Adhesion and Biofouling. In *Handbook of Bacterial Adhesion Principles, Methods, and Applications* (pp. 43–51). Springer Science+Business Media, LLC.

Damas, O., Branchu, P., Douay, F., Schwartz, C., Grand, C., & Marot, F. (2018). Présomption de pollution d'un sol, Des clés pour comprendre et agir. In *Plante & Cité*. https://www.cerema.fr/system/files/documents/2019/03/mise_en_page_presomption_de_pollution_10_dec.pdf

Darvishi, P., Ayatollahi, S., Mowla, D., & Niazi, A. (2011). Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPPI-2. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *84*(2), 292–300. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.01.011

Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*, *2011*, 1–13. https://doi.org/10.4061/2011/941810

Dasgupta, D., Ghosh, R., & Sengupta, T. K. (2013). Biofilm-Mediated Enhanced Crude Oil

Degradation by Newly Isolated Pseudomonas Species. *ISRN Biotechnology*, *2013*, 13 pages. http://dx.

Dash, D. M., & Osborne, W. J. (2020). Rapid biodegradation and biofilm-mediated bioremoval of organophosphorus pesticides using an indigenous Kosakonia oryzae strain -VITPSCQ3 in a Vertical-flow Packed Bed Biofilm Bioreactor. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *192*(January), 110290. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110290

Dash, H. R., Mangwani, N., Chakraborty, J., Kumari, S., & Das, S. (2013). Marine bacteria: Potential candidates for enhanced bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(2), 561–571. https://doi.org/10.1007/s00253-012-4584-0

Decaëns, T., Jiménez, J. J., Gioia, C., Measey, G. J., & Lavelle, P. (2006). The values of soil animals for conservation biology. *European Journal of Soil Biology*, *42*, 23–38. https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2006.07.001

Delarras, C. (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire* (T. & D. Lavoisier (ed.)).

Djidel, M. (2008). *Pollution minérale et organique des eaux de la nappe superficielle de la cuvette de Ouargla (Sahara septentrional, Algérie)*. Université de Annaba.

Edwards, E. A., Toth, C. R. A., Luo, F., Bawa, N., Webb, J., Guo, S., & Dworatzek, S. (2021). Anaerobic benzene biodegradation linked to the growth of highly specific bacterial clades. *Environmental Science and Technology*, *55*(12), 7970–7980. https://doi.org/10.1021/acs.est.1c00508

Ejaz, M., Zhao, B., Wang, X., Bashir, S., Haider, F. U., Aslam, Z., Khan, M. I., Shabaan, M., Naveed, M., & Mustafa, A. (2021). Isolation and characterization of oil-degrading enterobacter sp. From naturally hydrocarbon-contaminated soils and their potential use against the bioremediation of crude oil. *Applied Sciences (Switzerland)*, *11*(8). https://doi.org/10.3390/app11083504

El-kamali, H. H., Hassan, H. I., & El-kheir, M. S. M. (2017). Effect of Soil Physico-Chemical Properties and Plant Species on Bacterial Diversity in Semi-Arid Parts in Central Sudan. Part III: AL-Gaeli Region, Khartoun North. *OALib*, *04*(03), 1–11. https://doi.org/10.4236/oalib.1103337

El Othmany, R., Zahir, H., Ellouali, M., & Latrache, H. (2021). Current Understanding on Adhesion and Biofilm Development in Actinobacteria. *International Journal of Microbiology*, *2021*. https://doi.org/10.1155/2021/6637438

Elkhawaga, M. A. (2018). Optimization and characterization of biosurfactant from Streptomyces griseoplanus NRRL-ISP5009 (MS1). *Journal of Applied Microbiology*, *124*(3), 691–707. https://doi.org/10.1111/jam.13665

Esikova, T. Z., Anokhina, T. O., Abashina, T. N., Suzina, N. E., & Solyanikova, I. P. (2021). Characterization of soil bacteria with potential to degrade benzoate and antagonistic to fungal and bacterial phytopathogens. *Microorganisms*, *9*(4). https://doi.org/10.3390/microorganisms9040755

Evans, F. F., Rosado, A. S., Sebastián, G. V., Casella, R., Machado, P. L. O. A., Holmström, C., Kjelleberg, S., Van Elsas, J. D., & Seldin, L. (2004). Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. *FEMS Microbiology Ecology*, *49*(2), 295–305. https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.04.007

Fallah, M., Shabanpor, M., Zakerinia, M., & Ebrahimi, S. (2015). Risk assessment of gas oil and kerosene contamination on some properties of silty clay soil. *Environmental Monitoring and Assessment*, *187*(7). https://doi.org/10.1007/s10661-015-4633-0

FAO-Unesco. (1977). Soil map of the world, 1:5000000. *Fao Soil Bulletin*, *VI*(1), 346.

Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, *17*(6), 368–376.

https://doi.org/10.1007/BF01734359

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, *39*(4), 783–791. https://doi.org/10.1080/00837792.1905.10669550

Ferradji, F. Z., Mnif, S., Badis, A., Rebbani, S., Fodil, D., Eddouaouda, K., & Sayadi, S. (2014). Naphthalene and crude oil degradation by biosurfactant producing Streptomyces spp. isolated from Mitidja plain soil (North of Algeria). *International Biodeterioration and Biodegradation*, *86*, 300–308. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.10.003

Ferreira, I. N. S., Rodríguez, D. M., Campos-Takaki, G. M., & Andrade, R. F. da S. (2020). Biosurfactant and bioemulsifier as promising molecules produced by Mucor hiemalis isolated from Caatinga soil. *Electronic Journal of Biotechnology*, *47*, 51–58. https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.06.006

Fowler, S. J., Gutierrez-Zamora, M. L., Manefield, M., & Gieg, L. M. (2014). Identification of toluene degraders in a methanogenic enrichment culture. *FEMS Microbiology Ecology*, *89*(3), 625–636. https://doi.org/10.1111/1574-6941.12364

Freedman, B. (2018). Environmental Science a Canadian perspective. In *DALHOUSIE UNIVERSITY LIBRARIES* (Digital ed). https://dalspace.library.dal.ca/handle/10222/74278

Galazka, A., Grzadziel, J., Galazka, R., Ukalska-Jaruga, A., Strzelecka, J., & Smreczak, B. (2018). Genetic and functional diversity of bacterial microbiome in soils with long term impacts of petroleum hydrocarbons. *Frontiers in Microbiology*, *9*(1923), 1–17. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01923

Genies, C. (2013). *Génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques en melanges , une classe majeure de polluants atmosphériques* [Université de Grenoble]. https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01561073

Ghazali, F. M., Rahman, R. N. Z. A., Salleh, A. B., & Basri, M. (2004). Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *54*(1), 61–67. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.02.002

Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T. K., & Ahn, Y. (2016). Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Frontiers in Microbiology*, *7*(AUG). https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01369

Gieg, L. M., Fowler, S. J., & Berdugo-Clavijo, C. (2014). Syntrophic biodegradation of hydrocarbon contaminants. *Current Opinion in Biotechnology*, *27*, 21–29. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.002

Goldin, A. (1987). Reassessing the use of loss-on-ignition for estimating organic matter content in noncalcareous soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, *18*(10), 1111–1116. https://doi.org/10.1080/00103628709367886

Gomila, M., Mulet, M., Garc, E., & Lalucat, J. (2022). Genome-Based Taxonomy of the Genus Stutzerimonas and Proposal of S. frequens sp. nov. and S. degradans sp. nov. and Emended Descriptions of S. perfectomarina and S. chloritidismutans. *Microorganisms Article*, *10*(1363), 22. https://doi.org/https://doi.org/ 10.3390/microorganisms10071363

Gontia-Mishra, I., Sapre, S., & Tiwari, S. (2017). Diversity of halophilic bacteria and actinobacteria from India and their biotechnological applications. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, *46*(8), 1575–1587.

Grimm, A. C., & Harwood, C. S. (1997). Chemotaxis of Pseudomonas spp. to the polyaromatic hydrocarbon naphthalene. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*(10), 4111–4115. https://doi.org/10.1128/aem.63.10.4111-4115.1997

Guo, Q., Yin, Q., Du, J., Zuo, J., & Wu, G. (2022). New insights into the r/K selection theory achieved in methanogenic systems through continuous-flow and sequencing batch operational modes. *Science of the Total Environment*, *807*, 150732. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150732

Gupta, G., Kumar, V., & Pal, A. K. (2016). Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Microbial Consortium: A Distinctive Approach for Decontamination of Soil. *Soil and Sediment Contamination*, *25*(6), 597–623. https://doi.org/10.1080/15320383.2016.1190311

Hamdi-Aissa, B., Valles, V., Aventurier, A., & Ribolzi, O. (2004). Soils and Brine Geochemistry and Mineralogy of Hyperarid Desert Playa, Ouargla Basin, Algerian Sahara. *Arid Land Research and Management*, *18*(2), 103–126. https://doi.org/10.1080/1532480490279656

Haritash, A. K., & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, *169*(1–3), 1–15. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137

Hassan Al-Taai, S. H. (2021). Soil Pollution - Causes and Effects. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *790*(1). https://doi.org/10.1088/1755-1315/790/1/012009

Hassanshahian, M., Abarian, M., & Cappello, S. (2015). Biodegradation of Aromatic Compounds. In *Biodegradation and Bioremediation of Polluted Systems - New Advances and Technologies*. InTech. https://doi.org/10.5772/60894

Henner, P., Schiavon, M., Morel, J. L., & Lichtfouse, E. (1997). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) occurrence and remediation methods. *Analusis*, *25*(9–10). https://www.researchgate.net/publication/29644648 Polycyclic

Howard, I. C., Okpara, K. E., & Techato, K. (2021). Toxicity and risks assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in river bed sediments of an artisanal crude oil refining area in the niger delta, Nigeria. *Water*, *13*(22), 19. https://doi.org/10.3390/w13223295

Hu, M. (2020). Environmental Behavior of Petroleum in Soil and its Harmfulness Analysis. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *450*(1). https://doi.org/10.1088/1755-1315/450/1/012100

Hua, F., & Wang, H. Q. (2014). Uptake and trans-membrane transport of petroleum hydrocarbons by microorganisms. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, *28*(2), 165–175. https://doi.org/10.1080/13102818.2014.906136

Huang, L., Ye, J., Jiang, K., Wang, Y., & Li, Y. (2021). Oil contamination drives the transformation of soil microbial communities: Co-occurrence pattern, metabolic enzymes and culturable hydrocarbon-degrading bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *225*. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112740

IAEA. (2004). Soil sampling for environmental contaminants. In *International Atomic Energy Agency* (Vol. 26, Issue 1). https://doi.org/10.1080/15320383.2017.1244172

Ibrahim, M. M., Al-Turki, A., Al-Sewedi, D., Arif, I. A., & El-Gaaly, G. A. (2015). Molecular application for identification of polycyclic aromatic hydrocarbons degrading bacteria (PAHD) species isolated from oil polluted soil in Dammam, Saud Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *22*(5), 651–655. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.018

Iskander, L., Khalil, C. A., & Boufadel, M. C. (2020). Fate of Crude Oil in the Environment and Remediation of Oil Spills. *STEM Fellowship Journal*, *6*(1), 69–75. https://doi.org/10.17975/sfj-2020-013

Jabbarov, Z., Abdrakhmanov, T., Pulatov, A., Kováčik, P., & Pirmatov, K. (2019). Change in the parameters of soils contaminated by oil and oil products. *Agriculture*, *65*(3), 88–98. https://doi.org/10.2478/agri-2019-0009

Jain, D. K., Collins-Thompson, D. L., Lee, H., & Trevors, J. T. (1991). A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, *13*(4), 271–279. https://doi.org/10.1016/0167-7012(91)90064-W

Jernelöv, A. (2017). Environmental effects of terrestrial oil spills. In *Encyclopedia of the Anthropocene* (Vols. 1–5). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809665-

9.10271-X

Jianping, S., Yanqing, W., Xiaojun, M., Gaosen, Z., Huyuan, F., & Yinghua, Z. (2004). Soil Microbial Counts and Identification of Culturable Bacteria in an Extreme by Arid Zone. *Folia Microbiol*, *49*(4), 423–429.

Joffin, J.-N., & Leyral, G. (2009). *Microbiologie technique : Dictionnaire des techniques* (Canopé (ed.); 4 eme édit).

Jones, A., Breuning-Madsen, H., Brossard, M., Dampha, A., Deckers, J., Dewitte, O., Gallali, T., Hallett, S., Jones, R., Kilasara, M., Le Roux, P., Micheli, E., Montanarella, L., Spaargaren, O., Thiombiano, L., Van Ranst, E., Yemefack, M., R., Z., & Zougmoré, R. (2013). *Soil atlas of Africa* (E. Commission (ed.)). Publications Office of the European Union. https://doi.org/10.2788/52319

Jonsson, S., Persson, Y., Frankki, S., van Bavel, B., Lundstedt, S., Haglund, P., & Tysklind, M. (2007). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in contaminated soils by Fenton's reagent: A multivariate evaluation of the importance of soil characteristics and PAH properties. *Journal of Hazardous Materials*, *149*(1), 86–96. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.03.057

Joy, S., Rahman, P. K. S. M., & Sharma, S. (2017). Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. *Chemical Engineering Journal*, *317*, 232–241. https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.02.054

Kapellos, G. E. E. (2017). Microbial Strategies for Oil Biodegradation. In S. M. Becker (Ed.), *Modeling of Microscale Transport in Biological Processes* (pp. 19–39). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804595-4.00002-X

Karabi, M., Hamdi, A. B., & Zenkhri, S. (2016). Microbial diversity and organic matter fractions under two arid soils in Algerian Sahara. *AIP Conference Proceedings*, *1758*. https://doi.org/10.1063/1.4959402

Karlapudi, A. P., Venkateswarulu, T. C., Tammineedi, J., Kanumuri, L., Ravuru, B. K., Dirisala, V. ramu, & Kodali, V. P. (2018). Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. *Petroleum*, *4*(3), 241–249. https://doi.org/10.1016/j.petlm.2018.03.007

Kebede, G., Tafese, T., Abda, E. M., Kamaraj, M., & Assefa, F. (2021). Factors Influencing the Bacterial Bioremediation of Hydrocarbon Contaminants in the Soil: Mechanisms and Impacts. *Journal of Chemistry*, *2021*. https://doi.org/10.1155/2021/9823362

Khan, Z., Troquet, J., & Vachelard, C. (2005). Sample preparation and analytical techniques for determination of polyaromatic hydrocarbons in soils. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *2*(3), 275–286. https://doi.org/10.1007/BF03325887

Khanafer, M., Al-Awadhi, H., & Radwan, S. (2017). Coliform Bacteria for Bioremediation of Waste Hydrocarbons. *BioMed Research International*, *2017*. https://doi.org/10.1155/2017/1838072

Kim, M., Oh, H. S., Park, S. C., & Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *64*(PART 2), 346–351. https://doi.org/10.1099/ijs.0.059774-0

Kim, S.-J., & Joo, G.-J. (2018). Characterization of Diesel Degrading *Enterobacter cancerogenus* DA1 from Contaminated Soil. *Environmental Biology Research*, *36*(2), 190–198. https://doi.org/10.11626/kjeb.2018.36.2.190

Klamerus-Iwan, A., Błońska, E., Lasota, J., Kalandyk, A., & Waligórski, P. (2015). Influence of Oil Contamination on Physical and Biological Properties of Forest Soil after Chainsaw Use. *Water, Air, and Soil Pollution*, *226*(11). https://doi.org/10.1007/s11270-015-2649-2

Koull, N. (2007). *Effets de la matière organique sur les propriétés physiques et chimiques des sols sableux de la région de Ouargla*. University of Ouargla.

Krasowska, A., & Sigler, K. (2014). How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *4*, 1–7. https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00112

Kuiper, I., Lagendijk, E. L., Pickford, R., Derrick, J. P., Lamers, G. E. M., Thomas-Oates, J. E., Lugtenberg, B. J. J., & Bloemberg, G. V. (2004). Characterization of two Pseudomonas putida lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Molecular Microbiology*, *51*(1), 97–113. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03751.x

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547–1549. https://doi.org/10.1093/molbev/msy096

Kumari, S., Mangwani, N., & Das, S. (2016). Synergistic effect of quorum sensing genes in biofilm development and PAHs degradation by a marine bacterium. *Bioengineered*, *7*(3), 205–211. https://doi.org/10.1080/21655979.2016.1174797

Kuppusamy, S., Thavamani, P., Venkateswarlu, K., Lee, Y. B., Naidu, R., & Megharaj, M. (2017). Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions. *Chemosphere*, *168*, 944–968. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.115

Kuykendall, J. R. (2008). Benzene. In *Encyclopedia of Ecology, Five-Volume Set* (pp. 326–332). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00373-6

Labar, S., Hani, A., & Djabri, L. (2012). Biochemical Approach to Assess Groundwater Pollution by Petroleum Hydrocarbons (Case Skikda Algeria). *Journal of Water Resource and Protection*, *04*(07), 493–496. https://doi.org/10.4236/jwarp.2012.47057

Lacal, J., Muñoz-Martínez, F., Reyes-Darías, J. A., Duque, E., Matilla, M., Segura, A., Calvo, J. J. O., Jímenez-Sánchez, C., Krell, T., & Ramos, J. L. (2011). Bacterial chemotaxis towards aromatic hydrocarbons in Pseudomonas. *Environmental Microbiology*, *13*(7), 1733–1744. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02493.x

Lacal, J., Reyes-Darias, J. A., García-Fontana, C., Ramos, J. L., & Krell, T. (2013). Tactic responses to pollutants and their potential to increase biodegradation efficiency. *Journal of Applied Microbiology*, *114*(4), 923–933. https://doi.org/10.1111/jam.12076

Lalucat, J., Gomila, M., Mulet, Magdalena Anderson, Z., & García-Valdés, E. (2022). Past, present and future of the boundaries of the Pseudomonas genus: Proposal of Stutzerimonas gen. Nov. *Systematic and Applied Microbiology*, *45*(1). https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.syapm.2021.126289.

Leahy, J. G., & Colwell, R. R. (1990). Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiological Reviews*, *54*(3), 305–315. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1840-5_14

Lemière, B., Seguin, J. J., Le Guern, C., Guyonnet, D., Baranger, P., Darmendrail, D., & Conil, P. (2001). Guide sur Le Comportement des Polluants dans les Sols et les Nappes: Application dans un Contexte d'Evaluation Détaillée des Risques pour les Resources en Eau. *BRGm-50662-FR, January 2001*, 103.

Lemmel, F. (2019). *Diversités taxonomique et fonctionnelle des communautés microbiennes en lien avec le cycle du carbone dans un gradient de sols multi-contaminés* [Université de Lorraine]. https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02130115

Lester, E. D., Satomi, M., & Ponce, A. (2007). Microflora of extreme arid Atacama Desert soils. *Soil Biology and Biochemistry*, *39*(2), 704–708. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.09.020

Li, W., Liu, Y., Li, D., Wang, L., Mao, Z., & Wang, Q. (2021). *Enhanced Biodegradation of*

Anthracene by Multi- Substrate Progressive Domestication of a Mixed Microbial Consortium With Pseudomonas_Aeruginosa DM3. http://dx.doi.org/10.21203/rs.3.rs-292903/v1

Lipiec, J., Frac, M., Brzezinska, M., Turski, M., & Oszust, K. (2016). Linking microbial enzymatic activities and functional diversity of soil around earthworm burrows and casts. *Frontiers in Microbiology*, *7*(AUG), 1–9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01361

Liu, J., Bacosa, H. P., & Liu, Z. (2017). Potential environmental factors affecting oil-degrading bacterial populations in deep and surface waters of the Northern Gulf of Mexico. *Frontiers in Microbiology*, *7*(JAN). https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02131

Liu, J. H., Maity, J. P., Jean, J. S., Chen, C. Y., Chen, C. C., & Ho, S. Y. (2010). Biodegradation of benzene by pure and mixed cultures of Bacillus spp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *26*(9), 1557–1567. https://doi.org/10.1007/s11274-010-0331-9

Lovaglio, R. B., dos Santos, F. J., Jafelicci, M., & Contiero, J. (2011). Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: PH rules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *85*(2), 301–305. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.03.001

Łyszczarz, S., Lasota, J., Szuszkiewicz, M. M., & Błońska, E. (2021). Soil texture as a key driver of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) distribution in forest topsoils. *Scientific Reports*, *11*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-021-94299-x

Makhalanyane, T. P., Valverde, A., Gunnigle, E., Frossard, A., Ramond, J. B., & Cowan, D. A. (2015). Microbial ecology of hot desert edaphic systems. *FEMS Microbiology Reviews*, *39*(2), 203–221. https://doi.org/10.1093/femsre/fuu011

Maletic, S., Dalmacija, B., & Roncevic, S. (2013). Petroleum Hydrocarbon Biodegradability in Soil – Implications for Bioremediation. In V. Kutcherov & A. Kolesnikov (Eds.), *Hydrocarbon*. InTechOpen Access Publisher. https://doi.org/10.5772/50108

Mangwani, N., Kumari, S., & Das, S. (2017). Bacterial biofilms and quorum sensing: fidelity in bioremediation technology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, *32*(1–2), 43–73. https://doi.org/10.1080/02648725.2016.1196554

Manivasagan, P., Sivasankar, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., & Kim, S. K. (2014). Optimization, production and characterization of glycolipid biosurfactant from the marine actinobacterium, Streptomyces sp. MAB36. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *37*(5), 783–797. https://doi.org/10.1007/s00449-013-1048-6

Margaritis, A., Zajic, J. E., & Gerson, D. F. (1979). Production and surface-active properties of microbial surfactants. *Biotechnology and Bioengineering*, *21*(7), 1151–1162. https://doi.org/10.1002/bit.260210706

Markande, A. R., Patel, D., & Varjani, S. (2021). A review on biosurfactants: properties, applications and current developments. *Bioresource Technology*, *330*(March), 124963. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124963

Massenet, J.-Y. (2012). *Chapitre Iv : Proprietes Physiques Du Sol*.

McCaul, M. (2012). The isolation and characterisation of dissolved organic matter from freshwater and marine enviroments. In *BRGMRP-50662.FR*. http://doras.dcu.ie/17514/

Mebarka, D. H., Taleb, S., Benghalem, A., Tundo, P., Ahmed, M. T., & Arabi, M. (2012). Residue analysis of some PAHs in some algerian soil: A preliminary environmental impact assessment. *Energy Procedia*, *18*(c), 1125–1134. https://doi.org/10.1016/j.egypro.2012.05.127

Mézédjri, L., Ali, A. T., & Djebar, A. B. (2008). Statistical approach on the impact of the activity of the industrial zone of Skikda on the quality of the waters of Saf-Saf Wadi (Skikda Algerian East Coasts). *European Journal of Scientific Research*, *20*(2), 343–347.

Minigazimov, N. C., Khaydarshina, E. T., Zagitova, L. R., Kutliyarov, D. N., & Yunusov, S. A. (2021). Estimation of the soil contamination level of a large industrial centre. *Polish Journal of Environmental Studies*, *30*(4), 3181–3188.

https://doi.org/10.15244/pjoes/130950

Mitra, S., & Leslie, W. (2003). Three-dimensional structural model of the Rhourde el Baguel field, Algeria. *American Association of Petroleum Geologists Bulletin*, *87*(2), 231–250. https://doi.org/10.1306/07120201114

Mnif, S., Chamkha, M., Labat, M., & Sayadi, S. (2011). Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, *111*(3), 525–536. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05071.x

Mohsen, L. Y., Jarallah, E. M., & Al-Mamoori, A. M. J. (2022). Screening And Characterization Of Biosurfactant-Producing Bacteria Isolated From Oil-Contaminated Soil. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, *13*(8), 1325–1331. https://doi.org/10.47750/pnr.2022.13.S08.164

Moran, A. C., Martitnez, M. A., & Siñeriz, F. (2002). Quantification of surfactin in culture supernatants by hemolytic activity. *Biotechnology Letters*, *24*, 177–180. https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1014140820207

Moreno, L. B. (2018). Cellular Ecophysiology of Microbe: Hydrocarbon and Lipid Interactions. In *Cellular Ecophysiology of Microbe: Hydrocarbon and Lipid Interactions* (Issue May). https://doi.org/10.1007/978-3-319-50542-8

Morikawa, M., Daido, H., Takao, T., Murata, S., Shimonishi, Y., & Imanaka, T. (1993). A new lipopeptide biosurfactant produced by Arthrobacter sp. strain MIS38. *Journal of Bacteriology*, *175*(20), 6459–6466. https://doi.org/10.1128/jb.175.20.6459-6466.1993

Mukherjee, A. K., & Bordoloi, N. K. (2012). Biodegradation of benzene, toluene, and xylene (BTX) in liquid culture and in soil by Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa strains and a formulated bacterial consortium. *Environmental Science and Pollution Research*, *19*(8), 3380–3388. https://doi.org/10.1007/s11356-012-0862-8

Mulligan, C. N., Cooper, D. G., & Neufeld, R. J. (1984). Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. *Journal of Fermentation Technology*, *62*(4), 311–314.

Mykhailova, L., Fischer, T., & Iurchenko, V. (2018). *Microbial activity and decomposition of soil organic matter in roadside soils contaminated with petroleum hydrocarbons*. https://doi.org/doi: 10.1002/clen.201800132

Naeth, M. A., Chanasyk, D. S., Rothwell, R. L., & Bailey, A. W. (1991). Grazing impacts on soil water in mixed prairie and fescue grassland ecosystems of Alberta. *Canadian Journal of Soil Science*, *71*(3), 313–325. https://doi.org/10.4141/cjss91-031

Nayarisseri, A., Singh, P., & Singh, S. K. (2018). Screening, isolation and characterization of biosurfactant producing Bacillus subtilis strain ANSKLAB03. *Bioinformation*, *14*(06), 304–314. https://doi.org/10.6026/97320630014304

Ndimele, P. E., Saba, A. O., Ojo, D. O., Ndimele, C. C., Anetekhai, M. A., & Erondu, E. S. (2018). Remediation of Crude Oil Spillage. In *The Political Ecology of Oil and Gas Activities in the Nigerian Aquatic Ecosystem*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809399-3.00024-0

Nedunuri, K. V., Govindaraju, R. S., Banks, M. K., Schwab, A. P., & Chen, Z. (2000). Evaluation of Phytoremediation for Field-Scale Degradation of Total Petroleum Hydrocarbons. *Journal of Environmental Engineering*, *126*(6), 483–490. https://doi.org/10.1061/(asce)0733-9372(2000)126:6(483)

Nejidat, A., Meshulam, M., Diaz-Reck, D., & Ronen, Z. (2023). Emergence of hydrocarbon-degrading bacteria in crude oil-contaminated soil in a hyperarid ecosystem: Effect of phosphate addition and augmentation with nitrogen-fixing cyanobacteria on oil bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *178*(105556). https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2022.105556

Nguemté, P. M., Valérie, G., Wafo, D., François, P., Magloire, I., Noumsi, K., & Ngnien, W. (2022). Phytoremédiation de sols pollués par les hydrocarbures – évaluation des potentialités de six espèces végétales tropicales. *Journal of Water Science*, *30*(1), 13. https://doi.org/DOI : https://doi.org/10.7202/1040058ar

Nweke, C. O., & Okpokwasili, G. C. (2003). Drilling fluid base oil biodegradation potential of a soil Staphylococcus species. *African Journal of Biotechnology*, *2*(9), 293–295. https://doi.org/10.5897/ajb2003.000-1059

Nzila, A., Musa, M. M., Sankara, S., Al-Momani, M., Xiang, L., & Li, Q. X. (2021). Degradation of benzo[a]pyrene by halophilic bacterial strain Staphylococcus haemoliticus strain 10SBZ1A. *PLoS ONE*, *16*(2 February), 1–17. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247723

Okafor, C. P., Udemang, N. L., Chikere, C. B., Akaranta, O., & Ntushelo, K. (2021). Indigenous microbial strains as bioresource for remediation of chronically polluted Niger Delta soils. *Scientific African*, *11*, e00682. https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00682

Olukunle, O. F. (2020). Phylogenetic analysis of hydrocarbon degrading bacteria associated with crude oil polluted soil from Mesogar community, Delta State, Nigeria. *Nigerian Journal of Biotechnology*, *36*(2), 62–76. https://doi.org/10.4314/njb.v36i2.8

Oren, A., & Garrity, G. M. (2021). Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *71*(10). https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005056

Osborn, A. M., Moore, E. R. B., & Kenneth, N. T. (2000). An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, *2*(1), 39–50. https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00081.x

Pandolfo, E., Barra Caracciolo, A., & Rolando, L. (2023). Recent Advances in Bacterial Degradation of Hydrocarbons. *Water*, *15*(2), 375. https://doi.org/10.3390/w15020375

Pardhi, D. S., Panchal, R. R., Raval, V. H., Joshi, R. G., Poczai, P., Almalki, W. H., & Rajput, K. N. (2022). Microbial surfactants: A journey from fundamentals to recent advances. *Frontiers in Microbiology*, *13*(August), 1–23. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.982603

Parthipan, P., Preetham, E., Machuca, L. L., Rahman, P. K. S. M., Murugan, K., & Rajasekar, A. (2017). Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by bacterium Bacillus subtilis A1. *Frontiers in Microbiology*, *8*(FEB), 1–14. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00193

Pasumarthi, R., Chandrasekaran, S., & Mutnuri, S. (2013). Biodegradation of crude oil by Pseudomonas aeruginosa and Escherichia fergusonii isolated from the Goan coast. *Marine Pollution Bulletin*, *76*(1–2), 276–282. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.08.026

Patowary, K., Patowary, R., Kalita, M. C., & Deka, S. (2017). Characterization of biosurfactant produced during degradation of hydrocarbons using crude oil as sole source of carbon. *Frontiers in Microbiology*, *8*(FEB). https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00279

Patowary, K., Saikia, R. R., Kalita, M. C., & Deka, S. (2015). Degradation of polyaromatic hydrocarbons employing biosurfactant-producing Bacillus pumilus KS2. *Annals of Microbiology*, *65*(1), 225–234. https://doi.org/10.1007/s13213-014-0854-7

Peele, K. A. (2017). *Characterization and Emulsifying Activities of a Quorum Sensing Biosurfactant Produced By a Marine Bacterium*. University of Vadlamudi.

Peng, R. H., Xiong, A. S., Xue, Y., Fu, X. Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y. S., & Yao, Q. H. (2008). Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*, *32*(6), 927–955. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00127.x

Perfumo, A., Smyth, T. J. P., Marchant, R., Banat, I, M., & Banat, I. (2010). Production and Roles of Biosurfactants and Bioemulsifiers in Accessing Hydrophobic Substrates. In K. N. Timmis (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (Vol. 2, pp. 1501–

1512). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4

Pi, Y., Bao, M., Li, Y., Li, G., Lu, J., & Sun, P. (2015). Characterization of crude oil degrading microbial cultures isolated in Qingdao China. *RSC Advances*, *5*(118), 97665–97674. https://doi.org/10.1039/c5ra16628d

Popoola, L. T., & Yusuff, A. S. (2021). Optimization and characterization of crude oil contaminated soil bioremediation using bacteria isolates:Plant growth effect. *South African Journal of Chemical Engineering*, *37*, 206–213. https://doi.org/10.1016/j.sajce.2021.06.004

Prince, R. ., Amande, T. J., & McGenity, T. J. (2019). Prokaryotic Hydrocarbon Degraders Roger. In *Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes* (p. 373). https://doi.org/10.1007/978-3-030-14796-9

Prince, R. C., & Lessard, R. R. (2004). Crude Oil Releases to the Environment: Natural Fate and Remediation Options. In *Encyclopedia of Energy* (Vol. 1, pp. 727–736). https://doi.org/10.1016/b0-12-176480-x/00556-8

Rahman, P. K. S. M., & Sekhon Randhawa, K. K. (2015). Editorial: Microbiotechnology based surfactants and their applications. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 6, Issue DEC). https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01344

Rani, M., Weadge, J. T., & Jabaji, S. (2020). Isolation and Characterization of Biosurfactant-Producing Bacteria From Oil Well Batteries With Antimicrobial Activities Against Food-Borne and Plant Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, *11*(February), 1–17. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00064

Raphaël, G. (2004). *Fonctionnement et qualité des sols soumis à des perturbations physiques et chimiques d ' origines anthropiques : réponses du sol , de la flore et de la microflore bactérienne tellurique* [Université de Savoie]. https://theses.hal.science/tel-00006161

Ren, J., Wang, Z., Niu, D., Huhetaoli, H., Huang, X., Fan, B., & Li, C. (2020). Isolation and characterization of the novel oil-degrading strain Kosakonia cowanii IUMR B67 and expression of the degradation enzyme. *FEMS Microbiology Letters*, *367*(9), 1–7. https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa067

Ren, X., Zeng, G., Tang, L., Wang, J., Wan, J., Liu, Y., Yu, J., Yi, H., Ye, S., & Deng, R. (2018). Sorption, transport and biodegradation – An insight into bioavailability of persistent organic pollutants in soil. *Science of the Total Environment*, *610–611*, 1154–1163. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.089

Renforth, P., & Campbell, J. S. (2021). The role of soils in the regulation of ocean acidification. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *376*(1834). https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0174

Rogerson, A., & Berger, J. (1981). Effect of Crude Oil and Petroleum-degrading Micro-organisms on the Growth of Freshwater and Soil Protozoa. *Microbiology*, *124*(1), 53–59. https://doi.org/10.1099/00221287-124-1-53

Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2001). Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, *3*(4), 229–236. https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00190.x

Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, *13*(3), 249–252. https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00316-6

Rosenberg, M. (2006). Microbial adhesion to hydrocarbons: Twenty-five years of doing MATH. *FEMS Microbiology Letters*, *262*(2), 129–134. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00291.x

Rosenberg, M., & Rosenberg, E. (1985). Bacterial adherence at the hydrocarbon-water interface. *Oil and Petrochemical Pollution*, *2*(3), 155–162. https://doi.org/10.1016/S0143-7127(85)90178-4

Saadoun, I., Munir, ;, Mohammad, J., Khalid, ;, Hameed, M., & Mo'ayyad Shawaqfah, ; (2008). Microbial populations of crude oil spill polluted soils at the Jordan-Iraq desert (the Badia

region). In *Brazilian Journal of Microbiology* (Vol. 39). https://doi.org/doi: 10.1590/S1517-83822008000300008

Said Belarbi, H., & Rezaiguia, M. C. (2018). *Modélisation et Caractérisation De Comportement Phasique et volumétrique De Fluide Cas d'étude : Le champ BHIRET AISSA*. Université Kasdi Merbah Ouargla.

Sakshi, Singh, S. K., & Haritash, A. K. (2021). Catabolic enzyme activities during biodegradation of three-ring PAHs by novel DTU-1Y and DTU-7P strains isolated from petroleum-contaminated soil. *Archives of Microbiology*, *203*(6), 3101–3110. https://doi.org/10.1007/s00203-021-02297-4

Sałek, K., & Euston, S. R. (2019). Sustainable microbial biosurfactants and bioemulsifiers for commercial exploitation. *Process Biochemistry*, *85*(June), 143–155. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.06.027

San Keskin, N. O., Han, D., Devrim Ozkan, A., Angun, P., Onarman Umu, O. C., & Tekinay, T. (2015). Production and structural characterization of biosurfactant produced by newly isolated staphylococcus xylosus STF1 from petroleum contaminated soil. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, *133*, 689–694. https://doi.org/10.1016/j.petrol.2015.07.011

Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(3), 1–31. https://doi.org/10.3390/ijms17030401

Satpute, S. K., Banpurkar, A. G., Dhakephalkar, P. K., Banat, I. M., & Chopade, B. A. (2010). Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, *30*(2), 127–144. https://doi.org/10.3109/07388550903427280

Seaton, F. M., George, P. B. L., Lebron, I., Jones, D. L., Creer, S., & Robinson, D. A. (2020). Soil textural heterogeneity impacts bacterial but not fungal diversity. *Soil Biology and Biochemistry*, *144*(December 2019), 107766. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107766

Semai, A., Plewniak, F., Charrié-Duhaut, A., Sayeh, A., Gil, L., Vandecasteele, C., Lopez-Roques, C., Leize-Wagner, E., Bensalah, F., & Bertin, P. N. (2021). Characterisation of hydrocarbon degradation, biosurfactant production, and biofilm formation in Serratia sp. Tan611: a new strain isolated from industrially contaminated environment in Algeria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *114*(4), 411–424. https://doi.org/10.1007/s10482-021-01527-5

Seo, J. S., Keum, Y. S., & Li, Q. X. (2009). Bacterial degradation of aromatic compounds. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 6, Issue 1). https://doi.org/10.3390/ijerph6010278

Sessitsch, A., Weilharter, A., Gerzabek, M. H., Kirchmann, H., & Kandeler, E. (2001). Microbial Population Structures in Soil Particle Size Fractions of a Long-Term Fertilizer Field Experiment. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(9), 4215–4224. https://doi.org/10.1128/AEM.67.9.4215-4224.2001

Shahid, M., Al-Khattaf, F. S., Danish, M., Zeyed, M. T., Atef Hatamleh, A., Mohamed, A., & Ali, S. (2022). PGPR Kosakonia Radicincitans KR-17 Increases the Salt Tolerance of Radish by Regulating Ion-Homeostasis, Photosynthetic Molecules, Redox Potential, and Stressor Metabolites. *Frontiers in Plant Science*, *13*(August), 1–22. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.919696

Shahsavari, E., Schwarz, A., Aburto-Medina, A., & Ball, A. S. (2019). Biological Degradation of Polycyclic Aromatic Compounds (PAHs) in Soil: a Current Perspective. *Current Pollution Reports*, *5*(3), 84–92. https://doi.org/10.1007/s40726-019-00113-8

Siddiquia, Z., Grohmannb, E., & Abdul, M. (2023). Degradation of alkane hydrocarbons by Priestia megaterium ZS16 and sediments consortia with special reference to toxicity and

oxidative stress induced by the sediments in the vicinity of an oil refinery. *Chemosphere*, *137886*. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.137886

Sierra-Garcia, I. N., & Oliveira, V. M. (2013). Microbial Hydrocarbon Degradation: Efforts to Understand Biodegradation in Petroleum Reservoirs. In *Biodegradation - Engineering and Technology* (pp. 47–72). https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/55920

Smith, M. B., & March, J. (2007). March's Advanced Organic Chemistry. In *March's Advanced Organic Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc. https://doi.org/10.1002/0470084960

Somee, M. R., Amoozegar, M. A., Dastgheib, S. M. M., Shavandi, M., Maman, L. G., Bertilsson, S., & Mehrshad, M. (2022). Genome-resolved analyses show an extensive diversification in key aerobic hydrocarbon-degrading enzymes across bacteria and archaea. *BMC Genomics*, *23*(1). https://doi.org/10.1186/s12864-022-08906-w

Speight, J. G. (2006). The Chemistry and Technology of Petroleum. In H. HEINEMANN (Ed.), *The Chemistry and Technology of Petroleum*. CRC Press, Taylor & Francis Group. https://doi.org/10.1201/b16559

Sriram, M. I., Gayathiri, S., Gnanaselvi, U., Jenifer, P. S., Mohan Raj, S., & Gurunathan, S. (2011). Novel lipopeptide biosurfactant produced by hydrocarbon degrading and heavy metal tolerant bacterium Escherichia fergusonii KLU01 as a potential tool for bioremediation. *Bioresource Technology*, *102*(19), 9291–9295. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.094

Stackebrandt, E., & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16s rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *44*(4), 846–849. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)43317-4

Syakti, A. D., Yani, M., Hidayati, N. V., Siregar, A. S., Doumenq, P., & Made Sudiana, I. M. (2013). The bioremediation potential of hydrocarbonoclastic bacteria isolated from a mangrove contaminated by petroleum hydrocarbons on the cilacap coast, Indonesia. *Bioremediation Journal*, *17*(1), 11–20. https://doi.org/10.1080/10889868.2012.731446

Tahar, W., Mezedjri, L., & Tahar, A. (2021). Hydric pollution assessment generated through the petrochemical industrial zone in the Skikda region (North-East Algeria). *Biodiversity Journal*, *12*(2), 345–356. https://doi.org/10.31396/biodiv.jour.2021.12.2.345.356

Thomas, O., Theraulaz, F., Domeizel, M., & Massiani, C. (1993). Uv spectral deconvolution: A valuable tool for waste water quality determination. *Environmental Technology (United Kingdom)*, *14*(12), 1187–1192. https://doi.org/10.1080/09593339309385397

Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, *22*(22), 4673–4680. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6754-9_3188

Toledo, F. L., Gonzalez-Lopez, J., & Calvo, C. (2008). Production of bioemulsifier by Bacillus subtilis, Alcaligenes faecalis and Enterobacter species in liquid culture. *Bioresource Technology*, *99*(17), 8470–8475. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.055

Toth, J. (1965a). Aspect forestier d'une plantation saharienne. *Revue Forestière Française*, *10*, 674. https://doi.org/10.4267/2042/24691

Toth, J. (1965b). Aspect forestier d ' une plantation saharienne. *Revue Forestière Française*, 674–695.

Tourinho, P. S., van Gestel, C. A. M., Lofts, S., Svendsen, C., Soares, A. M. V. M., & Loureiro, S. (2012). Metal-based nanoparticles in soil: Fate, behavior, and effects on soil invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *31*(8), 1679–1692. https://doi.org/10.1002/etc.1880

Trenozhnikova, L., & Azizan, A. (2018). Discovery of Actinomycetes from Extreme

Environments with Potential to Produce Novel Antibiotics. *Central Asian Journal of Global Health*, *7*(1). https://doi.org/10.5195/cajgh.2018.337

Trudgeon, B., Dieser, M., Balasubramanian, N., Messmer, M., & Foreman, C. M. (2020). Low-Temperature Biosurfactants from Polar Microbes. *Microorganisms*, *8*(1183), 1–14. https://doi.org/doi:10.3390/microorganisms8081183

Truskewycz, A., Gundry, T. D., Khudur, L. S., Kolobaric, A., Taha, M., Aburto-Medina, A., Ball, A. S., & Shahsavari, E. (2019). Petroleum hydrocarbon contamination in terrestrial ecosystems—fate and microbial responses. *Molecules*, *24*(18), 1–20. https://doi.org/10.3390/molecules24183400

Tuleva, B. K., Ivanov, G. R., & Christova, N. E. (2002). Biosurfactant production by a new Pseudomonas putida strain. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, *57*(3–4), 356–360. https://doi.org/10.1515/znc-2002-3-426

US-EPA. (1996). Soil Screening Guidance : Technical Background Document. In *Office of Solid Waste and Emergency Response* (Issue May).

USDA. (n.d.). *USDA Soil Texture Calculator*. https://www.nrcs.usda.gov/resources/education-and-teaching-materials/soil-texture-calculator

USDA. (2014). *Inherent Factors Affecting Soil Phosphorus*. https://www.nrcs.usda.gov/conservation-basics/natural-resource-concerns/soils/soil-health/soil-health-educators-guide

Uzoigwe, C., Burgess, J. G., Ennis, C. J., & Rahman, P. K. S. M. (2015). Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Frontiers in Microbiology*, *6*(APR), 1–6. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00245

Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, *223*, 277–286. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037

Vásquez-Dean, J., Maza, F., Morel, I., Pulgar, R., & González, M. (2020). Microbial communities from arid environments on a global scale. A systematic review. *Biological Research*, *53*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/s40659-020-00296-1

Victor, I. A., Archibong, I. A., & Andem, A. B. (2020). The biochemical mechanisms of petroleum degradation by bacteria. *International Journal of Engineering Research*, *11*(July), 1258–1275.

Walter, V., Syldatk, C., & Hausmann, R. (2010). Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *672*, 1–13. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9_1

Wang, D., Ma, J., Li, H., & Zhang, X. (2018). Concentration and potential ecological risk of PAHs in different layers of soil in the petroleum-contaminated areas of the loess plateau, China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *15*(8). https://doi.org/10.3390/ijerph15081785

Wang, Y., Feng, J., Lin, Q., Lyu, X., Wang, X., & Wang, G. (2013). Effects of crude oil contamination on soil physical and chemical properties in momoge wetland of China. *Chinese Geographical Science*, *23*(6), 708–715. https://doi.org/10.1007/s11769-013-0641-6

Wei, Y., & Li, G. (2018). Effect of Oil Pollution on Water Characteristics of Loessial Soil. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *170*(3). https://doi.org/10.1088/1755-1315/170/3/032154

Wick, A. F., Haus, N. W., Sukkariyah, B. F., Kathryn, C. H., & Daniels, W. L. (2011). Remediation of PAH-Contaminated Soils and Sediments: A Literature Review Environmental Soil Science, Wetland Restoration and Mined Land Reclamation. *Soil and Landscape Rehabilitation*, 1–102. http://landrehab.org/

Williams, S. D., Ladd, D. E., & Farmer, J. J. (2006). Fate and Transport of Petroleum Hydrocarbons in Soil and Ground Water at Big South Fork National River and Recreation

Area, Tennessee and Kentucky, 2002-2003. In *U. S. Geological Survey Scientific Investigations Report 2005-5104*. http://pubs.usgs.gov/sir/2005/5104/

Yadete, G. D. (2006). *The role of food aid in sustainable land management: the case of tach Gayint Wereda, South Gondar Zone, Amhara Region*. Addis Ababa University.

Yakimov, M. M., Timmis, K. N., & Golyshin, P. N. (2007). Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, *18*(3), 257–266. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.04.006

Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *67*(5), 1613–1617. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755

Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., & McInerney, M. J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, *56*(3), 339–347. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.11.001

Yuan, S. Y., Shiung, L. C., & Chang, B. V. (2002). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by inoculated microorganisms in soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *69*(1), 66–73. https://doi.org/10.1007/s00128-002-0011-z

Zambry, N. S., Ayoib, A., Md Noh, N. A., & Yahya, A. R. M. (2017). Production and partial characterization of biosurfactant produced by Streptomyces sp. R1. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *40*(7), 1007–1016. https://doi.org/10.1007/s00449-017-1764-4

ANNEXES

Annexe 1 : préparation des milieux de culture

Milieu de culture pour l'enrichissement et l'isolement

- 2,0 g NH_4Cl ;
- 0,1 g KCl ;
- 1,0 g K_2HPO_4 ;
- 0,01 g $CaCl_2$;
- 0,5 g KH_2PO_4 ;
- 0,01 g $FeSO_4$ 7 H_2O ;
- 0,5 g $MgSO_4$ $7H_2O$
- 15g agar-agar (pour la forme gélosée)

Le pH a été ajusté à une valeur de 7 en ajoutant l'NaOH (1M) et le milieu a été stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 min. 2% de pétrole est additionné après autoclavage.

Gélose au sang

- Préparer le matériel pour prélèvement de sang de mouton : des gants, une seringue stérile, un Erlenmeyer contenant des billes anticoagulantes, une solution antiseptique.
- Aseptiser de la veine jugulaire du mouton,
- Prélever le sang à l'aide d'une seringue stérile dans l'Erlenmeyer, et mélanger doucement pour éviter la coagulation.
- Ajouter 5% de sang à une gélose en surfusion (gélose de base) pour éviter la dénaturation du sang, mélanger délicatement puis et couler les boites à ensemencer.

Préparation de l'additif

Résultats du test après incubation

Tous les milieux qui vont suivre ont été préparés, ensemencés et lus selon les protocoles décrit sur (Joffin & Leyral, 2009) et (Delarras, 2007).

Gélose à la gélatine (QSP 1L d'eau distillée)

- Peptone : 5 g
- Gélatine : 10 g
- NaCl : 5 g
- Agar-agar : 15 g

Gélose à l'amidon (QSP 1L d'eau distillée)

- Peptone: 5 g
- Amidon : 1 g
- NaCl : 5 g
- Agar-agar : 15 g

Gélose à la caséine (QSP 1L d'eau distillée)

- Peptone: 5 g
- Caséine: 2 g
- NaCl: 5 g
- Agar-agar: 15 g

Gélose au saccharose (Test levan)

- Saccharose : 20 g
- Peptone : 5 g
- K_2HPO_4 : 2 g
- Agar-agar : 15 g

Gélose pour test de tolerance au sel : (QSP 1L d'eau distillée)

- Peptone : 5 g
- NaCl : varier les concentrations de sel (3%, 6%, 9%, 12%)
- Agar-agar : 15 g (18 à 20g pour les hautes concentrations en sel)

Instructions

- Dissoudre les ingrédients un par un dans l'eau distillée en chauffant.
- Porter la solution à ébullition tout en continuant à remuer.
- Ajouter l'agar-agar et s'assurer qu'il soit complètement dissous.
- Verser la solution dans des boîtes de Pétri stériles pour former des géloses.
- Ensemencer les souches à tester par point.
- Incuber 24/48h puis lire les tests.

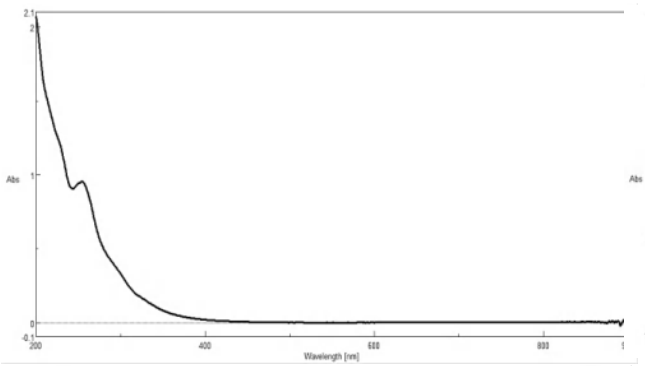
Gélose au jaune d'œuf

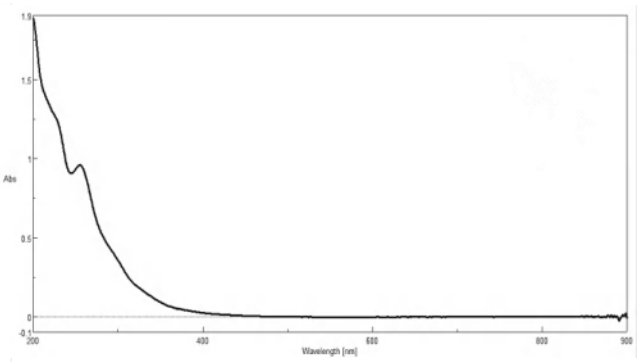
- 1.5ml de l'émulsion (Jaune d'œuf stérile +Eau physiologique stérile V/V)
- Gélose nutritive

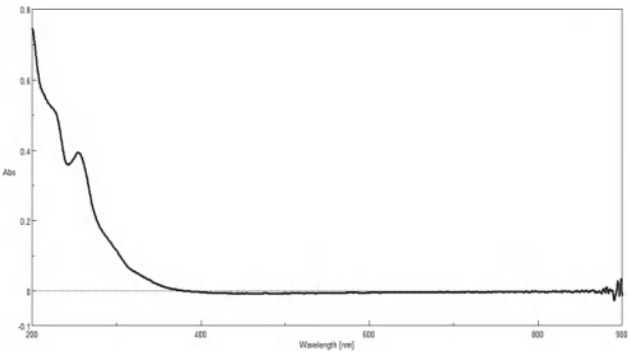
Instructions

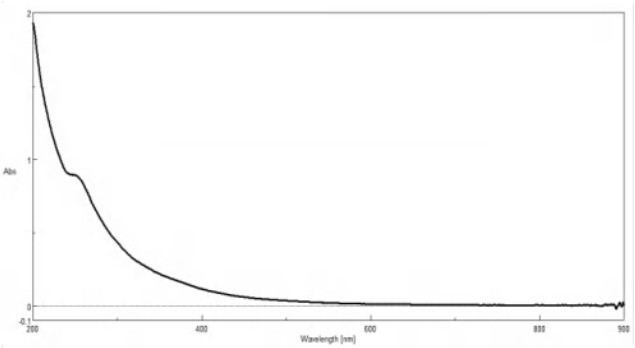
- Verser l'émulsion dans la boite de Petri et ajouter la gélose en surfusion et mélanger,
- Laisser sécher et inoculer en point et lire après 24 heures d'incubation.

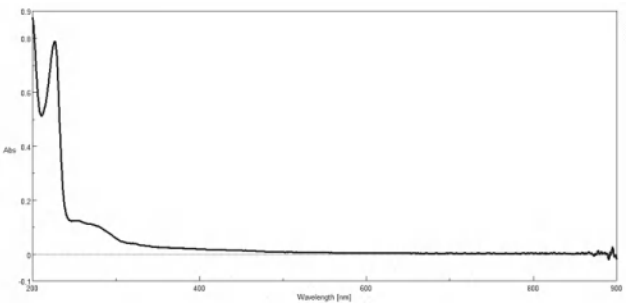
Annexe 2 : spectres bruts des échantillons de la zone S

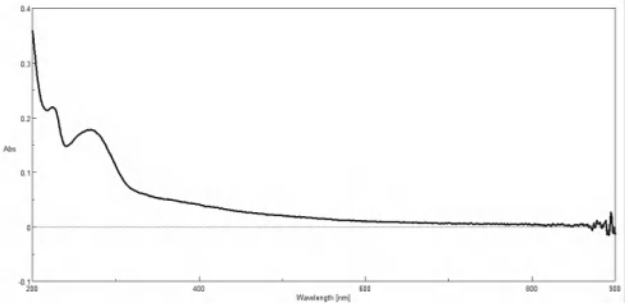


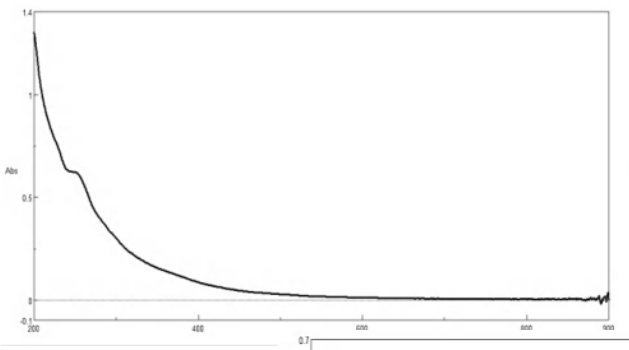


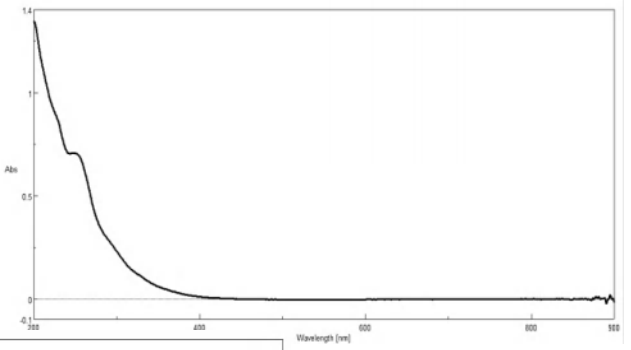


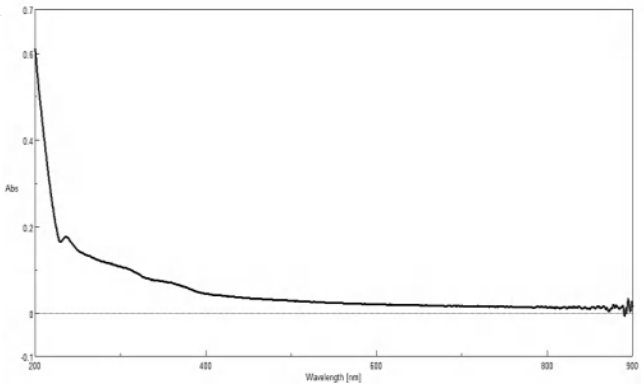




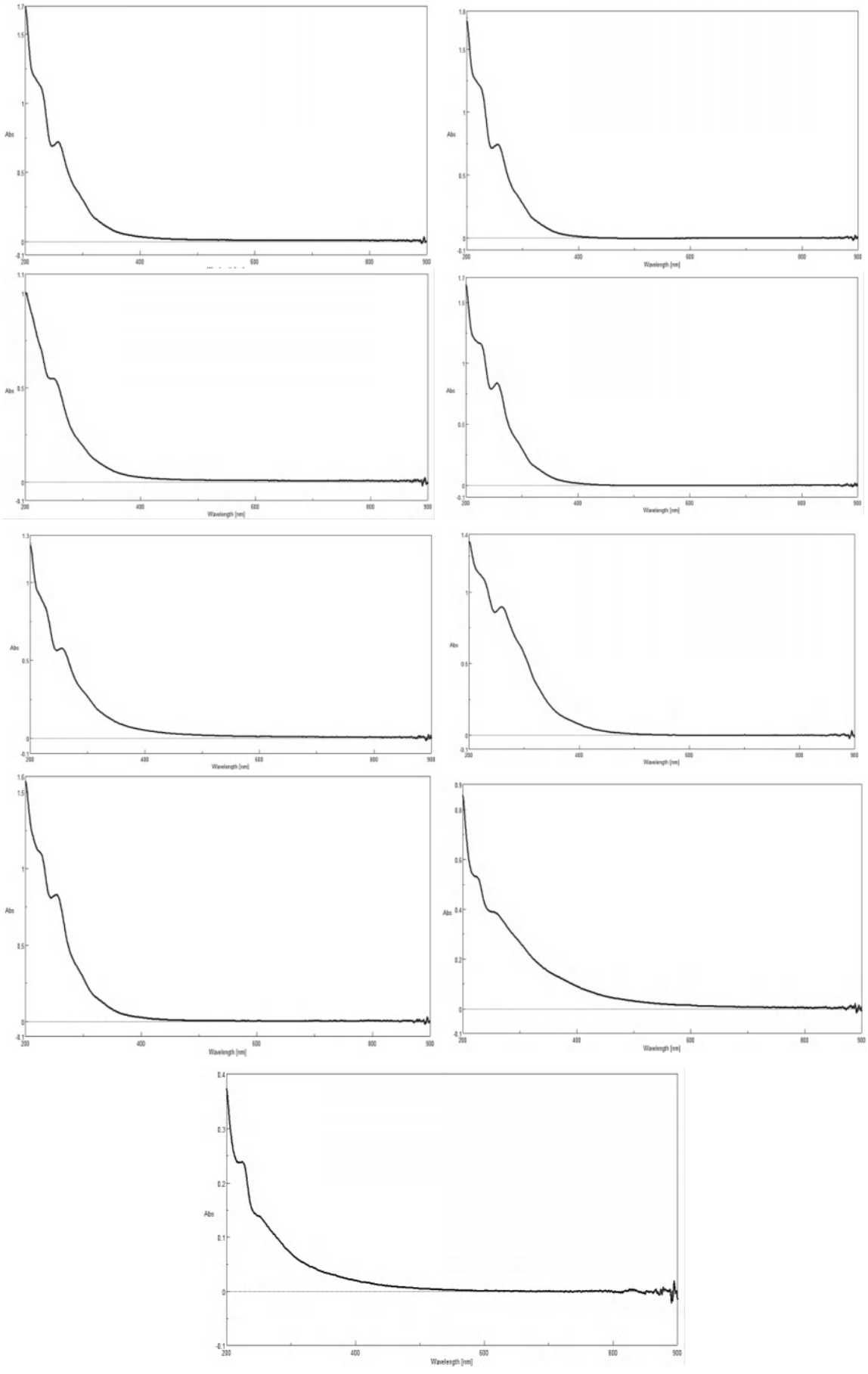




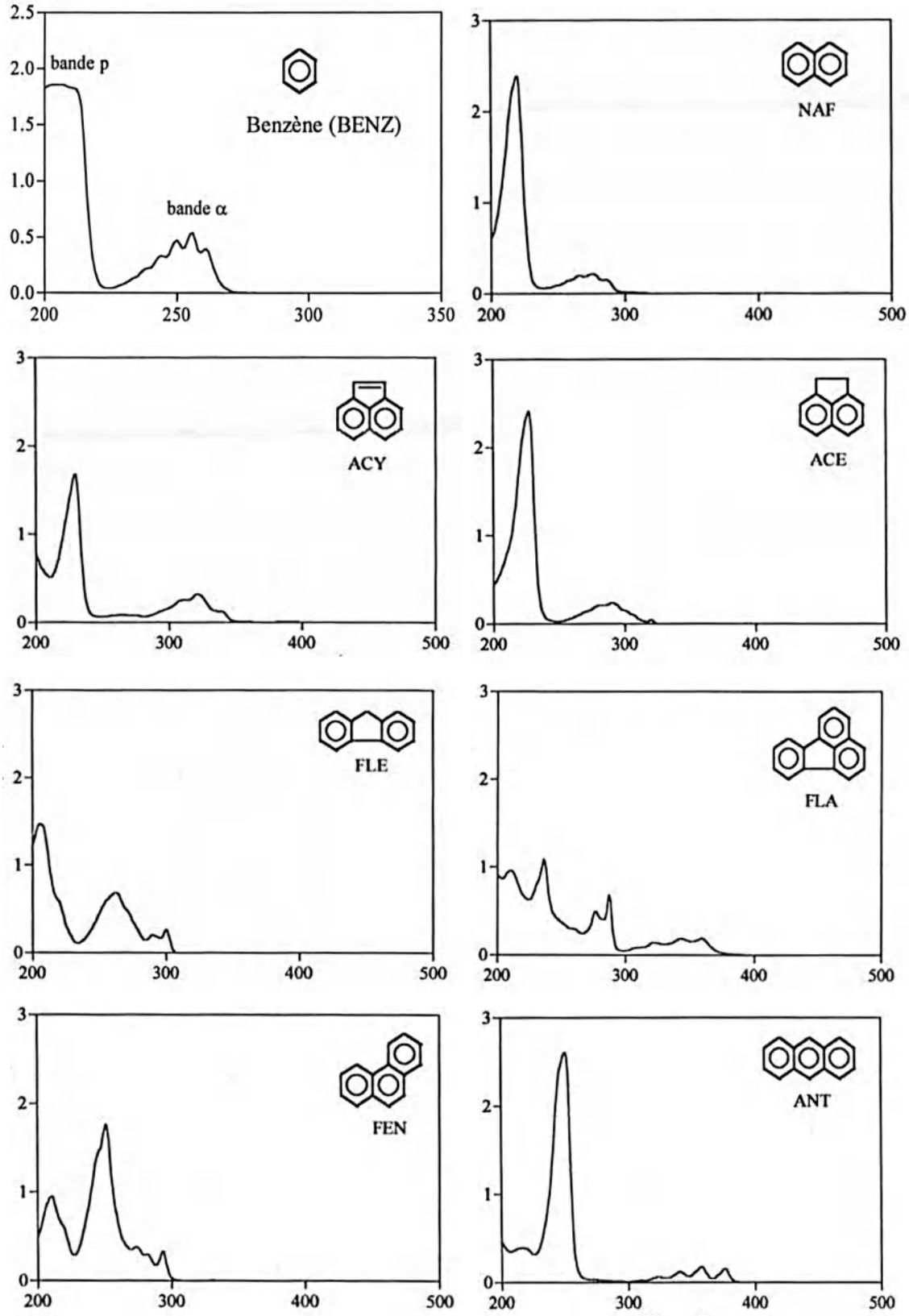


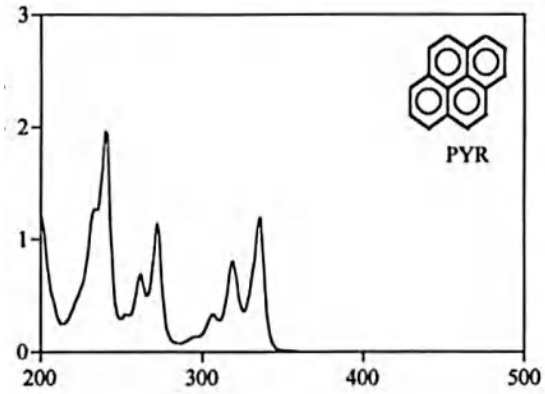


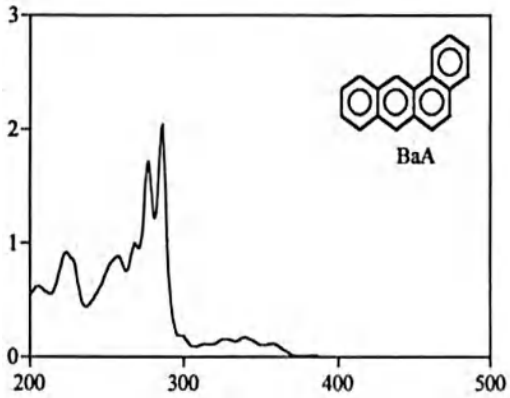
Spectres bruts des échantillons de la zone R

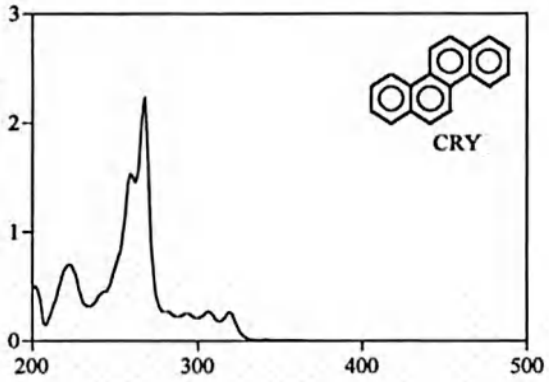


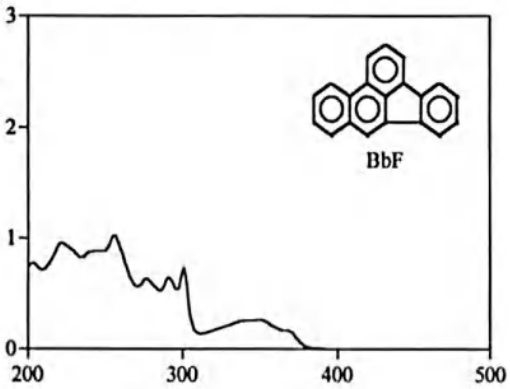
Spectres de référence de 17 HA

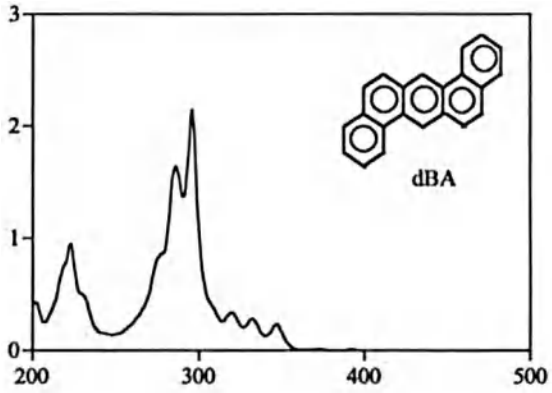


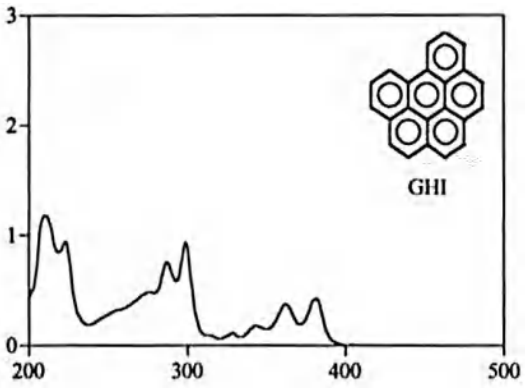

PYR
3
2
1
0
200
300
400
500

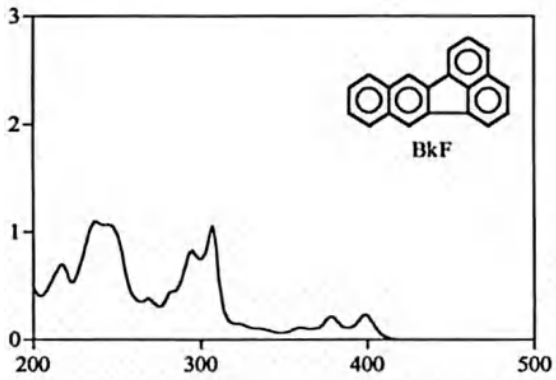

BaA
3
2
1
0
200
300
400
500

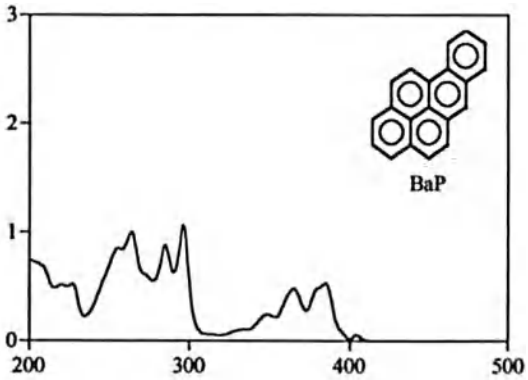

CRY
3
2
1
0
200
300
400
500

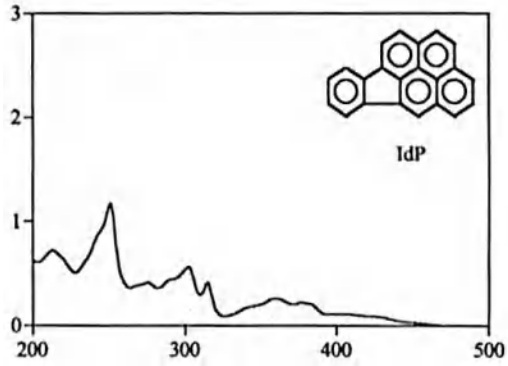

BbF
3
2
1
0
200
300
400
500


dBA
3
2
1
0
200
300
400
500


GHI
3
2
1
0
200
300
400
500


BkF
3
2
1
0
200
300
400
500


BaP
3
2
1
0
200
300
400
500


IdP
3
2
1
0
200
300
400
500

Annexe 3 : Dosage hydrocarbures aromatiques

Tableau I : Abondance relative des hydrocarbures aromatiques par nombre de cycles benzène

Echantillon		HA total	1 cycle	2 cycles	3 cycles	4 cycles	5 cycles	6 cycles
Zone S	**SAE1**	100	95,24	0,00	0,93	0,00	1,71	2,12
	SAE2	100	45,33	0,00	32,39	0,00	2,62	19,67
	SAE3	100	49,09	8,41	7,87	0,00	15,92	18,71
	SBE1	100	78,87	5,77	5,53	0,00	9,83	0,00
	SBE2	100	48,85	7,27	7,12	0,00	20,83	0,00
	SBE3	100	44,47	8,80	8,52	0,00	21,93	0,00
	SCE1	100	75,56	0,00	16,20	2,35	5,89	0,00
	SCE2	100	44,50	0,00	20,08	5,42	16,04	13,96
	SCE3	100	43,37	4,26	13,88	14,77	9,59	14,13
Zone R	**RAE1**	100	49,55	8,46	25,13	0,00	16,86	0,00
	RAE2	100	48,20	8,27	8,02	0,00	16,79	18,72
	RAE3	100	42,03	6,38	24,73	0,00	12,69	14,17
	RBE1	100	45,66	0,00	32,07	2,59	6,36	13,32
	RBE2	100	45,07	0,00	22,69	0,00	15,33	16,91
	RBE3	100	59,12	0,00	40,88	0,00	0,00	0,00
	RCE1	100	21,38	0,00	21,13	0,00	27,34	30,15
	RCE2	100	62,24	0,00	6,96	5,03	11,81	13,96
	RCE3	100	47,77	0,00	30,57	2,16	0,00	19,49

Annexe 4 : Production de biosurfactants/bioémulsifiants

Tableau II : Tests de détection Bs/Be chez les isolats de la zone S

Echantillon	Bactéries		E24		OSD		HS		EG	
			Moy	ET	Moy	ET	Type	Niveau	Diamètre	Niveau
SAE1	SA1	*Bacillus 1*	3,47	1,84	4,20	0,20	β	++++	0,65	+++
	SA2	*Bacillus 2*	5,72	0,46	2,40	0,00	β	++++	0,45	+
	SA3	*Bacillus 1*	3,53	3,56	4,20	0,00	β	++++	0,70	++++
	SA4	*Bacillus 3*	10,91	4,81	2,40	0,00	β	++++	0,45	+
	SA5	*Pseudomonas 1*	16,02	9,61	3,17	0,06	β	++	0,50	+
	SA6	*Bacillus 3*	4,07	2,85	2,40	0,00	β	++++	0,45	+
	SA7	*Bacillus 2*	25,55	7,99	2,50	0,1	nd	/	/	/
SAE2	SA8	*Bacillus 5*	52,22	20,51	3,90	0,00	β	+++	0,60	+++
	SA9	*Bacillus 2*	51,28	10,63	3,20	0,00	β	++++	0,60	+++
	SA10	*Bacillus 2*	16,22	7,76	2,90	0,00	β	++++	0,45	+
	SA11	*Bacillus 4*	6,13	8,31	2,60	0,00	α	+	0,50	+
	SA12	*Bacillus 3*	27,29	17,90	2,60	0,00	β	++++	0,45	+
	SA13	*Bacillus 3*	9,89	8,49	2,40	0,00	β	++++	0,45	+
	SA14	*Pseudomonas 1*	30,70	29,64	3,30	0,00	β	++	0,55	++
SAE3	SA15	*Bacillus 5*	9,84	7,88	3,20	0,00	β	+++	0,60	+++
	SA16	*Bacillus 3*	11,97	11,43	2,40	0,00	β	++++	0,45	+
	SA17	*Bacillus 3*	19,96	31,43	2,47	0,12	β	++++	0,45	+
	SA18	*Pseudomonas 2*	58,18	14,43	3,37	0,06	β	++	0,55	++
	SA19	*Serratia*	58,18	9,09	2,60	0,00	α	+	0,50	+
SBE1	SB1	*Bacillus 5*	53,15	12,98	3,40	0,17	β	+++	0,60	+++
	SB2	*Pseudomonas 1*	51,28	10,63	2,13	0,12	β	++	0,50	+
	SB3	*Pseudomonas 2*	47,83	10,15	3,33	0,06	β	++	0,50	+
	SB4	*Pseudomonas 2*	62,42	7,35	3,40	0,00	β	++	0,55	++
	SB5	*Bacillus 2*	9,84	7,88	2,80	0,00	++++	++++	0,45	+
SBE2	SB6	*Bacillus 5*	55,42	11,24	2,20	0,00	β	+++	0,50	+
	SB7	*Bacillus 1*	3,47	1,84	3,20	0,00	β	++++	0,65	+++
	SB8	*Bacillus 4*	5,28	2,08	2,60	0,52	α	+	0,45	+
	SB9	*Enterobacter*	36,86	24,42	2,57	0,06	α	+	0,45	+
	SB10	*Bacillus 5*	18,93	2,78	3,00	0,10	β	+++	0,55	++
SBE3	SB11	*Bacillus 4*	38,40	18,57	2,80	0,00	α	+	0,50	+
	SB12	*Bacillus 5*	20,47	7,81	3,40	0,00	β	+++	0,60	+++
	SB13	*Bacillus 5*	13,62	11,23	3,10	0,10	β	+++	0,60	+++
	SB14	*Bacillus 4*	28,46	22,31	2,70	0,1	α	+	/	/
	SB15	*Kosakonia*	33,02	24,59	3,23	0,06	α	+	0,50	+

Tableau III : Tests de détection Bs/Be chez les isolats de la zone R

Echantillon	Bactéries		E24		OSD		HS		EG	
			Moy	ET	Moy	ET	Type	Niveau	Diamètre	Niveau
RAE1	RA1	*Pseudomonas 2*	7,30	0,00	3,30	0,00	β	++	0,60	+++
	RA2	*Pseudomonas 2*	17,58	14,70	1,80	0,40	β	+	/	/
	RA3	*Pseudescherichia*	56,97	11,11	2,73	0,12	β	++	0,50	+
	RA4	*Bacillus 2*	20,61	29,45	2,23	0,15	β	+++	0,45	+
	RA5	*Bacillus 5*	6,06	2,78	3,37	0,21	β	+	0,65	+++
	RA6	*Pseudomonas 2*	10,31	5,84	2,77	0,06	β	+	0,50	+
	RA7	*Pseudomonas 2*	9,70	10,65	2,80	0,00	β	+	0,50	+
RAE2	RA8	*Stutzerimonas 1*	56,29	10,84	2,50	0,20	β	+++	0,45	+
	RA9	*Pseudescherichia*	16,98	10,93	2,37	0,06	β	++	/	/
	RA10	*Pseudescherichia*	46,67	18,58	1,04	0,45	β	++	0,45	+
	RA11	*Staphylococcus*	8,90	1,04	2,20	0,00	β	+	0,50	+
	RA12	*Pseudomonas 2*	8,49	10,01	2,50	0,00	β	+++	0,50	+
RAE3	RA13	*Pseudomonas 2*	3,33	3,44	3,10	0,00	β	+	0,60	+++
	RA14	*Pseudomonas 2*	31,62	1,23	3,70	0,10	β	+	0,60	+++
	RA15	*Pseudescherichia*	40,61	19,61	2,07	0,06	β	++	0,45	+
	RA16	*Pseudomonas 2*	15,45	22,88	2,57	0,06	β	+	0,50	+
	RA17	*Pseudomonas 2*	15,15	23,09	3,00	0,00	β	+	0,50	+
RBE1	RB1	*Psychrobacter*	6,92	0,45	0,52	0,02	ϒ	/	/	/
	RB2	*Kocuria*	3,95	0,00	0,94	0,08	β	++	/	/
	RB3	*Kocuria*	8,92	3,18	2,27	0,35	β	++	/	/
	RB4	*Kocuria*	11,00	0,97	0,49	0,19	β	++	/	/
	RB5	*Kocuria*	10,80	0,19	0,74	0,05	β	++	/	/
	RB6	*Kocuria*	10,83	1,12	2,22	0,81	β	++	/	/
RBE2	RB7	*Bacillus 6*	7,00	0,42	3,20	0,00	ϒ	/	/	/
	RB8	*Bacillus 7*	16,00	4,95	1,26	0,05	β	+++	/	/
RBE3	RB9	*Bacillus 8*	3,76	1,18	2,80	0,10	β	++	/	/
	RB10	*Stutzerimonas 2*	10,87	4,00	3,30	0,20	β	+	/	/
	RB11	*Stutzerimonas 1*	10,96	0,04	2,40	0,00	β	+++	/	/
	RB12	*Stutzerimonas 2*	10,96	1,96	3,10	0,35	β	+	/	/
	RB13	*Streptomyces*	6,11	0,74	1,21	0,02	β	++	/	/
	RB14	*Kocuria*	9,00	4,58	6,79	3,13	β	+	0,55	

Annexe 5 :

Tableau IV : Concentrations admissibles des hydrocarbures aromatiques dans les sols selon l'US-EPA

HAP	**Concentration Limite (mg/kg)**
Benzène	0,2
Naphtalène	1
Acénaphtène	2
Acénaphtylène	2
Fluorène	0,2
Phénanthrène	1
Anthracène	0,2
Fluoranthène	1
Pyrène	1
Benzo[a]anthracène	0,2
Chrysène	0,5
Benzo[b]fluoranthène	0,2
Benzo[k]fluoranthène	0,2
Benzo[a]pyrène	0,2
Dibenzo [a, h] anthracène	0,2
Indéno[1,2,3-cd] pyrène	0,2
Benzo [g, h, i] perylène	0,2

Annexe 6 : Tableaux statistiques

Tableau V : Statistiques descriptives

		N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum
						Borne inférieure	Borne supérieure		
pH	S	9	7,5367	,87235	,29078	6,8661	8,2072	6,25	8,45
	R	9	7,1933	,71411	,23804	6,6444	7,7422	6,15	8,05
	Total	18	7,3650	,79328	,18698	6,9705	7,7595	6,15	8,45
CRE	S	9	41,22	6,553	2,184	36,18	46,26	32	55
	R	9	26,22	6,870	2,290	20,94	31,50	17	35
	Total	18	33,72	10,098	2,380	28,70	38,74	17	55
MO	S	9	3,7889	,93734	,31245	3,0684	4,5094	2,10	5,60
	R	9	7,4644	7,55430	2,51810	1,6577	13,2712	,50	22,70
	Total	18	5,6267	5,55381	1,30905	2,8648	8,3885	,50	22,70
BNZ	S	9	1259,8211	2297,75700	765,91900	-506,3913	3026,0335	5,29	5614,08
	R	9	466,5067	553,31503	184,43834	41,1911	891,8222	15,80	1656,53
	Total	18	863,1639	1671,89261	394,06887	31,7513	1694,5765	5,29	5614,08
NAP	S	9	56,7678	133,95370	44,65123	-46,1982	159,7337	,00	410,43
	R	9	32,9833	63,76058	21,25353	-16,0274	81,9941	,00	148,34
	Total	18	44,8756	102,50329	24,16026	-6,0981	95,8492	,00	410,43
ACN	S	9	62,1678	125,72553	41,90851	-34,4734	158,8090	,00	393,58
	R	9	72,0444	94,04970	31,34990	-,2486	144,3374	,00	270,10
	Total	18	67,1061	107,82803	25,41531	13,4845	120,7277	,00	393,58

Tableau V (suite) : Statistiques descriptives

		N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum
						Borne inférieure	Borne supérieure		
ACY	S	9	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
	R	9	9,6522	25,40349	8,46783	-9,8746	29,1791	,00	77,12
	Total	18	4,8261	18,12042	4,27102	-4,1850	13,8372	,00	77,12
FLR	S	9	3,0300	6,56541	2,18847	-2,0166	8,0766	,00	19,77
	R	9	131,3344	191,36442	63,78814	-15,7613	278,4302	,00	563,65
	Total	18	67,1822	147,00674	34,64982	-5,9225	140,2870	,00	563,65
PHN	S	9	1,0411	3,12333	1,04111	-1,3597	3,4419	,00	9,37
	R	9	5,7033	14,47158	4,82386	-5,4205	16,8272	,00	44,03
	Total	18	3,3722	10,43543	2,45965	-1,8172	8,5616	,00	44,03
FLN	S	9	,0889	,26667	,08889	-,1161	,2939	,00	,80
	R	9	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
	Total	18	,0444	,18856	,04444	-,0493	,1382	,00	,80
PYR	S	9	,0467	,14000	,04667	-,0609	,1543	,00	,42
	R	9	,5322	1,59667	,53222	-,6951	1,7595	,00	4,79
	Total	18	,2894	1,12753	,26576	-,2713	,8502	,00	4,79
BAA	S	9	,0344	,10333	,03444	-,0450	,1139	,00	,31
	R	9	1,7256	5,17667	1,72556	-2,2536	5,7047	,00	15,53
	Total	18	,8800	3,65689	,86194	-,9385	2,6985	,00	15,53

Tableau V (suite) : Statistiques descriptives

		N	Moyenne	Ecart type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne		Minimum	Maximum
						Borne inférieure	Borne supérieure		
CHR	S	9	,4444	,84021	,28007	-,2014	1,0903	,00	2,31
	R	9	1,8222	5,46667	1,82222	-2,3798	6,0243	,00	16,40
	Total	18	1,1333	3,85979	,90976	-,7861	3,0528	,00	16,40
BBF	S	9	91,9489	186,46176	62,15392	-51,3783	235,2761	,00	581,31
	R	9	125,1467	167,58900	55,86300	-3,6736	253,9670	,00	484,51
	Total	18	108,5478	172,82972	40,73636	22,6016	194,4940	,00	581,31
BAP	S	9	6,5178	19,36654	6,45551	-8,3687	21,4042	,00	58,16
	R	9	,4722	1,41667	,47222	-,6167	1,5612	,00	4,25
	Total	18	3,4950	13,67915	3,22421	-3,3075	10,2975	,00	58,16
DBA	S	9	18,0200	38,19281	12,73094	-11,3376	47,3776	,00	118,44
	R	9	21,8278	29,32926	9,77642	-,7167	44,3722	,00	78,90
	Total	18	19,9239	33,09204	7,79987	3,4676	36,3802	,00	118,44
GHI	S	9	25,2989	42,60212	14,20071	-7,4480	58,0458	,00	111,01
	R	9	147,4911	206,01200	68,67067	-10,8637	305,8460	,00	621,49
	Total	18	86,3950	157,41222	37,10242	8,1157	164,6743	,00	621,49
N	S	9	123811,11	113810,901	37936,967	36328,31	211293,91	300	300000
	R	9	65877,78	162913,119	54304,373	-59348,33	191103,89	2900	500000
	Total	18	94844,44	139548,023	32891,785	25448,84	164240,04	300	500000

Tableau VI : ANOVA pour la comparaison des variances entre échantillons zone S

		Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
pH	Intergroupes	,172	2	,086	,087	,917
	Intragroupes	5,916	6	,986		
	Total	6,088	8			
CRE	Intergroupes	117,556	2	58,778	1,560	,285
	Intragroupes	226,000	6	37,667		
	Total	343,556	8			
MO	Intergroupes	3,002	2	1,501	2,237	,188
	Intragroupes	4,027	6	,671		
	Total	7,029	8			
BNZ	Intergroupes	23555650,087	2	11777825,043	3,783	,087
	Intragroupes	18681847,841	6	3113641,307		
	Total	42237497,928	8			
NAP	Intergroupes	28830,595	2	14415,298	,754	,510
	Intragroupes	114718,160	6	19119,693		
	Total	143548,756	8			
ACN	Intergroupes	35232,076	2	17616,038	1,159	,375
	Intragroupes	91223,197	6	15203,866		
	Total	126455,273	8			
FLR	Intergroupes	136,436	2	68,218	1,964	,221
	Intragroupes	208,401	6	34,733		
	Total	344,837	8			
PHN	Intergroupes	19,510	2	9,755	1,000	,422
	Intragroupes	58,531	6	9,755		
	Total	78,042	8			

Tableau VI (suite) : ANOVA pour la comparaison des variances entre échantillons zone S

		Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
FLN	Intergroupes	,142	2	,071	1,000	,422
	Intragroupes	,427	6	,071		
	Total	,569	8			
PYR	Intergroupes	,039	2	,020	1,000	,422
	Intragroupes	,118	6	,020		
	Total	,157	8			
BAA	Intergroupes	,021	2	,011	1,000	,422
	Intragroupes	,064	6	,011		
	Total	,085	8			
CHR	Intergroupes	,697	2	,349	,423	,673
	Intragroupes	4,950	6	,825		
	Total	5,648	8			
BBF	Intergroupes	72906,827	2	36453,413	1,066	,402
	Intragroupes	205237,076	6	34206,179		
	Total	278143,903	8			
BAP	Intergroupes	745,279	2	372,640	,991	,425
	Intragroupes	2255,224	6	375,871		
	Total	3000,503	8			
DBA	Intergroupes	3341,796	2	1670,898	1,204	,363
	Intragroupes	8327,730	6	1387,955		
	Total	11669,526	8			
GHI	Intergroupes	1189,581	2	594,791	,268	,774
	Intragroupes	13329,947	6	2221,658		
	Total	14519,528	8			
Nombre bacterien	Intergroupes	26766442222,222	2	13383221111,111	1,045	,408
	Intragroupes	76856926666,667	6	12809487777,778		
	Total	103623368888,889	8			

Tableau VII : ANOVA pour la comparaison des variances entre citernes zone S

		Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
pH	Intergroupes	5,795	2	2,898	59,334	,000
	Intragroupes	,293	6	,049		
	Total	6,088	8			
CRE	Intergroupes	68,222	2	34,111	,743	,515
	Intragroupes	275,333	6	45,889		
	Total	343,556	8			
MO	Intergroupes	1,269	2	,634	,661	,550
	Intragroupes	5,760	6	,960		
	Total	7,029	8			
BNZ	Intergroupes	6973243,117	2	3486621,559	,593	,582
	Intragroupes	35264254,811	6	5877375,802		
	Total	42237497,928	8			
NAP	Intergroupes	45677,235	2	22838,618	1,400	,317
	Intragroupes	97871,520	6	16311,920		
	Total	143548,756	8			
ACN	Intergroupes	36732,040	2	18366,020	1,228	,357
	Intragroupes	89723,232	6	14953,872		
	Total	126455,273	8			
FLR	Intergroupes	66,406	2	33,203	,716	,526
	Intragroupes	278,431	6	46,405		
	Total	344,837	8			
PHN	Intergroupes	19,510	2	9,755	1,000	,422
	Intragroupes	58,531	6	9,755		
	Total	78,042	8			
FLN	Intergroupes	,142	2	,071	1,000	,422
	Intragroupes	,427	6	,071		
	Total	,569	8			

Tableau VII (suite) : ANOVA pour la comparaison des variances entre citernes zone S

		Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
PYR	Intergroupes	,039	2	,020	1,000	,422
	Intragroupes	,118	6	,020		
	Total	,157	8			
BAA	Intergroupes	,021	2	,011	1,000	,422
	Intragroupes	,064	6	,011		
	Total	,085	8			
CHR	Intergroupes	3,556	2	1,778	5,099	,051
	Intragroupes	2,092	6	,349		
	Total	5,648	8			
BBF	Intergroupes	87035,015	2	43517,508	1,366	,324
	Intragroupes	191108,888	6	31851,481		
	Total	278143,903	8			
BAP	Intergroupes	745,279	2	372,640	,991	,425
	Intragroupes	2255,224	6	375,871		
	Total	3000,503	8			
DBA	Intergroupes	2754,181	2	1377,091	,927	,446
	Intragroupes	8915,344	6	1485,891		
	Total	11669,526	8			
GHI	Intergroupes	10396,988	2	5198,494	7,566	,023
	Intragroupes	4122,540	6	687,090		
	Total	14519,528	8			
Nombre bacterien	Intergroupes	56772975555,556	2	28386487777,778	3,635	,092
	Intragroupes	46850393333,333	6	7808398888,889		
	Total	103623368888,889	8			

Tableau VIII : ANOVA pour la comparaison des variances entre échantillons zone R

		Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
pH	Intergroupes	2,284	2	1,142	3,815	,085
	Intragroupes	1,796	6	,299		
	Total	4,080	8			
CRE	Intergroupes	42,889	2	21,444	,384	,696
	Intragroupes	334,667	6	55,778		
	Total	377,556	8			
MO	Intergroupes	164,928	2	82,464	1,697	,261
	Intragroupes	291,611	6	48,602		
	Total	456,539	8			
BNZ	Intergroupes	767804,624	2	383902,312	1,370	,324
	Intragroupes	1681455,535	6	280242,589		
	Total	2449260,159	8			
NAP	Intergroupes	4313,696	2	2156,848	,459	,653
	Intragroupes	28209,598	6	4701,600		
	Total	32523,294	8			
ACN	Intergroupes	20635,946	2	10317,973	1,235	,355
	Intragroupes	50126,825	6	8354,471		
	Total	70762,771	8			
ACY	Intergroupes	1161,907	2	580,953	,871	,465
	Intragroupes	4000,790	6	666,798		
	Total	5162,697	8			
FLR	Intergroupes	31490,813	2	15745,406	,361	,711
	Intragroupes	261471,917	6	43578,653		
	Total	292962,730	8			

Tableau VIII (suite) : ANOVA pour la comparaison des variances entre échantillons zone R

		Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
PHN	Intergroupes	585,504	2	292,752	1,612	,275
	Intragroupes	1089,910	6	181,652		
	Total	1675,414	8			
PYR	Intergroupes	5,099	2	2,549	1,000	,422
	Intragroupes	15,296	6	2,549		
	Total	20,395	8			
BAA	Intergroupes	53,596	2	26,798	1,000	,422
	Intragroupes	160,787	6	26,798		
	Total	214,383	8			
CHR	Intergroupes	59,769	2	29,884	1,000	,422
	Intragroupes	179,307	6	29,884		
	Total	239,076	8			
BBF	Intergroupes	88352,810	2	44176,405	1,944	,223
	Intragroupes	136335,786	6	22722,631		
	Total	224688,596	8			
BAP	Intergroupes	4,014	2	2,007	1,000	,422
	Intragroupes	12,042	6	2,007		
	Total	16,056	8			
DBA	Intergroupes	2723,610	2	1361,805	1,965	,221
	Intragroupes	4158,036	6	693,006		
	Total	6881,646	8			
GHI	Intergroupes	132746,261	2	66373,131	1,926	,226
	Intragroupes	206781,281	6	34463,547		
	Total	339527,543	8			
N	Intergroupes	54247402222,222	2	27123701111,111	1,030	,413
	Intragroupes	158078073333,333	6	26346345555,556		
	Total	212325475555,556	8			

Tableau IX : ANOVA pour la comparaison des variances entre citernes zone R

		Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
pH	Intergroupes	1,128	2	,564	1,147	,379
	Intragroupes	2,951	6	,492		
	Total	4,080	8			
CRE	Intergroupes	186,889	2	93,444	2,941	,129
	Intragroupes	190,667	6	31,778		
	Total	377,556	8			
MO	Intergroupes	137,781	2	68,891	1,297	,340
	Intragroupes	318,758	6	53,126		
	Total	456,539	8			
BNZ	Intergroupes	400344,805	2	200172,402	,586	,585
	Intragroupes	2048915,354	6	341485,892		
	Total	2449260,159	8			
NAP	Intergroupes	19582,205	2	9791,102	4,540	,063
	Intragroupes	12941,089	6	2156,848		
	Total	32523,294	8			
ACN	Intergroupes	12736,344	2	6368,172	,658	,551
	Intragroupes	58026,426	6	9671,071		
	Total	70762,771	8			
ACY	Intergroupes	1502,777	2	751,389	1,232	,356
	Intragroupes	3659,920	6	609,987		
	Total	5162,697	8			
FLR	Intergroupes	60814,350	2	30407,175	,786	,498
	Intragroupes	232148,380	6	38691,397		
	Total	292962,730	8			
PHN	Intergroupes	363,303	2	181,652	,831	,480
	Intragroupes	1312,111	6	218,685		
	Total	1675,414	8			

Tableau IX (suite) : ANOVA pour la comparaison des variances entre citernes zone R

		Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
PYR	Intergroupes	5,099	2	2,549	1,000	,422
	Intragroupes	15,296	6	2,549		
	Total	20,395	8			
BAA	Intergroupes	53,596	2	26,798	1,000	,422
	Intragroupes	160,787	6	26,798		
	Total	214,383	8			
CHR	Intergroupes	59,769	2	29,884	1,000	,422
	Intragroupes	179,307	6	29,884		
	Total	239,076	8			
BBF	Intergroupes	36372,807	2	18186,404	,579	,589
	Intragroupes	188315,789	6	31385,965		
	Total	224688,596	8			
BAP	Intergroupes	4,014	2	2,007	1,000	,422
	Intragroupes	12,042	6	2,007		
	Total	16,056	8			
DBA	Intergroupes	979,387	2	489,694	,498	,631
	Intragroupes	5902,259	6	983,710		
	Total	6881,646	8			
GHI	Intergroupes	33892,746	2	16946,373	,333	,729
	Intragroupes	305634,797	6	50939,133		
	Total	339527,543	8			
N	Intergroupes	51285535555,556	2	25642767777,778	,955	,436
	Intragroupes	161039940000,000	6	26839990000,000		
	Total	212325475555,556	8			

Tableau X: Test t de Student pour la comparaison des moyennes entre zone S, R

		Test de Levene sur l'égalité des variances		Test t pour égalité des moyennes					Intervalle de confiance de la différence à 95 %	
		F	Sig.	t	ddl	Sig. (bilatéral)	Différence moyenne	Différence erreur standard	Inférieur	Supérieur
pH	Hypothèse de variances égales	,993	,334	,914	16	,374	,34333	,37579	-,45330	1,13997
	Hypothèse de variances inégales			,914	15,399	,375	,34333	,37579	-,45584	1,14250
CRE	Hypothèse de variances égales	,458	,508	4,740	16	,000	15,000	3,165	8,291	21,709
	Hypothèse de variances inégales			4,740	15,965	,000	15,000	3,165	8,290	21,710
MO	Hypothèse de variances égales	13,703	,002	-1,449	16	,167	-3,67556	2,53741	-9,05462	1,70351
	Hypothèse de variances inégales			-1,449	8,246	,184	-3,67556	2,53741	-9,49655	2,14544
BNZ	Hypothèse de variances égales	9,527	,007	1,007	16	,329	793,31444	787,81306	-876,77464	2463,40353
	Hypothèse de variances inégales			1,007	8,925	,340	793,31444	787,81306	-991,13738	2577,76627
NAP	Hypothèse de variances égales	,603	,449	,481	16	,637	23,78444	49,45144	-81,04793	128,61682
	Hypothèse de variances inégales			,481	11,448	,640	23,78444	49,45144	-84,53996	132,10885
ACN	Hypothèse de variances égales	,001	,971	-,189	16	,853	-9,87667	52,33679	-120,82570	101,07237
	Hypothèse de variances inégales			-,189	14,818	,853	-9,87667	52,33679	-121,54913	101,79580
ACY	Hypothèse de variances égales	5,155	,037	-1,140	16	,271	-9,65222	8,46783	-27,60322	8,29877
	Hypothèse de variances inégales			-1,140	8,000	,287	-9,65222	8,46783	-29,17907	9,87463
FLR	Hypothèse de variances égales	10,958	,004	-2,010	16	,062	-128,30444	63,82567	-263,60882	6,99993
	Hypothèse de variances inégales			-2,010	8,019	,079	-128,30444	63,82567	-275,42656	18,81767

Tableau X (suite) : Test t de Student pour la comparaison des moyennes entre zone S, R

		Test de Levene sur l'égalité des variances		Test t pour égalité des moyennes					Intervalle de confiance de la différence à 95 %	
		F	Sig.	t	ddl	Sig. (bilatéral)	Différence moyenne	Différence erreur standard	Inférieur	Supérieur
PHN	Hypothèse de variances égales	2,991	,103	-,945	16	,359	-4,66222	4,93493	-15,12381	5,79937
	Hypothèse de variances inégales			-,945	8,744	,370	-4,66222	4,93493	-15,87590	6,55145
FLN	Hypothèse de variances égales	5,224	,036	1,000	16	,332	,08889	,08889	-,09955	,27732
	Hypothèse de variances inégales			1,000	8,000	,347	,08889	,08889	-,11609	,29387
PYR	Hypothèse de variances égales	4,315	,054	-,909	16	,377	-,48556	,53426	-1,61815	,64703
	Hypothèse de variances inégales			-,909	8,123	,390	-,48556	,53426	-1,71433	,74322
BAA	Hypothèse de variances égales	5,016	,040	-,980	16	,342	-1,69111	1,72590	-5,34985	1,96763
	Hypothèse de variances inégales			-,980	8,006	,356	-1,69111	1,72590	-5,67049	2,28827
CHR	Hypothèse de variances égales	3,339	,086	-,747	16	,466	-1,37778	1,84362	-5,28608	2,53052
	Hypothèse de variances inégales			-,747	8,378	,475	-1,37778	1,84362	-5,59603	2,84048
BBF	Hypothèse de variances égales	,179	,678	-,397	16	,696	-33,19778	83,56904	-210,35623	143,96068
	Hypothèse de variances inégales			-,397	15,821	,696	-33,19778	83,56904	-210,51909	144,12354
BAP	Hypothèse de variances égales	4,464	,051	,934	16	,364	6,04556	6,47276	-7,67609	19,76720
	Hypothèse de variances inégales			,934	8,086	,377	6,04556	6,47276	-8,85319	20,94431
DBA	Hypothèse de variances égales	,028	,870	-,237	16	,815	-3,80778	16,05164	-37,83574	30,22018
	Hypothèse de variances inégales			-,237	15,001	,816	-3,80778	16,05164	-38,02088	30,40533
GHI	Hypothèse de variances égales	5,704	,030	-1,743	16	,101	-122,19222	70,12361	-270,84763	26,46319
	Hypothèse de variances inégales			-1,743	8,683	,117	-122,19222	70,12361	-281,71013	37,32568
N	Hypothèse de variances égales	,001	,974	,875	16	,395	57933,333	66243,327	-82496,247	198362,914
	Hypothèse de variances inégales			,875	14,307	,396	57933,333	66243,327	-83859,410	199726,077

Tableaux XI : Analyse des composantes principales

Indice de Kaiser-Meyer-Olkin pour la mesure de la qualité d'échantillonnage.		,691
Test de sphéricité de Bartlett	Khi-carré approx.	77,482
	ddl	21
	Signification	<,001

Variance totale expliquée

Composante	Valeurs propres initiales			Sommes extraites du carré des chargements		
	Total	% de la variance	% cumulé	Total	% de la variance	% cumulé
1	3,833	54,753	54,753	3,833	54,753	54,753
2	1,631	23,300	78,053	1,631	23,300	78,053
3	,715	10,213	88,267			
4	,411	5,873	94,140			
5	,198	2,822	96,962			
6	,140	1,999	98,961			
7	,073	1,039	100,000			

Matrice des composantes

	Composantes	
	CP1	**CP2**
pH	-,662	,125
CRE	-,248	,731
MO	,766	-,538
BNZc1	,603	,627
NAPc2	,670	,614
ACNc3	,953	,243
FLRc3	,646	-,660
BBFc5	,974	-,208
DBAc5	,943	-,027
GHIc6	,606	,802

Tableau XII : Correlation entre les variables et le nombre bactérien

			pH	CRE	MO	BNZ	NAP	ACN	FLR	BBF	DBA	GHI	N
Rho de Spearman	pH	Coefficient de corrélation	1,000	0,164	-,513*	-0,412	-0,387	-0,441	-0,119	-,605**	-0,400	0,102	0,245
		Sig. (bilatérale)		0,516	0,030	0,089	0,113	0,067	0,637	0,008	0,100	0,687	0,327
		N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
	CRE	Coefficient de corrélation	0,164	1,000	-0,182	0,000	0,056	-0,071	-,666**	0,019	0,099	-0,276	0,263
		Sig. (bilatérale)	0,516		0,470	1,000	0,826	0,779	0,003	0,941	0,695	0,268	0,292
		N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
	MO	Coefficient de corrélation	-,513*	-0,182	1,000	,576*	0,369	,656**	0,079	,681**	,496*	0,154	-0,432
		Sig. (bilatérale)	0,030	0,470		0,012	0,132	0,003	0,754	0,002	0,036	0,541	0,074
		N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
	BNZ	Coefficient de corrélation	-0,412	0,000	,576*	1,000	0,325	,866**	0,022	,768**	,667**	0,336	-,777**
		Sig. (bilatérale)	0,089	1,000	0,012		0,188	0,000	0,932	0,000	0,003	0,172	0,000
		N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
	NAP	Coefficient de corrélation	-0,387	0,056	0,369	0,325	1,000	,501*	-0,338	,532*	0,357	-0,342	0,111
		Sig. (bilatérale)	0,113	0,826	0,132	0,188		0,034	0,169	0,023	0,146	0,165	0,662
		N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18

*. La corrélation est significative au niveau 0.05 (bilatéral).

**. La corrélation est significative au niveau 0.01 (bilatéral).

Tableau XII (suite) : Correlation entre les variables et le nombre bactérien

			pH	CRE	MO	BNZ	NAP	ACN	FLR	BBF	DBA	GHI	N
Rho de Spearman	ACN	Coefficient de corrélation	-0,441	-0,071	,656**	,866**	,501*	1,000	0,058	,641**	,530*	0,166	-,582*
		Sig. (bilatérale)	0,067	0,779	0,003	0,000	0,034		0,819	0,004	0,024	0,509	0,011
		N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
	FLR	Coefficient de corrélation	-0,119	-,666**	0,079	0,022	-0,338	0,058	1,000	-0,067	-0,003	0,324	-0,375
		Sig. (bilatérale)	0,637	0,003	0,754	0,932	0,169	0,819		0,791	0,990	0,189	0,125
		N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
	BBF	Coefficient de corrélation	-,605**	0,019	,681**	,768**	,532*	,641**	-0,067	1,000	,777**	0,147	-0,466
		Sig. (bilatérale)	0,008	0,941	0,002	0,000	0,023	0,004	0,791		0,000	0,559	0,051
		N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
	DBA	Coefficient de corrélation	-0,400	0,099	,496*	,667**	0,357	,530*	-0,003	,777**	1,000	0,258	-,475*
		Sig. (bilatérale)	0,100	0,695	0,036	0,003	0,146	0,024	0,990	0,000		0,302	0,047
		N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
	GHI	Coefficient de corrélation	0,102	-0,276	0,154	0,336	-0,342	0,166	0,324	0,147	0,258	1,000	-,475*
		Sig. (bilatérale)	0,687	0,268	0,541	0,172	0,165	0,509	0,189	0,559	0,302		0,047
		N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
	N	Coefficient de corrélation	0,245	0,263	-0,432	-,777**	0,111	-,582*	-0,375	-0,466	-,475*	-,650**	1,000
		Sig. (bilatérale)	0,327	0,292	0,074	0,000	0,662	0,011	0,125	0,051	0,047	0,004	
		N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18

*. La corrélation est significative au niveau 0.05 (bilatéral).

**. La corrélation est significative au niveau 0.01 (bilatéral).

Tableau XIII : Analyse factorielle des correspondances zone S

					Proportion d'inertie		Valeur singulière de confiance	
Dimension	Valeur singulière	Inertie	Khi-deux	Sig.	Représentation	Cumulé	Ecart type	Corrélation
1	,525	,275			,749	,749	,062	2
2	,246	,061			,165	,914	,072	
3	,143	,020			,056	,970		
4	,103	,011			,029	,998		
5	,024	,001			,002	1,000		
Total		,367	59,143	,026[a]	1,000	1,000		
a. 40 degrés de liberté								

Tableau XIV : Table des correspondances zone S

Bactérie	BNZ	NAP	ACN	FLR	PHN	BBF	BAP	DBA	GHI	Marge active
Bacillus	6	4	6	1	1	5	2	5	3	33
Priestia	3	2	3	1	1	2	2	2	1	17
Pseudomonas	4	2	4	1	1	3	6	4	3	28
Enterobacter	1	1	1	6	6	1	2	6	6	30
Serratia	1	1	1	6	6	1	6	1	1	24
Kosakonia	1	1	1	6	6	1	6	1	6	29
Marge active	16	11	16	21	21	13	24	19	20	161

Tableau XV : Analyse factorielle des correspondances zone R

					Proportion d'inertie		Valeur singulière de confiance	
Dimension	Valeur singulière	Inertie	Khi-deux	Sig.	Représentation	Cumulé	Ecart type	Corrélation
1	,360	,129			,354	,354	,055	-,034
2	,344	,118			,323	,677	,056	
3	,268	,072			,197	,873		
4	,175	,031			,084	,957		
5	,117	,014			,037	,995		
6	,044	,002			,005	1,000		
Total		,366	95,031	,025[a]	1,000	1,000		

a. 70 degrés de liberté

Tableau XVI : Table des correspondances zone R

Bactérie	BNZ	NAP	ACN	ACY	FLR	PHN	BAA	BBF	BAP	DBA	GHI	Marge active
Bacillus	3	1	2	1	3	1	6	2	6	2	1	28
Staphylococcus	1	1	1	6	6	6	6	1	6	1	1	36
Kocuria	2	6	1	1	2	1	1	1	6	6	1	28
Streptomyces	1	6	6	1	1	1	6	6	6	6	6	46
Pseudomonas	3	3	3	6	2	1	6	3	1	2	2	32
Stutzerimonas	2	1	1	1	1	1	6	1	6	1	1	22
Pseudescherichia	3	3	3	6	2	1	6	3	1	2	2	32
Psychrobacter	1	6	1	6	1	6	1	1	6	6	1	36
Marge active	16	27	18	28	18	18	38	18	38	26	15	260

Annexe 7 : séquences nucléotidiques partielle de l'ADNr 16S

Souches Skikda

>SA3 (MW229045)
ggggaaacggttaGCATGCTTCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGT
AAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAA
CATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTA
ATGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG
AGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTA
CCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGG
TTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTG
AGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACAC
CAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCT
TAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAA
GGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACC
TTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTCTTTCGGGGGCAGAGTGA
CAGTGTGCATGatgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgcacgagcgcaacccttgatcttagttgccagcattcagttgggcactcta
aagtgactgccgtgacaaccggagaaggtgggatgacgtcaatcatcatgcctcttatgactgggcctaacacacgtgctaacattggactgacagtcagcgtacg
cgaagtaggcaattccaacaaaacctggtt

>SA9 (MW229046)
taggtttcctctgcttttgCTTCTTTATTGAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATA
AGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAA
ATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTA
ACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG
AGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGT
GCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTG
GTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACA
CCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTAGGGAGCAAAC
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCC
TTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAACTCAAA
GGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCTGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACC
TTACCAGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCTTCGGGAGCAGAGTGACAggtg
gtgcatggttgttcgtcagctcgtgtcgtgaagatgtggggttaagtcccgcaacgagcgcacctttgatctttagtgcaatcattaagttggcacctcctaggtgactg
caggtgaacaacggagaggtggggatgatcgtcaaatcatcatgccatatgtgacctggcttaccatgtgcttacatgaacgggttacaagagctgcgtactgcaag
gtggaagctaattctcttaaaacggttctctcagatctgcgaatg

>SA12 (MW229042)
ggggacggttaaGCTTGCTCTTATGAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATA
AGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAA
ATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTA
ACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG
AGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGT
GCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTG
GTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACA
CCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCT
TTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAG
GAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCT
TTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCCTTCTCCTTCGGGAgcagagtgacaggtgg
tgcatggcttgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttggtaaagtcccgcacgagcgcaacccttgatcttagttgcatcattaagtgggccactctaggtgactgccgg
tgacaaacggagggaggtgggggatgacgttcaatcatcatgcccctatggacttggcttaccacgtgcctacatgcaacggtacagactgcagacgcgaaggtg
gacttattccctaagctcgtttctcagtccgtgat

>SA17 (MW229039)
ggggcgatAGCTTGCCTCTTATGAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATA
AGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATATTTTGAACTGCATGGTTCGAAA
TTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA
CGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA
GCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGC
TAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTT
TCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAG
TGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCA
GTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTT
AGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAG
GAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCT
TACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAG
GTGGTGCATGGTTGTcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgcaacgagcgcaacccttgatcttagttgccatcattagttgggcacct
ctaaaggtgactgccgtgacaaccggaggaagggtgggatgacgtcaaatcatcatgcccctatgactggctaccacgtgctacattgacgtacagagctgcagg
accgcaagtgaactattctcataaaccgttctctcag

>SB11 (MW231893)
taggaaaccggttgtcattTCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTA
AGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGA
TTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA
CGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA
GCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTAC
AAGAGTAACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTT
CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGT
GCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA
GTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTT
AGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAG
GAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGATAACcttacc
aggtcttgacatcctctgacaactctagagatagagcgttcccctttcggggacagagtgacaggtgtgcatggttgtcgtcagctcgcgtcatgagatgttggttaag
ttcccgcaaccgagcgctaacccttgatcttagttgcccagccatttagtggacacctctaaggtcgactgccgtgtgaactaaaccgaagaaagtgtgtatgacgtc
caaatcatccatgcctcgtaatgaccctggcaaccaccctgctcaccagtgatggtacaatgctgccagaactgcaagtacaggacattcctatataaaactgcatttc
ttactcagacag

>SA18 (MW229040)
aaggggggactTGCTCTGGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGG
GGATAACGTCCGGAAACGGGCGCTAATACCGCATACGTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCG
GACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGC
GACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTG
TGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGC
TGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAG
GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTG
AAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGG
TGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACC
ACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACG
CGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATG
CTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCG
TCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCcttgtccttagttaccagcaccctcgggt
gggcactctcgagactgccggtgaacaaacgagaggtggggatgacgtcaagtcatcatgtcctttacgccagggctacacacgtgcctaacatgtcgttacaatg
gttgccaagcgcaagttgaacctaatccataaaacgaattcgttagttccggaatcgcccag

>SB4 (MW229041)
ggggaaggtaACTTGCTCTGGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTG
GGGGATAACGTCCGGAAACGGGCGCTAATACCGCATACGTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTT
CGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAG
GCGACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGT
GTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCT
TGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
AAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGA
TGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGG
GTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGC
GACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCT
AACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGG
GCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGA
CATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCT
GTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGtccttagttaccagcc
acctcgggtgggcacctctaagagactgcccggtgacaaccgagagtggggatgacgtcaagttcatcatgaccttacggccaggcctaaccaccgtgcctacatt
gttcgtacaaggttgccagtcgcaagtgaagctaatccataaccgatcgtaagtccggatcggccg

>SB9 (MW229043)
aaagAGAAGCTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGG
AGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACC
TTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCT
AGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGC
GTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAA
CCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTC
GGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGA
GGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAG
GCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAG
CTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGG
GGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTT
GACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGG
CTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCaaccccttatccctttgttgccagcg
gttccggccggaactcaaggagactgccagtgataactggaggaagtgggggatgacgtcagtcatcatgtccttacgagttaggcctacaccacggtgctacaat
gacgcataccaagagaaagcgactcgcggagagacaaggcggaaccctctcataaaagggtgtgcgg

>SB15 (MW229044)
gcTTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGG
GATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGG
GCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGCGGGGTAACGGCCCACCTAGGCG
ACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGT
GAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGGTACGGTTAATAACCGTG
CCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGA
GGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATG
TGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTGGAGTCTCGTAGAGGGA
GGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGG
CCTCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAA
CGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACA
TCCACAGAAACCTGGCAGAGATGCCGGGGTGCCTT
CGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTgaaatgttgggtttaagtcccgcaacgagc
gcaacccttatcctttgttgccagcggttcaggcgggactcaagagactgccagtgataactgagaaggtggggatgacgtcagtcatcatgtccttacgacaaggg
ctaccacgtgcctaacatgcgcaatacaagagagcacctcgaggagagcaagcggactcataaggttgcgctccggtagattccga

> RA19(MW231892)
ggggaagagACTTGCTCAATGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGAT
GGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGG
ACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCA
CCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCC
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGccatgccgcg
tgtgtgaagaaggccttcgtgttgtaaagctctttcagcgaggaagaaggtggtgatcttaccatgctgttttttgtttccgagcacataagaaccaactataactgcgtg
ccagcaccgatgatatatagggtgcaaaacttaaactcattttctgtgcgtaaatcgcgcataatggagctttaattggatatgtaatcccccgctcccctgggaactgc
atcctaaacttgctatctagaagacagtataaggtgggggaatttcctgtggatcgccgaatgcgtacatataagaatgaccacccgtggcctagcgaccaccttgga
ct

Souches Rhourde el baguel

>RB6 (MW229030)
cgtACGGTCTTGCTGGTGTGGATGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACGTGAGTAACCTGCCCTTGAC
TCTGGGATAAGCCCGGGAAACTGGGTCTAATACTGGATGCTACATGTCACCGCATGGTGGTGTGTG
GAAAGGGTTTACTGGTCTTGGATGGGCTCACGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACC
AAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCG
CGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCCACAAGTGACGGT
ACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGT
TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTCGCGTCTGCTGTGAAAGCCCGGGG
CTTAACCCCGGGTGTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCCTG
GTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGT
TACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCG
TAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGACATTCCACGTTTTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTG
CCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCG
GCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGATC
GTTCCAGAGATGGTTCTTCCCCTTTGGGGTCGGTATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCACCCTCGTtcatgttgccagcacgtgatggtggggactcatgggg
agactgccggggtcactcggaggatgtggggatgacgtcaatcatcatgcccctatgtcttgggctcacgcatgctaacatgtcgtacaaagggctgcgatctgtg
agtgctctaatcgaaagtcagtctcaggtcggattgaaggtctgcca

>RB8 (MW229031)
gggggcgggttaGGCTTGCTCTTATGAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCAT
AAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGCACCGCATGGTGCGA
AATTCAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT
AACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG
GAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAG
TGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGT
GGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACT
TGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAAC
ACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCC
CTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCA
AAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAA
CCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGA
CAGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGggttagtcccgcacgagcgcacccttgatcttagtgccat
cattagttggcactctaaggtgactgcgtgacaaccgagaggtgggatgacgtcaatcatcatgcccctttatgactggcttaccacgtgctacattgaacgtacaaga
gctgcagaccgcaagttgagcctatctcataaaccgattcctccagagtg

>RB9 (MW229036)
gggggcctgtAAGGCTGCTCTCAGAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCAT
AAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACTGCATGGTTCGA
AATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT
AACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG
GAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAG
TGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGT
GGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACT
TGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAAC
ACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCC
CTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCA
AAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAA
CCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGA
CAGTGGTGCATGGTTGtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgcaacgagcgcaacccttgatctagttgccatcattaagttgggca
ctctaaggtgactgcggtgacaaccggagaaggtggggatgacgtcaatcatcatgcccctttatgactgggctaaccacgtgcttacatgaacggtacaagagctg
cagatcgcaagtgagcctatctccaataaccgattccttcagagttgcg

>RB13 (MW229038)
gggcaccgtcaAGATGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTG
GGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGATCCTCGCAGGCATCTGCGAGGTTCGA
AAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
GCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
GAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCT
GCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTC
CGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTA
ACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTA
GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTG
ACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC
GGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCG
CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGA
GCATGTGGCTTAATTTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAACCC
TGGAGACAGGGTCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTG
AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTTGCcagcagcccttgtggtgctggggactca
cgggagaccgccggggtcaactcggaggatgttggggacgacgtcagtcatcatgcccctttatgtcttgggcctgcacacgtgctacattgcgttaacatgagctg
gcgatacccgcagtgacgaatctcaaaagcgtctcagtttcggaattgggggttctggcaaactg

>RA3 (MW229032)
aggtaggGAGCTTGCTCCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGAT
GGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGG
ACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCA
CCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCC
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGC
CGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATACGGTTA
ATAACCGTGTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAA
GTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGACAGGCTAGAGTCTTGT
AGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCG
AAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCG
GAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGA
CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACT
CTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCA
TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTgaaatgttgggttaagtcccgcaacgagcgcaacccttatccttttgttgccagcggtcggccggaactca
aggagactgccagtgataaactggagaggtggggatgacgtccaggtcatcatgtccttacgagtaggctaaccacgtgcctaccatgcgcatacataggagcga
actcgcggagaccagcgaacctcataaggtgcgctcgttgttccggatccgggagat

>RA8 (MW229033)
gcgaagGGAACTGCTCTCTGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGATAGTG
GGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTT
CGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
GCGACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGT
GTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACCTAATACGT
TAGTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
AAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTTAAGTTGAAT
GTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTGGCAAGCTAGAGTATGGCAGAGGG
TGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG
ACCACCTGGGCTAATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT
GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTA
ACGCATTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGG
CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTG
ACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGG
CTGTCGTCAGCTCGTGtcgtgagatgttggggttaagtcccgtaacggagcgcaacccttgtcccttagttaccagccacgttatggtgggcactctag
gagactggccgggtgacaaccgggagggaaggtgggggatgacggtcaagttcatcatgggtcctttacggcctggggcctacacacggtgcttacaatgggtt
cggtaacaaacggattgccaggcgcgagggtgaaagctatccaataaaaccggaatcggtagttccgggaaatcgtcgc

>RA14 (MW229034)
aaaggAACTTGCTCTGGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGG
GGATAACGTCCGGAAACGGGCGCTAATACCGCATACGTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCG
GGCCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGC
GACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTG
TGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGC
TGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAG
GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTG
AAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGG
TGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACC
ACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACG
CGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCCTTGACAT
GCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGTGCTGCATGGCTGTCG
TCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTTAAGTCCCGTAACGAGCGCACCCTTgtccttagttaccagcacctcggg
tggcactctagagactgccgtgacaaccgagtgtgggatgacgtcagtcatcatgtccctacgcaagctaccccacgtgctaacatggttcgttacaatgctggcca
gctgcgaggtgactatcataaatcgatcgtagtcccagaatccgcagtcttgccaatctcg

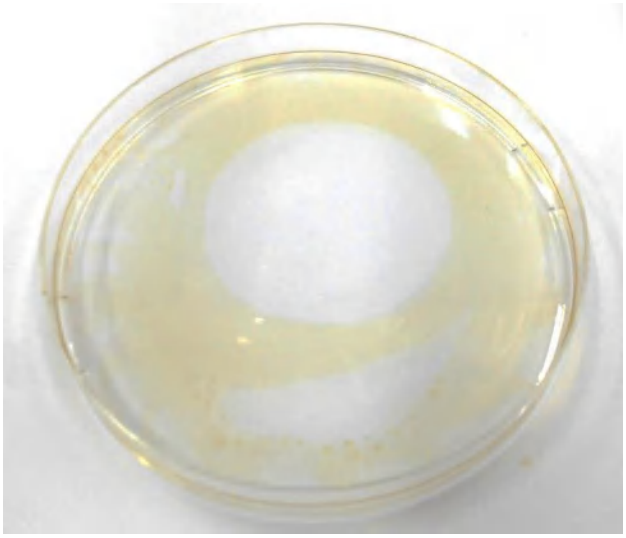
>RB10 (MW229037)
aggcagctGCTCATGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGA
CAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGAC
CTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGAC
GATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGA
AGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGT
TTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGT
GCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAA
GCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTGGCGAGCTAGAGTATGGCAGAGGGTGGTGG
AATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACC
TGGGCTAATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCAT
TAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCA
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCA
GAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC
AGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTTGTCcttagttaccagcacgtttatg
tgggcactctatggagactgcccggtgacaaccgagaggtgggatgacgtcagtcatcatgccttacggctgcctaacacacgtgcctacattgatcgtacaaggat
tgccaagcgcagtgaacctaatccataaaccgaatcgtagtccgaatcgccaatcctgtcaatcg

>RB1 (MW229035)
tagggGAGCTTGCTTCTCGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATACTTAGGAATCTACCTAGTAG
TGGGGGATAGCTCGGGGAAACTCGAATTAATACCGCATACGACCTACGGGAGAAAGGGGGCAACT
TGTTGCTCTCGCTATTAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGATGGTGGGGTAAAGGCCTACCATG
GCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACCGGGACTGAGACACGGCCCGGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGT
GTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTAAAGCACTTTAAGCAGTGAAGAAGACTCCATGGTTAATACCC
ATGGACGATGACATTAGCTGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
AGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGAGCGTAGGTGGCTTGATAAGTCAG
ATGTGAAAGCCCCGGGCTTAACCTGGGAACGGCATCTGATACTGTTAGGCTAGAGTAGGTGAGAG
GAAGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGG
CAGCCTTCTGGCATCATACTGACACTGAGGTTCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTAGTCGTTGGGTCCCTTGAGGACTTAGTGACGCAGCT
AACGCAATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGG
GCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGA
CATATCTAGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAAATTAGAATACAGGTGCTGCATGGC
TGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCACGAGCGCaacccttgtccttagtaccagcggtttgg
cgggactctacgatactgcagtgacaactgagtgcgggacgacgtcagtcatcatgtcctacgacaagggctaacacgtgctacatgtagtacgagggcagctac
agcatggatgccatctcaaggcctatcgtactcaaatgggagtctgccaact

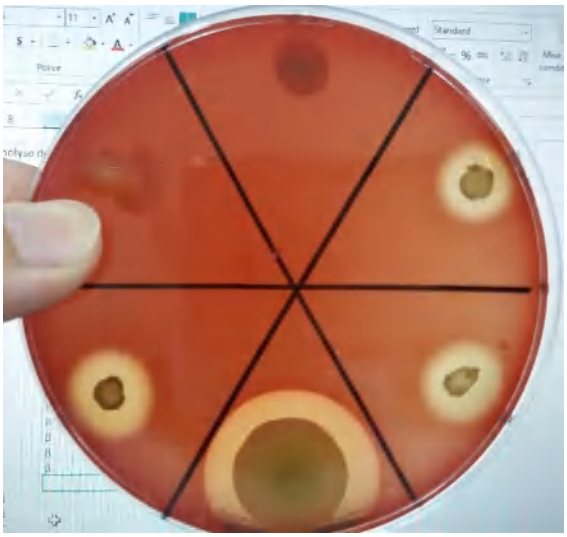
Annexe 8 : photographies de quelques résultats des tests de détection de biosurfactants

Emulsification de kérosène

Déplacement d'huile



Hémolyse de sang



Effondrement de la goutte sur parafilm M

GUERGOURI Derrouiche Ibtissem

Titre : Etude de la diversité bactérienne des sols pollués aux hydrocarbures dans les biotopes littoraux et sahariens de l'Algérie. Approche statistique et moléculaire.

Résumé

Les hydrocarbures aromatiques libérés dans les sols des parcs industriels suite à des déversements accidentels de pétrole brut ou ses dérivés constituent des substances toxiques, hydrophobes, ayant tendance à se séquestrer dans la matrice du sol, ce qui les rend persistants et difficiles à éliminer par les microorganismes. Les molécules les plus légères, sont cependant plus réactives et mobiles, capables de rejoindre différents compartiments de l'écosystème, ce qui constitue un risque accru sur la santé humaine et environnementale. En réponse à cette situation, certaines bactéries produisent des biomolécules qui agissent sur les hydrocarbures et entrainent une augmentation de leur solubilité et disponibilité pour la biodégradation, ce sont les biosurfactants (Bs) et les bioémulsifiants (Be). Cette thèse a pour objectif d'explorer la diversité des bactéries telluriques de sols des parcs industriels pollués aux hydrocarbures, en mettant l'accent sur deux environnements distincts : une zone littorale (la raffinerie de Skikda) et une zone saharienne (le champ pétrolier Rhourde el baguel à Ouargla). Notre recherche se concentre sur les bactéries aérobies cultivables, impliquées dans la dégradation des hydrocarbures par production des Bs/Be. L'analyse physicochimique a permis de mettre en évidence des variations dans la texture, le pH, la capacité de rétention d'eau et la matière organique d'un sol à l'autre. La spectrophotométrie-UV a révélée des teneurs élevées en hydrocarbures aromatiques mono et polycycliques atteignant les 7117,83 mg/Kg de sol sec. 94 bactéries ont été isolées sur milieu de culture contenant le pétrole brut comme unique source de carbone et d'énergie. 34 isolats de la zone littorale (S) et 31 de la zone saharienne (R), répartis sur 14 phénogroupes à Gram positif et 10 phénogroupes à Gram négatif, ont donné des réponses positives aux tests d'émulsification du kérosène et de déplacement d'huile, témoignant de la présence de Bs/Be dans la culture bactérienne. Une sélection a porté sur 20 bactéries comme étant les meilleures productrices de Bs/Be représentant leur phénogroupes, en se référant aux valeurs de l'indice d'émulsification E_{24} (3,53-62,42 %) et le diamètre de déplacement d'huile (0,49-4,20 cm). Le séquençage de l'ADNr 16S a conduit à leur attribution aux genres suivants avec leurs abondances relatives respectives : *Bacillus* (40.63%), *Kocuria* (7,81%), *Priestia* (6,25%), *Staphylococcus* (1,56%) et *Streptomyces* sp. (1,56%) pour les bactéries à Gram positif, et *Pseudomonas* (23,44%), *Stutzerimonas* (6,25%), *Pseudescherichia* (6,25%), *Serratia* (1,56%), *Psychrobacter* (1,56%), *Enterobacter* (1,56%) et *Kosakonia* sp. (1,56%) pour les bactéries à Gram négatif. L'analyse statistique par le billet de plusieurs tests a permis de confirmer l'effet combiné d'un ensemble de facteurs comme l'âge de la pollution, la composition du polluant, les conditions climatiques et édaphiques, sur la flore bactérienne qui dégrade les hydrocarbures que ça soit en zone littorale ou en zone saharienne.

Mots clés : diversité bactérienne, sols pollués, hydrocarbures aromatiques, zone littoral, zone saharienne, biodégradation, biosurfactants, bioémulsifiants.