

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Naufrage d'un pétrolier le <i>Sanchi</i> en mer de Chine orientale le 14 janvier 2018. Trois nappes d'hydrocarbure mesurent au total 332 km ² . La marée noire se déplace vers le nord en raison des vents et des courants marins menaçant les côtes sud-coréennes et japonaises.	2
2	Vue générale de la raffinerie d'Augusta visée pour des plaintes pour pollution.	3
3	Photographie montrant l'explosion de la plate forme pétrolière DeepWater dans le golfe du Mexique le 20 avril 2010.	3
4	Photographie montrant une partie du complexe de gaz naturel liquéfié (GNL) à Skikda après une explosion survenue lundi 20 janvier 2004.	5
5	Schéma représentant les principales familles d'hydrocarbures et autres composés contenus dans le pétrole.	12
6	Chambre de diffusion développée pour augmenter le potentiel de croissance des microorganismes.	21
7	Situation géographique de la wilaya de Skikda.	27
8	Image satellitaire montrant la zone industrielle (cercle rouge) de la wilaya de Skikda.	28
9	Plan de masse de la zone industrielle de Skikda (DRIK.2000).	28
10	Image satellitaire montrant la centrale thermique CTE du Complexe pétrochimique de Skikda et ses 3 principaux points de rejets dans l'oued Saf saf (cercle noir).	29
11	Image satellitaire montrant une vue globale des complexes GL1/K et CP1/K avec les points de rejets des 2 complexes respectivement dans l'oued Saf-saf et la méditerranée.	30
12	Photographie montrant le bassin de traitement des eaux polluées par les hydrocarbures (ETP-2) de la raffinerie de Skikda: 1-Séparateurs en parallèle vu d'en haut, 2- Un séparateur vide, 3- Un bassin montrant le racleur de fond.	32
13	Photographie montrant le 1 ^{er} traitement par le sulfate de fer (FeSO ₄) pour provoquer la floculation (ETP-2).	33
14	Photographie montrant le bassin de floculation de la station d'épuration des effluents (ETP-2) de la raffinerie de Skikda.	33
15	Photographies montrant différents angles du bassin où se déroule le traitement biologique a : bassin biologique montrant les turbines d'air par les flèches rouges. b : vue intégrale du bassin biologique.	35
16	Photographie un bassin propre pourvu pour le traitement biologique, montrant les structures des turbines d'aire par les flèches bleu.	35
17	Photographie montrant le système d'évacuation des boues en excès (ETP2).	35
18	Photographie montrant les filtres à sable -(ETP-2).	36
19	Photographie montrant le bassin des eaux traitées et en cours d'évacuation vers la méditerranée, où a eu lieu le 1 ^{er} échantillonnage.	37
20	Localisation des sites d'étude et d'échantillonnage 2 (Google map 2015 modifiée). a: ETP2 1101 : 36°52'00.4"N 6°57'57.7"E ,b: Oued zeramna 36°52'41.2"N 6°56'08.9"E et c: Oued saf saf 36°87'23.4"N 6°94'25.7"E.	39
21	Photographie représentant le Chromatographe en phase Gazeuse / Spectromètre de Masse.	41
22	Illustration de l'hydrogénation du benzène.	42

23	Photographie représentant l'appareil du MALDI TOF Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight.	46
24	Schéma montrant le principe du MALDI-TOF MS Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight.	47
25	Représentation de la variation annuelle des moyennes des températures dans les eaux traitées biologiquement dans l'ETP2 entre 2008 et 2014. Ligne rouge: valeur limite.	48
26	Représentation des variations mensuelles des moyennes des températures des eaux traitées dans l'ETP2 en 2014. Ligne rouge: valeur limite.	49
27	Représentation des variations annuelles du pH moyen des eaux usées avant et après traitement biologique dans l'ETP2 entre 2008 et 2014, lignes rouge et jaune: valeurs limites.	49
28	Représentation des variations mensuelles moyennes des pH de l'eau traitée dans l'ETP2 en 2014. Lignes rouge et jaune: valeurs limites.	50
29	Représentation des variations annuelles des conductivités moyennes des eaux usées avant et après traitement biologique dans l'ETP2 entre 2008 et 2014. Cercles: valeurs limites.	50
30	Représentation des variations mensuelles des moyennes des conductivités des eaux traitées dans l'ETP2 en 2014.	51
31	Variations annuelles des concentrations des hydrocarbures totaux de la station de traitement des effluents S1101-ETP2 entre 2008 et 2014. Ligne rouge: norme.	52
32	Graphes de la chromatographie gazeuse (GC) de l'eau à T ₀ : temps de rétention théorique du benzène est de 2.98 min.	54
33	Graphes Spectromètre de masse (MS) de l'eau à T ₀ : signature m/z = 78. La signature m/z du benzène est entourée en rouge.	54
34	Cinétiques des concentrations du cyclohexane B (µg/µl) issus de la biodégradation du benzène par la culture des 10 différentes espèces bactériennes après 4 semaines d'incubation.	57
35	Cinétiques des concentrations du cyclohexane T (µg/µl) issus de la biodégradation du toluène par la culture des 10 différentes espèces bactériennes après 4 semaines d'incubation.	58
36	Cinétiques des concentrations (µg/µl) des cyclohexanes B issus de la biodégradation du benzène par la culture des 10 différentes espèces bactériennes après 9 semaines d'incubation.	60
37	Cinétiques des concentrations (µg/µl) des cyclohexanes T issus de la biodégradation du toluène par la culture des 10 différentes espèces bactériennes après 9 semaines d'incubation.	61
38	Arbre phylogénétique par la méthode Neighbor-joining basée sur les séquences s'ADNr 16S des souches du consortium bactérien responsable de biodégradation des hydrocarbures pétroliers selon Guermouche, (2014).	66
39	Arbre phylogénétique par la méthode Neighbor-joining basée sur les séquences d'ARNr 16S des souches isolées des sols contaminés par du pétrole (Zhengzhi <i>et al.</i> , 2010).	67

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Les principales maladies causées par les eaux récréatives contaminées.	10
2	Valeurs guides québécoises et françaises pour différents HAPs (Ministère de l'Environnement du Québec, 1998).	17
3	Représentation des valeurs < et > aux normes.	39
4	Coordonnées géographiques des 3 sites de rejets retenus dans la zone industrielle.	40
5	Caractéristiques du benzène et du toluène ajoutés dans nos échantillons.	40
6	Description et identification des spécificités chimiques du Cyclohexane utilisé.	42
7	Standards de cyclohexane retenus.	43
8	Quelques microorganismes impliqués dans la dégradation des hydrocarbures mono-aromatiques (Be: Benzène, To: Toluène, Eb: Ethylbenzène, Xy: Xylènes, oXy: o-xylène, pXy: p-xylène, mXy: m-xylène).	43
9	Représentation des 4 familles et des 10 espèces de bactéries ubiquistes retenues.	44
10	Représentation des scores des 10 espèces identifiées par MALDI-TOF et la signification de leurs scores.	53
11	Concentrations du cyclohexane chez les 6 espèces de la famille <i>Enterobacteriaceae</i> après 4 semaines d'incubation.	56
12	Concentrations du cyclohexane chez les 2 espèces de la famille <i>Moraxellaceae</i> après 4 semaines d'incubation.	56
13	Concentrations du cyclohexane chez la S1850 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> après 4 semaines d'incubation.	56
14	Concentrations du cyclohexane chez la S1663 <i>Enterococcus faecalis</i> après 4 semaines d'incubation.	57
15	Concentrations du cyclohexane chez les 6 espèces de la famille <i>Enterobacteriaceae</i> après 9 semaines d'incubation.	59
16	Concentrations du cyclohexane chez les 2 espèces de la famille <i>Moraxellaceae</i> après 9 semaines d'incubation.	59
17	Concentrations du cyclohexane chez la S1850 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> après 9 semaines d'incubation.	59
18	Concentrations du cyclohexane chez la S1663 <i>Enterococcus faecalis</i> après 9 semaines d'incubation.	60
19	Taux d'approvisionnement (F) et taux de consommation (AF) des espèces impliquées dans les processus microbiens dans le sous-sol (Hunkeler <i>et al.</i> , 2002).	64

Table des matières

Introduction	1
1. Généralités.....	10
1.1. Rappel sur les principaux types de pollution.	10
1.1.1. Pollution microbiologique.....	10
1.1.2. Pollution organique.....	10
1.2. Hydrocarbures pétroliers.....	11
1.2.1. Définition.....	11
1.2.2. Classification.....	11
1.2.2.1. Hydrocarbures saturés.....	12
- Alcanes linéaires.....	12
- Alcanes ramifiés.....	12
- Cyclohexanes.....	12
1.2.2.2. Hydrocarbures aromatiques.....	13
1.2.2.3. Composés polaire.....	13
1.2.2.4. Résines asphaltènes	13
1.3. Pollution de l'environnement par les hydrocarbures et leur impact.....	13
1.3.1. Toxicité	14
1.3.2. Impact des effluents industriels sur la sante humaine et l'environnement....	14
1.3.3. Impact eco-toxicologique.....	14
1.3.4. Mesures de protection contre la pollution.....	15
1.3.4.1. Evaluation des sites pollués.....	15
1.3.4.2. Réglementation au niveau national.....	16
1.3.4.3. Réglementation et normes internationales sur les rejets des effluents de raffineries de pétrole.....	17
1.4. Devenir des hydrocarbures dans l'environnement.....	18
1.4.1. Transformation abiotique.....	18
1.4.2. transformation biotique.....	19
1.4.2.1. Biodégradation par les microorganismes.....	19
1.4.2.2. Microorganismes aptes à biodégrader les hydrocarbures.....	19
1.4.2.3. Diversité bactérienne et classification des microorganismes	20
1.5. Les hydrocarbures Aromatiques et leur biodégradation dans les milieux aquatiques.	
1.5.1 Propriété Physico-chimiques des Hydrocarbures Aromatiques.....	22
1.5.2 Provenance et devenir des Hydrocarbures Aromatiques.....	22
1.5.3 Toxicité des Hydrocarbures Aromatiques.....	23
1.5.4 Biodégradation des Hydrocarbures Aromatiques par les microorganismes (surtout Bactéries).....	23
1.5.4.1 Facteurs influençant la dégradation des HA.....	23
1.5.4.2 Facteurs bibliographiques favorisant l'accessibilité et la dégradation des HA.....	23

1.5.4.3 Voies métaboliques de dégradation des HA.....	24
- Voies de dégradation aérobies.....	25
- Voies de dégradation Anaérobies.....	25
- Dégradation des HA par les champignons.....	25
- Dégradation des HA par les micro algues.....	26
- Dégradation des HA par les bactéries.....	26
2. Matériels et Méthodes.....	27
2.1. Description de la région de Skikda.....	27
2.2. Description des infrastructures industrielles de la wilaya de Skikda.....	27
2.2.1 Centrale thermique (CTE).....	29
2.2.2 Complexe de liquéfaction du gaz (GL1/K).....	29
2.2.3 Complexe pétrochimique (CP1/K).....	29
2.2.4 Complexe de Raffinage (RA1/K).....	30
2.2.4.1. Traitement des effluents rejeté	31
2.2.4.1.1. Phase chimique.....	31
2.2.4.1.2. Phase biologique.....	34
2.2.4.1.3. Phase physique.....	36
2.3. Zone d'échantillonnage.....	37
2.3.1. Echantillonnage 1.....	37
2.3.1.1. Caractéristiques Physico-chimiques	37
2.3.1.1.1 Mesure pH, conductivité et température	37
2.3.1.1.2. HTC.....	37
2.3.2. Echantillonnage 2.....	39
2.3.2.1. Essais préliminaires.....	40
2.3.2.2. technique d'analyse physico-chimique.....	41
2.3.2.2.1. Analyse du benzène et du toluène par GC/MS.....	41
2.3.2.2.2. Analyse des dérivés hydroxylés.....	42
2.3.2.3. Technique de microbiologie.....	43
2.3.2.3.1. Souches bactériennes utilisées.....	44
2.3.2.3.2. Caractères biochimiques des 10 souches utilisées.....	45
- <i>Enterobacteriaceae</i>	45
- <i>Pseudomonadaceae</i>	45
- <i>Moraxellaceae</i>	45
- <i>Enterococcaceae</i>	45
2.3.2.3.3. MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization- Time Of Flight.....	46
3. Résultats.....	48
3.1 Paramètres physico-chimiques.....	48
3.1.1. Concernant la température.....	48
3.1.2. Concernant le pH.....	49

3.1.3. Concernant la Conductivité.....	50
3.2 Paramètres organiques : Hydrocarbures totaux.....	51
3.3 Résultats de la technique MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption / onization -Time Of Flight.....	52
3.4 Quantification du benzène et du toluène par Chromatographie Gazeuse/ Spectrométrie de Masse: GC/MS.....	53
3.4.1. Résultats avant traitement (T ₀).....	54
3.4.2. Résultats après 4 semaines d'incubation.....	55
3.4.2.1. Incubation par <i>Enterobacteriaceae</i>	55
3.4.2.2. Incubation par <i>Pseudomonadaceae</i>	56
3.4.2.3. Incubation par <i>Moraxellaceae</i>	56
3.4.2.4. Incubation par <i>Enterococcaceae</i>	57
3.4.3. Résultats après 9 semaines d'incubation.....	58
3.4.3.1. Incubation par <i>Enterobacteriaceae</i>	58
3.4.3.2. Incubation par <i>Pseudomonadaceae</i>	59
3.4.3.3. Incubation par <i>Moraxellaceae</i>	59
3.4.3.4. Incubation par <i>Enterococcaceae</i>	60
4. Discussion et Conclusion.....	62
Perspectives.....	71
Résumés	73
Anglais.....	74
Références bibliographiques.....	75
Annexes.....	81

Introduction

Introduction

Le pétrole est une forme d'énergie très pratique à utiliser, c'est une source d'énergie qui dispose de nombreux avantages pratiques, du fait de ses caractéristiques et de son histoire. Pourtant il présente de nombreux inconvénients qui ont tendance à être oubliés, par omission volontaire, par négligence, par refus des alternatives, ou simplement par facilité.

Le pétrole est une ressource chimique et énergétique qui a accompagné et catalysé le développement technologique de l'Humanité. C'est également l'une des principales causes de la catastrophe écologique majeure qui s'annonce: le réchauffement climatique.

Le pétrole est un fluide, il possède une densité énergétique importante, 1Kg fournit environ 11.6 kWh d'énergie, soit 10 kWh /l, il permet de créer de nombreux produits dérivés, source d'énergie bon marché il présente une forte capacité d'investissement des compagnies qui se chiffrent en milliards de dollars en 2017.

Malheureusement l'ensemble de la filière du pétrole est catastrophique du point de vue environnemental:

- l'extraction du pétrole libère d'importantes quantités de gaz naturel, pas toujours valorisé, et dont l'effet de serre est 23 fois plus important que celui du gaz carbonique ;
- l'extraction toujours, qui n'est pas sans conséquence sur l'environnement immédiat des sites exploités (fuites sous-marines sur les sites d'extraction offshore) ;
- le transport sur de très longues distances, coûteux en énergie et, lorsqu'il s'effectue par bateau, peut avoir des conséquences catastrophiques sur l'environnement (marées noires, dégazage sauvages des pétroliers, fuites sur oléoducs);
- le traitement et l'utilisation, qui sont largement émetteurs de gaz à effet de serre et autres gaz polluants;
- le traitement des produits en fin de vie, qui lorsqu'ils ne sont pas recyclables (ou pas recyclés), polluent de manière rarement réversible notre air, notre sol, notre eau et nos mers.

Notre société "pétrolisée" a tendance à oublier les inconvénients de l'usage du pétrole comme source d'énergie: les catastrophes environnementales récurrentes comme les marées noires et la pollution tentent de nous les rappeler. Trois exemples récents nous permettent de constater qu'on pourrait inverser la majeure partie des avantages en inconvénients selon que

l'on se place du point de vue d'une nation/compagnie pétrolière, ou du point de vue du consommateur.

Le 1^{er} a eu lieu le 14 janvier 2018 quand un pétrolier Le Sanchi, qui transportait 136 000 tonnes de condensats, des hydrocarbures légers, a sombré après avoir brûlé pendant une semaine à la suite d'une collision avec un cargo à environ 300 km à l'est de Shanghai (Fig. 1), 32 marins ont péri dans la catastrophe. Une marée noire de 300Km a été provoquée en mer de Chine orientale et Le Sanchi gît à présent par 115 m de profondeur. La quantité de polluants encore éventuellement dans le bateau n'est pas connue. En plus de sa cargaison, le Sanchi, qui battait pavillon panaméen, pouvait transporter environ 1 000 tonnes de diesel lourd pour faire ses machines.



Figure 1: Naufrage d'un pétrolier le *Sanchi* en mer de Chine orientale le 14 janvier 2018. Trois nappes d'hydrocarbure mesurent au total 332 km². La marée noire se déplace vers le nord en raison des vents et des courants marins menaçant les côtes sud-coréennes et japonaises.

Le 2^{ème} a eu lieu le 13 mai 2018 quand la presse italienne s'est étonnée de voir la société Sonatrach accepter le rachat d'une vieille raffinerie d'Augusta en Sicile (Fig. 2) qui risque de coûter 2 fois plus cher en raison des énormes travaux de dépollution et de remplacement des équipements afin qu'elle soit aux normes européennes en matière de lutte contre la pollution qu'il faudra effectuer.



Figure 2: Vue générale de la raffinerie d'Augusta visée pour des plaintes pour pollution.

Le 3^{ème} exemple et le plus démonstratif s'est déroulé le 20 avril 2010 suite à l'explosion de la plate forme pétrolière DeepWater Horizon (Fig. 3) tuant 11 personnes et générant un incendie puis une marée noire de grande envergure, le désastre écologique est sans précédent au Etats Unies, 780.10⁶ de litres de pétrole répandu dans le Gulf du Mexique dans l'océan Atlantique (Geraud *et al.*, 2010).



Figure 3: Photographie montrant l'explosion de la plate forme pétrolière DeepWater dans le golfe du Mexique le 20 avril 2010.

Les Hydrocarbures qu'ils soient totaux ou Aromatiques monocycliques ou polycycliques regroupent un ensemble très vaste de composés organiques c'est les plus toxiques car ils sont classés cancérigènes, mutagènes et reprotoxiques (Yakimov *et al.*, 2007). Ces substances plus au moins mobiles se déplacent soit sous forme particulaire dans l'atmosphère, soit en solution dans les eaux de surfaces ou souterraines, elles peuvent alors atteindre différents écosystèmes naturels. Outre leur caractère ubiquiste, leur forte toxicité justifie leur classement en Polluant Organique Persistant et leur inscription comme substances prioritaires sur les listes de la Commission Européenne, de l'Agence de Protection de l'Environnement des Etats-Unis et de l'Organisation Mondiale de la Sante (Marchand *et al.*, 1996; Yerushalmi *et al.*, 2003).

L'Algérie est un pays producteur de pétrole et son économie est étroitement liée aux hydrocarbures. La production, l'industrie du raffinage et le transport du pétrole contribuent à la pollution et provoque de sérieux ennuis écologiques. Par conséquent, l'état générale de l'environnement en Algérie est devenu une des préoccupations capitales surtout avec la progression démographique, environ 50% de la population est concentrée sur le littoral. En particulier, dans les zones industrielles et portuaires comme Alger, Arzew et Skikda (Grimes, 2003). Cette évolution ne cesse d'amplifier légitimement les inquiétudes des citoyens sous les effets combinés des agressions à l'environnement. Une autre préoccupation concerne les sites menacés par des contaminations issues des rejets industriels dans les eaux de mer, c'est une réalité concrète qui impose aux collectivités territoriales l'apport de solutions pérennes. En outre, la protection des écosystèmes, des ressources en eau, des sols, des forêts, et en général, l'amélioration du cadre de vie ont toujours fait partis des priorités du gouvernement.

Dans la wilaya de Skikda, il y a eu plus d'une catastrophe industrielle mais celle qui a fait de graves pertes aussi bien matériels que humaines. C'est la violente explosion (Fig. 4) survenue lundi 20 janvier 2004 dans un complexe de gaz naturel liquéfié (GNL), qui a fait au moins 23 morts et 74 blessés, a entraîné l'arrêt de la raffinerie et provoqué la fermeture de ce port de première importance pour les exportations énergétiques du pays.



Figure 4: Photographie montrant une partie du complexe de gaz naturel liquéfié (GNL) à Skikda après une explosion survenue lundi 20 janvier 2004.

La mise en place d'outils de dépollution des sites contaminés par les hydrocarbures, est primordiale. Une large sensibilité écologique dans le monde et la recherche de nouveaux moyens de dépollution des produits pétroliers apparaissent comme des enjeux essentiels pour légitimer l'utilisation de ces produits. Leur réhabilitation peut être réalisée par traitement physico-chimique, malheureusement, ces procédés sont non seulement onéreux, mais aussi non respectueuses des écosystèmes. Ils doivent être rigoureusement testés afin de déterminer la quantité de réactif à utiliser et éviter qu'ils se trouvent en défaut ou en excès. Il est primordial de bien connaître les propriétés des milieux afin d'éviter les risques de réactions secondaires qui mèneraient à la formation de nouveaux polluants incontrôlables dans les milieux aquatiques.

Différents procédés physico-chimiques tels que le stripping, la flottation, la désorption thermique, l'extraction par solvant, l'ultrason, le traitement électrochimique ont été proposés pour traiter les milieux contaminés par les Hydrocarbures mono/polycycliques (Fritsche et Hofrichter ,2008). L'approche biologique est de plus en plus envisagée pour les dépollutions des hydrocarbures aromatiques. L'intérêt de cette technique utilisant le pouvoir épurateur des microorganismes, réside surtout dans son aspect non polluant, peu invasif et moins onéreux (LAN, 2009).

Depuis plus de 3,5 milliards d'années, les bactéries sont capables de s'adapter et de coloniser tous les types d'environnements jusqu'aux plus extrêmes, des eaux hyper-salines de la mer Morte aux sources bouillantes et acides de Yellowstone, en passant par la désastreuse marée noire du golfe du Mexique et les friches industrielles montréalaises (Canganella et Wiegel, 2011).

Les bactéries peuvent vivre dans ces milieux extrêmes parce qu'elles s'y adaptent rapidement. Cette adaptation repose sur ce qui pourrait paraître un superpouvoir, celui de s'échanger des gènes par simple contact (Soucy *et al.*, 2015). En effet, les bactéries n'acquièrent pas seulement leurs gènes de leur mère, mais aussi de leurs sœurs, cousines et voisines. Ce phénomène, appelé «transfert latéral de gènes», consiste principalement en la transmission de gènes portés par des plasmides entre une bactérie donneuse et une bactérie receveuse. Des bactéries aux propriétés physiologiques, aux structures cellulaires ou aux milieux de vie différents peuvent alors s'échanger des gènes pour améliorer leurs performances dans leur milieu actuel ou pour en envahir un nouveau (Gogarten *et al.*, 2002). Bien que les plasmides ne soient pas essentiels à la survie de la bactérie, ils contiennent des gènes qui peuvent lui être grandement bénéfiques, les plus connus étant ceux de résistance aux antibiotiques, de virulence ou de biodégradation de contaminants tels que les hydrocarbures (Obayori et Salam, 2010).

Grâce à leur pouvoir adaptatif, les bactéries indigènes (initialement présentes dans un milieu) exposées à long terme à une contamination finissent par développer la capacité de dégrader les contaminants. Pour elles, les hydrocarbures constituent une source de carbone et d'énergie pour leur respiration et leur croissance. Elles sont alors capables de dégrader les hydrocarbures, des plus simples aux plus complexes, puis de les assimiler (Das et Chandran, 2011).

Dans un milieu contaminé, une bactérie est rarement équipée de tous les mécanismes appropriés pour dégrader un hydrocarbure. Une dégradation totale devient donc possible grâce à un ensemble de bactéries possédant des mécanismes de dégradation variés. La dégradation aérobie (+O₂) représente la voie la plus rapide et la plus complète de dégradation des hydrocarbures (Rohrbacher et St-Arnaud, 2016).

De nombreux sites contaminés non oxygénés, tels que les puits de pétrole ou les sols profonds des friches industrielles, se révèlent à priori peu favorables au développement de la

vie. Pourtant, ces milieux abritent eux aussi une communauté bactérienne riche et variée, qui, en l'absence d'oxygène, est malgré tout capable de dégrader les hydrocarbures. Même si cette dégradation anaérobie n'est pas aussi efficace que la dégradation aérobie, l'intérêt grandit pour son utilisation dans la dépollution de sites contaminés.

Même si la bioremédiation constitue la meilleure solution à la décontamination de sites pollués aux hydrocarbures, elle reste relativement lente et peut durer plusieurs années. De nombreuses stratégies visent alors à l'accélérer. Parmi elles, l'ajout de dispersant permet au pétrole, qui devrait normalement remonter à la surface de l'eau, d'être émulsionné en de minuscules gouttelettes et de rester en suspension dans l'eau. Ainsi, ces gouttelettes peuvent être attrapées plus facilement par les bactéries indigènes, qui les dégradent. Cette stratégie a été utilisée pour la bioremédiation de la marée du golfe du Mexique. Cependant, le fait de disperser les hydrocarbures entraîne temporairement et localement une forte augmentation de leur toxicité, jusqu'à ce que le pétrole dispersé se dissémine dans un vaste volume d'eau et soit dégradé par les bactéries indigènes (Rico-Martínez *et al.*, 2013). Cet effet implique une certaine limitation de l'usage de la dispersion près des côtes et des zones sensibles ou lorsque les conditions de dilution semblent défavorables.

La bioaugmentation, quant à elle, consiste à enrichir un milieu pollué aquatique ou terrestre avec une ou plusieurs espèces bactériennes. Cette approche est utilisée lorsque les bactéries indigènes ne sont pas capables de dégrader les hydrocarbures parce qu'elles se trouvent dans des conditions stressantes de contamination soudaine. Bien que la bioaugmentation de bactéries exogènes (étrangères) ait été appliquée avec succès dans le nettoyage de sites contaminés, de nombreux facteurs influencent son efficacité au fil du temps ainsi que la survie des souches microbiennes introduites dans le sol ou l'eau. Non seulement les caractéristiques mêmes du milieu (telles que la température, le type de sol, la concentration en O₂) ont une influence considérable sur son efficacité, mais la compétition entre bactéries exogènes et indigènes explique son échec à long terme (Thompson *et al.*, 2005). En effet, les bactéries exogènes, habituées à croître en laboratoire dans des conditions optimales de croissance, entrent en compétition avec les indigènes, souvent beaucoup plus robustes et parfaitement adaptées aux conditions environnementales du milieu contaminé. La population exogèneensemencée finit donc par s'affaiblir et disparaître, son pouvoir biodégradant envolé en même temps qu'elle.

Actuellement, les chercheurs s'intéressent à modifier génétiquement les bactéries afin de pallier ce phénomène de compétition. Les bactéries étant capables de s'échanger des plasmides, l'intégration des gènes de dégradation d'hydrocarbures dans les plasmides des bactéries donneuses semble la solution tout indiquée. Ces bactéries donneuses peuvent alors transférer leurs gènes de dégradation aux bactéries indigènes receveuses. Ainsi, la disparition des bactéries donneuses importe peu, puisque les plasmides possédant les gènes de dégradation ont été transférés aux bactéries receveuses et perdurent donc dans le milieu Wang *et al.*, 2014). Cependant, la croissance non contrôlée de bactéries génétiquement modifiées et le fort potentiel de celles-ci de propager de nouvelles informations génétiques aux bactéries receveuses représentent des obstacles majeurs à la validation de cette technique (Benjamin *et al.*, 2015). En effet, la modification génétique des bactéries peut s'avérer dangereuse si elle n'est pas pleinement maîtrisée. Des bactéries nuisibles pourraient alors prendre de l'ampleur dans un écosystème et entraîner des conséquences dévastatrices pour la faune et la flore indigènes. Créer une nouvelle bactérie «kamikaze», c'est-à-dire contenant des gènes de suicide cellulaire, pourrait pallier cet inconvénient (Paul *et al.*, 2005). Cette bactérie serait non seulement capable de dégrader les hydrocarbures, mais aussi de contrôler sa croissance et son transfert latéral de gènes. L'apparition de traits génétiques indésirables, comme la résistance aux antibiotiques ou la virulence, serait alors évitée. Bien que les chercheurs soient encore dans une phase de recherche et d'expérimentation, l'utilisation de bactéries génétiquement modifiées a permis de franchir une frontière importante dans la bioremédiation de sites contaminés aux hydrocarbures.

Les groupes de composés pétroliers polluants pour lesquelles la biodépollution est possible sont: les hydrocarbures pétroliers (gasoils, fuels, kérosène, huiles minérales) et les déchets d'exploitation et de transformation du pétrole (boues et résidus d'huiles de forages et principalement les rejets ou effluents liquides) (Bertrand *et al.*, 1972). Le nouveau défi consiste aujourd'hui vue l'ensemble des pollutions ponctuelles d'origine anthropogénique, de dégrader d'énormes volumes de pétrole sur un site donné.

Certaines bactéries possèdent par ailleurs la capacité d'adopter des formes de vie (spores, symbiose) tel *Bacillus sp.* (Dandie *et al.*, 2004) et des structures (biofilms) particulières leur confèrent une résistance par rapport aux contraintes environnementales tel que: *Pseudomonas sp* (Johnsen *et al.*, 2005). Ces bactéries ont un potentiel élevé d'adaptation aux pollutions par les hydrocarbures dans les stations de traitement des sites pollués (Molina *et al.*, 2009). Dans un premier temps, les chercheurs ont procédé à l'isolement et l'étude

physiologique de nombreuses bactéries à partir des sites pollués par les hydrocarbures, ces études ont montré que certaines bactéries sont capables de baser leur métabolisme exclusivement sur la dégradation des hydrocarbures bien que de nombreuses sources de carbones plus facilement métabolisables, soient disponibles (Juhasz *et al.*, 2000). Cependant, les conditions de culture limitent l'extrapolation du comportement de la souche isolée dans la communauté exposée (1% des souches d'une communauté est cultivable dans les conditions du laboratoire).

En Algérie, comme partout ailleurs sur la planète, la préservation de l'environnement se vit au quotidien, c'est aujourd'hui, l'affaire de tous en faveur de tous et des générations futures. C'est dans ce contexte que nous avons élaboré ce travail de recherche, qui a pour but de caractériser le potentiel bactérien de biodégradation des hydrocarbures aromatiques, de sorte que le suivi quantitatif et qualitatif des hydrocarbures et la croissance de nos souches, soient synchrones, en vue d'une exploitation à grande échelle.

C'est ainsi que nous avons abordé une étude descriptive de la zone industrielle de Skikda, avec la mise au point méthodologique sur la problématique du traitement par des souches bactériennes, des rejets des effluents industriels destinés à être évacués en mer.

Nous avons préalablement suivi l'évolution annuelle de 4 paramètres physico-chimiques: pH, température, conductivité et estimé des teneurs en hydrocarbures totaux dans les eaux d'effluents entre 2008 et 2014 avant de les comparer avec les valeurs obtenues en 2015. Ensuite, nous nous sommes intéressés à suivre la biodégradation du benzène et du toluène par 10 souches bactériennes.

Généralités

1. Généralités

1.1 Rappel sur les principaux types de pollutions

Comprendre les mécanismes qui contrôlent le devenir des flux des contaminations apportés au littoral et déterminer les éléments biologiques impitoyables contaminants les eaux côtières, est un indispensable non seulement afin d'appréhender les risques environnementaux et sanitaires mais aussi pour établir un bilan de l'état général d'un écosystème côtier.

1.1.1 Pollution microbiologique

La pollution microbiologique de l'eau de mer est due au déversement des eaux usées, se qui provoque des crises sanitaires à l'échelle mondiale. Au niveau du littoral, la totalité des bactéries identifiées sont d'origine fécale, tel que: *Escherichia coli*, *streptococcus fecalis*. Dont leur présence dans l'eau de baignade provoque des centaines de milliers de maladies des voies respiratoires et gastro-intestinales (Tab. 1).

Tableau 1: Les principales maladies causées par les eaux récréatives contaminées. (Merabtine *et al.*, 1997).

Affections	Maladies	Germes responsables	Site d'attaque	Origine
Gastro-intestinales	Gastro-entérites	<i>E.coli</i>	Intestins (homme et animal)	Eau et coquillage
	Salmonelloses	<i>Salmonella</i>		
	Cholera	<i>Vibrio cholerae</i>		
Cutano-muqueuses	Otite externe	<i>Streptococcus sp</i>	Peau du conduit	Eau pendant la baignade
	Sinusite		Sinus frontal	
	Conjonctivite		conjonctive	

1.1.2 Pollution organique

Le développement industriel durant ces deux siècles passés a permis de considérables avancées technologiques tel que, l'utilisation des différentes ressources en énergie (pétrochimie du nucléaire). Le développement des installations industrielles et celui des moyen de transport. Cependant, ils sont souvent générateurs de nouvelles sources de pollution.

Dans la wilaya de Skikda, il y a eu plus d'une catastrophe industrielle mais celle qui a fait de graves pertes aussi bien matériels que humaine. C'est celle de la GNL en 2004 : 27 morts, 75 blessés et des dommages enregistrés dans un rayon de 4 km.

Il faut prendre en considération plusieurs éléments à haut risque et fortement influant, du à la concentration de l'industrie au Nord Algérien, dont notamment:

- Quartes zones pétrochimiques (Arzew, Alger, Bejaia et Skikda) ;
- Les complexes des pesticides et es aire de stockage comme le complexe d'Annaba ;
- Les grands sites pétroliers, les anciens puits de pétroles, les surfaces de stockages des huiles extrêmement dangereuses ;
- Les lignes de hautes tensions traversant le tissu urbain.

1.2. Hydrocarbures pétroliers

1.2.1. Définition

Les hydrocarbures sont des composés organiques contenant exclusivement des atomes de carbones (C) et d'hydrogènes (H) (Heider *et al.*, 1999). Dans le langage courant on parle des hydrocarbures pour faire référence au pétrole ou au gaz naturel. On distingue les hydrocarbures à chaîne ouverte ou hydrocarbures aliphatiques et les composés cycliques. Dans les composés à chaîne ouverte contenant plusieurs atomes de carbone ceux-ci sont reliés les uns aux autres pour former une chaîne ouverte pouvant présenter une ou plusieurs ramifications c'est à dire contenant des chaînes latérales. Dans les composés cycliques, les atomes de carbone forment un ou plusieurs cycles fermés. Ces deux groupes sont subdivisés en composés saturés et insaturés.

1.2.2. Classification

Les hydrocarbures sont la fraction la plus importante du pétrole brut, entre 65% et 95% de la plupart des pétroles bruts.ces hydrocarbures sont classés en 4 familles principales qui sont présentes en proportions variables selon leur origine: les hydrocarbures saturés (30 à 70%), les hydrocarbures aromatiques (20 à 40%), les composés polaires (5 à 25%) et les asphaltenes (0 à 10%) (Fig.5) (Syakti. 2004).

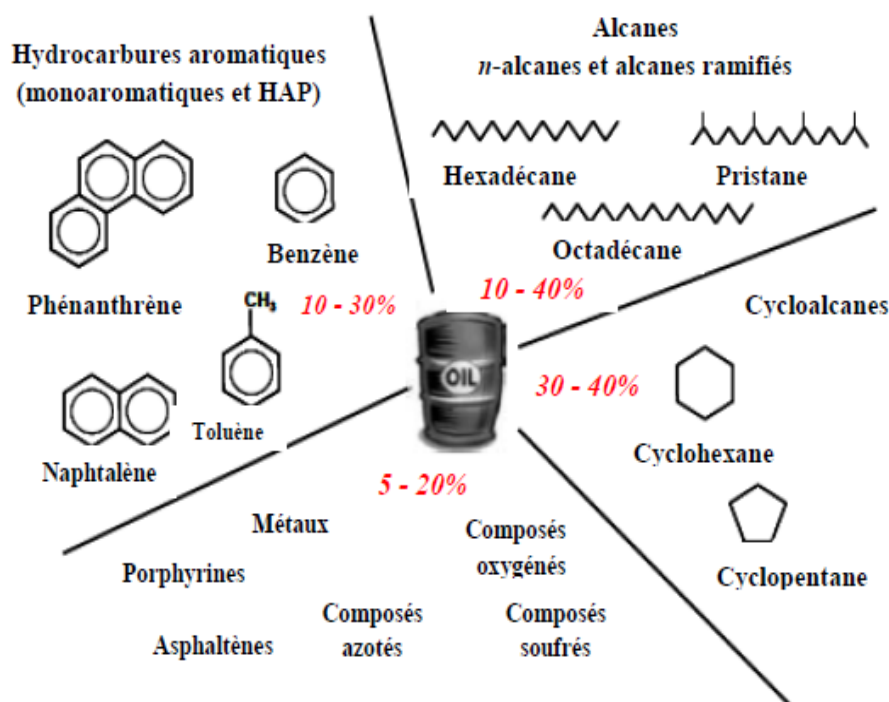


Figure 5: Schéma représentant les principales familles d'hydrocarbures et autres composés contenus dans le pétrole. (Syakti. 2004 ; modifiée par Guermouche MA, 2013).

1.2.2.1. Hydrocarbures saturés

Parmi les hydrocarbures saturés on distingue:

- Alcanes linéaires

De formule brute C_nH_{2n+2} , dont la longueur de leur chaîne varie de 7 à 40 atomes de carbones, constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40% des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut).

- Alcanes ramifiés

Les alcanes ramifiés les plus abondants sont les iso-alcanes, les autres alcanes ramifiés antéiso ou polyramifiés sont beaucoup moins nombreux. Ces composés se trouvent dans le pétrole brut à des proportions presque égales à celle des alcanes linéaires.

- Cycloalcanes

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

1.2.2.2. Hydrocarbures aromatiques

Plusieurs familles d'hydrocarbures aromatiques dont le nombre varie entre 2 et 6 noyaux sont présentes dans les pétroles bruts. Les cycles aromatiques peuvent être agencés de manières linéaire, angulaire ou groupé. Au sens strict, ils ne contiennent donc que des atomes de carbone et d'hydrogène (Seo *et al.*, 2009). Les HAPs se subdivisent en deux groupes: les légers et les lourds. En ce qui concerne les légers la masse molaire est comprise entre 150 et 180 g.mol⁻¹ (HAP de moins de 4 cycles), alors que les lourds (au moins 4 cycles) ; dont les masses molaires varient de 200 à 280 g.mol⁻¹.

Les HAPs présentant un caractère génotoxique élevé, seize d'entre eux ont été classés par l'Agence Américaine de protection de l'environnement (American Environmental Protection Agency), par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et par la communauté Européenne comme polluants fortement toxiques dont l'étude est prioritaire (Samanta *et al.*, 2002). Les hydrocarbures aromatiques sont moins abondants que les alcanes, et ne représentent que 10 à 30% des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier.

1.2.2.3. Composés polaire

Les composés polaires a des molécules hétérocycliques elle que:

- Des composés oxygénés: phénols, acides carboxyliques, alcools.....etc ;
- Des composés soufrés: sulfure, disulfures, mercaptans ;
- Des composés azotés: pyridines, quinoléines.

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

1.2.2.4. Résines et asphaltènes

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

Les composés appartenant à la fraction des résines et asphaltènes peuvent être liés a des éléments autres que l'hydrogène et le carbone tels que l'azote, l'oxygène et le soufre pour former des hétéroéléments. Ces éléments peuvent également être liés a des métaux lourds, tels que le nickel et le vanadium. Généralement présents a l'état de trace dans les pétroles (Tissot et Welte, 1984).

1.3. Pollution de l'environnement par les hydrocarbures et leur impact

La pollution est une modification défavorable du milieu naturel, qui apparait en totalité ou en partie. La notion de la pollution est toute relative, on peut considérer qu'il y a pollution par les hydrocarbures lorsque l'action de ceux peut être considéré comme néfaste à l'homme

directement ou aux conditions de vie humaine indirectement. Si elle affecte les populations animales et végétales qui lui sont utiles (Bertrand et Mille.1989).

1.3.1. Toxicité

Les hydrocarbures sont des contaminants omniprésents, ils constituent une classe des produits chimiques organiques dangereux dont certains de leurs effets toxiques sont reconnus comme fortement cancérigènes, immunotoxiques, mutagènes ou tératogènes. Il représentent une sérieuse menace pour la sante humaine (Erikson *et al.*, 2003).

Les sols contaminés par les hydrocarbures présentent un danger lors d'un contact direct avec l'homme ou l'animal ou lors de leur transfert dans les chaines alimentaires. C'est les phénomènes de bioaccumulation avec le piégeage par les végétaux et les animaux des polluants ou de leurs dérivés jusqu'à des teneurs atteignant les seuils de toxicité (Bertrand et Mille.1989).

1.3.2. Impact des effluents industriels sur la sante humaine et l'environnement

Les impacts de la pollution par hydrocarbures sont multiples. Les aspects les plus évidents sont les grandes catastrophes très médiatisés (Soltani, 2004). La plus grande catastrophe pétrolière fut celle du sous marin d'Ixtoc one, dans le golfe du Mexique ou 350 000 tonnes de pétrole brut se sont déversées dans l'océan entre juin 1979 et février 1980. D'autres sources viennent alourdir le bilan, citons l'exemple de la première guerre du Golfe, ou la fin du conflit en 1991 a révélé la catastrophe des champs de puits de pétrole en flamme et le naufrage de pétroliers bombardés, déversant des quantités importantes de brut. Le bilan total a été estimé à 800 000 tonnes déversées, 40 millions de tonnes de sols saturés de pétrole et 700 km de côtes polluées (Kennish, 2001).

En 1980, l'Algérie non plus n'a pas été épargnée, à ce titre, l'accident pétrolier Juan Lavallega a déversé plus de 40 000 tonnes de pétrole dans les eaux territoriales algériennes. Un plan d'action Algérien national pour la réduction de la pollution marine due à des activités industrielles menées à terre a été élaboré. L'essor de l'industrie a entraîné le rejet massif de résidus toxiques dans l'environnement.

Le pétrole étant la première source mondiale d'énergie, la pollution par les hydrocarbures est la plus répandue et affecte l'ensemble des écosystèmes.

1.3.3. Impact eco-toxicologique

Dans l'environnement, les contaminants peuvent être présents sous différentes formes augmentant ainsi les risques d'exposition. En effet, à température ambiante, les hydrocarbures aliphatiques sont gazeux jusqu'à C₄ puis liquide et enfin solides à partir de C₁₆ (excepté pour les alcalynes qui se solidifient à partir de C₁₅). Ces formes induisent des modes de

contaminations différentes. Par ordre d'importance, on notera d'inhalation, la pénétration à travers la peau puis l'ingestion (Soltani, 2004). Une fois dans l'organisme ces composés hautement liposolubles rejoignent la circulation sanguine puis sont répartis vers un spectre très large de tissus avec une localisation préférentielle au niveau des tissus adipeux. Du fait de leur caractère lipophile, ces polluants ont une tendance à la bioaccumulation via les réseaux trophiques (Fent, 2004).

De nombreux hydrocarbures aliphatiques présentent des risques toxicologiques, mutagènes voire même cancérigènes pour de nombreux organismes dont l'homme (Spencer *et al.*, 2002). Il est cependant difficile de dissocier leurs effets propres car ils sont souvent présents en mélange avec d'autres hydrocarbures, tel les HAPs, qui sont largement plus étudiés deviennent toxiques par oxydation enzymatique provoquant la formation de métabolites électrophiles solubles. Ces métabolites peuvent alors former des adduits sur les acides nucléiques ainsi que sur les protéines, amenant à un processus de division cellulaire et à la formation de tumeurs (Kallimanis *et al.*, 2007) .

Les hydrocarbures aliphatiques chlorés (méthane, éthane et éthènes chlorés) sont les plus étudiés car se sont des composés chimiques qui sont largement utilisés pour leurs propriétés de solvants et dont la toxicité est avérée (Ruder, 2006). En effet, le contact avec ces contaminants peut entraîner des dommages, pouvant aller jusqu'au développement de cancers, au niveau de nombreux organes (foie, reins, système cardio-vasculaire, système reproductif, système nerveux) (Ruder, 2006; Spencer *et al.*, 2002).

1.3.4. Mesures de protection contre la pollution

1.3.4.1. Evaluation des sites pollués

L'évaluation de sites contaminés et l'estimation du danger qui l'associe est un sérieux problème. Le risque est défini par le danger de la source polluante, lié à la nature des substances polluantes et à leur quantité, le transfert des polluants de la source aux milieux cibles (hommes ou environnement). Ainsi les paramètres les plus représentatif pour assurer une surveillance adéquate d'un effluent dans les raffineries sont: MES (Matières En Suspension), DCO (Demande Chimique en Oxygène), DBO₅ (la quantité en dioxygène nécessaire aux microorganismes aérobies pour oxyder les matières organiques dissoutes ou en suspensions, en 5 jours), alors que les hydrocarbures, les phénols, les NH₃, les sulfures et le pH doivent être mesurés en continu.

1.3.4.2. Réglementation au niveau national

Le littoral algérien est couvert par une pluralité de textes dont certains sont très anciens et d'autres plus récents et qui touchent des domaines très variés. L'Algérie a élaboré des lois pour l'environnement en 1983, incitant les institutions concernées à des mesures de réglementaires sur les activités originaires des pollutions (Loi des finances 1992, Art 117).

Ces mesures servent à alimenter le Fonds National de l'Environnement (FNE), ce fonds vise la promotion d'actions de sensibilisation dans le champ environnemental et de soutien financier concret à toute activité et mesure de protection de l'environnement.

Bien que la réglementation insaturée en matière de protection de l'environnement soit complète ou détaillée, elle reste cependant, inefficace sur le terrain pour plusieurs raisons:

Manques de procédures spécifiques d'application, manque de moyen d'intervention au niveau des inspections de l'environnement, elles sont insuffisantes pour protéger le littoral.

Le code des eaux, réaménagé en 1996, constitue une base suffisante pour une gestion rationnelle et intégrée de ressources en eaux, mais il est encore peu appliqué. L'Algérie a continué à chercher d'autres instruments législatifs à fin de mieux protéger son environnement.

Alors elle a adopté en 2002, une nouvelle loi relative à la protection et à la valorisation de l'environnement qui incite à préserver les espaces terrestres et marins nécessaires au maintien des équilibres naturels et l'interdiction de toute implantation d'activités industrielles nouvelles sur le littoral. C'est en 2003, que l'état a conçu la loi n°03-10 relative à la protection de l'environnement dans le cadre du développement durable, où elle interdit tout déversement, immersion et incinération dans les eaux maritimes sous juridiction Algérienne, des substances et matières susceptibles de nuire à l'environnement.

Concernant les normes Algériennes sur les hydrocarbures, il existe le décret exécutif n°93-160 du juillet 1993 (J.O n°46 du 14 juillet 1993) qui fixe la valeur limite maximale des hydrocarbures rejetés par les raffineries à 20 mg/l. il y a aussi le décret exécutif n°06-141 du 19 avril 2006 qui définit les valeurs limites des rejets d'effluents liquides au niveau des anciennes installations pétrolières par 15 mg/l des hydrocarbures totaux en attendant la mise à niveau des installations dans un délai de 7 ans (conformément aux dispositions législatives en vigueur, et notamment celle de la loi n°05-07 du 28 avril 2005). Après le délai la valeur limite des hydrocarbures totaux devient 10 mg/l (Saker, 2007).

1.3.4.3. Réglementation et normes internationales sur les rejets des effluents de raffineries de pétrole

Au Québec et en France, en ce qui concerne les eaux la somme des concentrations en benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(a)pyrène, benzo (g,h,i) pérylène et indéno(1,2,3-cd)pyrène ne doit pas excéder 0.1 µg/l, il est à noter que la concentration en benzo(a)pyrène ne doit pas dépasser la valeur de 0.01 µg/l (décrit n°2001-1220 du 20 décembre 2001, relatif aux eaux destinées à la consommation humaine).

Dans le domaine de la pollution des sols, les seules données disponibles sont les VCI (Valeur de Constat d'Impact), au delà des quelles une étude de la nature de la pollution et de ses impacts est nécessaire. Des valeurs dites guides, servant de référence sont utilisées au Québec (Ministère de l'Environnement du Québec, 1998) où un seuil de concentration est défini, correspondant à la valeur d'intervention au dessus de la quelle le site doit être dépollué. Le tableau 2 récapitule les valeurs retenues par ces gouvernements.

Tableau 2: Valeurs guides québécoises et françaises pour différents HAPs (Ministère de l'Environnement du Québec, 1998). **Pvl:** pas de valeur limite, **niveau A:** la limite de détection, **niveau B:** le seuil de contamination pour lequel des analyses approfondies sont nécessaires, **niveau C:** de techniques de dépollutions doivent être mise en œuvre.

	Critères québécois pour les eaux (mg/kg de matières sèches)			VCI françaises (mg/kg de matières sèches)	
	Niveau A	Niveau B	Niveau C	Usage sensible	Usage non sensible
Naphtalène	0.1	5	50	46	Pvl
Fluorène		10	100		
Phénanthrène		5	50		
Anthracène		10	100	Pvl	Pvl
Fluoranthène		10	100	6100	Pvl
Pyrène		10	100		
Benzo(a)anthracène		1	10	13.9	252
Chrysène		1	10	10 350	25 200
Benzo(a)Pyrène				7	25
Benzo (g,h,i) pérylène					
Benzo(k)fluoranthène				900	2520
indéno(1,2,3-cd)pyrène				16.1	252

Le MARPOL (pollution marine) est une convention internationale concernant la pollution de la mer, fondée en 1978, élaborée dans le cadre de l'Organisation Maritime Internationale (OMI). Parmi ses principales dispositions:

A une distance de 1 km de la cote et dans d'autres zones spéciales désignées, les pétroliers sont autorisés à rejeter de l'eau contenant jusqu'à 15 mg/l d'hydrocarbures. Au delà de cette concentration une pellicule brillante serait visible à la surface de l'eau, constituant une preuve de non-conformité. Au delà d'une limite de 1 km de la cote et hors des zones spéciales, les pétroliers sont autorisés à déverser jusqu'à 60 litres par la distance parcourue, jusqu'à un rejet total maximum représentant 1/15 000 de leur cargaison totale pour les navires-citernes existants ou 1/ 30 000 pour les navires-citernes neufs (<http://marpol.com>).

1.4. Devenir des hydrocarbures dans l'environnement

C'est par des processus physiques, chimiques et biologiques qu'un hydrocarbure va pouvoir être transformé ou éliminé, après avoir été diffusé dans l'environnement. Parmi les différentes altérations que peut subir un hydrocarbure, on citera les facteurs environnementaux qui sont:

1.4.1. Transformation abiotique

Les pertes abiotiques des hydrocarbures sont uniquement dues à des phénomènes d'ordre chimique et physique. Elles peuvent se traduire principalement par 6 phénomènes: évaporation, solubilisation, émulsifications, sédimentation, photo-oxydation et hydrolyse.

1.4.1.1. Evaporation:

L'évaporation touche les fractions de faible poids moléculaire et dépend des conditions atmosphériques (vent, vagues, températures...). Les hydrocarbures les plus légers, ayant de 4 à 12 atomes de carbone, qui représentent généralement près de 50% des hydrocarbures totaux d'un brut moyen, sont éliminés rapidement des premiers jours, pouvant conduire à une pollution de l'atmosphère (Soltani, 2004).

1.4.1.2. Solubilisation:

La solubilité des hydrocarbures dans l'eau est très faible. Un hydrocarbure est d'autant plus soluble que sa masse moléculaire est faible et que sa polarité est élevée. Il est important de noter que ces hydrocarbures solubles sont parmi les plus dangereux pour l'environnement. Ils sont difficiles à éliminer et sont adsorbés par la faune (Bouchez *et al.*, 1995).

1.4.1.3. Emulsification:

Deux types d'émulsion peuvent se former: eau dans l'huile appelée «mousse-chocolat» et huile dans l'eau. Ces émulsions sont constituées par des hydrocarbures de haut poids moléculaires, difficilement dégradables (Soltani, 2004).

1.4.1.4. Sédimentation:

La sédimentation est le passage du pétrole de la surface vers le fond. Ce phénomène concerne les résidus goudronneux constitués de la fraction pétrolière la plus lourde, dont la

densité est supérieure à celle de l'eau de mer. Se qui conduit à la constitution des agrégats de haute densité difficilement dégradables par voie naturelle (Morgan et Watkinson, 1989).

1.4.1.5. Photo-oxydation:

Observée en surface des eaux où l'air (oxygène) et la lumière sont présents pour la transformation des hydrocarbures. L'efficacité de ce phénomène dépend de la nature des hydrocarbures et de la présence de composés non hydrocarbonés. Ainsi, la photo-oxydation touche plus particulièrement les composés aromatiques qui sont plus photosensibles (Wilcke *et al.*, 2000).

1.4.1.6. Hydrolyse:

Processus de dégradation des molécules organiques sous l'action de l'eau, fortement influencé par le pH et la température.

1.4.2. Transformation biotique

1.4.2.1. Biodégradation par les microorganismes

La biodégradation est le phénomène le plus important dans la dépollution de l'environnement. Plusieurs microorganismes en sont responsables, en particuliers les bactéries (Willison, 2004). La biorémediation est considérée comme une façon écologique de diminuer la teneur de ces polluants récalcitrants notamment les hydrocarbures aromatiques. C'est en vue d'exploiter la faculté de certains microorganismes à dégrader les hydrocarbures que des études s'attachent à caractériser, quantifier et comprendre ces mécanismes de dégradation.

1.4.2.2. Microorganismes aptes à biodégrader les hydrocarbures

Ils proviennent des milieux très variés et peuvent vivre dans des conditions extrêmes: des températures en dessous de 0°C ou au contraire, très élevées, dans des milieux inondés ou en pleins désert, en présence d'oxygène ou anaérobie. En raison de leur pouvoir d'adaptation, ces microorganismes sont utilisés pour éliminer les composés xénobiotiques. L'existence d'organismes susceptibles de métaboliser les hydrocarbures a été signalée dès le début du 20^{ème} siècle par Sohgen (Gatellier, 1970). La dégradation des hydrocarbures dans les milieux marins et terrestre est réalisée par les bactéries suivantes: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Actinomycetes*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium* et *Mycobacterium* (Champagnat et Adrian, 1974).

Les caractéristiques des bactéries aptes à biodégrader les hydrocarbures sont les suivantes: génétiquement stable, apte à se reproduire rapidement, capable de dégrader une vaste étendue de polluants pétroliers, activité enzymatique et croissance des bactéries dans des conditions environnementales optimum, aucun effet secondaire néfaste ni produits finaux toxiques 63%

pigmentés, la majorité des souches bâtonnets Gram négatives, 2% des bactéries mobiles, 20% des bactéries Gram positives, filamenteuses (Pelmont, 1995).

Parmi les microorganismes aptes à se développer sur les hydrocarbures, les bactéries restent qualitativement et quantitativement prépondérante pour métaboliser ses substrats. On peut y trouver tout les types de bactéries, des autochtones, des hétérotrophes, des aérobies, des anaérobies, mésophiles, psychrophiles et des thermophiles (Gabet *et al.*, 2004).

Plusieurs études ont démontré que certains champignons et algues possèdent également le pouvoir de dégrader les hydrocarbures, parmi les champignons qui dégradent les HAPs les genres suivants: *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Penicillium*, *Trametes*, *Fusarium*, *Sacharomyces* et *Bjerkandera* (Kanaly et Hur, 2006).

Quelques recherches ont aussi démontré la dégradation de certains HAPs par des algues. En effet, *Selenastrum capricornutum*, une algue verte peut dégrader le fluoranthène, le pyrène (Lei *et al.*, 2007) et le benzo(a)pyrène (Juhasz et Naidu, 2000).

1.4.2.3. Diversité bactérienne et classification des microorganismes

Une des premières techniques d'études des microorganismes a consisté à inoculer des dilutions d'échantillons naturels dans des milieux de culture artificiels élaborés au laboratoire. Ces milieux, liquides ou solides, requièrent au minimum une source de carbone, une source d'énergie et un accepteur final d'électrons (Hugenholtz, 2002). Les milieux riches sont composés de sources complexes de nutriments : peptone, extrait de levure. Métabolisables par un grand nombre de microorganismes, souvent copiotrophes (des microorganismes qui ont des demandes élevées en nutriments et qui ont une croissance rapide lorsque les substrats sont abondants (Fierer *et al.*, 2007).

Les milieux minéraux, contenant un substrat et des sels minéraux, sont souvent utilisés pour isoler par enrichissement des bactéries ayant une fonction métabolique spécifique et conviennent aussi aux microorganismes oligotrophes (microorganismes capables de croître à faible concentration en nutriments grâce à leur haute affinité pour le substrat, leur croissance est plus lente).

Les paramètres de croissance tels que la température, le pH, le temps d'incubation, l'aération, la présence ou non de lumière, varient selon les populations que l'on cherche à détecter. Lorsque des populations spécifiques sont visées, des traitements préalables sont parfois mis en œuvre. La filtration, la centrifugation sur gradient de densité ou la cryométrie en flux (Hugenholtz, 2002) sont des techniques de tri des cellules selon leur taille, leur densité ou d'autres caractéristiques détectables par fluorescence.

Les approches dépendant de la culture sont mises en œuvre pour d'une part, dénombrer les cellules viables (Sait *et al.*, 2002) et d'autre part, isoler par enrichissement des microorganismes doués d'une activité particulière, dégrader un polluant par exemple (Willison, 2004). Cependant, les approches dépendantes de la culture présentent un certain nombre de biais, comme le fait de favoriser les microorganismes à croissance rapide (Sait *et al.*, 2002). De plus, les cultures de laboratoires reproduisent rarement les conditions existantes dans l'environnement et qui sont nécessaires à la croissance de la plupart des microorganismes. C'est pourquoi, les bactéries cultivables par des techniques standard ne représentent que 1 à 5 % de la diversité observée par des méthodes moléculaires (Hugenholtz, 2002 ; Janssen, 2006).

En diversifiant les conditions d'incubation et les milieux de culture, certains auteurs ont réussi à isoler de nouveaux genres bactériens. Par exemple, le remplacement de l'agar par la Gellan Gum a permis de cultiver non plus 5% mais 14% des cellules dénombrées par microscopie. Grâce à cette technique, certaines bactéries apparaissant après 10 semaines de croissance ont été isolées. Leur identification a montré qu'elles étaient affinitaires à des microorganismes dont on ne connaissait l'existence que par leur séquence ARr 16S. De nouveaux taxons d'Acidobactéries, notamment, ont été identifiés (Janssen *et al.*, 2006).

Par ailleurs, un système de culture *in situ* en chambre de diffusion a été mis au point pour permettre d'isoler des microorganismes sur milieu solide, tout en conservant les conditions naturelles d'apport de nutriments (Fig. 6). La majorité des isolats obtenus en chambres de diffusion (70%) n'était pas cultivable sur milieu solide classique (Epstein *et al.*, 2007).

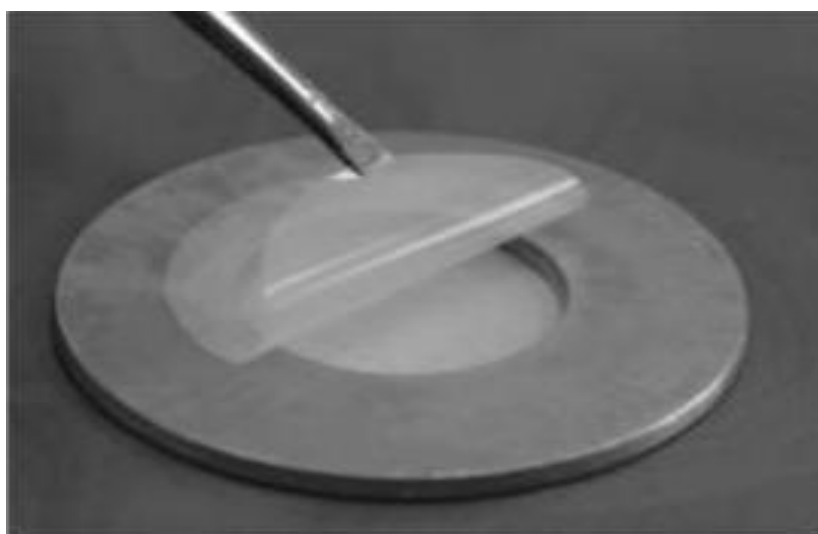


Figure 6: Chambre de diffusion développée pour augmenter le potentiel de croissance des microorganismes (Epstein *et al.*, 2007).

1.5. Les hydrocarbures Aromatiques et leur biodégradation dans les milieux aquatiques.

1.5.1 Propriété Physico-chimiques des Hydrocarbures Aromatiques

Les hydrocarbures aromatiques sont des composés, contenant au moins un noyau benzénique, on parle d'HAP de faible poids moléculaire pour désigner les composés possédant trois cycles au plus, et d'HAP de haut poids moléculaire pour désigner ceux qui possèdent plus de quatre cycles (Doyle *et al.*, 2008). On regroupe parfois avec les HAP certains composés tricycliques substitués possédant aussi des atomes de soufre, comme le dibenzothiophène, d'azote comme le carbazole, ou d'oxygène comme le dibenzofurane et la dibenzodioxine. Ces molécules sont très hydrophobes, peu volatiles (excepté pour les HAP à deux noyaux comme naphthalène) et ont une faible solubilité dans l'eau. Leur hydrophobicité augmente avec le nombre de cycles aromatiques. Ils ont tendance à s'adsorber sur les particules de sol et de sédiments (Johnsen *et al.*, 2005). Leurs propriétés physico-chimiques les rendent récalcitrants à la dégradation naturelle, et donc persistants sur les sites contaminés. A titre d'exemple, la demi-vie du phénanthrène est de 16 à 124 jours, mais celle du benzo[a]pyrène peut atteindre jusqu'à 4 années (Doyle *et al.*, 2008).

1.5.2 Provenance et devenir des Hydrocarbures Aromatiques

Les HA sont des composés issus de la transformation de la matière organique, principalement d'origine végétale. Naturellement émis dans l'atmosphère lors d'éruptions volcaniques, ou de feux de forêts, ils sont aussi contenus dans les combustibles fossiles comme le pétrole ou le charbon. Depuis le début de l'ère industrielle, les HA émis dans l'environnement sont majoritairement d'origine anthropogénique. Le transport, le chauffage résidentiel, le traitement des déchets par incinération émettent dans l'atmosphère des particules riches en HAP/M qui se dispersent avant de se déposer sur les sols lors d'épisodes de précipitations. D'autre part, l'exploitation des gisements de pétrole et de charbon, le raffinage, le stockage et les rejets accidentels ou incontrôlés (marées noires) sont sources de pollution des sols et des milieux marins par les HAP. Les sols des friches industrielles telles que les cokeries, les anciennes usines à gaz ou les usines pétrochimiques sont contaminées par des goudrons riches en HAP. Enfin, certains HAP comme le naphthalène ou le phénanthrène, se retrouvent dans des pesticides, fongicides, détergents ou colorants, et entrent dans l'environnement lors d'activités agricoles ou industrielles (Doyle *et al.*, 2008; Jouanneau *et al.*, 1999). Les HAP sont donc des composés ubiquitaires qui contaminent l'air, les eaux douces ou marines, les sédiments et les sols, à des concentrations variables. Suivant leur exposition, les sols peuvent contenir moins d'un centième de ppm de HAP dans les zones dites 'non contaminées' à plusieurs milliers de ppm sur des sites industriels (Cerniglia, 1992). Les HAP adsorbés aux particules de sol ou

associés à la matière organique sont peu mobiles, sauf s'ils sont remis en suspension, et sont difficilement dégradables par les microorganismes.

1.5.3 Toxicité des Hydrocarbures Aromatiques

En raison de leur caractère liposoluble, les HA peuvent s'accumuler dans la faune et la flore et tout au long de la chaîne trophique. Chez les mammifères, ils pénètrent dans l'organisme par inhalation, contact cutané ou ingestion, et sont, dans ce cas, absorbés au niveau de la paroi gastro-intestinale. Ils se retrouvent au niveau des tissus adipeux, et de certains organes, notamment le foie, lieu de la détoxification. Des monooxygénases de type cytochromes P450 transforment les HA par oxydation en époxydes, dérivés phénoliques, quinones, ou en radicaux très réactifs qui forment des adduits avec les protéines et l'ADN. Les HA peuvent se fixer à l'ADN de manière covalente provoquant des mutations, voire des cancers. De même, les HA peuvent traverser la barrière placentaire et provoquer des dommages chez le fœtus.

1.5.4 Biodégradation des Hydrocarbures Aromatiques par les microorganismes

Certains microorganismes, en particulier des bactéries, sont capables d'obtenir de l'énergie *via* le métabolisme des polluants tels que les HAP (Diaz, 2004). Ils ont développé des stratégies pour utiliser ces molécules comme sources de carbone et d'énergie, assurant la détoxification de l'environnement, ou pour les transformer en substrats métabolisables par d'autres microorganismes (Johnsen *et al.*, 2005). La réduction de la pollution qui en résulte, est exploitée dans des procédés de bioremédiation visant à décontaminer les sites pollués tout en conservant l'intégrité de l'écosystème.

1.5.4.1 Facteurs influençant la dégradation des HA

La biodégradation est influencée par des facteurs abiotiques tels que le pH, la température, l'humidité, l'oxygénation, la disponibilité des nutriments, la salinité du milieu. La composition du mélange d'HA détermine leur niveau de solubilité et leur résistance à la dégradation. De même, l'interaction des polluants avec les constituants du sol détermine l'efficacité de la bio-dépollution. Dans les eaux exposées sur de longues périodes, les HA sont fortement adsorbés aux particules et/ou se logent dans des pores très fins, ce qui les rend inaccessibles aux microorganismes. La biodisponibilité des HA est donc un facteur essentiel qui bien souvent limite l'efficacité des procédés de bioremédiation (Doyle *et al.*, 2008; Samanta *et al.*, 2002).

1.5.4.2 Facteurs bibliographiques favorisant l'accessibilité et la dégradation des HA

Les bactéries, *via* des voies métaboliques spécifiques, tiennent le rôle central des phénomènes de biodégradation des HA. Certaines d'entre elles ont développé un système de signalisation,

le chimiotactisme, favorisant l'accès aux HA (Samanta *et al.*, 2002). Ces mécanismes interviennent *via* des chimiorécepteurs et des voies de signalisation, et provoquent un déplacement des bactéries selon le gradient de concentration du polluant.

Les bactéries s'accumulent alors à l'interface entre le polluant hydrophobe et le milieu hydrophile, provoquant une augmentation du taux de dégradation des composés et souvent une augmentation de leur désorption (Law and Aitken, 2003). Certains microorganismes sont capables de s'adsorber aux particules riches en polluants grâce à leur paroi hydrophobe (Miyata *et al.*, 2004) et de former des biofilms (Johnsen *et al.*, 2005).

D'autres microorganismes produisent des surfactants. Ces molécules ont la propriété d'augmenter la solubilité des composés hydrophobes et d'en améliorer l'accessibilité (Zheng and Obbard, 2002).

Dans le cas de HAP très récalcitrants à la biodégradation comme le benzo[a]pyrène, des processus coopératifs peuvent se mettre en place : les champignons, connus pour leur capacité à dégrader les HAP de haut poids moléculaire (Cerniglia, 1992), amorcent la dégradation. Les bactéries utilisent ensuite les produits de dégradation plus hydrophiles et plus réactifs comme sources de carbone (Boonchan *et al.*, 2000). De même, l'interaction des bactéries avec les racines des plantes favorise souvent l'activité de dégradation des HAP dans la zone de diffusion des exsudats racinaires ou de l'oxygène. Le co-métabolisme des sources de carbone issues d'extraits de racines permet d'augmenter la capacité de dégradation du benzo[a]pyrène par une souche de *Sphingomonas yanoikuyae* (Rentz *et al.*, 2005). De même, la présence de roseaux a permis de stimuler la dégradation du pyrène dans des sédiments lacustres. Les racines des plantes augmentent, dans ce cas, la diffusion de l'oxygène dans les sédiments et favorisent ainsi la biodégradation bactérienne des HAP (Jouanneau *et al.*, 2005).

Les paramètres environnementaux et le niveau de biodisponibilité des HA sélectionnent, en quelque sorte, les communautés microbiennes qui seront capables de dégrader les polluants *in situ*.

1.5.4.3 Voies métaboliques de dégradation des HA

La minéralisation complète des HA en CO₂ et H₂O suit deux grandes voies cataboliques successives. La première, dite « périphérique » est spécifique du composé ou de la gamme de composés dégradés. Elle produit un métabolite intermédiaire, souvent de type catéchol. Celui-ci entre dans une deuxième voie dite « centrale », commune à de nombreux microorganismes, qui convertit le métabolite en intermédiaires du cycle de Krebs (Diaz, 2004). D'autres voies de dégradation des HA sont connues chez les champignons et les microalgues, mais celles-ci sont en général incomplètes, de sorte que ces microorganismes ne peuvent utiliser les HA

comme seules sources de carbone. (Doyle *et al.*, 2008; George and Hay, 2011; Peng *et al.*, 2008).

- Voies de dégradation aérobies

La voie de dégradation du naphthalène a été étudiée en détail et sert de modèle pour expliquer la dégradation des autres HA par les bactéries. La « voie périphérique » débute par l'insertion de deux atomes de l'oxygène moléculaire sur deux carbones adjacents du substrat produisant un *cis*-dihydrodiol. L'attaque initiale est catalysée par une naphthalenedioxygénase. Le *cis*-dihydrodiol est ensuite ré-aromatisé par une dihydrodiol déshydrogénase, produisant un intermédiaire dihydroxylé, puis le noyau aromatique est clivé par une extradioldioxygénase.

- Voies de dégradation Anaérobies

En absence d'oxygène, les bactéries métabolisent les HA par voie anaérobie, mais beaucoup plus lentement qu'en aérobiose. Peu d'études décrivent les voies métaboliques impliquées dans cette dégradation. Les microorganismes utilisent majoritairement le nitrate et le sulfate comme accepteurs d'électrons et, dans une moindre mesure, le fer ferrique, le chlorate, le manganèse ou le CO₂ (Gibson and Harwood, 2002; Meckenstock *et al.*, 2004). La dégradation du méthyl-naphthalène, qui est la plus documentée, est associée à la réduction du sulfate en sulfure ou du nitrate en azote gazeux. L'attaque initiale est une addition de la molécule de fumarate sur le méthyl pour donner le naphtyl-2-méthyl-succinate. Une molécule de coenzyme A (CoA) est ensuite transférée du succinyl-CoA au naphtyl-2-méthyl-succinate. Le carbone méthylé du composé obtenu est ensuite beta-oxydé. Puis une molécule d'H₂O serait ajoutée, suivi d'une étape d'oxydation et d'une étape de clivage de la chaîne latérale, conduisant à deux intermédiaires : l'acide 2-naphtoïque et le succinyl-CoA (Annweiler *et al.*, 2000; Meckenstock *et al.*, 2004).

- Dégradation des HA par les champignons

Les champignons de type micromycètes sont capables de dégrader les composés aromatiques suivant deux types de voies métaboliques (Cerniglia, 1992; Peng *et al.*, 2008). Les champignons lignolytiques excrètent trois types d'enzymes solubles, les lignineperoxydases, les manganèse-peroxydases, ou les phénol-oxydases, ainsi que des enzymes produisant du peroxyde d'hydrogène. Ces enzymes sont impliquées dans la dégradation de la lignine, un polymère constitué de structures phénoliques (Haritash and Kaushik, 2009). Ayant une faible spécificité du substrat, elles attaquent aussi les HAP, y compris quand ils sont piégés dans la matrice. L'attaque de l'un des noyaux aromatiques libère un composé hydroxylé, puis conduit à la production de quinones par oxydation radicalaire.

Les champignons non-lignolytiques utilisent des mono-oxygénases de type cytochrome P450 pour insérer un atome d'oxygène dans un cycle aromatique et former un époxyde très réactif. Celui-ci réagit avec l'eau pour former un aromatique hydroxylé. Les arènes hydroxylés sont souvent oxydés une seconde fois pour former des *trans*-dihydrodiols. Lorsqu'elle est partielle, la dégradation des HA par les champignons génère des composés phénoliques, des tétralones, des quinones, ou des diol-époxydes eux-mêmes très réactifs et qui peuvent être toxiques (Cerniglia, 1997; Meulenberg *et al.*, 1997; Sutherland, 1992).

La majorité des champignons est capable d'attaquer les HAP de haut poids moléculaire produisant des intermédiaires plus solubles et plus réactifs, qui sont potentiellement métabolisables par certaines bactéries aérobies (Boonchan *et al.*, 2000; Cerniglia, 1997).

- Dégradation des HA par les micro algues

Plusieurs études ont rapporté l'implication des microalgues procaryotes et eucaryotes dans la dégradation des HA (Cerniglia *et al.*, 1980; Narro *et al.*, 1992; Tam *et al.*, 2007). Ces microorganismes présentent plusieurs voies d'attaque des cycles aromatiques, notamment *via* des mono-oxygénases, suivant une voie similaire à celle des champignons, ou *via* des dioxygénases comme le rapportent les travaux de Warshawsky (Warshawsky *et al.*, 1995). Ces microorganismes, principalement photoautotrophes, dégradent les composés aromatiques pour produire des intermédiaires utilisables pour la biosynthèse de macromolécules (Gibson and Harwood, 2002). De même, les microalgues et les bactéries s'associent au sein de consortiums dans lesquels, les unes produisent de l'oxygène par la photosynthèse et les autres dégradent les HA pour produire du CO₂. Cette synergie renforce le potentiel de dégradation des HA (Borde *et al.*, 2003).

- Dégradation des HA par les Bactéries

Les voies de dégradation décrites précédemment ont été caractérisées grâce à l'isolement de microorganismes sur des milieux sélectifs contenant un HA particulier comme unique source de carbone. Les premières bactéries étudiées, isolées sur naphthalène, appartenaient au genre *Pseudomonas* (Grund and Gunsalus, 1983; Kurkela *et al.*, 1988; Simon *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1994). Par la suite, d'autres bactéries appartenant aux genres *Sphingomonas* et *Mycobacterium* ont largement été étudiées après isolement sur différents HA (Kim *et al.*, 2007; Krivobok *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2001; Willison, 2004). Plus récemment, des méthodes indépendantes de la culture ont permis d'enrichir nos connaissances sur des microorganismes actifs dans des sites contaminés aux HA (Jeon *et al.*, 2006; Ono *et al.*, 2007; Singleton *et al.*, 2009).

Matériels et Méthodes

2. Matériels et méthodes

2.1. Description de la wilaya de Skikda.

Située à l'Est du littoral algérien, Skikda s'étendant sur une superficie de 4.118 km² avec 130 à 140 km de côtes, située entre les latitudes 36°5' et 36°15'N et les longitudes 7°15' et 7°30'E. Cette wilaya regroupe 13 daïras et 38 communes, limitée au Nord par la mer méditerranée à l'Est par Annaba, Jijel à l'Ouest, Constantine et Guelma au Sud (Fig. 7).



Figure7: Situation géographique de la wilaya de Skikda (Google maps, 2018 modifiée).

La wilaya de Skikda de tradition portuaire millénaire, est un important pôle industriel, notamment dans les secteurs de la chimie, de la pétrochimie et des infrastructures modernes (Fig. 8). En effet, en plus de son potentiel agricole, Skikda est un pôle industriel d'importance nationale dominé par les complexes pétrochimiques dont la CTE, GNL, CP1K et RA1K. L'essentiel des capacités économiques et industrielles est concentré dans la zone littorale exposant cet écosystème côtier à des risques de pollutions pouvant, même si les services de l'environnement restent vigilants, engendrer diverses dégradations.

2.2. Description des principales infrastructures industrielles de la wilaya de Skikda

La compagnie algérienne de recherche, d'exploitation, de transport par canalisation, de transformation et de commercialisation des hydrocarbures et de leurs dérivés SONATRACH. Elle intervient également dans d'autres secteurs tels que la génération électrique, les énergies nouvelles et renouvelables et le dessalement d'eau de mer. Elle exerce ses métiers en Algérie et partout dans le monde où des opportunités se présentent.

La zone industrielle de Skikda est implantée dans le golf de Stora sur plus de 12 ha avec un linéaire côtier de 5.4 km. La particularité de cette zone est qu'elle se trouve au cœur d'un tissu urbain à

environ 2 km du centre ville, à 3 km de Hammadi krouma et à 1.5 km de Hamrouche hammadi (Figs. 8 et 9).



Figure 8: Image satellitaire montrant la zone industrielle (cercle rouge) de la wilaya de Skikda (Google earth, 2018 modifiée).

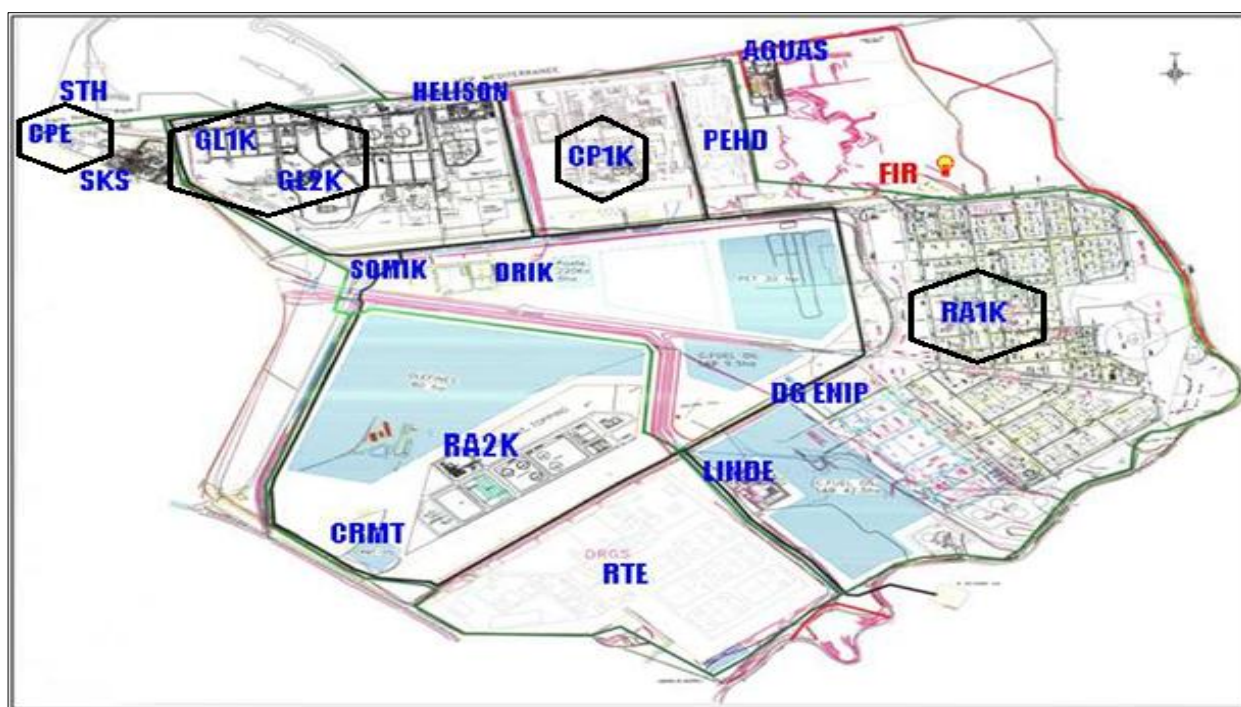


Figure 9: Plan de masse de la zone industrielle de Skikda (DRIK.2000).

RTE: Complexe de transport, **CRMT:** centre régional de la médecine de travail , **RA2K et RA1K:** Complexes de raffinage, **DG ENIP:** direction générale de l'entreprise nationale de pétrochimie, **SOMIK:** société de maintenance industrielle de Skikda, **DRIK:** direction régionale industrielle de Skikda, **CPE ou CTE:** Centrale thermique , **SKS:** sharik et kahraba Skikda, **GL1K et GL2K:** Complexe de liquéfaction du Gaz, **CP1K:** Complexe pétrochimique, **PEHD:** Complexe de polyéthylène à haute densité.

2.2.1. Centrale thermique (CTE)

La centrale Thermique Electrique s'étend sur une superficie de 9.8 ha, disposant d'une seule unité de production qui utilise le gaz naturel comme combustible à raison de 5.10^8 nm / an et l'eau de mer déminéralisée pour l'alimentation des chaudières (Fig. 10).



Figure 10: Image satellitaire montrant la centrale thermique CTE du Complexe pétrochimique de Skikda et ses 3 principaux points de rejets dans l'oued Saf saf (cercle noir) (Google earth, 2018 modifiée).

2.2.2. Complexe de liquéfaction du gaz (GL1/K)

Le GL1/K mis en service en 1973, s'étendant sur 74.8 ha. A partir du gaz naturel acheminé de Hassi Rmel (sud Algérien) par pipe line, il produit essentiellement du gaz liquéfié destiné à l'exportation et à l'extraction des hydrocarbures lourds et quelques alcanes tel que l'éthane, le propane, le butane et le naphta. Ce dernier exploite 15.10^4 m³/h d'eau de mer pour le refroidissement et 1440 m³/j des eaux industrielles pour les besoins du process. De fabrication pour cela il possède sa propre station de traitements (hors service depuis peu) (Fig. 11).

2.2.3. Complexe pétrochimique (CP1/K)

Le complexe CP1K mis en service 1977, s'étend sur 54 ha (Fig. 11). Bordé à l'Ouest par Polymed et le GL1/K, au Nord par la mer Méditerranée et au Sud par la zone de développement de la pétrochimie. C'est le lieu de fabrication des produits thermoplastiques de base tels que le polychlorure de Vinyle (PVC), le Mono Chlorure de Vinyle (VCM) et le

Polyéthylène Basse Densité (PEBD). Le complexe CP1/K est en mesure de couvrir 60% des besoins du pays.

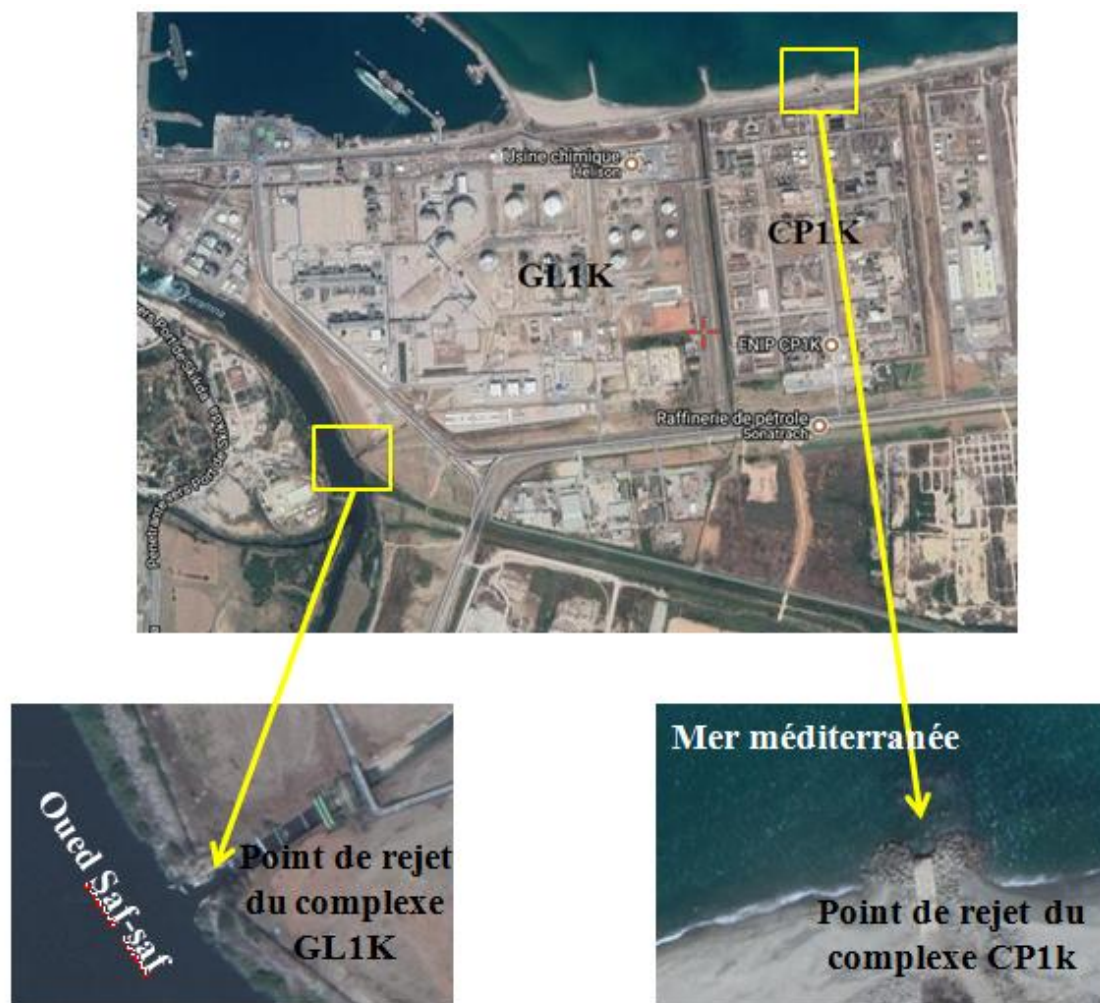


Figure 11: Image satellitaire montrant une vue globale des complexes GL1/K et CP1/K avec les points de rejets des 2 complexes respectivement dans l'oued Saf-saf et la méditerranée (Google earth, 2018 modifiée).

2.2.4. Complexe de raffinage (RA1/K)

La raffinerie de Skikda (RA1/K) est implantée dans la zone industrielle à 7km à l'Est de la ville sur une superficie de 190ha. Gérées par SONATRACH, en 1988 les sociétés de raffinage et de distribution des produits pétroliers ont séparées puis érigées en entreprises nationales de raffinage et de distribution des produites pétroliers (ERDP-NAFTAL). Depuis le 18 avril 1998 cette dernière est devenue une filiale nommée Société National de Raffinage de Pétrole NAFTEC spa dont la totalité des actions sont détenues par SONATRACH avec un capital social de 12.10^6 dinars.

Pour le traitement des effluents de la raffinerie, une nouvelle station, S1101-ETP2 a été construite, l'ancienne S1100 étant hors service suite à un incendie, toutes les eaux de la raffinerie: les eaux sanitaires, du processus de raffinage et celles des laboratoires sont collectées et transférées vers la station S1101-ETP2. Après traitement ces eaux sont évacuées vers l'Oued Marhoun puis Oued Saf-saf avant de rejoindre la mer méditerranée.

2.2.4.1 Traitement des effluents de la station de traitement des eaux S1101-ETP2

Le traitement des effluents se fait en 3 étapes: chimique, biologique et physique. Ce dernier permet d'éliminer d'abord les matières en suspension, ensuite les substances colloïdales et enfin les substances dissoutes minérales ou organiques. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la 2^{ème} étape du traitement, la phase biologique pour isoler les microorganismes responsables de la dégradation des hydrocarbures, de les cultiver pour les utiliser à large échelle.

Les eaux polluées parviennent à la station de traitement ETP2-S1101 au moyen d'un réseau de conduites déversant la charge hydraulique dans le bassin de collecte, il existe 5 sources d'effluents:

- Eau de lavages des réchauffeurs d'airs des chaudières.
- Drainage des filtres après régénération.
- Drainage pour nettoyage des réservoirs contenant les hydrocarbures.
- Drainage des eaux de pleins accumulés.
- Drainage des eaux de traitement et refroidissement des unités de procédés.

2.2.4.1.1. Phase chimique

Ce traitement passe par 4 étapes:

- Mixage des eaux et du flocculant
- Flocculation
- Flottation à air dissous
- Correction du pH, addition de flocculant et dosage des nourissants

Le traitement des eaux à forte pollution en hydrocarbures est effectué dans 2 séparateurs disposés en parallèle où a lieu la flottation des particules d'huile et la sédimentation des matières en suspension. Chaque bassin est équipé d'un chariot pont "API", d'un racleur de fond et d'un écumeur de surface (Fig. 12). Le racleur de fond rassemble les boues qui seront envoyées vers un bassin mélangeur de boues, tandis que l'écumeur de surface transporte les huiles et la mousse vers un autre bassin.



Figure 12: Photographie montrant le bassin de traitement des eaux polluées par les hydrocarbures (ETP-2) de la raffinerie de Skikda: 1-Séparateurs en parallèle vu d'en haut, 2- Un séparateur vide, 3- Un bassin montrant le racleur de fond.

- Etape 1: Mixage des eaux et du floculant

L'eau ayant subi le 1^{er} traitement dans les 2 séparateurs, arrive au bassin de mixage dans lequel on introduit du sulfate de fer (FeSO_4) pour provoquer la floculation (Fig. 13). L'agitation intense à 500 w/m^3 permet d'obtenir un mélange parfait de ces courants qui s'écoulent ensuite jusqu'au bassin de contrôle du pH par des dosages d' HCl ou de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pour le maintien des valeurs optimales durant la floculation. L'agitation est obtenue par insufflation d'air, dans le but d'oxyder le fer de l'état bivalent à l'état trivalent provoquant la précipitation totale du fer.



Figure 13: Photographie montrant le 1^{er} traitement par le sulfate de fer (FeSO_4) pour provoquer la floculation (ETP-2).

- Etape 2: Floculation

En mélangeant les polyélectrolytes et grâce à une légère agitation mécanique on provoque la coalescence des flocons formés dans la cuve par l'émulsion des huiles en très fines gouttelettes adsorbées par les flocons.

- Etape 3: Flottation à air dissous

Les courants localisés sont intimement mélangés à l'entrée du bassin à plan circulaire. Par le relancement de l'air dissous sous forme de bulles de 10 à 30 μm de diamètre on obtient la flottation des matières en suspensions contenues dans l'eau (Fig. 14).



Figure 14: Photographie montrant le bassin de floculation de la station d'épuration des effluents (ETP-2) de la raffinerie de Skikda.

Un système d'écumoirs de surface transporte ce qui flotte à l'entonnoir d'où il est transféré en continu par gravité à un autre bassin enfin, un racleur de fond transporte la matière sédimentée.

- Etape 4: Correction du pH, addition de flocculant, dosage des nourissants

En principe, le pH optimal de floculation coïncide avec celui qui est requis à l'entrée de la phase biologique compris entre 7 et 7,5. Pour cela, un bassin a été conçu pour le rapport du pH à des valeurs requises pour le traitement biologique grâce au dosage d'HCl ou de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Quand il est nécessaire d'améliorer la sédimentation de la boue on effectue un ajustement par ajout de flocculant FeSO_4 et de polyélectrolytes.

2.2.4.1.2. Phase biologique

L'élimination des matières organiques implique le recours à des traitements biologiques qui font intervenir des organismes vivants, essentiellement des bactéries. Ces procédés biologiques, le plus souvent aérobis, reposent sur la biodégradation des matières organiques en présence d' O_2 par des microorganismes hétérotrophes. Ils reproduisent les phénomènes naturels d'autoépuration qui se réalisent dans le milieu naturel. On utilise généralement les procédés à culture fixée où la biomasse épuratrice est établie sur des supports sur lesquels l'eau à traiter coule à leur contact. Les microorganismes fixent ainsi la pollution organique et la dégradent par biofiltration.

Les procédés à culture libre sont également retenus dans ce cas, la biomasse est en suspension dans l'eau à traiter et les microorganismes fixent la pollution et se développent sous forme de floccs biologiques que l'on peut séparer de l'eau traitée par décantation (boues activées par exemple).

- Traitement biologique à boues activées

Le courant provenant de la cuve de correction du pH, arrive aux bassins de boues actives équipés de turbines d'aération (Fig. 15a-b et Fig. 16) et fournissant l' O_2 nécessaire au procédé. Le volume des bassins d'aération est de 1160 m^3 et la concentration des boues est de $3,5 \text{ g} / \text{m}^3$. Les turbines ont une capacité d'oxygénation totale de $50 \text{ kg} / \text{h}$.

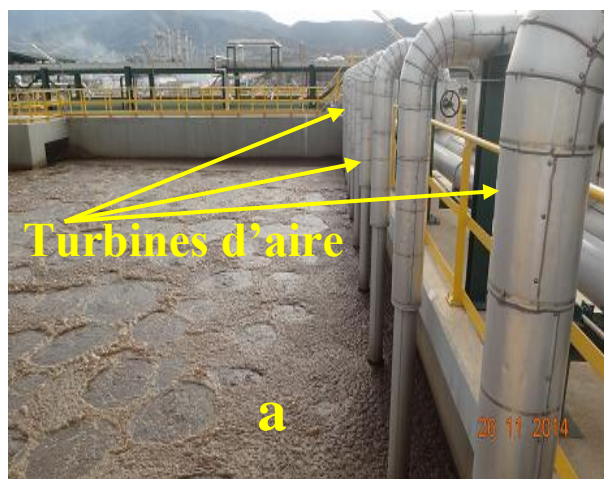


Figure 15: Photographies montrant différents angles du bassin où se déroule le traitement biologique **a:** bassin biologique montrant les turbines d'air par les flèches rouges. **b:** vue intégrale du bassin biologique.

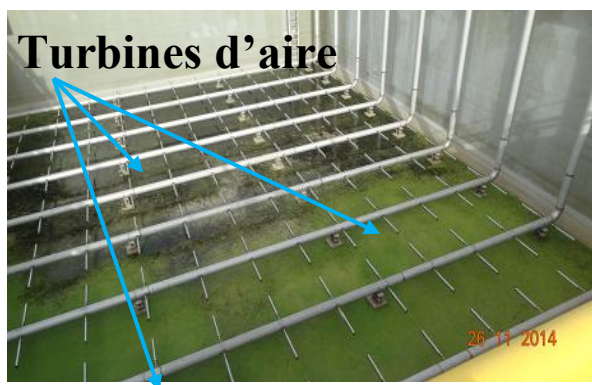


Figure 16: Photographie un bassin propre pour le traitement biologique, montrant les structures des turbines d'air par les flèches bleu.

Les boues en excès, tirées par le courant sont envoyées de manière continue à un chariot spécial à raison de $2 \text{ m}^3 / \text{h}$ (Fig. 17) afin de les desséchées et les stockées.



Figure 17: Photographie montrant le système d'évacuation des boues en excès (ETP2).

2.2.4.1.3. Phase physique

Cette phase se déroule en 2 étapes: filtrage sur sable et filtration sur charbon actif.

- Filtrage sur sable

La pompe relance au filtre à sable le courant provenant du traitement biologique. La séparation des solides en suspension qui ne sont pas sédimentés dans le décanteur ainsi que celle des particules d'huiles a lieu dans 3 filtres à sable (Fig. 18).



Figure 18: Photographie montrant les filtres à sable -(ETP-2).

Les filtres sont dimensionnés de manière à permettre la digestion du débit maximal sur 2 groupes le 3^{ème} reste en phase de contre-lavage. Ce dernier est effectué automatiquement une fois / jour, comme il peut également être réalisé manuellement. L'air du contre-lavage est fourni par une soufflante et l'eau est tirée du bassin grâce à une pompe.

- Filtration sur charbon actif

L'eau provenant des filtres à sable subit la filtration au charbon actif et les contre-lavages de ces filtres sont effectués manuellement. L'intervalle maximum du contre-lavage doit être < 72 h afin d'éviter un empaquetage du charbon actif. L'air et l'eau de contre-lavage proviennent des même machines prévues pour les filtres à sable. L'effluent, recueilli par la zone d'équipement, s'écoule dans un bassin spécifique. Le contre-lavage élimine l'empaquetage du charbon et les matières en suspension provenant des filtres à sable en cas de mauvais fonctionnement. Le renouvellement de la charge de charbon actif s'effectue par paires de filtres toutes les 5 à 10 années.

2.3. Zone d'échantillonnage

Dans cette étude nous avons opté pour 2 zones et types d'échantillonnages.

2.3.1. Échantillonnage 1

Nos prélèvements sont homogènes, représentatifs et quotidiens (sauf jours de panne ou d'entretien de machines) à raison d'1 litre d'eau du bassin réceptacle terminal dans des flacons en plastiques en 2014. Un total de 296 échantillons a été analysé et 4 paramètres physico-chimiques retenus: pH, température, conductivité et HTC (Fig. 19).



Figure 19: Photographie montrant le bassin des eaux traitées et en cours d'évacuation vers la méditerranée, où a eu lieu le 1^{er} échantillonnage.

2.3.1.1. Caractéristiques physico-chimiques

2.3.1.1.1. Mesures du pH, conductivités et températures

Les mesures du pH, de la conductivité et de la température ont été effectuées grâce à multiparamètre de précision inoLab pH/Cond 720 après calibration.

2.3.1.1.2. Quantification des hydrocarbures totaux (HTC)

Nous avons retenus les méthodes d'essai EPA 413.2 pour tester l'huile et la graisse totale retrouvées et EPA 418,1 pour les hydrocarbures pétroliers totaux (TPH). Il existe de nombreuses méthodes qui permettent de quantifier avec précision l'huile dans l'eau. Ces procédures utilisent des tests d'extraction par solvant et analysent par spectroscopie infrarouge grâce à l'analyseur *OCMA-310.

* La méthode EPA approuve les techniques d'essai, mais pas les spectromètres spécifiques du fabricant.

Pour cela nous avons utilisé le matériel suivant:

- Bouteille pour prélèvement d'1 litre avec couvercle;
- HCl;
- Flacons de 40 ml en téflon;
- Solvant pour l'extraction de l'huile de l'eau (grade spectroscopie infrarouge de HORIBA S-316, Fréon-113, ou perchloro-éthylène);
- Sulfate de sodium anhydre.

- Méthode d'analyse de l'OCMA-310

La méthode d'analyse de l'OCMA-310 pour quantifier les HTC se déroule en 13 étapes successives:

- 1- Recueillir un échantillon d'eau représentatif dans une bouteille d'1 litre avec couvercle;
- 2- Ajouter l'HCl pour amener le pH < 2;
- 3- Effectuer le calibrage, zéro, l'échelle et la mesure de solvant zéro en mg/l;
- 4- Sélectionnez mg / l sur l'OCMA-310 pour l'analyse du pétrole dans l'eau;
- 5- Agiter le flacon en verre pour mélanger l'échantillon.
- 6- Pipeter avec précision 10 ml du flacon de 40 ml. Le volume de l'échantillon peut varier et un facteur de dilution appliqué sur les résultats pour mesurer une large gamme à partir d'échantillons de concentration < ou >;

Nb: Risques chimiques (C_2H_2 et CCL_4 solvant). Ceci peut être absorbé par la peau, et une grande quantité peut être toxique. Porter des gants lors de la manipulation, et prendre des précautions pour éviter d'inhaler les vapeurs ou d'ingérer les liquides.

- 7- Fermer hermétiquement le flacon et agiter vigoureusement pour extraire le pétrole dans l'eau à l'huile dans un solvant;
- 8- Placer la cuvette dans une position verticale pour permettre aux bulles d'air de sortir du solvant, en moins de 30 sec.;
- 9- Regarder soigneusement le flacon pour rechercher une rupture brutale entre le solvant sur le fond et l'eau au dessus. Il ne devrait pas y avoir de couche d'émulsion. Le mélange solvant/extrait peut être coloré mais ne devrait pas être trouble:

- *Traiter le surnageant pour briser l'émulsion. Si l'échantillon ne nécessite pas ce traitement on passe à l'étape 10;*
- *Pipeter prudemment autant solvant/extrait que possible sans prendre la couche d'eau, dans un bécher stéril;*
- *Ajouter une ou plusieurs gouttes de sulfate de sodium anhydre Na_2SO_4 , pour briser l'émulsion par agitation avec un agitateur de verre. L'extrait devrait apparaître non trouble, mais peut être coloré dans quelques échantillons;*
- *Mettre un papier filtre conditionné 11 cm N°40 Whatman dans un entonnoir en verre et filtrer l'extrait, afin de retirer Na_2SO_4 ;*
- *Si moins de 6 ml de solvant/extrait sont récupérés, ajouter une quantité mesurée de solvant en tenant compte de la dilution dans les résultats;*

- 10- Pipeter environ 6 ml de solvant/extrait pour remplir la cellule OCMA-310;

- 11- Placez la cellule dans le OCMA-310 pour la mesure;

12- Lire la mesure de concentration ou lancer le contrôle de la stabilité. Ne pas oublier de tenir compte de toute dilution/concentration en utilisant un taux de solvant/eau différent que 1/1, ou lorsque du solvant est ajouté. La lecture obtenue est le taux total de pétrole et graisse;

- Si une mesure des TPH, est nécessaire, l'extrait peut être traité avec du gel de silice conditionné, filtré sur papier N°40 Whatman et remesuré.

13- Retirer la cellule de l'OCMA-310 et la vider en vue de la mesure suivante;

Remarque: une 2^{ème} lecture du même extrait peut être prise pour confirmer l'exactitude, on peut rincer la cellule avec une petite quantité d'extrait avant de prendre une seconde mesure. Il n'est pas nécessaire de remettre à zéro après chaque échantillon. EPA recommande l'étalonnage tous les 10 échantillons.

- Lorsque l'échantillon est hors gamme mesurable, sur l'écran LCD s'affiche UF. Cependant l'écran affiche "OF" si la valeur mesurée est < ou > aux normes (Tab.3).

Tableau 3: Représentation des valeurs < et > aux normes.

Unité	Valeur < aux normes	Valeur > aux normes
mg/l	-20.0	220
mg/kg	-20.0	1000
Abs	-0.200	1.000

2.3.2. Zone d'échantillonnage 2

Pour mieux cerner les problèmes et les nuisances engendrés par la toxicité des hydrocarbures aromatiques, nous avons procédé à des expérimentations pour évaluer le pouvoir biodégradable d'une série de bactéries ubiquistes. Les prélèvements des eaux des 3 points de rejets illustrés dans la figure 16, étaient mensuels à raison d'1 échantillon par site d'août 2015 à juillet 2016 en préservant les conditions hostiles d'une eau polluée par les rejets industriels (Fig. 20 et Tab. 3).



Figure 20: Localisation des sites d'étude et d'échantillonnage 2 (Google map 2015 modifiée). a: ETP2 1101 : 36°52'00.4"N 6°57'57.7"E ,b: Oued zeramna 36°52'41.2"N 6°56'08.9"E et c: Oued saf saf 36°87'23.4"N 6°94'25.7"E.

Tableau4: Coordonnées géographiques des 3 sites de rejets retenus dans la zone industrielle.

Désignation des sites d'étude	Localisation géographique
Effluent Treatment Plant 2 (ETP2 1101)	36°52'00.4"N 6°57'57.7"E
Oued Zeramna	36°52'41.2"N 6°56'08.9"E
Oued Saf-saf	36°87'23.4"N 6°94'25.7"E

2.3.2.1. Essais préliminaires

Les échantillons d'eau de mer prélevés sont répartis dans 21 flacons stériles dont un témoin négatif (T₀). Chaque flacon contient 1000 ml d'eau de mer stérilisée par autoclavage, auquel on ajoute du benzène et du toluène purs comme indiqué dans le tableau. 5.

Tableau 5: Caractéristiques du benzène et du toluène ajoutés dans nos échantillons.

	N° réservoir	Produits non aromatiques (%)	Benzène (%)	Toluène (%)
Benzène	38	0.02	99.98	/
Toluène	128	0.03	0.06	99.53

Les flacons sont agités afin d'obtenir un échantillon représentatif avec des concentrations initiales du benzène et du toluène fixées à 250 mg/l. Chaque flacon est ensuite inoculé par une des 10 souches bactériennes à raison de 8.10^{10} bactéries / flacon.

En fin d'expérience on obtient 10 flacons contenant de l'eau de mer polluée par le benzène et par le toluène dont chacun contient une souche, tout en assurant l'oxygénation continue grâce à des aérateurs spéciaux. Les bactéries inoculées sont préalablement cultivées sur milieux gélosés ordinaires et l'enrichissement se fait sur bouillon protéose-peptone 10.0g, infusion de cervelle de veau 12.5g, infusion de cœur de bœuf 5.0g, glucose 2.0g, chlorure de sodium 5.0g, hydrogenphosphate de sodium 2.5g (BHIB) à pH ajusté à 7.4 pour accélérer la multiplication bactérienne.

Les flacons sont hermétiquement fermés à l'aide de bouchons en caoutchouc afin d'éviter les contaminations et minimiser l'évaporation du benzène ou du toluène avant une incubation de 63 jours à 25°C sous une oxygénation continue. Des cultures quotidiennes ont été réalisées pour surveiller la pureté des souches. Pour évaluer la biodégradation du benzène et du toluène on effectue 2 prélèvements: le 1^{er} après 1 mois et le 2^{ème} après 9 semaines.

2.3.2.2 Techniques d'analyse physico-chimique

2.3.2.2.1. Analyse du benzène et du toluène par GC/MS

L'association de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse, constitue une technique analytique de choix dans l'identification de très nombreux constituants de mélanges complexes tels que les hydrocarbures aromatiques monocycliques, du fait de la grande sensibilité de cette technique et de la qualité des résultats obtenus (Yassaa *et al.*, 1999). L'analyse du benzène et de ses produits de dégradation a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (GC) (HP6890 - Agilent Technologies) équipé d'une colonne MDN12 (30 m x 0.25 mm, 25µm d'épaisseur de phase stationnaire; Supleco) dans laquelle passe de l'hélium ultra pur (pureté de 6.0), le gaz vecteur, à 0.5 ml/min. l'appareil GC est couplé à un détecteur de masse HP 5973 MS (Agilent Technologies) fonctionnant avec une énergie d'ionisation de 70eV et une tension de 2000 volts (Fig. 21). L'appareil a été réglé en mode Total-Ion-Chromatogram (TIC), afin de détecter les intensités de tous les pics spectraux de masse appartenant au même scan, y compris le bruit de fond ainsi que les composants de l'échantillon.



Figure 21: Photographie représentant le Chromatographe en phase Gazeuse / Spectromètre de Masse.

Pour procéder à l'extraction de la matière organique, 1 ml du témoin négatif ainsi que 1 ml de chaque prélèvement ont été mélangés à 0.5 ml d'éther di-éthylique. Le tout est soigneusement agité pendant 15 min afin d'atteindre l'équilibre d'extraction, 1 µl du

surnaissant est injecté dans la colonne à raison de 0.5 ml/min. La température du four est ensuite augmentée de 45 à 150°C selon un gradient de 10°C/min de pas, puis maintenue 10 min à 150°C. Ce programme est optimisé pour la séparation des hydrocarbures aromatiques monocycliques comme le préconisent Yassaa *et al.*, en 1999. Les hydrocarbures aromatiques monocycliques sont indiqués entre 2 et 17.5 min et détectés par le spectromètre de masse afin d'être identifiés. Les concentrations du benzène et du toluène sont alors calculées par l'injection de 0.5 µl de chaque hydrocarbure avec une pureté de 99.98%, sur la base d'une courbe de calibration obtenue à partir d'un mélange standard contenu dans le spectromètre de masse.

2.3.2.2.2. Analyse des dérivés hydroxylés

Parmi les dérivés du benzène, le cyclohexane qu'on obtient en faisant passer un courant gazeux riche en H₂ dans du benzène contenant un catalyseur d'hydrogénation, chaque molécule de benzène fixe 3 molécules d' H₂ et on obtient du cyclohexane (Fig. 22) dont les spécificités chimiques sont décrites dans le tableau 6.

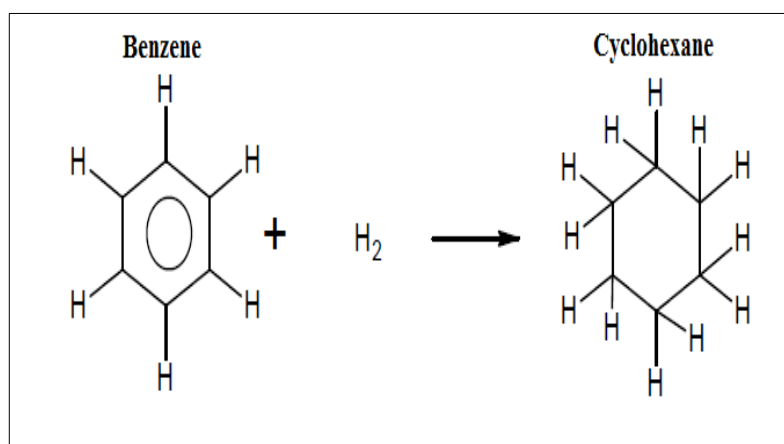


Figure 22: Illustration de l'hydrogénation du benzène.

Tableau 6: Description et identification des spécificités chimiques du Cyclohexane utilisé.

Product identification	
Product form	Substance
Trade name	Cyclohexane for synthesis
Chemical name	Cyclohexane
Index number	200-661-000
CE number	203-806-2
CAS number	111-82-7
REACH registration number	BA 110-82-7-0109-011
Raw formula	C ₆ H ₁₂
Molar mass	84.16 g/mol

Pour établir la courbe d'étalonnage, 6 standards de cyclohexane (S) ont été préparés (Tab. 7).

Tableau 7: Standards de cyclohexane retenus.

Standards de cyclohexane	
Standard	designation
S1	7.785×10^{-1} ,
S2	7.785×10^{-4} ,
S3	7.785×10^{-6} ,
S4	7.785×10^{-5} ,
S5	7.785×10^{-3} ,
S6	7.785×10^{-2}

2.3.2.3. Techniques de microbiologie

Les microorganismes tels que les bactéries, champignons et les micro-algues jouent un rôle clé dans l'élimination des hydrocarbures mono-aromatiques *in situ*. Les bactéries étant plus rapide et plus simple à manipuler, l'usage de ces dernières est, comme le soulignent Roger et Jacq, 2000; Prenafeta-Boldu *et al.* 2002; Schulze et Tiehm, 2004; ou encore Nikolova et Nenov, 2005 préférable. La plus part des études sur la biodégradation des hydrocarbures aromatiques, ont été réalisées avec des cultures de bactéries simples ou mixtes (Tab. 8). Il est généralement admis qu'un seul microorganisme n'est pas capable de dégrader tous les composés de mélanges complexes et les cultures mixtes ont non seulement un large choix de substrat mais aussi la dégradation peut être réalisée dans un système de co-oxydation et de commensalisme (Chikere *et al.*, 2011).

Tableau8: Quelques microorganismes impliqués dans la dégradation des hydrocarbures mono-aromatiques (Be: Benzène, To: Toluène, Eb: Ethylbenzène, Xy: Xylènes, oXy: o-xylène, pXy: p-xylène, mXy: m-xylène).

Bactéries	Hydrocarbures dégradés	Références
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	Be, To, Eb, Xy	Deeb and Alvarez-Cohen. 1999
<i>Rhodococcus sp. RR1, RR2</i>	Be, To, Eb, mXy, pXy	Deeb and Alvarez-Cohen. 2000
<i>Ralstonia pickettii PKO1</i>	To	Parales <i>et al.</i> , 2000
<i>Rhodococcus sp. strain DK17</i>	Be, To, Eb, oXy	Farhadian <i>et al.</i> , 2007
<i>Pseudomonas sp. ATCC 55595</i>	Be, pXy	Collins and Daugulis. 1999
<i>Burkholderia cepacia G4</i>	To	Parales <i>et al.</i> , 2000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Be	Kim <i>et al.</i> , 2003
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Be, To, Eb, oXy	Shim <i>et al.</i> , (2002,2005)
<i>Pseudomonas putida F1</i>	Be, To, Eb	Parales <i>et al.</i> , 2000
<i>Pseudomonas putida souche mt-2</i>	To, mXy, pXy	Morasch <i>et al.</i> , 2002
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Be, To, Eb, Xy	Nielsen <i>et al.</i> , 2006
<i>Blastochloris sulfovirdidis ToP1</i>	To	Van Hamme <i>et al.</i> , 2003
<i>Desulfobacterium cetonicum</i>	To	Shim <i>et al.</i> , (2002,2005)

2.3.2.3.1. Souches bactériennes utilisées

Devant les difficultés d'obtenir et de cultiver les bactéries qui se trouvent naturellement dans les milieux aquatiques et même telluriques contaminés par les hydrocarbures aromatiques, seul 1% des souches d'une communauté est cultivable dans des conditions de laboratoire, nous avons eu recours à des espèces ubiquistes isolées à partir de prélèvements pathologiques humains. Nous nous sommes basé sur les données bibliographiques et sur les propriétés communes des espèces ubiquistes qui appartiennent au même genre en occupant des niches écologiques très variées avec une large distribution géographique. Parmi ces bactéries, nous avons sélectionné une dizaine, qu'on a isolées à partir de différents prélèvements d'urine obtenues dans le laboratoire de l'Hôpital Militaire Universitaire Régional de Constantine (CHUM).

Il faut savoir que ces germes ont la capacité de dégrader le benzène et le toluène. Parmi les 10 espèces retenues, 6 appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*, 2 à celle des *Moraxellaceae*, 1 à celle des *Pseudomonadaceae* et 1 à la famille des *Enterococcaceae* (Tab. 9).

Tableau 9: Représentation des 4 familles et des 10 espèces de bactéries ubiquistes retenues.

N°	Références	Famille	Espèces
1	S05	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
2	S476		<i>Citrobacter youngae</i>
3	S1620		<i>Klebsiella pneumoniae</i>
4	S1664		<i>Klebsiella pneumoniae</i>
5	S02		<i>Klebsiella oxytoca</i>
6	S1687		<i>Serratia marcescens</i>
7	S1670	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
8	S1671		<i>Acinetobacter baumannii</i>
9	S1850	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
10	S1663	<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>

La biodégradabilité des hydrocarbures aromatiques est possible en aérobie et en anaérobie (Roger et Jacq, 2000), ce qui valorise nos souches aéro-anaéro facultatives, actives aussi bien en aérobie qu'en anaérobies qu'on a identifié grâce aux galeries Api[®] 20^E et confirmer a été faite par spectrométrie de masse Maldi-Tof (Bruker, biotyper 2.0).

2.3.2.3.2. Caractères biochimiques des 10 souches utilisées

- Famille des *Enterobacteriaceae*.

Communément appelée entérobactéries ou bactéries entériques, elles sont composées de bacilles et comprennent de nombreux genres bactériens dont 8 couramment isolés sont: *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter* et *Serratia*.

Les *Enterobacteriaceae* sont des bacilles droits, aérobies-anaérobies facultatifs, oxydase négative, réduisent les nitrates en nitrites, fermentent le glucose avec ou sans production de gaz, immobiles comme *Klebsiella*, *Shigella* ou encore *Yersinia pestis*, elles sont facilement cultivables sur les milieux habituels. De nombreuses espèces d'*Enterobacteriaceae* sont généralement distribuées sans aucun dommage aussi bien chez les humains que chez les animaux. Ces espèces sont également présentes dans différents types d'écosystèmes terrestres et aquatiques. Mais parmi les 130 espèces actuellement répertoriées, certaines sont pathogènes pour l'homme par exemple: *E. coli*, *Yersinia pestis*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* ... (Bousseboua.2005).

- Famille des *Pseudomonadaceae*

Cette famille comprend 4 genres: *Pseudomonas* et *Xanthomonas*, pour la plupart phytopathogènes rencontrés également dans des infections nosocomiales et *Fraternia* et *Zoogloea*, exclusivement saprophytes du milieu extérieur (Patrice Nordmann et Michele Guibert, 1998).

- Familles des *Moraxellaceae*

La famille des *Moraxellaceae* est membre de l'ordre *Pseudomonadales*, actuellement englobant les genres *Acinetobacter*, *Moraxella* et *Psychrobacter*. Plusieurs de ces microorganismes font partie de cette famille, leur identité discutable génère des difficultés dans l'interprétation des publications (Shuai Li *et al.*, 2017). Les *Acinetobacter* sont des bactéries ubiquitaires et font partie de la flore normale de l'homme et des animaux (Avril. J. L. *et al.*, 1992).

- Famille des *Enterococcaceae*

Ce sont des commensaux de la flore intestinale et des bactéries transitoires de la flore cutanée périnéale; on dénombre une trentaine d'espèces. *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* sont les plus fréquemment isolées en situation pathologique.

2.3.2.3.3. MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight:

MALDI-Tof est une technique introduite comme méthode d'ionisation pour une large gamme de molécules biologiques en 1998 par Hillenkamp et Karas (Karas et Hillenkamp, 1998), depuis, elle est devenue un outil analytique généralisé pour identifier des protéines (Hillenkamp et Karas, 1991).

L'échantillon (culture jeune) à analyser par MALDI-TOF est préparé en le mélangeant avec une solution en excès d'un composé organique absorbant appelé matrice (Fig. 23). Lorsque cette dernière se cristallise pendant le séchage, l'échantillon piégé dans la matrice co-cristallisée également est bombardée par un faisceau laser. La désorption et l'ionisation avec le rayon laser génèrent des ions mono protonés à partir d'analytes dans l'échantillon. Les ions protonés sont ensuite accélérés à un potentiel fixe qui les sépare les uns des autres en se basant sur le rapport: masse / charge (m/z). Les analytes chargés sont ensuite détectés et mesurés à l'aide d'analyseurs de temps de vol (TOF) (Neelja *et al.*, 2015).

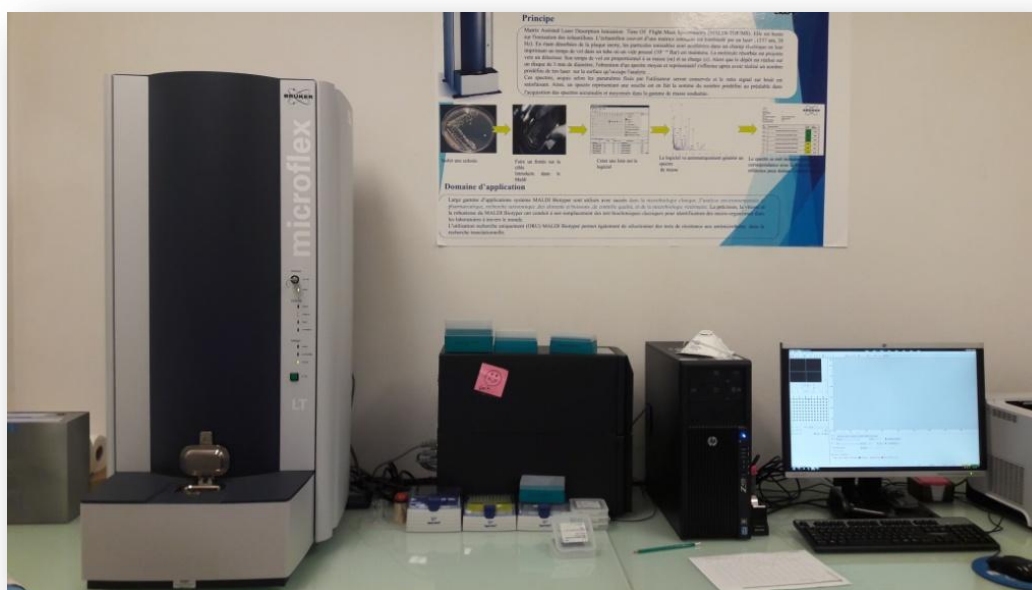


Figure 23: Photographie représentant l'appareil du MALDI TOF Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight.

Au cours de l'analyse MALDI-TOF, le rapport m/z d'un ion est mesuré en déterminant le temps nécessaire pour qu'il parcourt la longueur du tube de vol (Yates, 1998) et de produire un spectre de masse. Le spectre de masse obtenu est une sorte d'empreinte digitale spécifique et unique de la composition en protéines du microorganisme analysés (PMF), qui peut être comparé à une banque de données de spectres (Descy *et al.*, 2010) (Fig. 24).

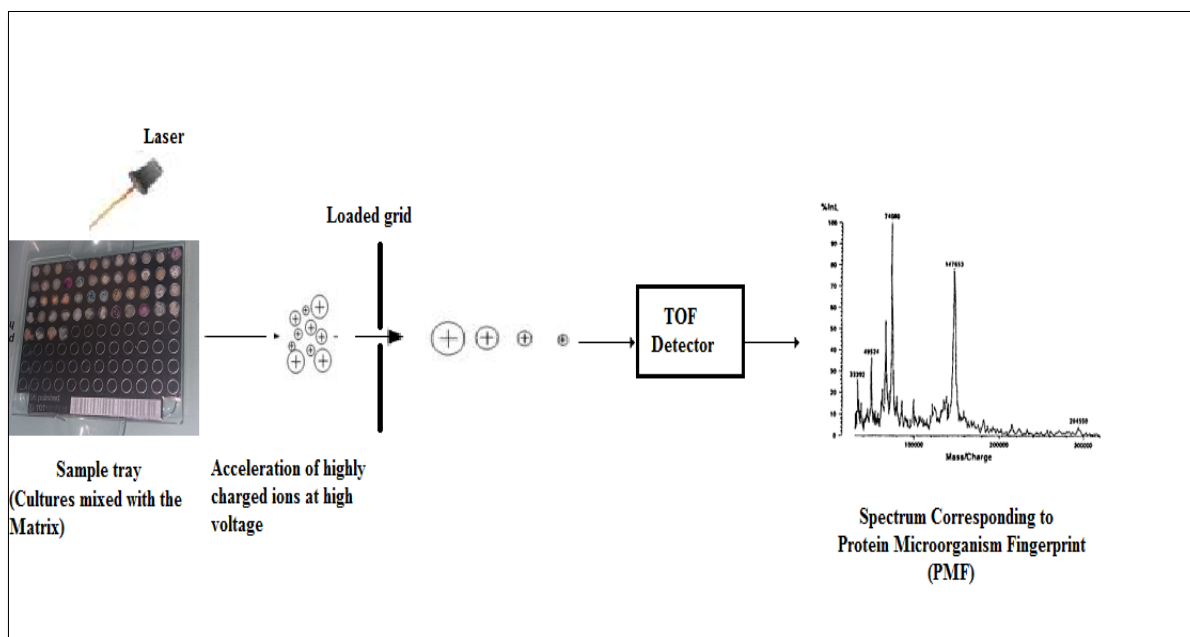


Figure 24: Schéma montrant le principe du MALDI-TOF MS Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight.

L'identification des bactéries par MALDI-TOF MS se fait en comparant le spectre MS (PMF) des isolats microbiens inconnus en comparaison aux spectres MS des isolats microbiens connus, contenus dans la base de données. Pour l'identification des germes à l'échelle des espèces, on utilise une gamme de masse typique de m/z de 2-20 kDa, qui représente principalement des protéines ribosomales avec quelques protéines d'entretien. Les protéines ribosomales sont les plus abondantes, elles représentent 60 à 70% du poids sec d'une cellule microbienne. La gamme de masse de 2-20 kDa est utilisée pour identifier un microorganisme particulier en associant son empreinte protéinique (Protein Microorganism Fingerprint). Avec ces PMF les protéines ribosomales contenues dans une vaste base de données sont ouvertes et comparées selon Murray, (2012). Ainsi, l'identité d'un microorganisme peut être établie selon le genre et dans de nombreux cas selon les espèces (Fagerquist et *al.*, 2010).

Résultats

3. RESULTATS

Dans cette partie nous présentons les résultats concernant les variations des paramètres physico-chimiques en rapport avec les hydrocarbures (HCT): température, pH et conductivité et ceux des concentrations des HCTotaux. Dans la 2^{ème} partie vient l'identification des 10 souches bactériennes retenues par MALDI-TOF et les quantifications du benzène et du toluène par GCMS dans l'eau avant et après 4 puis 9 semaines de traitement par les 4 familles représentant les 10 souches: *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae* et *Enterococcaceae*.

3.1. Paramètres physico-chimiques

Pour interpréter les moyennes annuelles des 4 paramètres physico-chimiques mesurées en 2014, nous les comparons avec celles obtenues de 2008 à 2013 et aux normes algériennes (Décret exécutif n° 06-141 2006, définissant les valeurs limites des rejets d'effluents liquides industriels).

3.1.1. Concernant la température

La moyenne des températures de l'année 2014 est de 24,6°C, c'est la valeur la plus basse comparée aux années précédentes, qui en 2010 et en 2011 s'élèvent respectivement à 29,36 et 29.47°C (Fig. 21). La variation temporelle des moyennes des températures des rejets de la raffinerie sont depuis 2008 < 30°C et par conséquent en conformité avec la réglementation Algérienne en vigueur (Fig. 25).

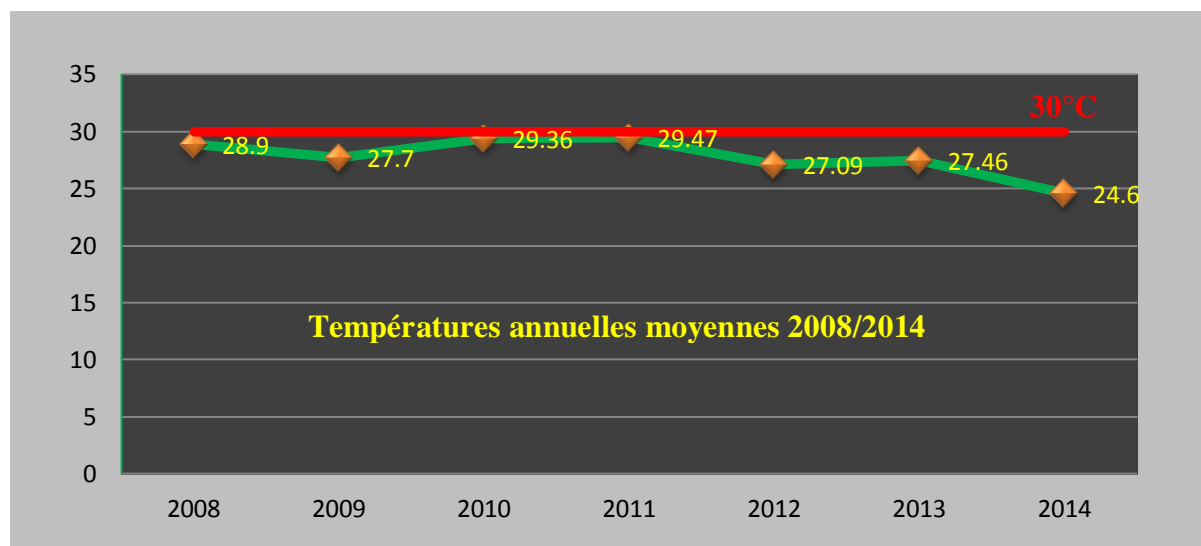


Figure 25: Représentation de la variation annuelle des moyennes des températures dans les eaux traitées biologiquement dans l'ETP2 entre 2008 et 2014. Ligne rouge: valeur limite.

Les moyennes des températures mensuelles enregistrées au cours de l'année 2014 fluctuent entre 29.24°C en juillet et 18.63°C en janvier (Fig. 26).

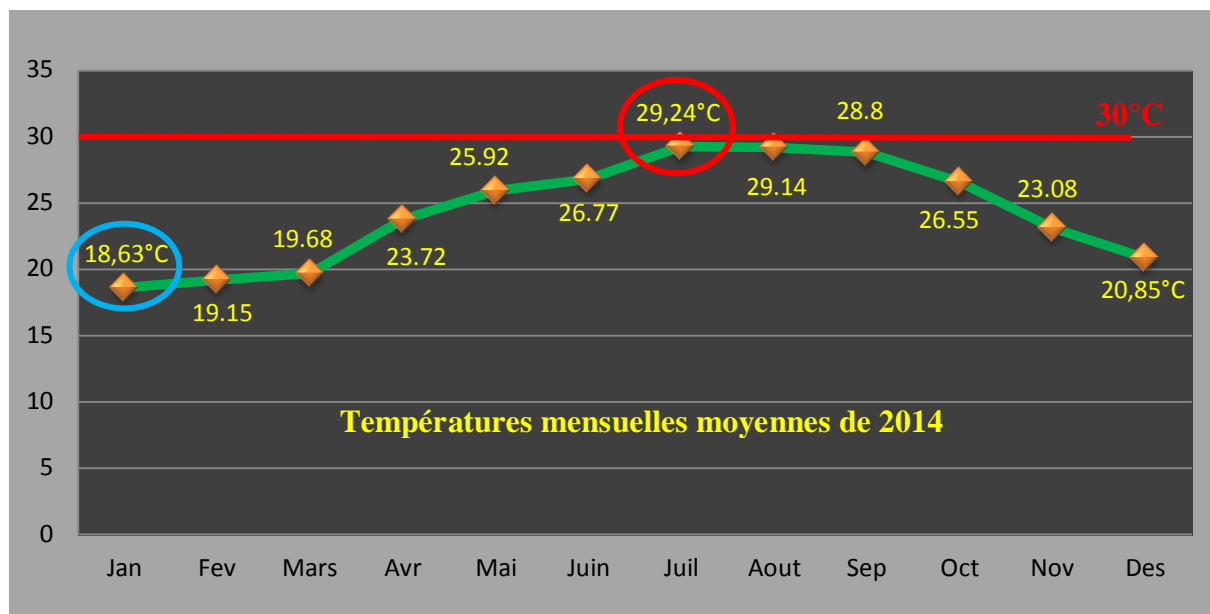


Figure 26: Représentation des variations mensuelles des moyennes des températures des eaux traitées dans l'ETP2 en 2014. Ligne rouge: valeur limite.

3.1.2. Concernant le pH

Entre 2008 et 2013, les fluctuations du pH moyen annuel varient entre 7.22 et 7.84 aussi bien pour l'eau procédée que pour l'eau traitée. Ces valeurs sont considérées comme normales, car les limites réglementaires sont comprises entre 6.5 et 8.5 (Décret exécutif n°6-141).

En 2014 on note des pH acides de 6.03 avant traitement neutralisés après traitement pour atteindre 7.03 (Fig. 27).

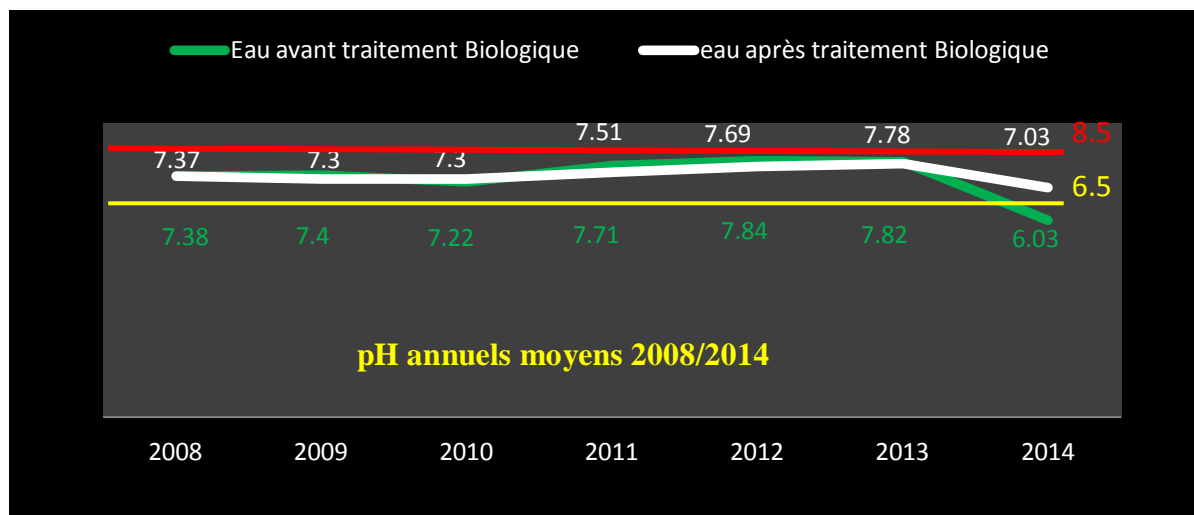


Figure 27: Représentation des variations annuelles du pH moyen des eaux utilisées avant et après traitement biologique dans l'ETP2 entre 2008 et 2014, lignes rouge et jaune: valeurs limites.

En 2014, les pH mensuels moyens des eaux rejetées par la raffinerie sont de l'ordre de 8.2 entre juin et aout, la température de l'eau est élevée et son débit faible (Fig. 27). En hiver, les eaux de pluies, le lessivage des terrains et la diminution des températures acidifient le pH qui passe à 7.68 (Fig. 28).

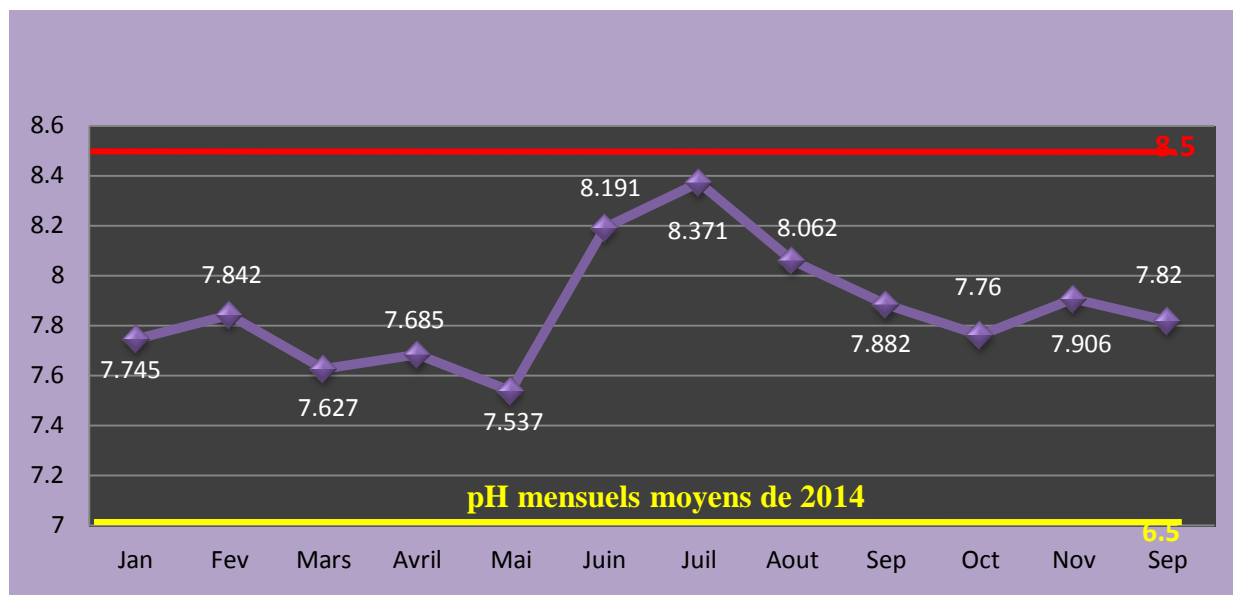


Figure 28: Représentation des variations mensuelles moyennes des pH de l'eau traitée dans l'ETP2 en 2014. Lignes rouge et jaune: valeurs limites.

3.1.3. Concernant la Conductivité

Aussi bien pour l'eau procédée que pour l'eau traitée, de 2008 à 2010 la conductivité varie entre 836.13 $\mu\text{S}/\text{cm}$ et 1169.1 $\mu\text{S}/\text{cm}$, ses valeurs triplent en 2011 pour atteindre 3219.51 $\mu\text{S}/\text{cm}$ avant de diminuer les années qui suivent (Fig. 29);

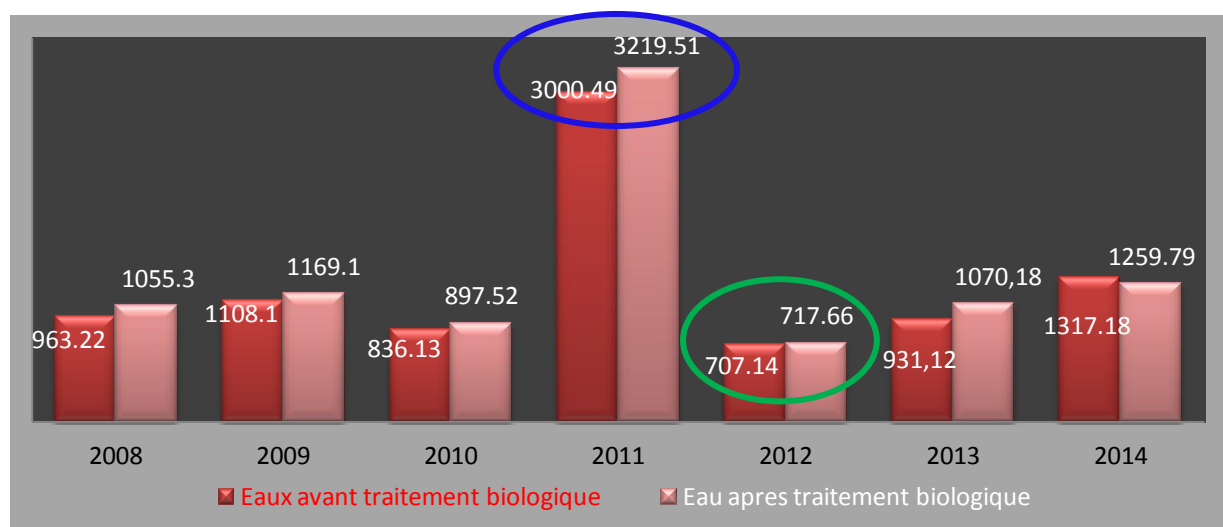


Figure 29: Représentation des variations annuelles des conductivités moyennes des eaux usées avant et après traitement biologique dans l'ETP2 entre 2008 et 2014. Cercles: valeurs limites.

Les variations mensuelles des moyennes des conductivités mesurées en 2014 montrent une faible minéralisation en avril correspondant à 937.6 $\mu\text{S}/\text{cm}$ qui augmente progressivement pour atteindre un pic de 1824 $\mu\text{S}/\text{cm}$ en aout signe d'une importante minéralisation (Fig. 30).

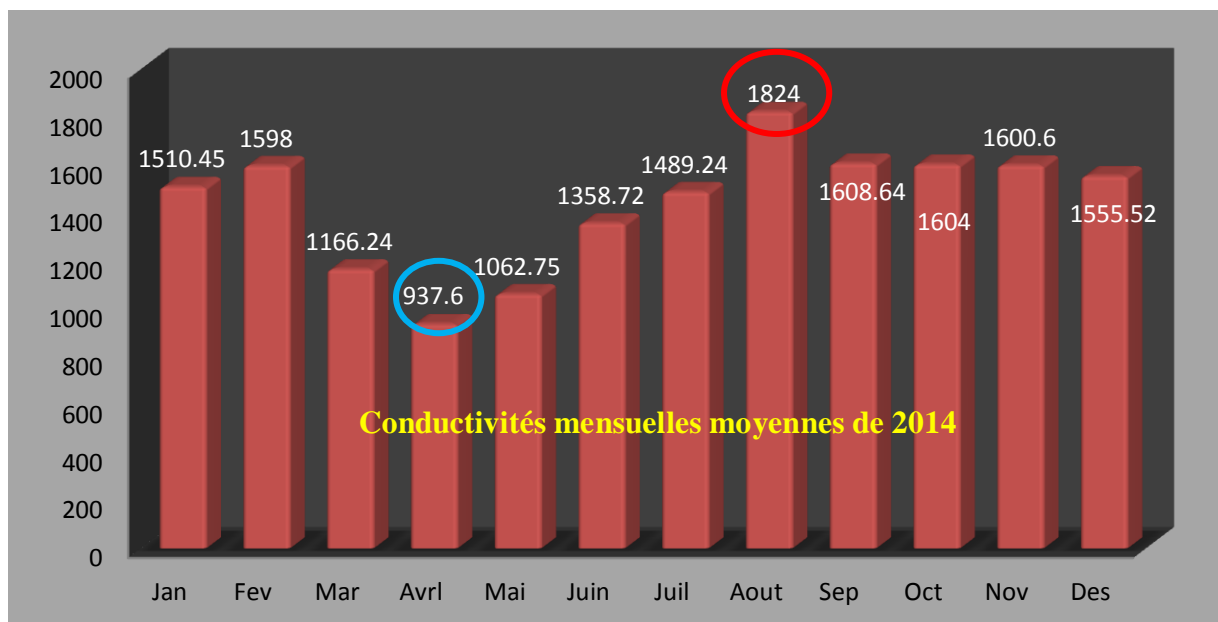


Figure 30: Représentation des variations mensuelles des moyennes des conductivités des eaux traitées dans l'ETP2 en 2014.

3.2. Concernant les HCTotaux

Le suivi des variations annuelles des concentrations des hydrocarbures totaux entre 2008 et 2012 est irrégulier avec un pic de 77.18 mg/l en 2010. Pendant ces 5 années, les valeurs sont restées supérieures aux normes réglementaires de 20 mg/l (Fig. 31) avec un pic 77.18 mg/l en 2010.

Depuis la mise en fonction de la station 1101 d'épuration, ces concentrations sont passées de 3 à 0.032 mg/l entre 2013 et 2014 (Fig.31) ce qui confirme l'efficacité de la station de traitement des effluents S1101-ETP2.

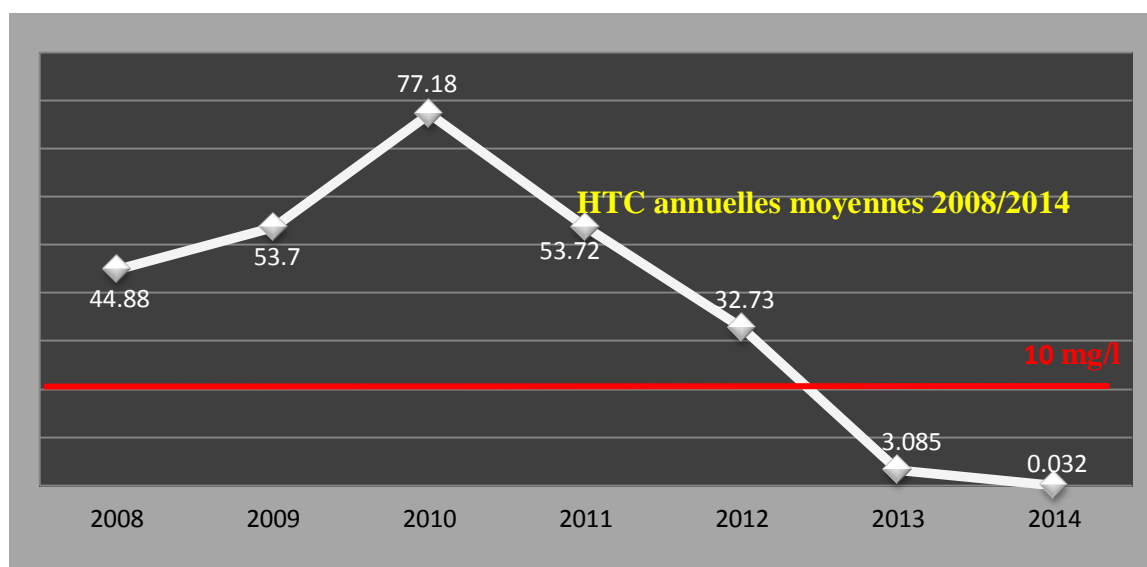


Figure 31: Variations annuelles des concentrations des hydrocarbures totaux de la station de traitement des effluents S1101-ETP2 entre 2008 et 2014. Ligne rouge: norme.

3.3. Résultats de l'analyse par MALDI-OF

On a identifié 10 souches bactériennes par MALDI-TOF qui dégradent les HC aromatiques: benzène et toluène polluants les eaux des effluents de la raffinerie RA1K. Ces souches appartiennent à 4 familles: *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae* et *Enterococcaceae*.

Le score des identifications pour la majorité des 10 espèces bactériennes (Tab. 10) est crédible. Ces identifications nous ont permis de confirmer les résultats obtenus par la technique des galeries Api®20. Il s'agit de: *Citrobacter freundii*, *Citrobacter youngae*, 2 souches différentes d'*Acinetobacter baumannii*, 2 souches différentes de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Les 2 espèces S1670 *Acinetobacter baumannii* et S1664 *Klebsiella pneumoniae* présentent un score d'identification hautement probable de respectivement 2,397 et 2,367. Tandis que 7 espèces indiquent une identification sûre du genre et probable de l'espèce avec un score compris entre 2.277 et 2.058 (Tab. 10).

La S1671 *Acinetobacter baumannii* avec 2.277 comme meilleur correspondance et un score de 2.15 pour la seconde meilleure correspondance. La S1620 *Klebsiella pneumoniae* présente un score de 2.270, assez proche des identifications sûres de l'espèce. Il en est de même avec la S5 *Citrobacter freundii* qui présente un score de 2.261, la S1663 *Enterococcus faecalis* avec 2.158 et la S1687 *Serratia marcescens* avec 2.157 (Tab. 10).

La souche S2 présente un score de 2.151 à l'identification pour l'espèce: *Klebsiell oxytoca* et *Raoultella omithinolytica* comme 2^{ème} meilleur choix avec un score de 1.933; la S476 s'identifie comme *Citrobacter youngae* avec un score 2.058, et 2.018 comme une seconde meilleure correspondance comme *Citrobacter freundii*.

La souche S1850 *Pseudomonas aeruginosa* a obtenu le score le plus bas de 1.976 (Tab. 10).

Tableau 10: Représentation des scores des 10 espèces identifiées par MALDI-TOF et la signification de leurs scores.

Analyte name	Analyte ID	Organism (best match)	Score value	Organism (second best match)	Score value
A7 (++) (C)	S5	<i>Citrobacter freundii</i>	2.261	<i>Citrobacter freundii</i>	2.199
A8 (++) (B)	S476	<i>Citrobacter youngae</i>	2.058	<i>Citrobacter freundii</i>	2.018
A10 (+++ (A)	S1670	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2.367	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2.221
D3 (+++ (C)	S1664	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.397	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.283
D4 (++) (C)	S1620	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.270	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.226
D5 (++) (A)	S1663	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.158	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.157
D6 (++) (C)	S2	<i>Klebsiell oxytoca</i>	2.151	<i>Raoultella omithinolytica</i>	1.933
D7 (++) (A)	S1671	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2.277	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2.15
D10 (++) (A)	S1687	<i>Serratia marcescens</i>	2.157	<i>Serratia marcescens</i>	2.022
A9 (+) (B)	S1850	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.976	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.976
Range	Description			Symbols	Color
2.300...3.000	Highly probable species identificaion			+++	Green
2.000...2.299	Secure genus identification probable species identification			++	Green
1.700...1.999	Probable genus identification			+	Yellow
0.000...1.699	Not reliable identification			-	Red

3.4. Quantifications du benzène et du toluène par GCMS

Après avoir mélangé du benzène et du toluène séparément dans de l'eau prélevée à partir de 3 points de rejets industriels: ETP2 -S1101, Oued zeramna et Oued saf saf. Cette dernière a été contaminée par une série de bactéries préalablement sélectionnée. On a effectué des analyses pour suivre le devenir du benzène, du toluène et leurs dérivés.

3.4.1. Résultats avant traitement

On a analysé l'eau du T₀ par GC/MS, pour voir s'il existe le benzène ou le toluène auparavant. Ca nous a permis de détecter seulement la présence du benzène, avant même de commencer l'expérience, avec une concentration de 0.097 µg/µl (Fig 32 et 33).

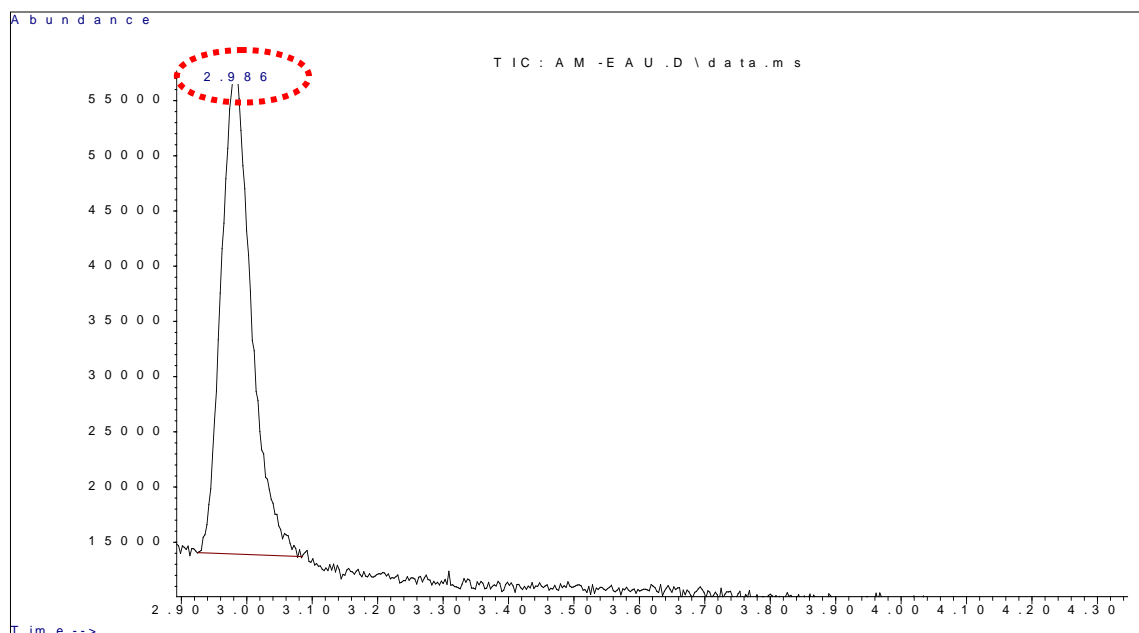


Figure 32: Graphe de la chromatographie gazeuse (GC) de l'eau à T₀: temps de rétention théorique du benzène est de 2.98 min.

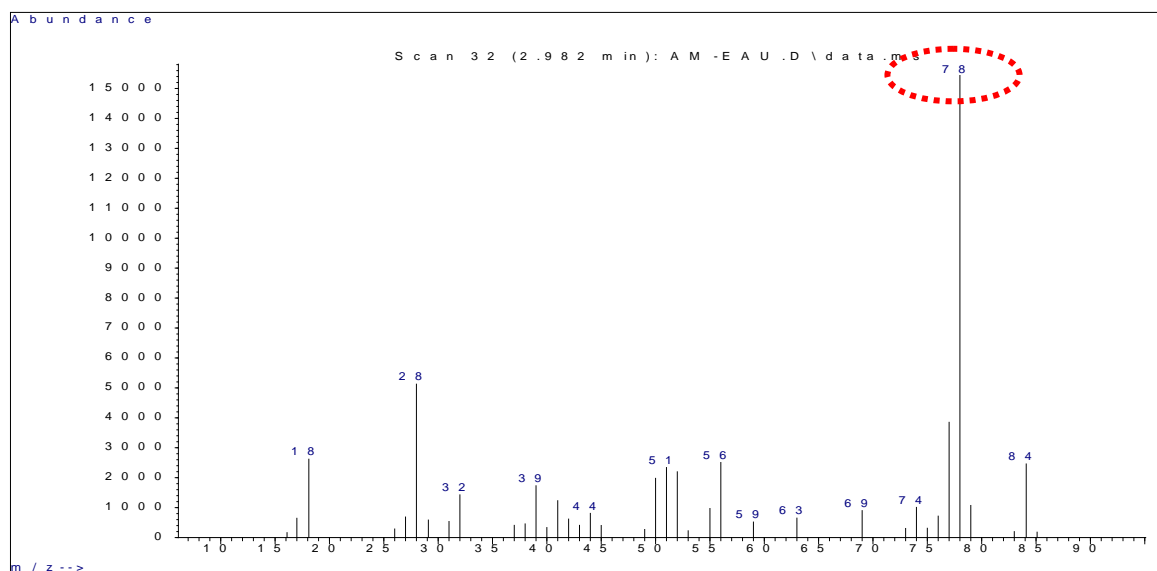


Figure 33: Graphe Spectromètre de masse (MS) de l'eau à T₀: signature $m/z = 78$. La signature m/z du benzène est entourée en rouge.

3.4.2. Résultats après 4 semaines d'incubation

En analysant nos échantillons un par un après 4 semaines d'incubation, les résultats obtenus indiquent la biotransformation quasi-totale du benzène et du toluène en un seul dérivé: le cyclohexane, dans des conditions normales, par l'intégralité des souches, à des concentrations fluctuantes (Figs. 34 et 35).

- Chez les *Enterobacteriaceae*

Les 6 espèces ont totalement dégradé le benzène et le toluène après 4 semaines d'incubation, et ont donné un seul dérivé le cyclohexane. Les concentrations de ce dernier diffèrent d'une souche à une autre même si elles appartiennent à la même famille, mais aussi selon son origine issu du benzène ou toluène. Par exemple, en comparant les concentrations du cyclohexane issu du benzène avec ceux issu du toluène, on observe clairement que nos souches ont consommé le toluène plus vite que le benzène, c'est-à-dire puisque il y a la disparition totale de l'hydrocarbure aromatique, suivie d'une diminution de la concentration du dérivé issu des 2 HAM, et au même temps, toutes les souches sans exception ont consommé le toluène plus rapidement que le benzène voir tableau 11. La concentration du cyclohexane (B) chez S476 *Citrobacter youngae*, après 4 semaines est de l'ordre de 0.0864 µg/µl, alors que celle du Cyclohexane (T) est de l'ordre de 0.0343 µg/µl. De même avec toutes les espèces de la famille des entérobactéries. La S1664 *Klebsiella pneumoniae* et S1620 *Klebsiella pneumoniae* sont de la même espèce mais se sont 2 souches différentes, du faite que la S1620 *Klebsiella pneumoniae* consomme le benzène plus rapide que la S1664 *Klebsiella pneumoniae* voir les concentrations du cyclohexane (B) 0.0599 µg/µl et 0.0846 µg/µl respectivement, et également les concentrations du cyclohexane (T): 0.0276 µg/µl et 0.0362 µg/µl respectivement.

La S1687 *Serratia marcescens* consomme plus rapidement que les autres le cyclohexane (T) avec la concentration la plus basse 0.0154 µg/µl. Les 2 espèces S02 *Klebsiella oxytoca* et S05 *Citrobacter freundii* présentent des concentrations assez rapprochées que se soit pour le cyclohexane (B): 0.0817 µg/µl et 0.0812 µg/µl, ou cyclohexane (T): 0.0352 µg/µl et 0.0344 µg/µl respectivement.

Tableau 11: Concentrations du cyclohexane chez les 6 espèces de la famille *Enterobacteriaceae* après 4 semaines d'incubation.

N°	Souches	Espèces	Concentrations du cyclohexane dans l'eau polluée par le benzène (µg/µl)	Concentrations du cyclohexane dans l'eau polluée par le toluène (µg/µl)
1	S 476	<i>Citrobacter youngae</i>	0.0864	0.0343
2	S 1664	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.0846	0.0362
3	S 1687	<i>Serratia marcescens</i>	0.0835	0.0154
4	S 02	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0.0817	0.0352
5	S 05	<i>Citrobacter freundii</i>	0.0812	0.0344
6	S 1620	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.0599	0.0276

- Chez les *Moraxellaceae*

Ce sont 2 même espèces mais 2 souches différentes. La S1670 *Acinetobacter baumannii* et la S1671 *Acinetobacter baumannii* consomment plus aisément le cyclohexane (T): 0.0277 µg/µl et 0.0231 µg/µl, que le cyclohexane (B): 0.0727 µg/µl et 0.0475 µg/µl respectivement (Tab. 12).

Cependant les souches de cette famille biodégradent le benzène plus rapidement que les autres familles, la moyenne des concentrations du cyclohexane (B) des *Moraxellaceae* est de l'ordre de 0.0601 µg/µl, alors que celle des souches de la famille des *Enterobacteriaceae* est de l'ordre de 0.0795 µg/µl, chez les *Pseudomonadaceae* est de 0.0821 µg/µl et les *Enterococcaceae* est a raison de 0.0964 µg/µl.

Tableau 12: Concentrations du cyclohexane chez les 2 espèces de la famille *Moraxellaceae* après 4 semaines d'incubation.

N°	Souches	Espèces	Concentrations du cyclohexane dans l'eau polluée par le benzène (µg/µl)	Concentrations du cyclohexane dans l'eau polluée par le toluène (µg/µl)
1	S 1670	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0.0727	0.0277
2	S 1671	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0.0705	0.0231

- Chez les *Pseudomonadaceae*

Une seule espèce S1850 *Pseudomonas aeruginosa* présentant une concentration du cyclohexane (B): 0.0821 µg/µl plus élevée que celle du cyclohexane (T): 0.0315 µg/µl (Tab. 13).

Tableau 13: Concentrations du cyclohexane chez la S1850 *Pseudomonas aeruginosa* après 4 semaines d'incubation.

N°	Souches	Espèces	Concentrations du cyclohexane dans l'eau polluée par le benzène (µg/µl)	Concentrations du cyclohexane dans l'eau polluée par le toluène (µg/µl)
1	S1850	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.0821	0.0315

- Chez *Enterococcaceae*

En effet, la S1663 *Enterococcus faecalis* est celle qui présente la concentration du cyclohexane (B) la plus élevée est de l'ordre de 0.0964 µg/µl (Tab. 14).

Tableau 14: Concentrations du cyclohexane chez la S1663 *Enterococcus faecalis* après 4 semaines d'incubation.

N°	Souches	Espèces	Concentrations du cyclohexane dans l'eau polluée par le benzène (µg/µl)	Concentrations du cyclohexane dans l'eau polluée par le toluène (µg/µl)
1	S 1663	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.0964	0.0183

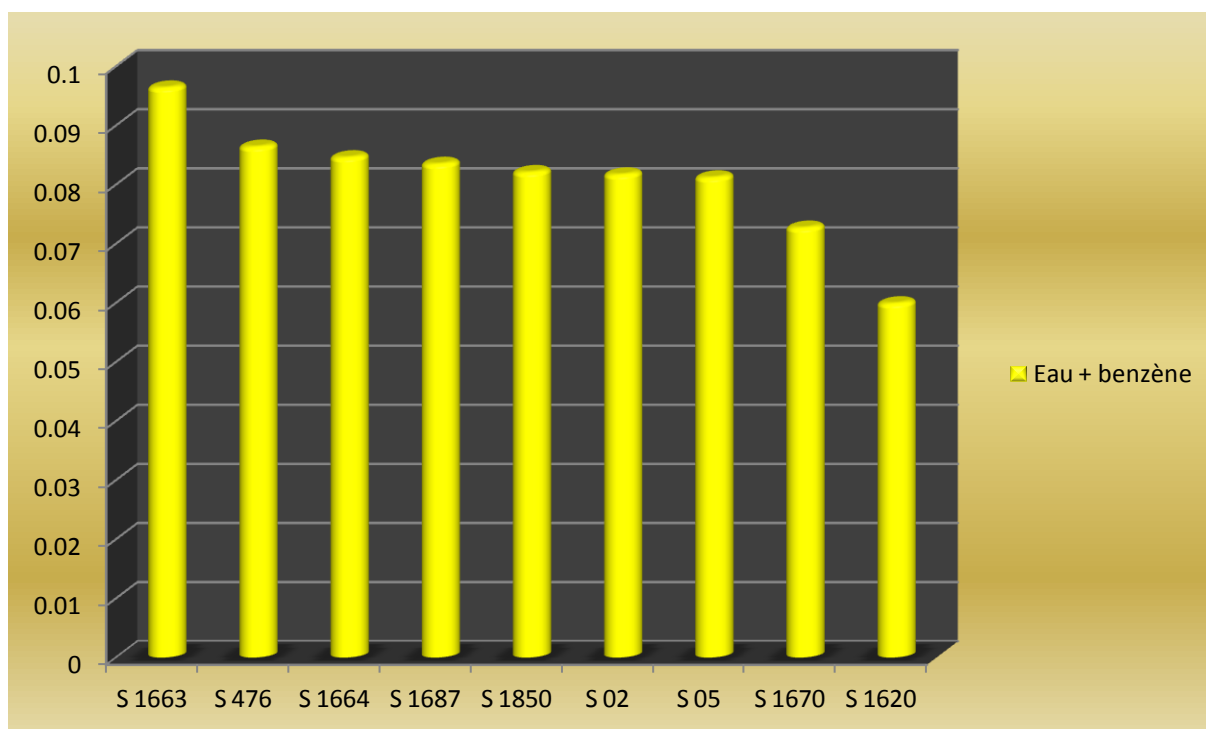


Figure 34: Cinétiques des concentrations du cyclohexane B (µg/µl) issus de la biodégradation du benzène par la culture des 10 différentes espèces bactériennes après 4 semaines d'incubation. (S1850: *Pseudomonas aeruginosa*, S05: *Citrobacter freundii*, S476: *Citrobacter youngae*, S02: *Klebsiella oxytoca*, S1687: *Serratia marcescens*, S1664: *Klebsiella pneumonia*, S1671: *Acinetobacter baumannii*, S1663: *Enterococcus faecalis*, S1670: *Acinetobacter baumannii*, S1620: *Klebsiella pneumoniae*).

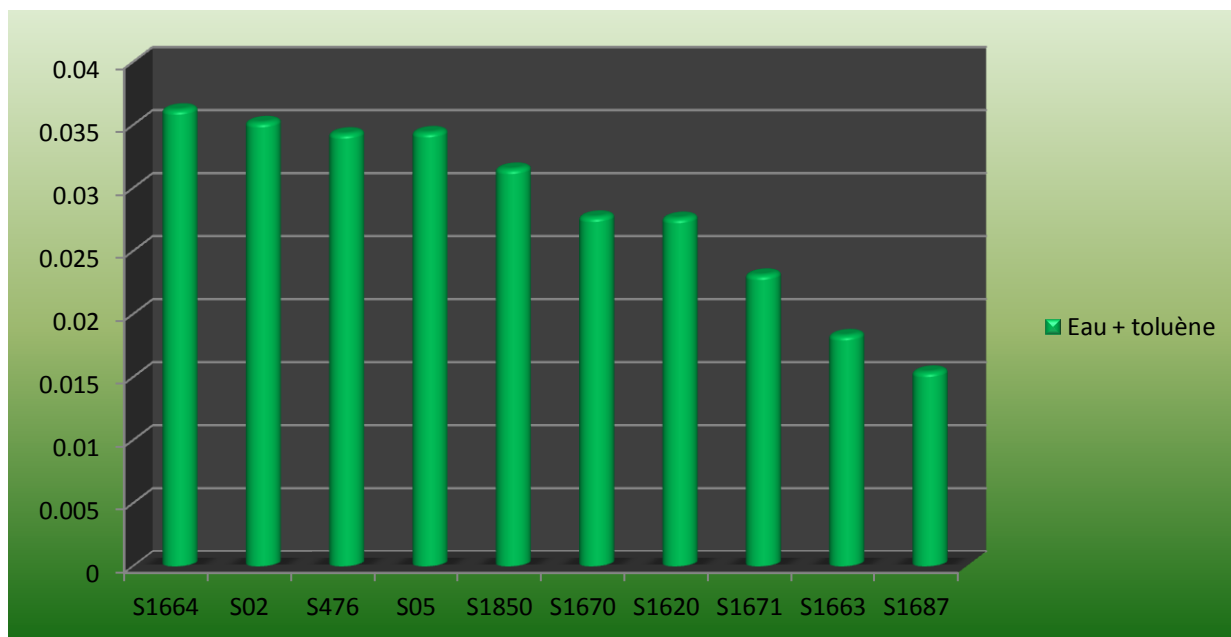


Figure 35: Cinétiques des concentrations du cyclohexane T ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) issus de la biodégradation du toluène par la culture des 10 différentes espèces bactériennes après 4 semaines d'incubation. (S1850: *Pseudomonas aeruginosa*, S05: *Citrobacter freundii*, S476: *Citrobacter youngae*, S02: *Klebsiella oxytoca*, S1687: *Serratia marcescens*, S1664: *Klebsiella pneumoniae*, S1671: *Acinetobacter baumannii*, S1663: *Enterococcus faecalis*, S1670: *Acinetobacter baumannii*, S1620: *Klebsiella pneumoniae*).

3.4.3 Résultats après 9 semaines d'incubation

Après 9 semaines d'incubation on peut facilement observer des diminutions remarquables dans les concentrations des cyclohexanes aussi bien ceux issus du benzène, que ceux issus du toluène (Figs. 36 et 37).

- Chez les *Enterobacteriaceae*

On observe qu'après 9 semaines, la croissance de l'ensemble des souches de la famille des Entérobactéries, ne s'arrêtent pas à l'exténuation du benzène et du toluène dans l'eau, mais elles continuent d'utiliser leurs dérivés comme seule source de carbone, le cas de la S1687 *Serratia marcescens*, de la S1664 *Klebsiella pneumoniae*, qui ont totalement consommé le toluène et son dérivé cyclohexane (T) avec des concentrations $0.00 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ et $0.0087 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ respectivement, en moins de 60 jours.

Alors que ces mêmes espèces (S1687 et S1664), ne présentent pas de grandes différences dans les concentrations du cyclohexane (B) après 9 semaines, qui est de l'ordre de $0.0746 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ et $0.0824 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ respectivement. En générale les concentrations du cyclohexane (B) n'ont pas enregistré une importante diminution, contrairement aux concentrations du cyclohexane (T) (Tab. 15).

Tableau 15: Concentrations du cyclohexane chez les 6 espèces de la famille *Enterobacteriaceae* après 9 semaines d'incubation.

N°	Souches	Espèces	Concentrations du cyclohexane dans l'eau polluée par le benzène (µg/µl)	Concentrations du cyclohexane dans l'eau polluée par le toluène (µg/µl)
1	S 476	<i>Citrobacter youngae</i>	0.0449	0.0208
2	S 1664	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.0824	0.0087
3	S 1687	<i>Serratia marcescens</i>	0.0746	No peak
4	S 02	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0.0531	0.0273
5	S 05	<i>Citrobacter freundii</i>	0.0316	0.0192
6	S 1620	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.0483	0.0167

- **Chez les *Moraxellaceae***

La S 1670 a enregistré une baisse assez importante dans la concentration du cyclohexane (B) et cyclohexane (T) 0.0457 µg/µl et 0.0207 µg/µl respectivement (Tab. 16). Cependant, la S1671 a totalement consommé le cyclohexane (T) en moins de 60 jours et enregistre une baisse dans la concentration du cyclohexane (B) de l'ordre de 0.0475 µg/µl.

Tableau 16: Concentrations du cyclohexane chez les 2 espèces de la famille *Moraxellaceae* après 9 semaines d'incubation.

N°	Souches	Espèces	Concentrations du cyclohexane dans l'eau polluée par le benzène (µg/µl)	Concentrations du cyclohexane dans l'eau polluée par le toluène (µg/µl)
1	S 1670	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0.0457	0.0207
2	S 1671	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0.0475	No peak

- **Chez les *Pseudomonadaceae***

Pour l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* après 9 semaines d'incubation les concentrations du cyclohexane(B) et cyclohexane (T) sont 0.0632 µg/µl et 0.0274 µg/µl respectivement (Tab. 17).

Tableau 17: Concentrations du cyclohexane chez la S1850 *Pseudomonas aeruginosa* après 9 semaines d'incubation.

N°	Souches	Espèces	Concentrations du cyclohexane dans l'eau polluée par le benzène (µg/µl)	Concentrations du cyclohexane dans l'eau polluée par le toluène (µg/µl)
1	S1850	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.0632	0.0274

- Chez *Enterococcaceae*

En se qui concerne la S1663, en 5 semaines les concertations du cyclohexane (B) qui est de 0.0446 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ et celle du cyclohexane (T) 0.0103 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, ont baissé de presque la moitié (Tab. 18).

Tableau 18: Concentrations du cyclohexane chez la S1663 *Enterococcus faecalis* après 9 semaines d'incubation.

N°	Souches	Espèces	Concentrations du cyclohexane dans l'eau polluée par le benzène ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Concentrations du cyclohexane dans l'eau polluée par le toluène ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
1	S 1663	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.0446	0.0103

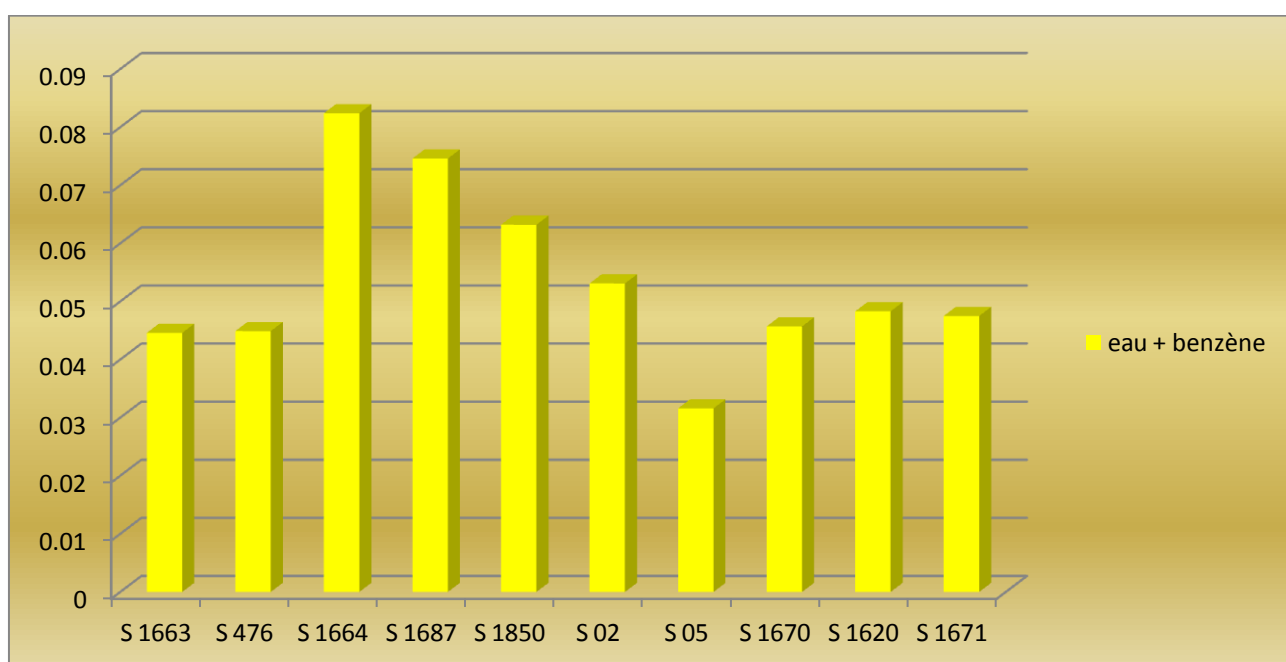


Figure 36: Cinétiques des concentrations ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) des cyclohexanes B issus de la biodégradation du benzène par la culture des 10 différentes espèces bactériennes après 9 semaines d'incubation. (S1850: *Pseudomonas aeruginosa*, S05: *Citrobacter freundii*, S476: *Citrobacter youngae*, S02: *Klebsiella oxytoca*, S1687: *Serratia marcescens*, S1664: *Klebsiella pneumonia*, S1671: *Acinetobacter baumannii*, S1663: *Enterococcus faecalis*, S1670: *Acinetobacter baumannii*, S1620: *Klebsiella pneumoniae*).

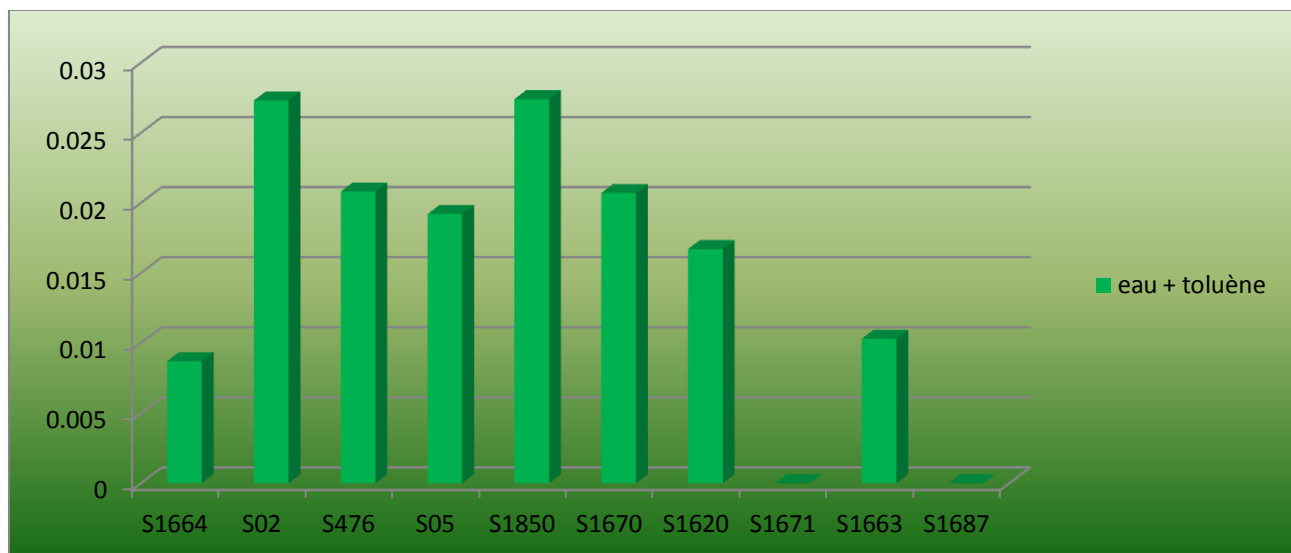


Figure 37: Cinétiques des concentrations ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) des cyclohexanes T issus de la biodégradation du toluène par la culture des 10 différentes espèces bactériennes après 9 semaines d'incubation. (S1850: *Pseudomonas aeruginosa*, S05: *Citrobacter freundii*, S476: *Citrobacter youngae*, S02: *Klebsiella oxytoca*, S1687: *Serratia marcescens*, S1664: *Klebsiella pneumonia*, S1671: *Acinetobacter baumannii*, S1663: *Enterococcus faecalis*, S1670: *Acinetobacter baumannii*, S1620: *Klebsiella pneumoniae*).

Discussion et Conclusion

4. Discussion et conclusion

Nous avons exploré la capacité de quelques souches bactéries ubiquistes, mésophiles (20 à 40°C) et aéro-anaéro-facultatives à dégrader les hydrocarbures aromatiques dans les milieux aquatiques. Pour cela nous avons d'abord caractérisé mensuellement la température, le pH, la conductivité et la teneur en hydrocarbures totaux, dans les effluents rejetés par la raffinerie de Skikda sur le littoral Est algérien.

Pour apprécier la problématique des pollutions causées par cette raffinerie nous avons abordé son évolution à travers les valeurs de ces 4 paramètres physico-chimiques entre 2008 et 2013 avant de les comparer avec ceux obtenus en 2014 et vérifier leur conformité avec la réglementation algérienne.

En 2014 les températures, pH ou encore les HTC sont conformes aux réglementations algériennes (Décret exécutif n°6-141). Les températures des eaux rejetées par la raffinerie varient entre 18.63°C en hiver et 29.24°C en été, ces valeurs sont conformes aux limites fixées par les différents textes réglementaires (JORA, 2006). Il en est de même pour les températures moyennes des années précédentes avec un minimum en 2012 de 27.09°C et un maximum de 29.47 °C en 2011 comme le signalent Gueddah en 2003, Rouidi en 2002 et le LEM en 1998.

Le pH moyen des rejets de la raffinerie, est de 8.2 en été, le débit d'eau est faible, il atteint 7.68 en hiver quand le débit des eaux rejetées est élevé. Ces valeurs de pH comprises entre 6 et 8 sont rares et selon Rodier (2009), les pH > 8.5 ne concernent que les eaux stagnantes où les réactions ioniques sont influencées par la photosynthèse, la végétation et la nature chimique des fonds. Dans l'ancienne station de la raffinerie S-1100, les valeurs limites inférieures des pH sont largement dépassées obligeant l'ANPE de Skikda à construire une nouvelle station S-1101, qui selon les valeurs observées en 2014, permet de respecter les normes algériennes. Depuis, les pH fluctuent entre 8.3 en juillet et 7.5 en mai. Ces valeurs sont similaires à celles observées par Gueddah en 2003 ou encore Hamidi en 1998.

La conductivité nous a permis d'évaluer rapidement mais approximativement la minéralisation globale de l'eau et d'en suivre l'évolution. Les rejets de la RA1/K se caractérisent par une conductivité entre 937.6 et 1608.64 µs/cm, ce qui correspond selon Rodier (2009) à une minéralisation normale car elle est < 2 000 µs/cm.

Les teneurs en HTC dans les eaux traitées mesurées en 2014 sont quasiment nulles alors qu'en 2008, 2009, 2011 et 2012 on note des dépassements significatifs respectifs de 44.88, 53.7, 53.72 et 32.73 mg/l. En 2010 ces teneurs ont atteint 77.17 mg/l. Dans l'ensemble ces valeurs sont comparables à celles rencontrées par Gueddah en 2003, le LEM en 1998 et Rouidi en 2002 et 2013.

Pour les 4 paramètres étudiés, nous notons un retour aux normes réglementaires dans les eaux de rejets après la mise en service de la nouvelle station S-1101-ETP2 en 2014.

Les effluents rejettent en mer: eaux usées des procédés de raffinage, eaux de réfrigération atmosphérique et eaux provenant d'activités connexes telles que: eaux de lavage des sols, eaux de déballastage et de nettoyage des pétroliers, eaux de purge des chaudières, eaux de laboratoire et eaux domestiques.

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques HAP sont des molécules persistantes en raison de leur faible biodégradabilité dans l'environnement. D'autres hydrocarbures aromatiques, dont le benzène et le toluène, font partie du groupe des composés organiques volatils (COV). Ce type d'hydrocarbures s'évapore rapidement à partir des eaux de surface ou demeure emprisonné dans les eaux souterraines sur une période plus ou moins longue. En raison de leur nature toxique et de leurs multiples voies de pénétration dans les organismes par inhalation, absorption par la peau ou ingestion, ces hydrocarbures portent atteinte aux organismes du milieu dans lequel ils se trouvent.

Différents procédés sont proposés pour traiter les milieux contaminés par les HA, les procédés physiques et chimiques sauf que ces derniers, doivent passer par plusieurs tests afin de bien connaître les propriétés des milieux pour éviter les risques de réactions secondaires qui mèneraient comme le montrent Fritsche et *al*, (2008) à la formation de nouveaux polluants. La biodégradation est l'un des principaux moyens par lesquels les polluants organiques peuvent être neutralisés et même ôtés de l'environnement et de nombreuses espèces de bactéries peuvent être utilisées pour éliminer ou au moins minimiser l'impact de ces hydrocarbures et leurs dérivés. L'efficacité de la biodégradation varie entre 0.13 et 50% pour les bactéries, d'autres microorganismes peuvent être impliqués dans ce processus, elles agissent souvent sous forme de consortiums. Il faut savoir comme le signalent Das et Chandran., (2011) qu'il est difficile de trouver des bactéries qui dégradent isolément toutes les fractions de pétrole brut.

Les hydrocarbures monoaromatiques, en particulier le benzène, sont des composés mutagènes et reprotoxiques. Le toluène et le benzène sont considérés comme les plus récalcitrants, ce qui les rend très difficiles à oxyder à la fois chimiquement et biologiquement. Ces composés servent de sources de carbone et d'énergie pour les bactéries aérobies qui cultivent du nitrate, du manganèse, du fer sérique, du sulfate ou de l'O₂ comme seul accepteur d'électrons (Chakraborty et Coates, 2004). Ce constat est confirmé par les travaux de Hunkeler *et al.*, en 2002 qui montrent que les oxydants ajoutés sont presque complètement consommés durant la dernière année de bioremédiation *in situ* et Fe (II), Mn (II) et CH₄ dissous détectés (Tab. 19). La disponibilité des oxydants limitait probablement le taux de biodégradation totale dans la zone de source au cours de la dernière période de bioremédiation *in situ* cependant, le flux total d'hydrocarbures pétroliers dissous est passé de 5 mol / j au début à 0,2 mol / j à la fin de l'étude (Hunkeler *et al.*, 2002).

Tableau19. Taux d'approvisionnement (F) et taux de consommation (AF) des espèces impliquées dans les processus microbiens dans le sous-sol (Hunkeler *et al.*, 2002). Tous les approvisionnements sont en mol / j. - : non déterminé. NO₃⁻: Nitrate. Mn(II): Manganese. Fe(II): fer sérique. SO₄²⁻: Sulfate. PHC: Hydrocarbures pétroliers.

Composés Années	O ₂		NO ₃ ⁻		Mn(II)	Fe(II)	SO ₄ ²⁻		CH ₄	PHC
	F	ΔF	F	ΔF	ΔF	ΔF	F	ΔF	ΔF	ΔF
1993	32	-26	89	-80	1.0	5.6	17	-5.6	19	0.5
1994	17	-15	24	-21	0.8	8.1	12	-9.2	19	-
1995	16	11	21	-10	0.1	2.4	10	-2.6	7.8	0.2
1996	21	-14	22	-7	0.4	3.5	10	-1.5	7.8	0.2
1997	20	-13	22	-7	0.3	3.9	10	-2.2	5.8	-

Dix souches de bactéries omniprésentes dans des conditions ordinaires et capables de dégrader *in vitro* du benzène et du toluène ont été caractérisées et identifiées grâce à MALDI-TOF et affiliées à 4 familles: *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae* et *Enterococcaceae*.

Le benzène et le toluène ajoutés ont été complètement éliminés par toutes nos souches après moins de 30 jours avec l'apparition d'un seul composé dans notre eau, le cyclohexane. C'est une hydrogénation, avec des concentrations différentes, qui peut s'expliquer par le fait que chacune de nos bactéries dégrade non seulement le benzène ou le toluène mais aussi leurs dérivés. Ce résultat n'est pas soutenu par Widdel et Rabus, (2001) montrent que les microorganismes dégradent le toluène en le transformant en CO₂ et en H₂O. En revanche ces auteurs montrent qu'en dégradant le toluène, la croissance des micro-organismes est plus rapide que pendant la dégradation d'autres hydrocarbures aromatiques. Tout en sachant que

l'hydrogénation du benzène ne peut se faire que dans des conditions de température, de pression et de catalyseur spécifiques. Nous montrons que le benzène est complètement transformé en cyclohexane dans des conditions normales, la concentration de cyclohexane diminue avec le temps sans formation d'autres produits secondaires toxiques.

Ce constat est similaire à celui signalé par Scow et Hicks en 2005 ainsi que Kao et Prosseren 2001. Ces auteurs montrent aussi que la biodégradation est naturellement améliorée en fournissant des nutriments, des accepteurs d'électrons et des microorganismes dégradant les hydrocarbures aromatiques.

Kao et Prosser ont adopté en 2001, pour une approche de flux de masse pour calculer la réduction jusqu'à 87% des isomères du benzène, du toluène, de l'éthylbenzène et du xylène dissous (BTEX) dans un site pollué par des déversements d'essence. Les résultats montrent que la biodégradation naturelle était la principale cause de réduction d'environ 88% de la masse du BTEX avec des taux d'atténuation variant entre 0,036 et 0,025% / jour.

Cependant, selon Jufeng *et al*, la concentration d'un mélange d'hydrocarbures monoaromatiques dans un milieu joue un rôle important dans la rapidité de la biodégradation. Avec une concentration d'environ 30 mg / kg d'un mélange d'hydrocarbures monaromatiques, tous ceux-ci sont biodégradés en 20 jours. Cependant, plus la concentration d'un mélange augmente, plus la biodégradation du benzène est lente alors que pour le toluène elle reste rapide. Avec une concentration de 300 mg / kg, pratiquement 100% du toluène se dégrade en 50 jours alors que seulement 31% du benzène le sera (Jufeng *et al.*, 2007).

On a montré qu'après 4 semaines, le toluène est complètement consommé et le cyclohexane apparaît comme un produit secondaire sauf que, comparé aux résultats de la dégradation du benzène, nous remarquons que les niveaux de concentration dans les eaux polluées par le benzène sont beaucoup plus élevés que ceux des eaux polluées au toluène. La dégradation du toluène par nos souches était plus rapide qu'avec le benzène. Après un traitement de 4 semaines par la souche S1663 *Enterococcus faecalis*, le taux de cyclohexane résultant du benzène est de 0,0964 µg / µl, tandis que celui provenant du toluène est de 0,0183 µg / µl. Après 60 jours, les souches S1687 *Serratia marcescens* et S1671 *Acinetobacter baumannii* dégradent le benzène, le transforme en cyclohexane à des concentrations respectives de 0,0746 et 0,0705 µg / µl alors qu'elles consomment complètement le toluène et ces dérivés.

Guermouche a étudié en 2014 la biodégradation des hydrocarbures pétroliers par les bactéries, il a identifié 4 souches dont 3 appartiennent aux genres: *Pseudomonas*, *Serratia* et

Acinetobacter. Ces dernières ont été adaptées à un environnement complexe pour servir comme le montrent Kim et Picardal, en 2000 en bioremediation des zones contaminées par les hydrocarbures.

Plusieurs consortiums ont été étudiés par Deppe et *al.*, en 2005 qui classent *Pseudomonas* parmi les bactéries prédominantes (Fig. 38).

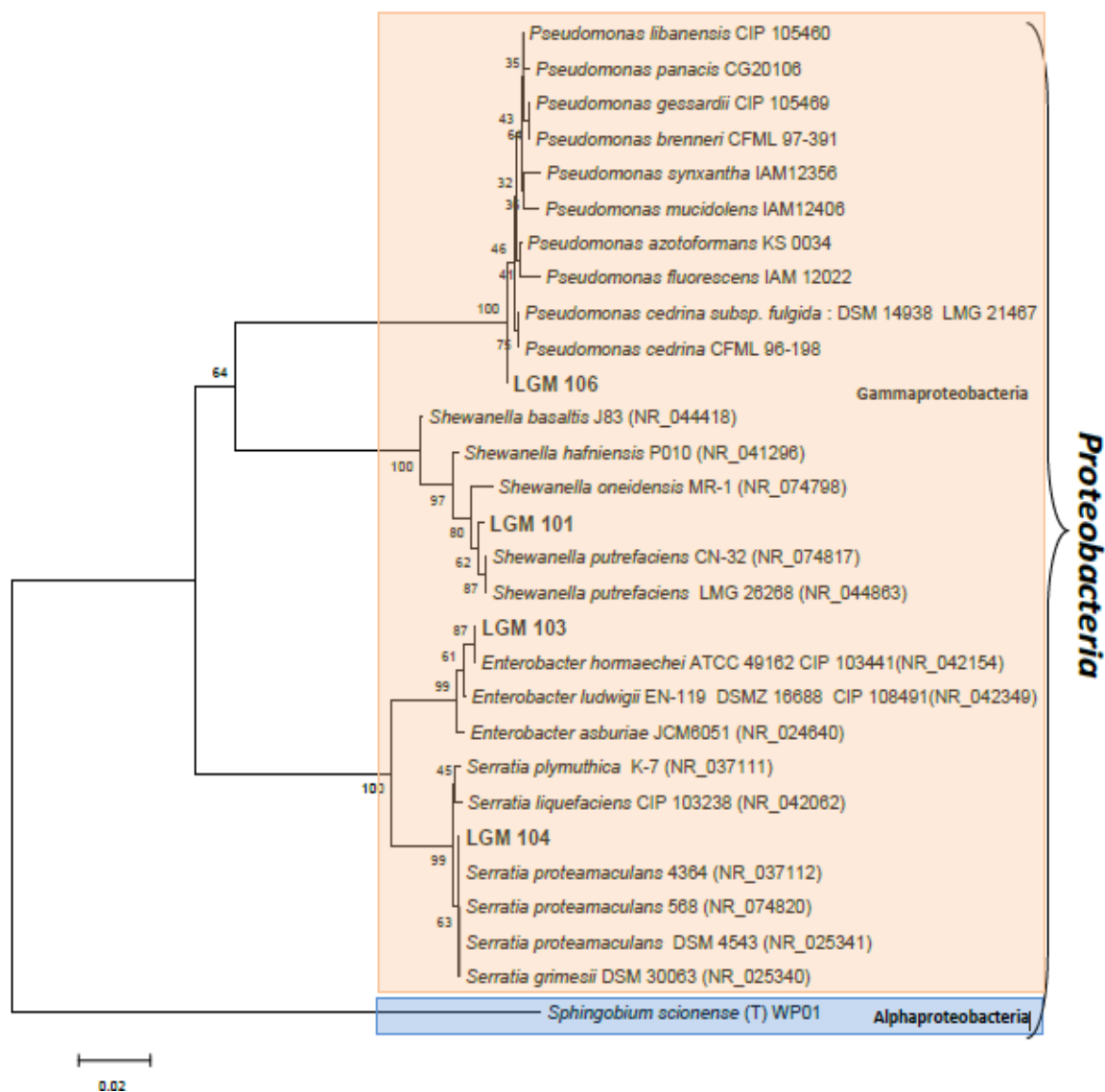


Figure 38: Arbre phylogénétique par la méthode Neighbor-joining (2010) basée sur les séquences s'ARNr 16S des souches du consortium bactérien responsable de la biodégradation des hydrocarbures pétroliers selon Guermouche, (2014).

Zhengzhi *et al* en 2010, qui ont travaillé sur la caractérisation et le potentiel biotechnologique des bactéries dégradant le pétrole, ont trouvé 25 germes dans des isolats contaminés par du gazoil, utilisé comme seule source de carbone et d'énergie. Basé sur les gènes 16S des isolats un arbre phylogénétique a été construit par la méthode de Neighbor-joining (2010) (Fig. 39). Les isolats ont été rassemblés en 2 groupes principaux

Proteobacteria et *Firmicutes*, 5 isolats composent le groupe de *Proteobacteria*, ils se rapportent aux genres *Pseudomonas*, *Enterobacter* et *Acinetobacter*.

Les isolats appartenant aux *Proteobacteria* comprennent des bactéries apparentées à l'*Acinetobacter* et à l'*Enterobacter*, certaines bactéries de ces genres dégradent les composés pétroliers, 2 d'entre elles sont apparentées à *Pseudomonas aeruginosa*. Ce genre est connu par des espèces dotées d'un rendement élevé pour dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les alcanes.

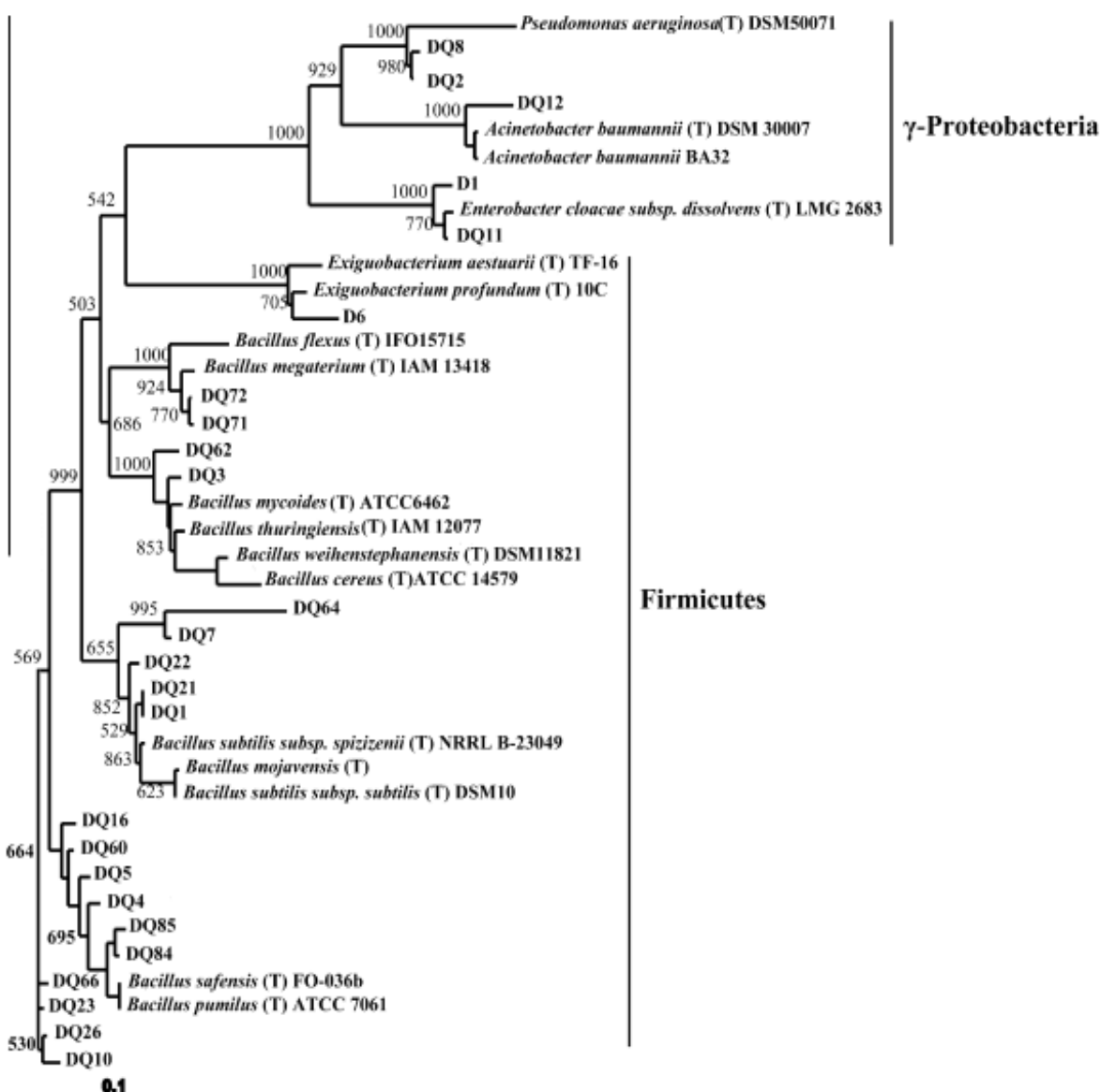


Figure 39: Arbre phylogénétique par la méthode Neighbor-joining (2010) basée sur les séquences d'ARNr 16S des souches isolées des sols contaminés par du pétrole (Zhengzhi *et al.*, 2010).

L'activité de biodégradation est controversée en effet, on trouve celle de Reinhard *et al.*, (2005) selon laquelle les taux de biodégradation du benzène par les bactéries sont

négligeables et celle d'Anderson et Lovley la même année (2005) qui indiquent que la dégradation du benzène en 25 jours. Nous montrons que la souche S1663 *Enterococcus faecalis* dégrade le benzène beaucoup moins rapidement que le cyclohexane, comme le montrent les concentrations de 0,0964 µg / µl après 30 jours et de 0,0446 µg / µl après 63 jours.

Grbic-Gralic et Vogel en 1987 observent le même effet avec la S05 *Citrobacter freundii* et la S476 *Citrobacter youngae*, ces souches ont des difficultés à métaboliser le benzène, mais dégradent plus facilement le cyclohexane. Ces auteurs constatent 2 faits:

- la biodégradation totale du benzène se produit uniquement en l'absence de tout autre substrat carboné et
- lorsque d'autres hydrocarbures monoaromatiques sont présents avec des quantités plus élevées que le benzène, la dégradation du benzène n'a pas lieu.

Ces constats montrent que les bactéries ne dégradent le benzène qu'en dernier recours car c'est le polluant le plus résistant comme le rappellent Grbic-Gralic et Vogel (1987) dans presque toutes leurs études de terrain, en tant que cancérigène le plus toxique. Pour le reste des bactéries retenues, la S02 *Klebsiella oxytoca*, la S1687 *Serratia marcescens*, la S1664 *Klebsiella pneumonia* et la S1850 *Pseudomonas aeruginosa*, mènent à une élimination partielle mais considérable du cyclohexane et totale du benzène.

Conclusion

On peut dire que les eaux provenant des 3 points de rejets industriels de la raffinerie de Skikda présentaient entre 2008 et 2012 une forte pollution. Après la mise en service de la nouvelle station S-1101-ETP2 en 2014, on note un retour aux normes réglementaires des températures, pH et conductivités de ces eaux.

Notre démarche se démarque des approches classiques basées sur l'isolement de souches pures sur milieux sélectifs, dont on connaît les limites puisque moins de 5% des espèces bactériennes sont cultivables.

La performance de la dégradation aérobique du benzène et du toluène, par une série de bactéries omniprésentes dans la phase aqueuse a été expérimentée. Ce traitement biologique est fiable, il a permis l'élimination complète du benzène et du toluène avec l'apparition d'un seul dérivé le cyclohexane, dégradé à son tour sans formation d'autres composés.

Le grand défi reste l'usage de bactéries à grande échelle, pour traiter de fortes concentrations d'hydrocarbures aromatiques industriels.

L'inoculation de nos souches dans des bioréacteurs immobilisés contenant des concentrations de plus en plus élevées de benzène permettrait aux bactéries de s'adapter et de tolérer comme le signalent Shim en 1997 ou encore Shim et Yang en 1999, des concentrations élevées. Les consortiums possèdent une efficacité de dégradation des hydrocarbures supérieure à celle des souches isolées. Les co-cultures auraient sans doute des applications très prometteuses dans le traitement des eaux contaminées par les rejets industriels en améliorant la productivité des stations d'épurations et contenir ainsi les dégâts sur l'environnement.

Au cours de cette thèse, nous avons bien mis en évidence une série de bactéries capable de dégrader les HAP, et montré que les bactéries dégradant les HAP dans l'eau étaient très mal connues. En effet, une des perspectives de ce travail serait d'entreprendre le séquençage métagénomique de chaque souche pour obtenir des informations sur le génome des espèces majoritaires impliquées dans la dégradation des HAP.

En employant les techniques de séquençage de nouvelle génération, on pourrait concevoir un volume de séquences suffisant pour reconstituer une partie du génome des acteurs majoritaires de la dégradation du phénanthrène. Ces données serviraient de base à des études approfondies des gènes cataboliques spécifiques du métabolisme des HAP, sans même avoir isolé les bactéries auxquelles ils appartiennent. En outre, ces résultats constitueraient une base de données précieuse pour l'identification, par l'approche protéomique, de souches

encore mal connue. Par ailleurs, l'exploration de la diversité bactérienne que nous avons mise en œuvre à quasi exclusivement ciblé des microorganismes capables de dégrader des HAP facilement bioaccessibles.

D'un point de vue appliqué, les résultats que nous avons obtenus permettraient de développer des outils de diagnostic et de suivi des eaux contaminés par les HAP. Connaissant les espèces des bactéries dégradant les HAP, on peut envisager de les détecter *in situ* par une approche d'hybridation *in situ* par une sonde fluorescente (FISH) ou par qPCR en fonction des conditions environnementales: changements de température au cours des saisons, salinité des eaux en hiver, apports en O₂ et en nutriments par les roseaux. Appliqué à la gestion des bassins de retentions des eaux de chaussée, un tel suivi permettrait de mieux comprendre le système de traitement des eaux contaminées et d'améliorer l'efficacité du traitement par bioremédiation.

Perspectives:

Les études sur la biodégradabilité des polluants organiques persistants et fortement toxiques, ont pour but d'apporter des solutions efficaces en cas de catastrophes accidentelles et de répondre à une série de questions, tels que: quelle sera la qualité des eaux rejetées par ces installations vis-à-vis de la contamination des milieux récepteurs naturels, et donc dans la faune et la flore aquatiques et marines? Quel est le devenir de ces polluants dans la colonne d'eau, le sédiment, la faune, la flore et dans la chaîne alimentaire ? Quel est l'impact sur la santé publique ?

Raison pour la quelle, il nous paraît intéressant de développer en perspective les 10 points suivants, afin d'éviter les contraintes que l'élimination des déchets pourrait faire peser sur l'environnement et les coûts qu'elle entraîne et pour encourager une gestion plus avisée des ressources peu abondantes:

1. la mise en place des locaux spécialisés dans le traitement des substances classées prioritaires dit micropolluants, tels que les hydrocarbures aromatiques, et encourager le personnel à recevoir des formations. La formation et l'instruction du personnel sont essentielles pour agir efficacement en cas d'épisode de déversement;
2. S'équiper de matériels nécessaires tels que les barrages d'épandages de produits absorbant, pour retenir les hydrocarbures;
3. la conception d'équipements plus sûrs, fiables et performants;
4. l'inspection et la maintenance des installations;
5. l'usage d'équipements de contrôle et de surveillance permettant la détection rapide des dysfonctionnements et notamment des fuites;
6. le choix de modes de transport et d'itinéraires minimisant les risques d'accidents;
7. Le contrôle d'un éventuel épisode de déversement, pour cela, des barrières de contention sont utilisées. Ce sont des dispositifs flottant qui dévient les tâches pour éviter que l'hydrocarbure s'attaque à des zones sensibles pour ainsi contenir et concentrer l'hydrocarbure déversé afin de faciliter sa récupération;
8. Il faut avoir une bonne vision des relations entre la composition bactérienne d'une microflore et son aptitude de dégrader le polluant;
9. Orienter les recherches vers l'élimination des Hydrocarbures aromatiques par les bioprocédés, surtout les bactéries, est essayer de cultiver son propre microflore.

Enfin, nous devons sensibiliser toute la population aux risques industriels. Cette culture doit être partagée par tous et est notamment renforcée par la mobilisation des équipes lors

d'exercices de crise grandeur nature. Il s'agit bien entendu de remédier aux pollutions existantes, mais également d'anticiper et d'éviter les sources de pollutions à venir afin de préserver l'environnement et la santé publique.

RESUMES

Résumé

Les hydrocarbures aromatiques poly ou monocycliques sont des composés ubiquitaires issus de la combustion incomplète de matières organiques. Surtout générés par l'exploitation des produits pétroliers, ils sont à l'origine de pollutions de l'environnement, car ce sont des composés toxiques pour les êtres vivants et pour l'homme en particulier. De nombreuses bactéries capables de dégrader les HA ont été isolées et étudiées, mais celles qui les dégradent *in situ* sont mal connues. En effet, moins de 5% des bactéries dotées du pouvoir biodégradable sont cultivables en laboratoire. Le premier objectif de cette étude était d'identifier les bactéries qui dégradent les HA dans l'eau. L'approche adoptée est l'évaluation de l'efficacité de la bio remédiation *In Vitro*. Comme mesure de suivi pour éliminer les hydrocarbures aromatiques contenus dans les rejets industriels. Les travaux ont ciblé une série de bactéries ubiquistes préalablement habiles à dégrader le benzène. L'identification des bactéries utilisées a été faite par la technique MALDI-Tof (Bruker Daltonics). Ces bactéries ont été inoculées dans de l'eau de mer stérile contaminée par le benzène pure (pureté 99.98%) pendant 63 jours, incubées à température ambiante avec une oxygénation continue. L'analyse par GC/MS HP6890/ HP 5973 MS (Agilent Technologies) a permis d'apprécier l'évolution de la concentration du benzène et ses dérivés. Le benzène a totalement été éliminé en moins de 30 jours.

Mots clés : Hydrocarbures Aromatiques, benzène, bactéries ubiquistes, biodégradation, élimination

Abstract

Poly or monocyclic aromatic hydrocarbons are ubiquitous compounds resulting from the incomplete combustion of organic materials. Mostly generated by the exploitation of petroleum products, they are at the origin of environmental pollution, because they are toxic compounds for living beings and particularly for humans. Many bacteria capable of degrading HA have been isolated and studied, but those that degrade them in situ are poorly known. In fact, less than 5% of bacteria with biodegradable power are cultivable in the laboratory. The first objective of this study was to identify bacteria that degrade HA in water. The approach adopted is the evaluation of the effectiveness of In Vitro bio remediation. As a follow-up measure to eliminate aromatic hydrocarbons contained in industrial discharges. The work targeted a series of ubiquitous bacteria previously able to degrade benzene. Identification of the bacteria used was made by the MALDI-Tof technique (Bruker Daltonics). These bacteria were inoculated in sterile seawater contaminated with pure benzene (99.98% purity) for 63 days, incubated at room temperature with continuous oxygenation. GC / MS analysis HP6890 / HP 5973 MS (Agilent Technologies) allowed to evaluate the evolution of the concentration of benzene and its derivatives. Benzene was totally eliminated in less than 30 days.

Keywords: Aromatic hydrocarbons; benzene; ubiquitous bacteria; biodegradation; GC / MS HP6890 / HP 5973 MS (Agilent Technologies); MALDI-Tof (Bruker Daltonics).

Références Bibliographiques

References bibliographiques

- Anderson R T, Lovely D R (2000). Anaerobic bioremediation of benzene under sulfate-reducing conditions in a petroleum contaminated aquifer. *Environmental Science and Technology*.34, 2261-2266.
- A.N.P.A (1994). Monographie de la Wilaya de Skikda. 186p.
- ATSDR (2007). Agency for Toxic Substance and Disease Registry. Toxicological Profile For Xylene. Atlanta. GA.438.
- Avril JL, Dabernat H, Dens F, Monteil H, Piemonty Y, Le faou A, Jaulhac B, Riot B (1992). Bactériologie clinique. 2^{ème} Edition, Paris, Editeur des préparations grandes écoles médecine. N°32. 522p.
- Bertrand AR, Briant J, Castela A, Degobert P, Gatellier C, Masson M, Oudin JL, Poittier J (1972). Preservation et lutte contre la pollution au cours des opérations de forages et de production en mer. *Oil and gas Energy Booksellersince*.
- Bertrand A R, Mille G (1989). Devenir de la matière organique exogène. Un modèle: les hydrocarbures. In *Microorganismes dans les écosystèmes océaniques*. Bianchi M. Paris: Masson. pp. 343-385.
- Benjamin, S. R., de Lima, F. et Rathoure, A. K. (2015). Genetically engineered microorganisms for bioremediation processes: GEMs for bioremediation. Dans A. K. Rathoure et V. K. Dhatwalia (dir.), *Toxicity and Waste Management Using Bioremediation* (p. 113).
- Boonchan S, Britz ML, Stanley GA (2000). Degradation and mineralization of highmolecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1007-1019.
- Bouhayene S (2002). Contribution à la contamination des herbiers a *Posidonia oceanic* dans la baie d'Annaba Est-Algérien: Phénologie, biomasse, lepidochronologie et production primaire. Thèse de Magister. Université Badji Mokhtar- Annaba-Algérie. 151p.
- Canganella F, Wiegel J (2011). Extremophiles: From abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. *Naturwissenschaften*, 98(4), 253-279.
- Cerniglia CE (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3: 351-368.
- Chakraborty R, Coates JD (2004). Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Applied Microbiology Biotechnology*. 64, 437-446.
- Chikere CB, Okpokwasili GH, Chikere BO (2011). Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. *Biotechnol.*1:117-138.
- Dandie CE, Thomas SM, Bentham RH, McClure NC (2004). Physiological characterization of *Mycobacterium sp.* Strain 1B isolated from bacterial culture able to degrade high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Appl. Microbiol.* 97: 246-255.
- Das N, Chandran P (2011). Microbial degradation et petroleum hydrocarbons contaminants: An overview. *Biotechnol. Res.Int.* Article ID 941810, 13p.
- Deppe U, Richnow HH, Michaelis W, Antranikian G (2005). Degradation of crude oil by an arctic microbial consortium. *Extremophiles*. 9(6): 461-70.

- Descy J, Meex C, Melin P, Hayette PM, Huynen P, De Mol P (2010). Mass spectrometry MALDI-TOF in clinical bacteriology or how to identify a bacterium in one minute. *Revue Medicale de Liege*. 65: 29-34.
- Diaz E (2004). Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *Int. Microbiol.* 7: 173-180.
- Doyle E, Muckian L, Hickey AM, Clipson N (2008). Microbial PAH degradation. *Adv. Appl. Microbiol.* 65: 27-66.
- Drancourt M (2010). Detection of microorganism's in blood specimens using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clinical Microbiology and infection*. Jun 8.
- Epstein SS, Bollmann A, Lewis K (2007). Incubation of environmental samples in a diffusion chamber increases the diversity of recovered isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 6386-6390.
- Erikson M, Sodersten E, Yu Z, Dalhammar G, Mohn WW (2003). Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons at Low Temperature under aerobic and Nitrate-Reducing conditions in Enrichment culture from Northern soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(1): 275-284.
- Fagerquist C K, Garbus B R, Miller WG, Williams KE, Yee E, Bates A H., et al (2010). Rapid identification of protein biomarkers of *Escherichia coli* O157:H7 by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight-time-of-flight mass spectrometry and top-down proteomics. *Analytical Chemistry*. 82, 2717–2725.
- Farhadian M, Larroche C, Borghei M, Troquet J, Vachelard C (2006). Bioremediation of BTEX-contaminated groundwater through bioreactors, 4^{ème} colloque Franco-Roumain de chimie appliquée. Université Blaise Pascal. Clermont-Ferrand. France. 28 June-2 July 2006. P. 438.
- Farhadian M, Vachelard C, Duchez D, Larroche C (2008). In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater. *Bioresouce Technology* .99. 5296-5308.
- Fierer N, Bradford MA, Jackson RB (2007). Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88: 1354-1364.
- Fritsche W and Hofrichter M (2008). Aerobic degradation by microorganisms, *Biotechnology Set, Second Edition*, pp. 144-167.
- George KW, Hay AG (2011). Bacterial Strategies for Growth on Aromatic Compounds. *Adv. Appl. Microbiol.* 74: 1-33.
- Gibson J, Harwood CS (2002). Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 345-369.
- Gogarten J P, Doolittle W F, Lawrence J G (2002). Prokaryotic evolution in light of gene transfer. *Molecular Biology and Evolution*, 19(12), 2226-2238.
- Gordian C, Obute C, Osuji L, Kalio C (2004). Genotoxicity of petroleum refinery waste water in Nigeria. *Global Journal of Environmental Sciences*. vol. 3 (1 et 2). p. 55-58.
- Grbic-Galic D, Vogel T M (1987). Transformation of Toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. *Applied Environmental Microbiology*. 53, 254-260.
- Gueddah D (2003). Evaluation de la pollution industrielle et urbaine dans la région de Skikda ; Impact sur écosystème marin côtier. Thèse de Magister. Université Badji Mokhtar. Annaba. Algérie. 114p.

- Hamidi S (1997). Conception et objectif du réseau de surveillance de la qualité des eaux de baignade. Premier Atelier Régional Est sur la surveillance de la qualité des eaux de baignade. El Taref. 14p.
- Heider J, Spormann A M, Beller H R, Widdel F (1999). Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *F.E.M.S. Microbiology Reviews*. 22: 459-473.
- Hillenkamp F, Karas M, Beavis R C, Chait B T (1991). Matrix-Assisted laser desorption/ionization Mass spectrometry of biopolymers. *Analytical Chemistry*.63,1193A.
- Hugenholtz P (2002). Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biol*. 3: reviews0003-reviews0003.8.
- Hunkeler D, Hohener P, Zeyer J (2002). Engineered and subsequent intrinsic in situ bioremediation of a diesel fuel contaminated aquifer. *Journal of Contaminant Hydrology*.59, 231-245. [https://doi.org/10.1016/S0169-7722\(02\)00059-1](https://doi.org/10.1016/S0169-7722(02)00059-1).
- Janssen PH (2006). Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol*. 72: 1719-1728.
- Johnsen AR, Wick LY, Harms H (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil *Environ. Pollut*. 133: 71-84.
- JORA (2006). Journal Officiel de la République Algérienne. Décret ministériel n°06-141., du 19 avril 2006 définissant les valeurs limites des rejets d'effluents liquides industriels.
- Jouanneau Y, Willison JC, Meyer C, Krivobok S, Chevron N, Besombes J *et al* (2005). Stimulation of pyrene mineralization in freshwater sediments by bacterial and plant bioaugmentation. *Environ. Sci. Technol*. 39: 5229-5235.
- Jouanneau Y, Willison JC, Rodarie D (1999). Dégradation microbiologique des hydrocarbure aromatiques polycycliques. *Rapport pour l'Agence de l'Environnement et de la Maitrise de l'Energie, CEA Grenoble*.
- Juhasz AL, Naidu R (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of microbial of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 45: 57-88.
- Junfeng D, Xiang L, Zhifeng H (2007). Anaerobic BETX degradation in soil bioaugmented with mixed consortia under nitrate reducing conditions. *Journal of Environmental Sciences*. 20. 2008.585-592.
- Kao CM, Prosser J (2001).Evaluation of naturel attenuation rate at a gasoline spill site. *Journal of Hazardous Materials*.82, 275-289.
- Khodaei K, Nassery HR, Asadi MM, Mohammadzadeh H, Mahmoodlu MG (2017). BTEX biodegradation in contaminated groundwater using a novel strain (*Pseudomonas sp.*BTEX-30).*International Biodeterioration and Biodegradation*.116,234-242.
- Kim S, Picardal FW (2000). A novel bacterium that utilizes monochlorobiphenyls and 4-chlorobenzoate as growth substrates. *FEMS Microbiol*. 185 (2): 225-9.
- Lan H T (2009). Electrochemical destruction of polycyclic aromatic hydrocarbons contained in highly contaminated matrices. PhD thesis. University of Quebec.Canada, 73-79.

- Law AMJ, Aitken MD (2003). Bacterial chemotaxis to naphthalene desorbing from a nonaqueous liquid. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5968-5973.
- L.E.M. (1998). Etude d'impact sur l'environnement du dragage de l'ancien port de Skikda. Entreprise Portuaire de Skikda. 36p.
- Ludwig W, Klenk H-P (2001). Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. In: R.W. BDRaC (ed). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Springer-Verlag, New York, N.Y. edn. pp 49-65.
- Merabtine H, Merzoug A (1997). Salubrite des sites récréatifs marins: méthodes d'analyse microbiologique de l'eau de mer. premier Atelier Regional Est sur la surveillance de la qualité des eaux de baignade, El Taref. 13p.
- Miyata N, Iwahori K, Foght JM, Gray MR (2004). Saturable, energy-dependent uptake of phenanthrene in aqueous phase by *Mycobacterium* sp strain RJGII-135. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 363-369.
- Molina M, Gonzalez N, Bautista L, Simarro R, Sanchez I, Sanz J (2009). Isolation and genetic identification of PAH degrading bacteria from a microbial consortium. *Biodegradation*. 20(6): 789-800.
- Neelja S, Manish K, Pawan KK, Jugsharan SV (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*. 6, 791.
- Nielsen DR, McLellan PJ, Daugulis AJ (2006). Direct estimation of the oxygen requirements of *Achromobacter xylosoxidans* for aerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons (BTEX) in a bioscrubber. *Biotechnology Letters*. 28, 1293-1298.
- Niklova N, Nenov V (2005). BTEX degradation by fungi. *Water Science and Technology*. 51, 87-93.
- Obayori O S, Salam L B (2010). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Role of plasmids. *Scientific Research and Essays*, 5(25), 4093-4106.
- Ounissi M, Ferhi H, Khelifi-Touhami M (1998). Composition et abondance du zooplancton en situation d'eutrophisation dans un secteur côtier du golf d'Annaba. Algérie. *Ann. Inst. Oceanogr. Paris*. 74 (1): 13-28.
- Pardos M, Blaise C (1999). Assessment of toxicity and genotoxicity of hydrophobic organic compounds in wastewater. *Environmental Toxicity*. vol. 14. N° 2. p. 241-247.
- Parente-Feta-Boldu F X, Vervoort J, Grotenhuis JT, Van Groenestijn JW (2002). Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene (BTEX) hydrocarbons by the Fungus *Cladophialophora* sp. strain T1. *Applied Environmental Microbiology*. 68, 2660-2665.
- Paul D, Pandey G, Jain R K (2005). Suicidal genetically engineered microorganisms for bioremediation: Need and perspectives. *Bioessays*, 27(5), 563-573.
- Reinhard M, Bowman R S, Steinle-Darling E, LeBron C A (2005). In situ biotransformation of BTEX compounds under methanogenic conditions. *Ground water Monitoring and Remediation*. 25, 50-59.

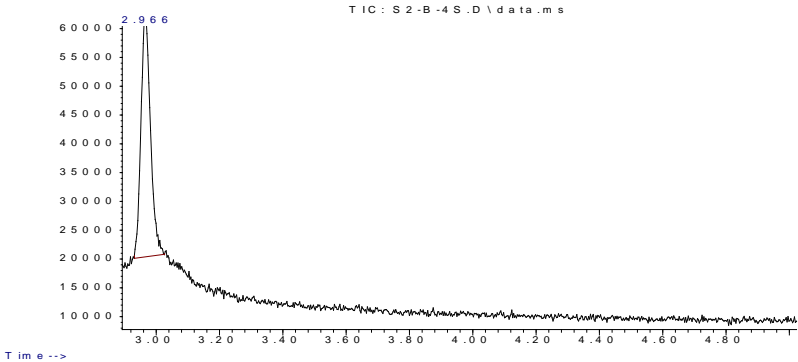
- Rentz JA, Alvarez PJJ, Schnoor JL (2005). Benzo[a]pyrene co-metabolism in the presence of plant root extracts and exudates: Implications for phytoremediation. *Environ. Pollut.* 136: 477-484.
- Rico-Martínez R, Snell T W, Shearer T L (2013). Synergistic toxicity of Macondo crude oil and dispersant Corexit 9500A® to the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera). *Environmental Pollution*, 173(5), 5-10.
- Rodier J (2009). L'Analyse de l'eau. 9^{ème} Edition. 1579p.
- Roger P, Jacq V (2000). Introduction à la bioremédiation des sols, des eaux et de l'air. Université de Provence Aix-Marseille 1. 99p.
- Rohrbacher F, St-Arnaud M (2016). Root exudation: The ecological driver of hydrocarbon rhizoremediation. *Agronomy*, 6(1): 19.
- Roland M Courteau (2011). La pollution de la Méditerranée: état et perspectives à l'horizon 2030. p115-188.
- Rouidi S, Hadjem A, Asia L, Mille G, Tahar A (2013). Sources and distribution of hydrocarbons in surface sediments of Saf-saf oued (Skikda city, northeastern Algeria). *Ann Biol. Res.* 2013,4(4): 61-69.
- Rouidi (2002). Cartographie de la pollution par les hydrocarbures totaux au niveau de la plate forme industrielle de Skikda. Thèse de Magister. Université de Constantine, 112p.
- Sait M, Hugenholtz P, Janssen PH (2002). Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environ Microbiol* 4: 654-666.
- Samanta SK, Singh OV, Jain RK (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.* 20: 243-248.
- Sandrine Mal Jean-Dubois (2002). *Chronique des faits internationaux*, RGDIP, t. 106-4, p. 951.
- Schulze S, Tiehm A (2004). Assessment of microbial natural attenuation in groundwater polluted with gasworks residues. *Water and Science Technology*.50, 347-353.
- Scow K M, Hicks KA (2005). Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater. *Current Opinion in Biotechnology*.16, 246-253. [https://doi: 10.1016/j.copbio.2005.03.009](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.03.009).
- Seo J S, Keum Y S, Li Q X (2009). Bacterial degradation of aromatic compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 6(1): 278-309.
- Shuai L, Haitao L, Tianjie Q, Xixin Y, Boli W, Jitao Guan, Yu L (2017). Comparative transcriptomics analyses of the different growth states of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 85, 564-574.
- Soucy S M, Huang J, Gogarten J P (2015). Horizontal gene transfer: Building the web of life. *Nature Reviews Genetics*, 16(8), 472-482.
- Syakti A D (2004). Biotransformation des hydrocarbures pétroliers et effets sur les acides gras phospholipidiques des bactéries hydrocarbonoclastes marines. Thèse de doctorat. Université de droit, d'Economie et des Sciences. (Aix Marseille III). Marseille France. 224 p.
- Thompson I P, Van Der, Gast C J, Ciric L, Singer, A. C (2005). Bioaugmentation for bioremediation: The challenge of strain selection. *Environmental Microbiology*, 7(7), 909-915.
- Tissot B P, Welte D H (1984). Petroleum formation and occurrence. Berlin, Heidelberg, German.

- Van Beilen JB, Li Z, Duetz WA, Smits TH, Witholt B (2003). Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil & Gas Science and Technology. Rev IFP*.58: 427-440.
- Wang Y, Jiang Q, Zhou C, Chen B, Zhao W, Song J, Xiao M (2014). *In-situ* remediation of contaminated farmland by horizontal transfer of degradative plasmids among rhizosphere bacteria. *Soil Use and Management*, 30(2), 303-309.
- White P, Rassmussen JB, Blaise C (1998). Comparing the presence, potency, and potential hazard of genotoxins extracted from a broad range of industrial effluents. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. vol. 27. N° 2. p. 116-139.
- Widdel F, Rabus R (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*. 12:259-276.
- Willison JC (2004). Isolation and characterization of a novel sphingomonad capable of growth with chrysene as sole carbon and energy source. *FEMS Microbiol Lett* 241: 143-50.
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990). Towards a natural system of organisms -proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87: 4576-4579.
- Yakimov MM, Timmis KN, Golyshin PN (2007). Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. 18(3): 257-266.
- Yang X, Beckmann D, Fiorenza S, Niedermeier C (2005). Field study of pulsed air sparging for remediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil and groundwater. *Environmental Science and Technology*. 39, 7279-7286.
- Yassaa N, Mekiaati BY, Cecinato A (1999). Evaluation qualitative des hydrocarbures aromatiques monocyclique dans l'air urbain d'Alger par deux techniques d'extraction. *Pollution atmosphérique*. n°164. p.93-102.
- Yassaa N, Cecinato A (2005). Composition of torched crude oil organic particulate emitted by refinery and its similarity to atmospheric aerosol in the surrounding area. *Chemosphere*.60:1660-1666.
- Yates J R (1998). Mass spectrometry and the age of the proteome. *Journal of Mass Spectrometry*. 33. 1–19. 10.1002.
- Yerushalmi R, Baldrige KK, Scherz A (2003). An experimental look into subelectron charge flow. *Journal of the American Chemical Society*. 125(42): 12706-7.
- Zhang Z, Gai L, Hou Z, Yang C, Ma C, Wang Z, Sun B, He Z, Tang H, Ping Xu P (2010). Characterization and biotechnological potential of petroleum degrading bacteria isolated from oil-contaminated soils. *Bioresour. Technol*. 101:8452-8456.
- Zheng ZM, Obbard JP (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbon removal from soil by surfactant solubilization and *Phanerochaete chrysosporium* oxidation. *J. Environ. Qual*. 31: 1842-1847.

Annexes

Annexe 1/ Souche 2-benzène

Abundance



Area Percent Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S2-B-4S.D
Acq On : 16 Nov 2016 10:17
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc : 45.5.10.150.2.FL0.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20
ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1

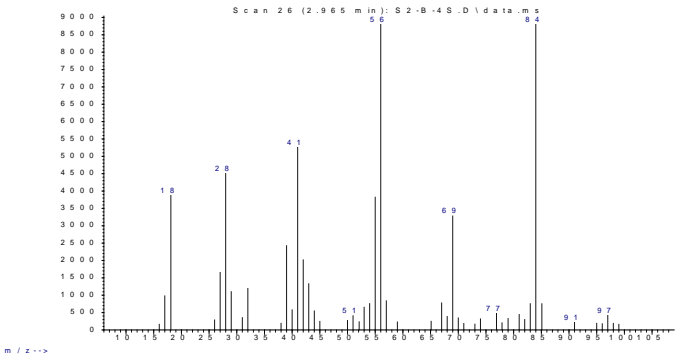
Integration Parameters: events.e
Integrator: ChemStation

Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
Title :

Signal : TIC: S2-B-4S.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. %	% of max.
1	2.968	14	27	47	BV 3	41893	883247	100.00%	100.000%

Abundance



Library Search Report

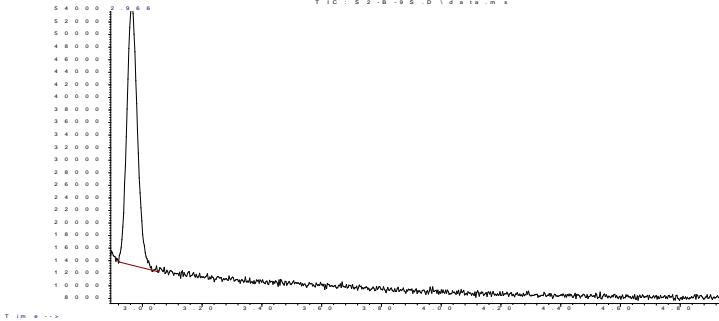
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S2-B-4S.D
Acq On : 16 Nov 2016 10:17
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc : 45.5.10.150.2.FL0.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20
ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.l Minimum Quality: 50
C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 0

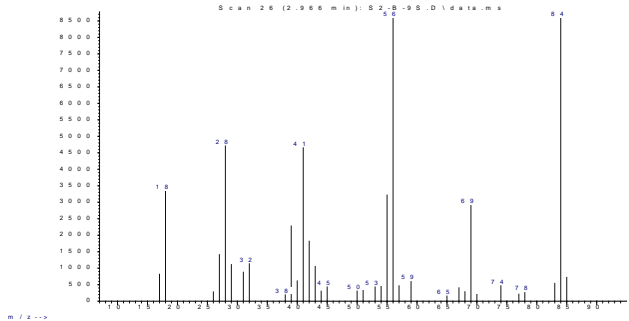
Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: Chemstation Integrator - events.e

PK#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	2.968	100.00	C:\Users\EFTQH\Desktop\biblio\wiley7n.l			
			Cyclohexane		3536 000110-82-7 93	
			Cyclohexane		3539 000110-82-7 93	
			Cyclohexane		3537 000110-82-7 90	

Abundance



Abundance



Area Percent Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S2-B-9S.D
Acq On : 16 Nov 2016 10:41
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc : 45.5.10.150.2.FL0.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20
ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1

Integration Parameters: events.e
Integrator: ChemStation
Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
Title :

Signal : TIC: S2-B-9S.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. %	% of max.
1	2.966	10	26	57	BV 4	41240	1028569	100.00%	100.000%
Sum of corrected areas:							1028569		

Library Search Report

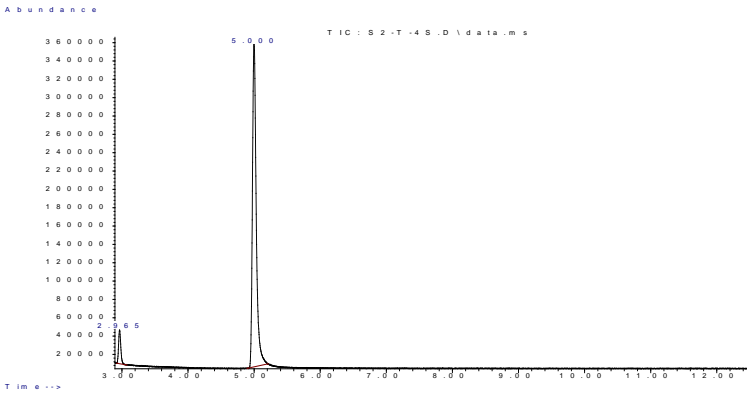
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S2-B-9S.D
Acq On : 16 Nov 2016 10:41
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc : 45.5.10.150.2.FL0.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20
ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.l Minimum Quality: 50
C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: Chemstation Integrator - events.e

PK#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	2.966	100.00	C:\Users\EFTQH\Desktop\biblio\wiley7n.l			
			Cyclohexane		3535 000110-82-7 94	
			Cyclohexane		3536 000110-82-7 93	
			Cyclohexane (CAS) \$\$ Hexanaphthene		3540 000110-82-7 93	
			\$\$ Hexamethylene \$\$ Hexahydrobenz			
DEFAULT.M Thu Nov 17 19:11:09 2016						

Annexe 2/ Souche 2- toluène

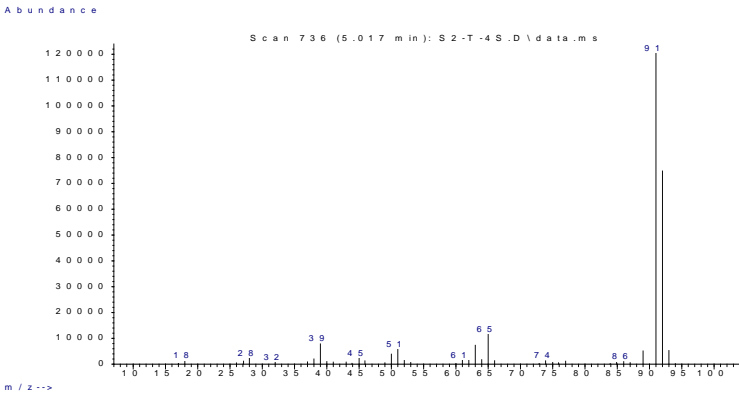


Area Percent Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
Data File : S2-T-4S.D
Acq On : 30 Nov 2016 22:34
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc :
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Integration Parameters: events.e
Integrator: ChemStation
Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
Title :
Signal : TIC: S2-T-4S.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. %	% of max.
1	2.966	11	26	59	BV 2	36501	852457	6.01%	5.671%
2	5.000	694	730	800	BV	359037	14180020	100.00%	94.329%

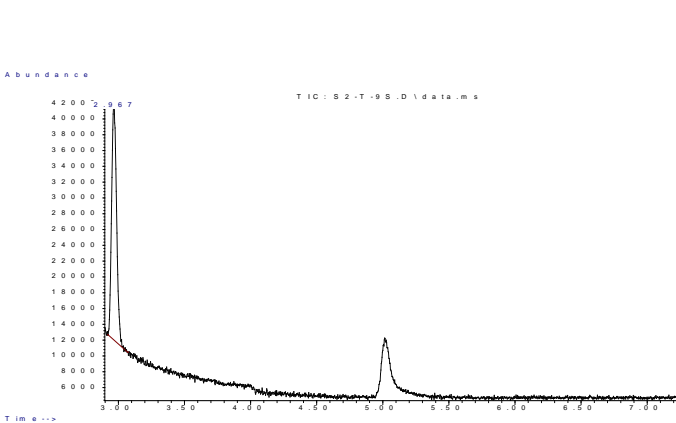
Sum of corrected areas: 15032478
DEFAULT.M Tue Dec 13 16:00:54 2016



Library Search Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
Data File : S2-T-4S.D
Acq On : 30 Nov 2016 22:34
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc :
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 50
C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.l Minimum Quality: 0
Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: Chemstation Integrator - events.e

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	2.966	5.67	C:\Users\EFTQH\Desktop\iblio\NIST02.L			
			Cyclohexane	1436	000110-82-7	93
			Cyclohexane	1433	000110-82-7	90
			Cyclohexane	1434	000110-82-7	90
2	5.000	94.33	C:\Users\EFTQH\Desktop\iblio\NIST02.L			
			Toluene	2400	000108-88-3	95

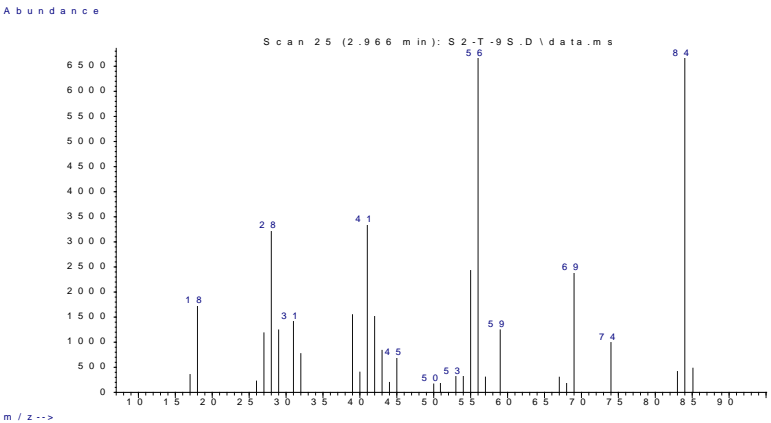


Area Percent Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
Data File : S2-T-9S.D
Acq On : 30 Nov 2016 22:53
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc :
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Integration Parameters: events.e
Integrator: ChemStation
Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
Title :
Signal : TIC: S2-T-9S.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. %	% of max.
1	2.966	9	25	61	BB 2	30044	781672	100.00%	100.000%

Sum of corrected areas: 781672
DEFAULT.M Tue Dec 13 16:04:26 2016



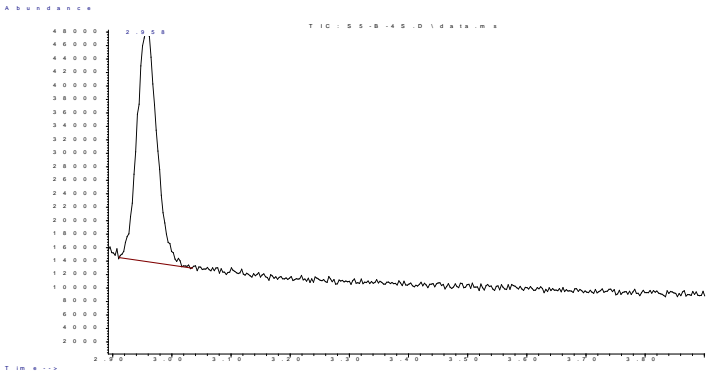
Library Search Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
Data File : S2-T-9S.D
Acq On : 30 Nov 2016 22:53
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc :
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 50
C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.l Minimum Quality: 0
Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: Chemstation Integrator - events.e

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	2.966	100.00	C:\Users\EFTQH\Desktop\iblio\NIST02.L			
			Cyclohexane	1434	000110-82-7	81
			Cyclohexane	1433	000110-82-7	81
			Cyclohexane	1436	000110-82-7	81

DEFAULT.M Tue Dec 13 16:04:23 2016

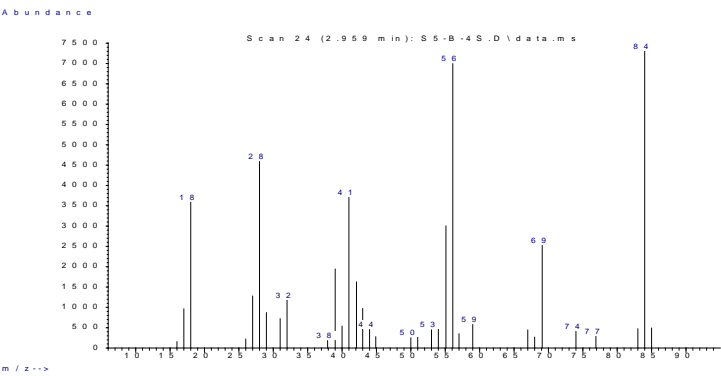
Annexe 3/ Souche 5-benzène



Area Percent Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S5-B-4S.D
Acq On : 16 Nov 2016 11:52
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc : 45.5.10.150.2.FL0.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20
ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1
Integration Parameters: events.e
Integrator: ChemStation
Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
Title : Signal : TIC: S5-B-4S.D\data.ms
peak R.T. first max last PK peak corr. corr. % of
min scan scan scan TY height area % max. total

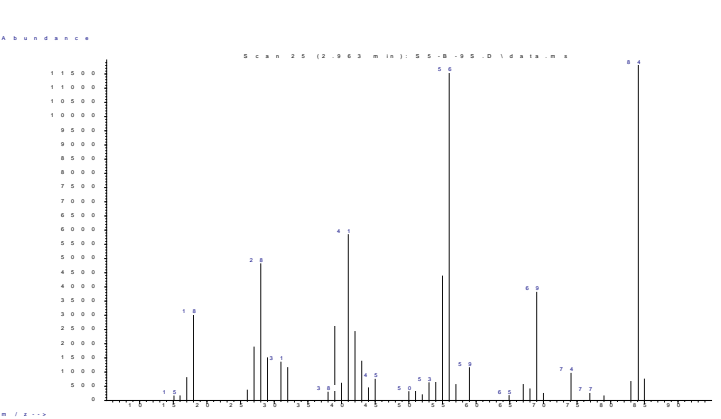
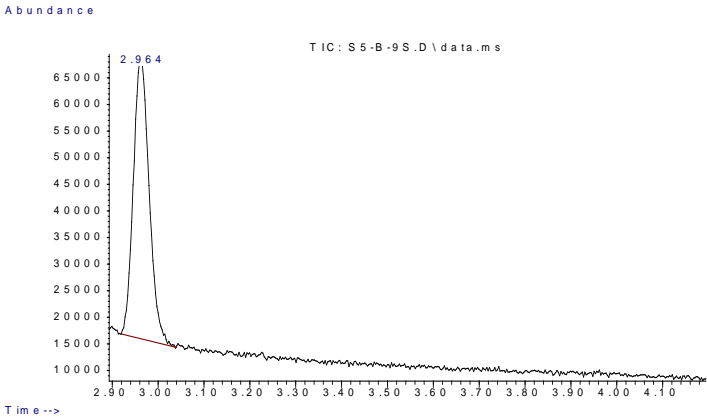
1 2.959 8 24 50 BV 3 34313 814396 100.00% 100.000%
Sum of corrected areas: 814396
DEFAULT.M Thu Nov 17 19:14:05 2016



Library Search Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S5-B-4S.D
Acq On : 16 Nov 2016 11:52
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc : 45.5.10.150.2.FL0.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20
ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1
Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.1 Minimum Quality: 50
C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 0
Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: Chemstation Integrator - events.e
Pk# RT Area% Library/ID Ref# CAS# Qual

1 2.959 100.00 C:\Users\EFTQH\Desktop\iblio\wiley7n.1
Cyclohexane (CAS) \$\$ Hexanaphthene 3540 000110-82-7 93
\$\$ Hexamethylene \$\$ Hexahydrobenz
ene \$\$ Benzene, hexahydro- \$\$ Cicl
oesano \$\$ Cyclohexaan \$\$ Cyclohexa
n \$\$ Cykloheksan \$\$ Rcra waste num
ber U056 \$\$ UN 1145



Library Search Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S5-B-9S.D
Acq On : 16 Nov 2016 12:47
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc : 45.5.10.150.2.FL0.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20
ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1
Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.1 Minimum Quality: 50
C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 0
Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: Chemstation Integrator - events.e

Pk# RT Area% Library/ID Ref# CAS# Qual

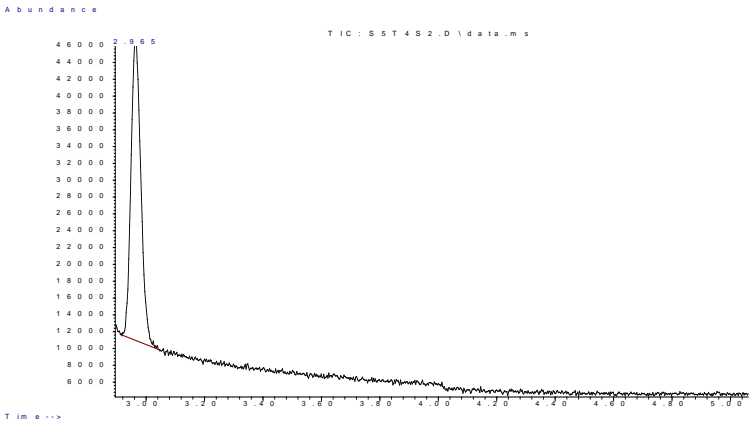
1 2.963 100.00 C:\Users\EFTQH\Desktop\iblio\wiley7n.1
Cyclohexane 3535 000110-82-7 93
Cyclohexane (CAS) \$\$ Hexanaphthene 3540 000110-82-7 93
\$\$ Hexamethylene \$\$ Hexahydrobenz
ene \$\$ Benzene, hexahydro- \$\$ Cicl
oesano \$\$ Cyclohexaan \$\$ Cyclohexa
n \$\$ Cykloheksan \$\$ Rcra waste num
ber U056 \$\$ UN 1145
Cyclohexane 3539 000110-82-7 93
DEFAULT.M Thu Nov 17 19:16:31 2016

Area Percent Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S5-B-9S.D
Acq On : 16 Nov 2016 12:47
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc : 45.5.10.150.2.FL0.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20
ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1
Integration Parameters: events.e
Integrator: ChemStation
Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
Title :
Signal : TIC: S5-B-9S.D\data.ms
peak R.T. first max last PK peak corr. corr. % of
min scan scan scan TY height area % max. total

1 2.963 10 25 52 BV 2 53152 1267312 100.00% 100.000%
Sum of corrected areas: 1267312
DEFAULT.M Thu Nov 17 19:16:27 2016

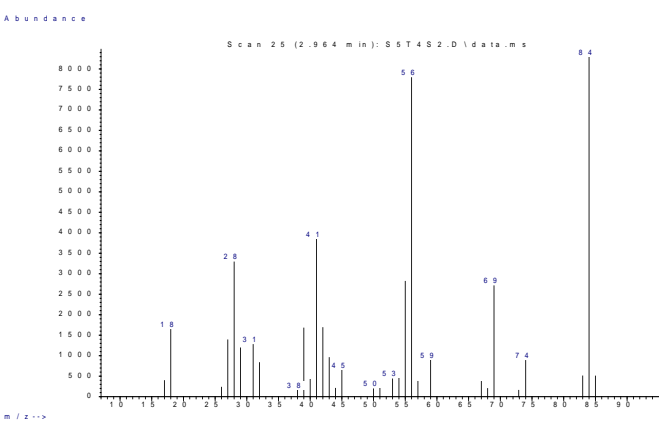
Annexe 4/ Souche 5-toluène



Area Percent Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
Data File : S5T4S2.D
Acq On : 1 Dec 2016 00:24
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc :
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Integration Parameters: events.e
Integrator: ChemStation
Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
Title :
Signal : TIC: S5T4S2.D\data.ms
peak R.T. first max last PK peak corr. corr. % of
min scan scan scan TY height area % max. total

1 2.966 9 26 56 BB 3 35931 845349 100.00% 100.000%
Sum of corrected areas: 845349
DEFAULT.M Thu Mar 08 11:40:45 2018

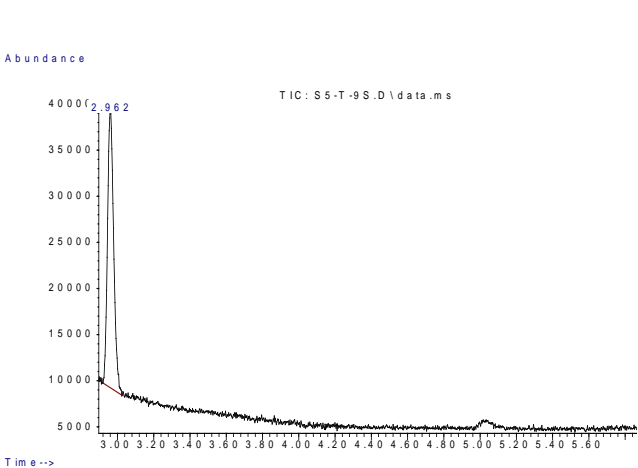


Library Search Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
Data File : S5T4S2.D
Acq On : 1 Dec 2016 00:24
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc :
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.1 Minimum Quality: 50
C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: Unknown
Spectrum: Apex
Integration Events: Chemstation Integrator - events.e
Pk# RT Area% Library/ID Ref# CAS# Qual

1 2.966 100.00 C:\Users\EFTQH\Desktop\iblio\wiley7n.1
Cyclohexane \$\$ Benzene, hexahydro- 3538 000110-82-7 90
\$\$ Hexahydrobenzene \$\$ Hexamethyl
ene \$\$ Hexanaphthene \$\$ Cicloesano
\$\$ Cykloheksan \$\$ Rcra waste numb
er U056 \$\$ UN 1145
Cyclohexane 3539 000110-82-7 87
Cyclohexane (CAS) \$\$ Hexanaphthene 3533 000110-82-7 87
\$\$ Hexamethylene \$\$ Hexahydrobenz
ene \$\$ Benzene, hexahydro-

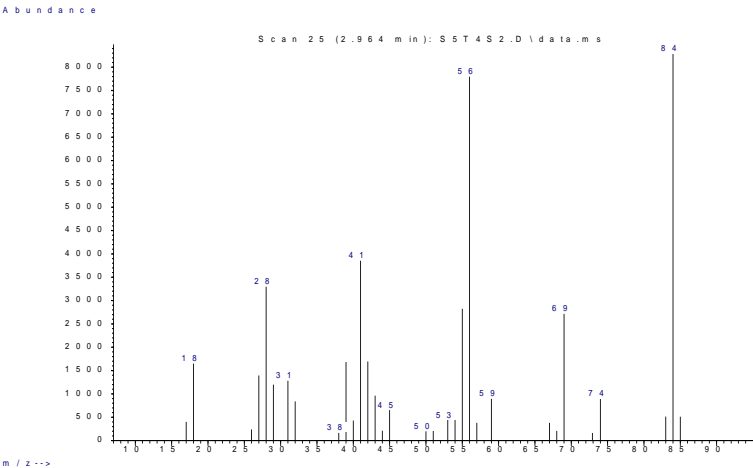
DEFAULT.M Thu Mar 08 11:52:20 2018



Area Percent Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
Data File : S5-T-9S.D
Acq On : 30 Nov 2016 23:35
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc :
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Integration Parameters: events.e
Integrator: ChemStation
Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
Title :
Signal : TIC: S5-T-9S.D\data.ms
peak R.T. first max last PK peak corr. corr. % of
min scan scan scan TY height area % max. total

1 2.960 9 23 46 BV 3 30772 708438 100.00% 100.000%
Sum of corrected areas: 708438
DEFAULT.M Tue Dec 13 16:18:02 2016

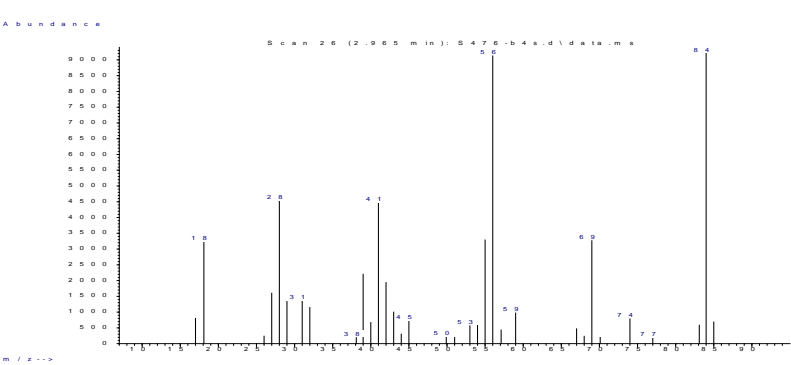
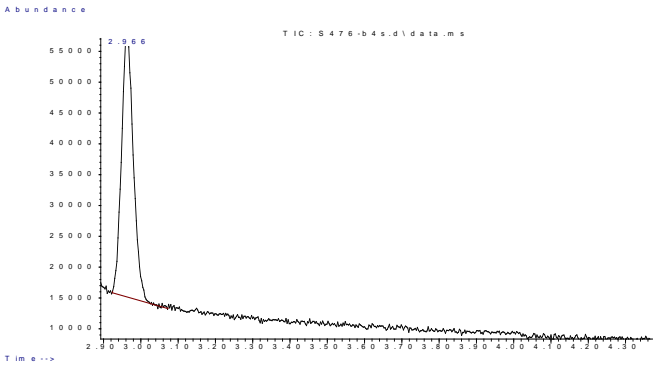


Library Search Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
Data File : S5-T-9S.D
Acq On : 30 Nov 2016 23:35
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc :
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 50
C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.1 Minimum Quality: 0
Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: Chemstation Integrator - events.e
Pk# RT Area% Library/ID Ref# CAS# Qual

1 2.960 100.00 C:\Users\EFTQH\Desktop\iblio\NIST02.L
Cyclohexane 1436 000110-82-7 93
Cyclohexane 1433 000110-82-7 87
Cyclohexane 1434 000110-82-7 87
DEFAULT.M Tue Dec 13 16:18:13 2016

Annexe 5/ Souche476-benzène



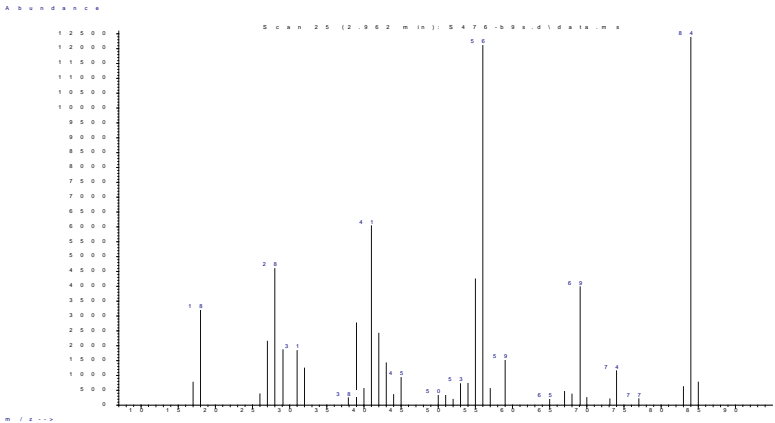
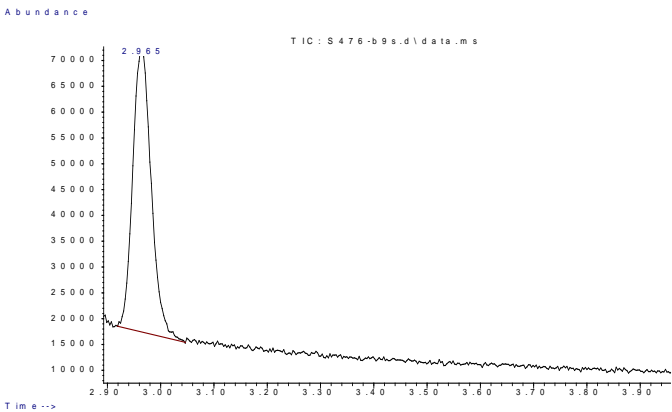
Area Percent Report
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S476-b4s.d
Acq On : 16 Nov 2016 13:17
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc : 45.5.10.150.2.FL0.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20
ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1
Integration Parameters: events.e
Integrator: ChemStation
Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
Title :
Signal : TIC: S476-b4s.d\data.ms
peak R.T. first max last PK peak corr. corr. % of
min scan scan scan TY height area % max. total

1 2.965 12 26 63 BB 3 41770 946352 100.00% 100.000%
Sum of corrected areas: 946352
DEFAULT.M Thu Nov 17 19:20:02 2016

Library Search Report
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S476-b4s.d
Acq On : 16 Nov 2016 13:17
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc : 45.5.10.150.2.FL0.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20
ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1
Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.1 Minimum Quality: 50
C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 0
Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: Chemstation Integrator - events.e
Pk# RT Area% Library/ID Ref# CAS# Qual

1 2.965 100.00 C:\Users\EFTQH\Desktop\biblio\wiley7n.1
Cyclohexane (CAS) \$\$ Hexanaphthene 3540 000110-82-7 93
\$\$ Hexamethylene \$\$ Hexahydrobenz
ene \$\$ Benzene, hexahydro- \$\$ Cioesano \$\$ Cyclohexaan \$\$ Cyclohexa

DEFAULT.M Thu Nov 17 19:20:00 2016



Area Percent Report
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S476-b9s.d
Acq On : 16 Nov 2016 13:03
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc : 45.5.10.150.2.FL0.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20
ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1
Integration Parameters: events.e
Integrator: ChemStation
Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
Title :
Signal : TIC: S476-b9s.d\data.ms
peak R.T. first max last PK peak corr. corr. % of
min scan scan scan TY height area % max. total

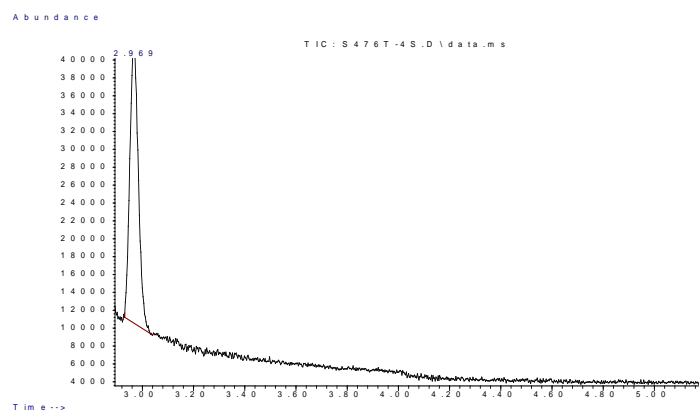
1 2.965 10 26 54 BV 4 55246 1326158 100.00% 100.000%
Sum of corrected areas: 1326158
DEFAULT.M Thu Nov 17 19:23:04 2016

Library Search Report
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S476-b9s.d
Acq On : 16 Nov 2016 13:03
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc : 45.5.10.150.2.FL0.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20
ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1
Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.1 Minimum Quality: 50
C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 0
Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: Chemstation Integrator - events.e
Pk# RT Area% Library/ID Ref# CAS# Qual

1 2.965 100.00 C:\Users\EFTQH\Desktop\biblio\wiley7n.1
Cyclohexane 3535 000110-82-7 93
Cyclohexane 3536 000110-82-7 93
Cyclohexane (CAS) \$\$ Hexanaphthene 3540 000110-82-7 93
\$\$ Hexamethylene \$\$ Hexahydrobenz
ene \$\$ Benzene, hexahydro- \$\$ Cicl
oesano \$\$ Cyclohexaan \$\$ Cyclohexa
n \$\$ Cykloheksan \$\$ Rcra waste num
ber U056 \$\$ UN 1145

DEFAULT.M Thu Nov 17 19:23:09 2016

Annexe 6/ Souche476-toluène



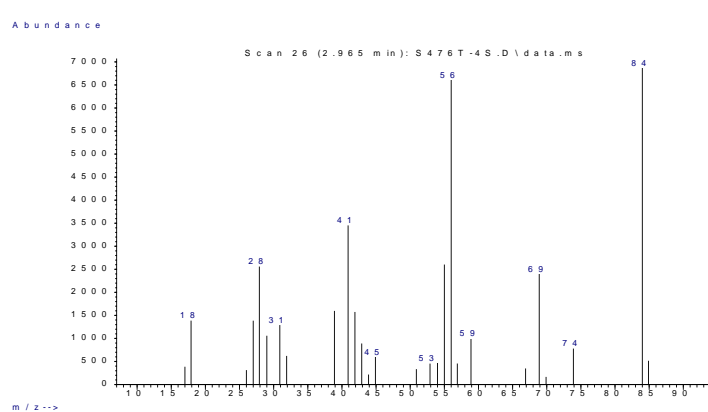
Area Percent Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
 Data File : S476T-4S.D
 Acq On : 4 Dec 2016 22:32
 Operator :
 Sample : MME MEFTAH
 Misc :
 ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
 Integration Parameters: events.e
 Integrator: ChemStation
 Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
 Title :
 Signal : TIC: S476T-4S.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. %	% of total
1	2.968	14	27	52	BB 3	30555	723031	100.00%	100.000%

Sum of corrected areas: 723031

DEFAULT.M Tue Dec 13 16:31:13 2016

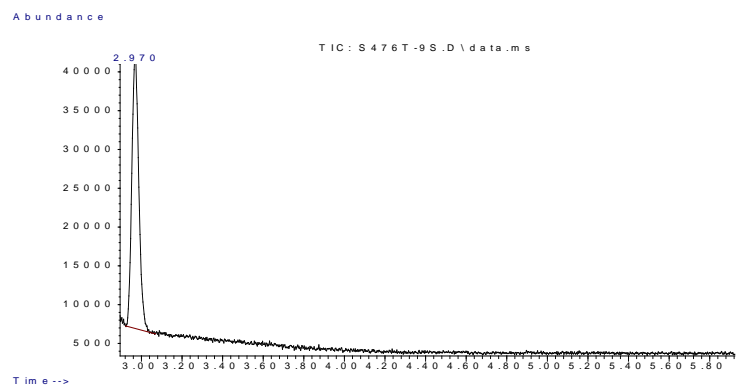


Library Search Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
 Data File : S476T-4S.D
 Acq On : 4 Dec 2016 22:32
 Operator :
 Sample : MME MEFTAH
 Misc :
 ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
 Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 50
 C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.1 Minimum Quality: 0
 Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: Chemstation Integrator - events.e

PK#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	2.968	100.00	C:\Users\EFTQH\Desktop\iblio\NIST02.L			
			Cyclohexane	1434	000110-82-7	87
			Cyclohexane	1433	000110-82-7	83
			Cyclohexane	1436	000110-82-7	81

DEFAULT.M Tue Dec 13 16:31:18 2016



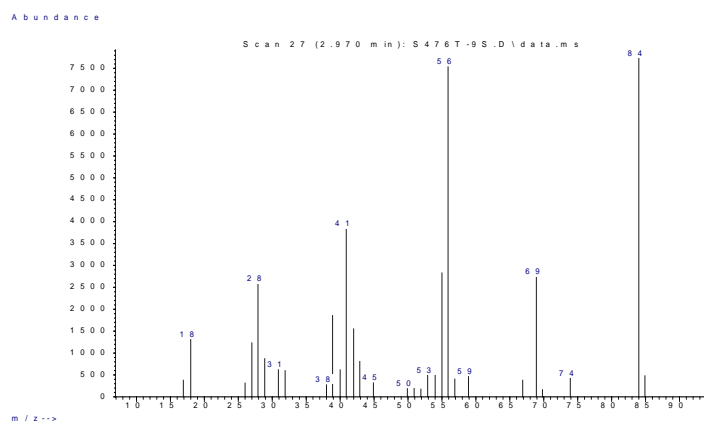
Area Percent Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
 Data File : S476T-9S.D
 Acq On : 4 Dec 2016 23:11
 Operator :
 Sample : MME MEFTAH
 Misc :
 ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
 Integration Parameters: events.e
 Integrator: ChemStation
 Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
 Title :
 Signal : TIC: S476T-9S.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. %	% of total
1	2.970	11	27	61	BB 3	35487	844798	100.00%	100.000%

Sum of corrected areas: 844798

DEFAULT.M Tue Dec 13 16:33:00 2016



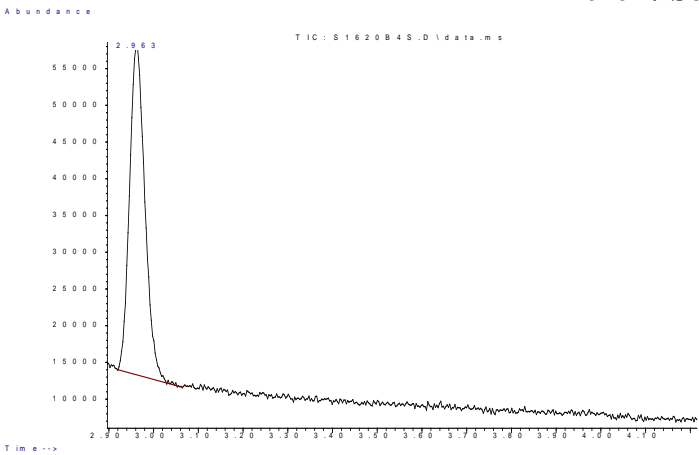
Library Search Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
 Data File : S476T-9S.D
 Acq On : 4 Dec 2016 23:11
 Operator :
 Sample : MME MEFTAH
 Misc :
 ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
 Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 50
 C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.1 Minimum Quality: 0
 Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: Chemstation Integrator - events.e

PK#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	2.970	100.00	C:\Users\EFTQH\Desktop\iblio\NIST02.L			
			Cyclohexane	1436	000110-82-7	91
			Cyclohexane	1434	000110-82-7	90
			Cyclohexane	1433	000110-82-7	87

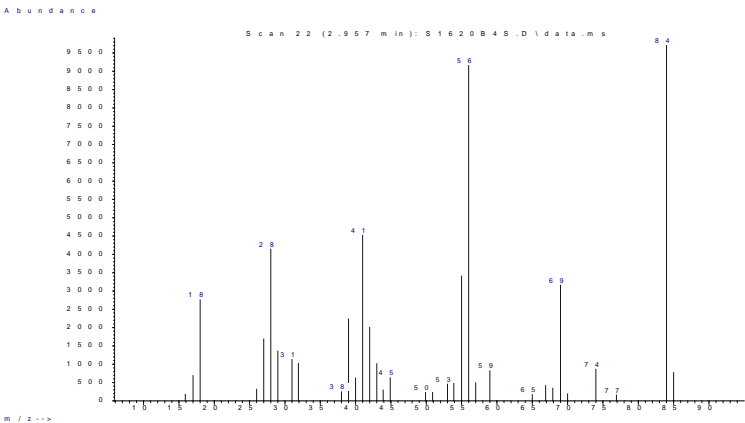
DEFAULT.M Tue Dec 13 16:32:56 2016

Annexe 7/ Souche1620-benzène



Area Percent Report
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S1620B4S.D
Acq On : 17 Nov 2016 10:25
Operator :
Sample : Mme MEFTAH
Misc : 45.5.10.150.2.FL0.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Integration Parameters: events.e
Integrator: ChemStation
Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
Title :
Signal : TIC: S1620B4S.D\data.ms
peak R.T. first max last PK peak corr. corr. % of
min scan scan scan TY height area % max. total

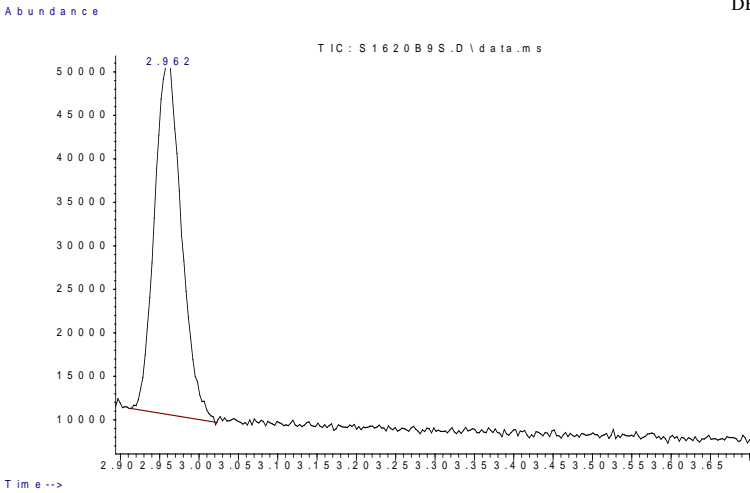
1 2.963 9 24 59 BB 2 45127 1075604 100.00% 100.000%
Sum of corrected areas: 1075604
DEFAULT.M Thu Nov 17 12:13:16 2016



Library Search Report
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S1620B4S.D
Acq On : 17 Nov 2016 10:25
Operator :
Sample : Mme MEFTAH
Misc : 45.5.10.150.2.FL0.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.1 Minimum Quality: 50
C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 0
Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: Chemstation Integrator - events.e
Pk# RT Area% Library/ID Ref# CAS# Qual

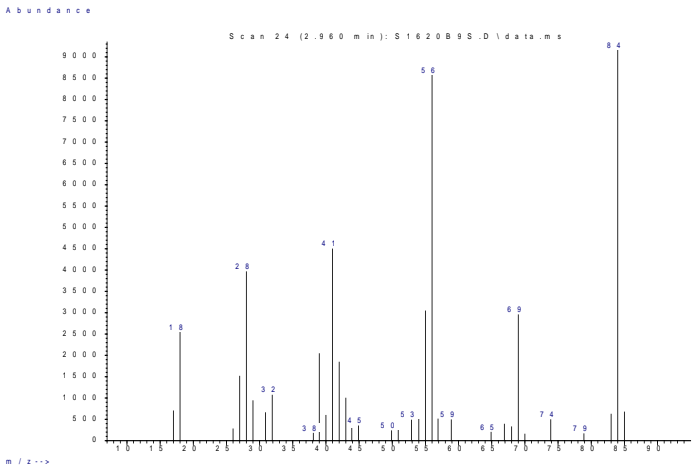
1	2.963	100.00	C:\Users\EFTQH\Desktop\iblio\wiley7n.1			
			Cyclohexane	3536	000110-82-7	93
			Cyclohexane	3535	000110-82-7	93
			Cyclohexane (CAS) \$ Hexanaphthene	3540	000110-82-7	93
			\$ Hexamethylene \$ Hexahydrobenz			
			ene \$ Benzene, hexahydro- \$ Cicl			
			oesano \$ Cyclohexaan \$ Cyclohexa			
			n \$ Cykloheksan \$ Rera waste num			
			ber U056 \$ UN 1145			

DEFAULT.M Thu Nov 17 12:13:25 2016



Area Percent Report
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S1620B9S.D
Acq On : 17 Nov 2016 10:43
Operator :
Sample : Mme MEFTAH
Misc : 45.5.10.150.2.FL0.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Integration Parameters: events.e
Integrator: ChemStation
Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
Title :
Signal : TIC: S1620B9S.D\data.ms
peak R.T. first max last PK peak corr. corr. % of
min scan scan scan TY height area % max. total

1 2.960 8 24 46 BV 4 41017 970106 100.00% 100.000%
Sum of corrected areas: 970106

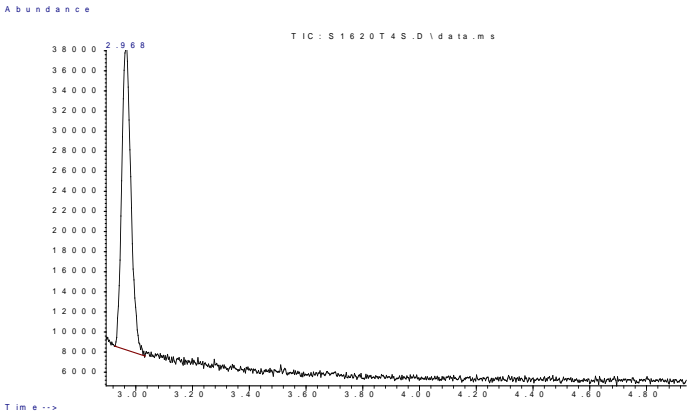


Library Search Report
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S1620B9S.D
Acq On : 17 Nov 2016 10:43
Operator :
Sample : Mme MEFTAH
Misc : 45.5.10.150.2.FL0.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.1 Minimum Quality: 50
C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 0
Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: Chemstation Integrator - events.e
Pk# RT Area% Library/ID Ref# CAS# Qual

1	2.960	100.00	C:\Users\EFTQH\Desktop\iblio\wiley7n.1			
			Cyclohexane	3536	000110-82-7	95
			Cyclohexane	3535	000110-82-7	95
			Cyclohexane (CAS) \$ Hexanaphthene	3540	000110-82-7	93
			\$ Hexamethylene \$ Hexahydrobenz			
			ene \$ Benzene, hexahydro- \$ Cicl			
			oesano \$ Cyclohexaan \$ Cyclohexa			
			n \$ Cykloheksan \$ Rera waste num			
			ber U056 \$ UN 1145			

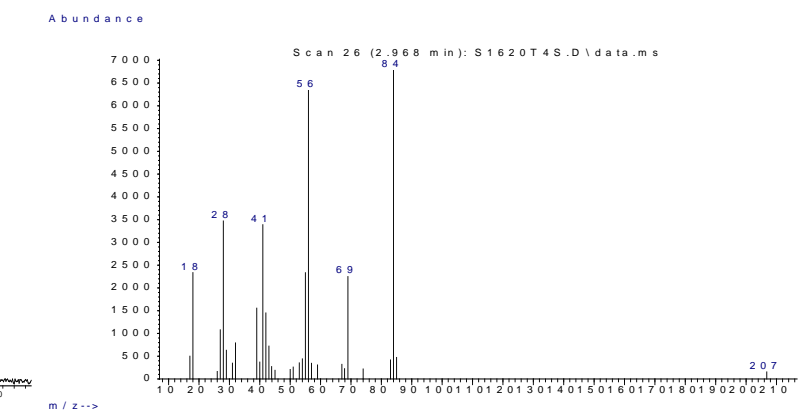
DEFAULT.M Thu Nov 17 12:20:43 2016

Annexe 8/ Souche1620-toluène



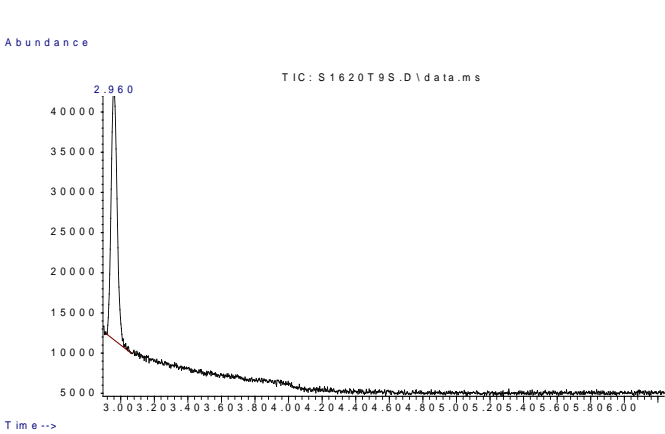
Area Percent Report
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
Data File : S1620T4S.D
Acq On : 1 Dec 2016 1:35
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc :
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Integration Parameters: events.e
Integrator: ChemStation
Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
Title :
Signal : TIC: S1620T4S.D\data.ms
peak R.T. first max last PK peak corr. corr. % of
min scan scan scan TY height area % max. total

1 2.968 12 26 49 BV 3 30370 686015 100.00% 100.000%
Sum of corrected areas: 686015
DEFAULT.M Tue Dec 13 16:34:23 2016.



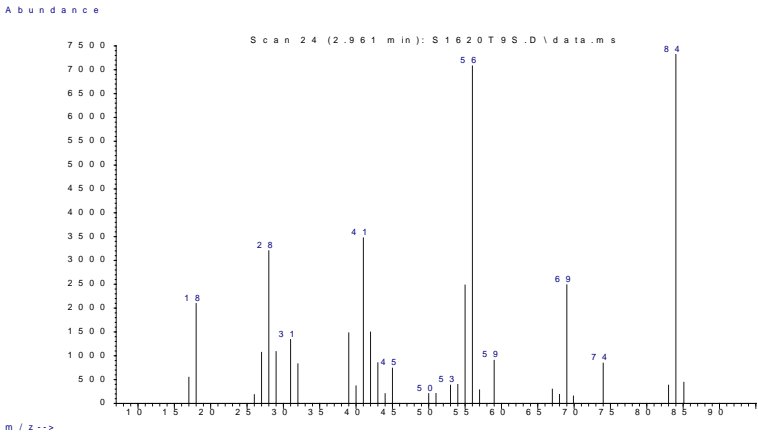
Library Search Report
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
Data File : S1620T4S.D
Acq On : 1 Dec 2016 1:35
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc :
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Search Libraries: C:\Users\EFTQH...biblio\NIST02.L Minimum Quality: 50
C:\Users\EFTQH...biblio\wiley7n.1 Minimum Quality: 0
Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: Chemstation Integrator - events.e
Pk# RT Area% Library/ID Ref# CAS# Qual

1 2.968 100.00 C:\Users\EFTQH\Desktop\biblio\NIST02.L
Cyclohexane 1436 000110-82-7 94
Cyclohexane 1434 000110-82-7 91
Cyclohexane 1433 000110-82-7 91
DEFAULT.M Tue Dec 13 16:34:20 2016



Area Percent Report
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
Data File : S1620T9S.D
Acq On : 1 Dec 2016 1:54
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc :
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Integration Parameters: events.e
Integrator: ChemStation
Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
Title :
Signal : TIC: S1620T9S.D\data.ms
peak R.T. first max last PK peak corr. corr. % of
min scan scan scan TY height area % max. total

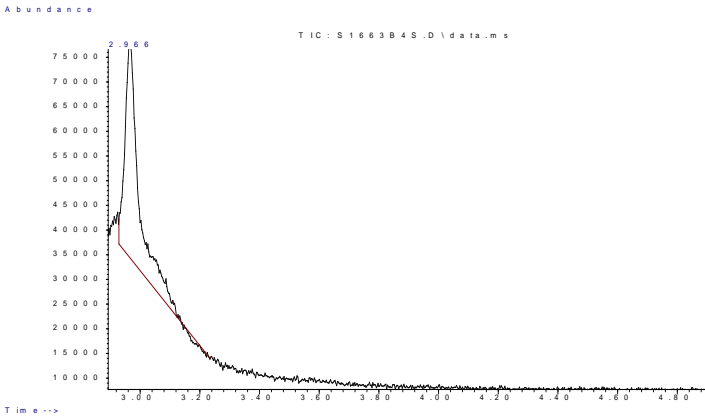
1 2.961 8 24 59 BB 3 31733 784598 100.00% 100.000%
Sum of corrected areas: 784598
DEFAULT.M Tue Dec 13 16:45:20 2016



Library Search Report
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
Data File : S1620T9S.D
Acq On : 1 Dec 2016 1:54
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc :
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Search Libraries: C:\Users\EFTQH...biblio\NIST02.L Minimum Quality: 50
C:\Users\EFTQH...biblio\wiley7n.1 Minimum Quality: 0
Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: Chemstation Integrator - events.e
Pk# RT Area% Library/ID Ref# CAS# Qual

1 2.961 100.00 C:\Users\EFTQH\Desktop\biblio\NIST02.L
Cyclohexane 1434 000110-82-7 81
Cyclohexane 1433 000110-82-7 81
Cyclohexane 1436 000110-82-7 81
DEFAULT.M Tue Dec 13 16:45:03 2016

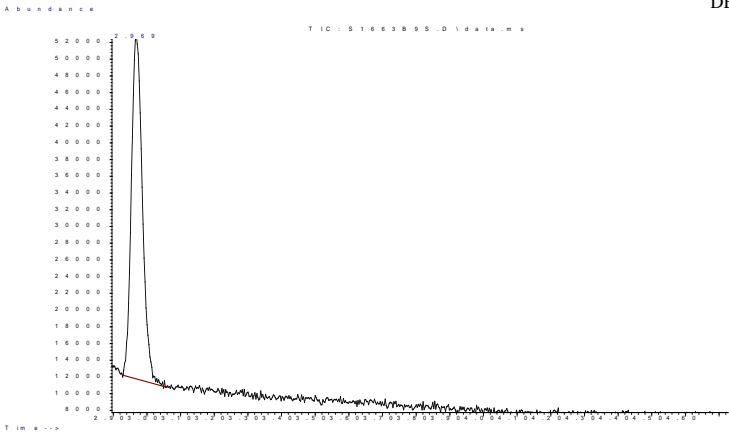
Annexe 9/ Souche1663-benzène



Area Percent Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S1663B4S.D
Acq On : 17 Nov 2016 9:17
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc : 45.5,10,150,2.FL0.5ML/MIN,0.2ULSPL1/20
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Integration Parameters: events.e
Integrator: ChemStation
Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
Title :
Signal : TIC: S1663B4S.D\data.ms
peak R.T. first max last PK peak corr. corr. % of
min scan scan scan TY height area % max. total

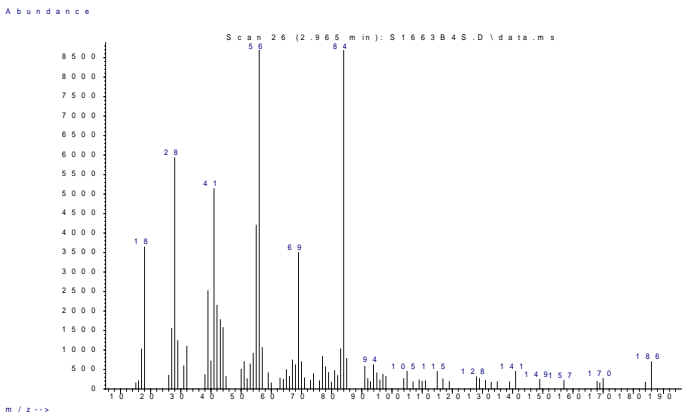
1 2.965 13 26 119 VB 5 43820 1403622 100.00% 100.00%
Sum of corrected areas: 1403622
DEFAULT.M Thu Nov 17 11:55:04 2016



Area Percent Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S1663B9S.D
Acq On : 17 Nov 2016 9:36
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc : 45.5,10,150,2.FL0.5ML/MIN,0.2ULSPL1/20
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Integration Parameters: events.e
Integrator: ChemStation
Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
Title :
Signal : TIC: S1663B9S.D\data.ms
peak R.T. first max last PK peak corr. corr. % of
min scan scan scan TY height area % max. total

1 2.968 13 26 57 BB 2 41063 937071 100.00% 100.00%
Sum of corrected areas: 937071
DEFAULT.M Thu Nov 17 11:55:39 2016

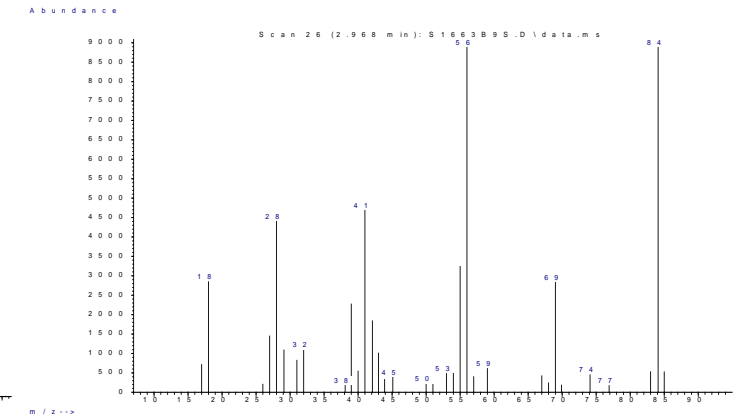


Library Search Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S1663B4S.D
Acq On : 17 Nov 2016 9:17
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc : 45.5,10,150,2.FL0.5ML/MIN,0.2ULSPL1/20
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.1 Minimum Quality: 50
C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 0
Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: Chemstation Integrator - events.e
Pk# RT Area% Library/ID Ref# CAS# Qual

1	2.965	100.00	C:\Users\EFTQH\Desktop\biblio\wiley7n.1		
			Cyclohexane \$\$ Benzene, hexahydro-	3538	000110-82-7 87
			\$\$ Hexahydrobenzene \$\$ Hexamethyl		
			ene \$\$ Hexanaphthene \$\$ Cicloesano		
			\$\$ Cykloheksan \$\$ Rcra waste numb		
			er U056 \$\$ UN 1145		
			Cyclohexane	3539	000110-82-7 87
			Cyclohexane	3536	000110-82-7 87

DEFAULT.M Thu Nov 17 11:54:11 2016



Library Search Report

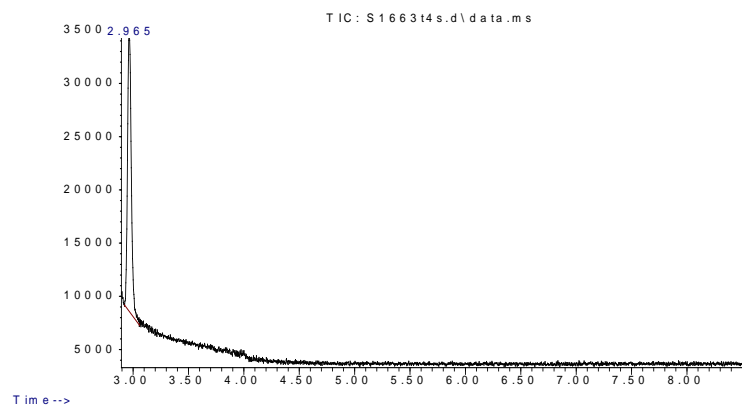
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S1663B9S.D
Acq On : 17 Nov 2016 9:36
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc : 45.5,10,150,2.FL0.5ML/MIN,0.2ULSPL1/20
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.1 Minimum Quality: 50
C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 0
Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: Chemstation Integrator - events.e
Pk# RT Area% Library/ID Ref# CAS# Qual

1	2.968	100.00	C:\Users\EFTQH\Desktop\biblio\wiley7n.1		
			Cyclohexane (CAS) \$\$ Hexanaphthene	3540	000110-82-7 94
			\$\$ Hexamethylene \$\$ Hexahydrobenz		
			ene \$\$ Benzene, hexahydro- \$\$ Cicl		
			oesano \$\$ Cyclohexaan \$\$ Cyclohexa		
			n \$\$ Cykloheksan \$\$ Rcra waste num		
			ber U056 \$\$ UN 1145		
			Cyclohexane	3535	000110-82-7 93
			Cyclohexane	3536	000110-82-7 93

DEFAULT.M Thu Nov 17 12:24:39 2016

Annexe 10/ Souche1663-toluène

Abundance



Area Percent Report

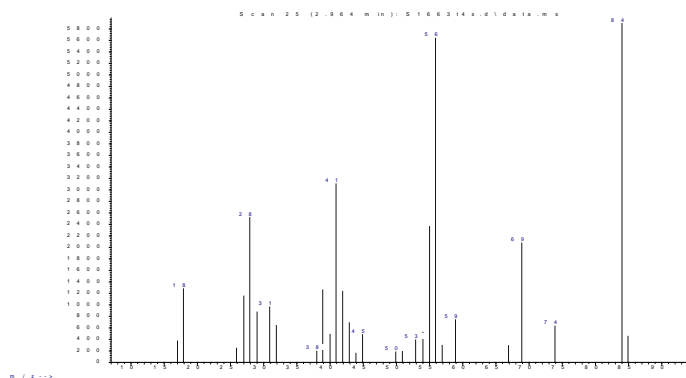
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
 Data File : S1663t4s.d
 Acq On : 4 Dec 2016 23:53
 Operator :
 Sample : MME MEFTAH
 Misc :
 ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
 Integration Parameters: events.e
 Integrator: ChemStation
 Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
 Title :
 Signal : TIC: S1663t4s.d\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	2.966	11	26	57	BV 2	26522	628837	100.00%	100.000%

Sum of corrected areas: 628837

DEFAULT.M Mon Dec 19 07:40:23 2016

Abundance



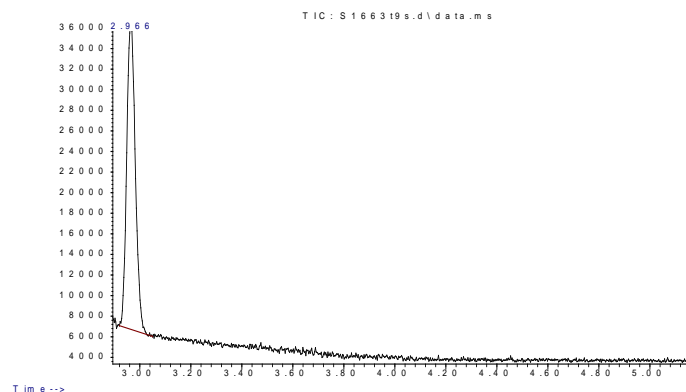
Library Search Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
 Data File : S1663t4s.d
 Acq On : 4 Dec 2016 23:53
 Operator :
 Sample : MME MEFTAH
 Misc :
 ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
 Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 50
 C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.l Minimum Quality: 0
 Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: Chemstation Integrator - events.e

PK#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	2.966	100.00	C:\Users\EFTQH\Desktop\biblio\NIST02.L			
			Cyclohexane	1434	000110-82-7	87
			Cyclohexane	1433	000110-82-7	83
			Cyclohexane	1436	000110-82-7	81

DEFAULT.M Mon Dec 19 07:40:44 2016

Abundance



Area Percent Report

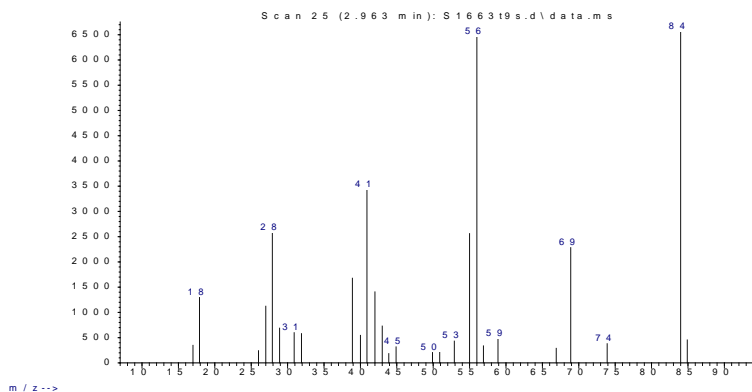
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
 Data File : S1663t9s.d
 Acq On : 4 Dec 2016 23:37
 Operator :
 Sample : MME MEFTAH
 Misc :
 ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
 Integration Parameters: events.e
 Integrator: ChemStation
 Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
 Title :
 Signal : TIC: S1663t9s.d\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	2.966	10	26	55	BB 3	29754	700280	100.00%	100.000%

Sum of corrected areas: 700280

DEFAULT.M Mon Dec 19 07:42:44 2016

Abundance



Library Search Report

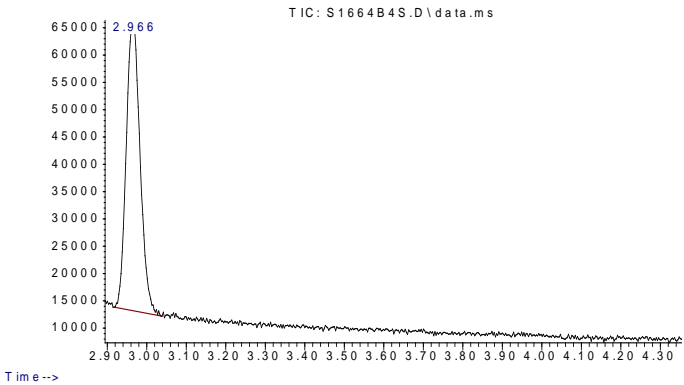
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
 Data File : S1663t9s.d
 Acq On : 4 Dec 2016 23:37
 Operator :
 Sample : MME MEFTAH
 Misc :
 ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
 Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 50
 C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.l Minimum Quality: 0
 Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: Chemstation Integrator - events.e

PK#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	2.966	100.00	C:\Users\EFTQH\Desktop\biblio\NIST02.L			
			Cyclohexane	1436	000110-82-7	90
			Cyclohexane	1434	000110-82-7	87
			1-Pentene, 2-methyl-	1455	000763-29-1	87

DEFAULT.M Mon Dec 19 07:42:53 2016

Annexe 11/ Souche1664-benzène

Abundance



Area Percent Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S1664B4S.D
Acq On : 16 Nov 2016 14:02
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc : 45.5.10.150.2.FL0.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20
ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1
Integration Parameters: events.e
Integrator: ChemStation
Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
Title :
Signal : TIC: S1664B4S.D\data.ms
peak R.T. first max last PK peak corr. corr. % of
min scan scan scan TY height area % max. total

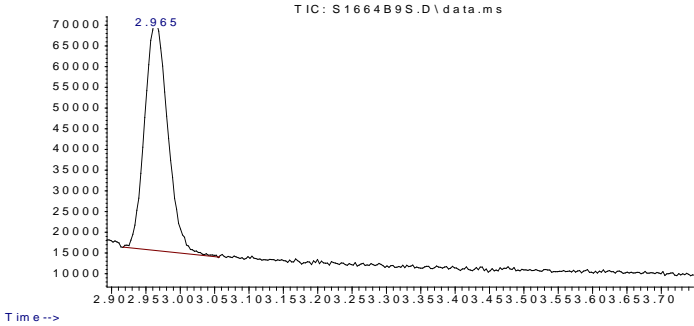
1 2.967 9 26 51 BV 3 53049 1293921 100.00% 100.000%
Sum of corrected areas: 1293921
DEFAULT.M Thu Nov 17 19:34:02 2016

Library Search Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S1664B4S.D
Acq On : 16 Nov 2016 14:02
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc : 45.5.10.150.2.FL0.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20
ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1
Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.1 Minimum Quality: 50
C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 0
Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: Chemstation Integrator - events.e
Pk# RT Area% Library/ID Ref# CAS# Qual

1	2.967	100.00	C:\Users\EFTQH\Desktop\biblio\wiley7n.1		
			Cyclohexane (CAS) \$ Hexanaphthene	3533	000110-82-7 94
			\$ Hexamethylene \$ Hexahydrobenz		
			ene \$ Benzene, hexahydro-		
			Cyclohexane	3539	000110-82-7 94
			Cyclohexane (CAS) \$ Hexanaphthene	3540	000110-82-7 94
			\$ Hexamethylene \$ Hexahydrobenz		
			ene \$ Benzene, hexahydro- \$ Cicl		
			oesano \$ Cyclohexaan \$ Cyclohexa		
			DEFAULT.M Thu Nov 17 19:33:58 2016		

Abundance

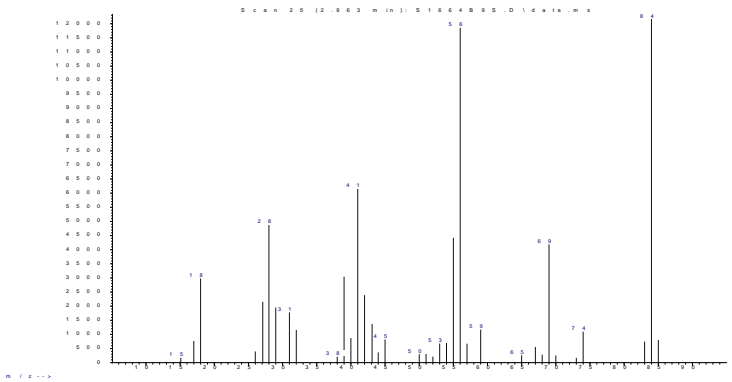


Area Percent Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S1664B9S.D
Acq On : 16 Nov 2016 14:16
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc : 45.5.10.150.2.FL0.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20
ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1
Integration Parameters: events.e
Integrator: ChemStation
Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
Title :
Signal : TIC: S1664B9S.D\data.ms
peak R.T. first max last PK peak corr. corr. % of
min scan scan scan TY height area % max. total

1 2.966 9 26 57 BV 2 55878 1299642 100.00% 100.000%
Sum of corrected areas: 1299642
DEFAULT.M Thu Nov 17 11:34:37 2016

Abundance



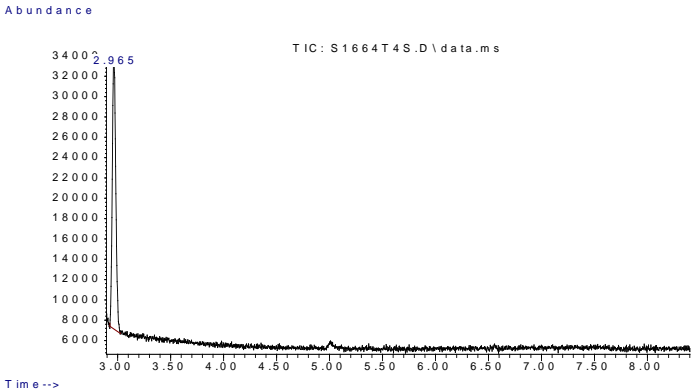
Library Search Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S1664B9S.D
Acq On : 16 Nov 2016 14:16
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc : 45.5.10.150.2.FL0.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20
ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1
Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.1 Minimum Quality: 50
C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 0
Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: Chemstation Integrator - events.e
Pk# RT Area% Library/ID Ref# CAS# Qual

1	2.966	100.00	C:\Users\EFTQH\Desktop\biblio\wiley7n.1		
			Cyclohexane	3535	000110-82-7 93
			Cyclohexane (CAS) \$ Hexanaphthene	3540	000110-82-7 93
			\$ Hexamethylene \$ Hexahydrobenz		
			ene \$ Benzene, hexahydro- \$ Cicl		
			oesano \$ Cyclohexaan \$ Cyclohexa		
			n \$ Cykloheksan \$ Rera waste num		
			ber U056 \$ UN 1145		
			Cyclohexane (CAS) \$ Hexanaphthene	3533	000110-82-7 93
			\$ Hexamethylene \$ Hexahydrobenz		
			ene \$ Benzene, hexahydro-		

DEFAULT.M Thu Nov 17 11:34:50 2016

Annexe 12/ Souche1664-toluène

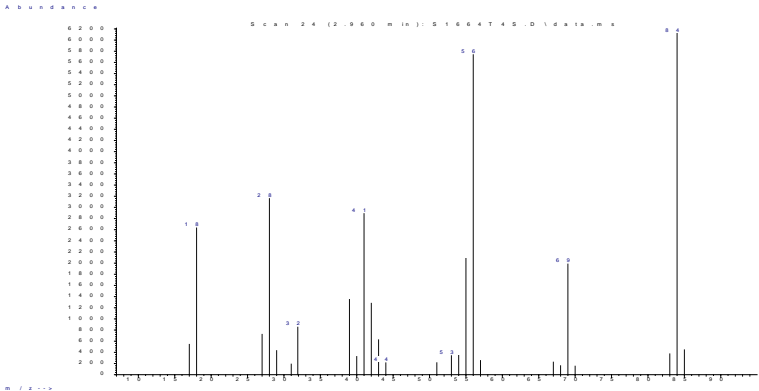


Area Percent Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
Data File : S1664T4S.D
Acq On : 1 Dec 2016 2:20
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc :
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Integration Parameters: events.e
Integrator: ChemStation
Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
Title :
Signal : TIC: S1664T4S.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. %	% of max.	total	
1	2.963	13	25	47	BV 2	26940	614457	100.00%	100.000%		
Sum of corrected areas:							614457				

DEFAULT.M Mon Dec 19 07:44:50 2016

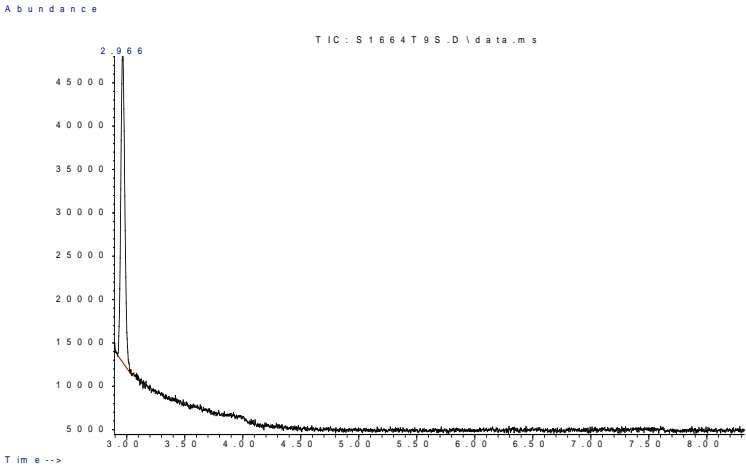


Library Search Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
Data File : S1664T4S.D
Acq On : 1 Dec 2016 2:20
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc :
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 50
C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.1 Minimum Quality: 0
Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: Chemstation Integrator - events.e

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	2.963	100.00	C:\Users\EFTQH\Desktop\iblio\NIST02.L			
			Cyclohexane	1436	000110-82-7	94
			Cyclohexane	1433	000110-82-7	90
			Cyclohexane	1434	000110-82-7	90

DEFAULT.M Mon Dec 19 07:44:55 2016



Area Percent Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
Data File : S1664T9S.D
Acq On : 1 Dec 2016 2:37
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc :
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1

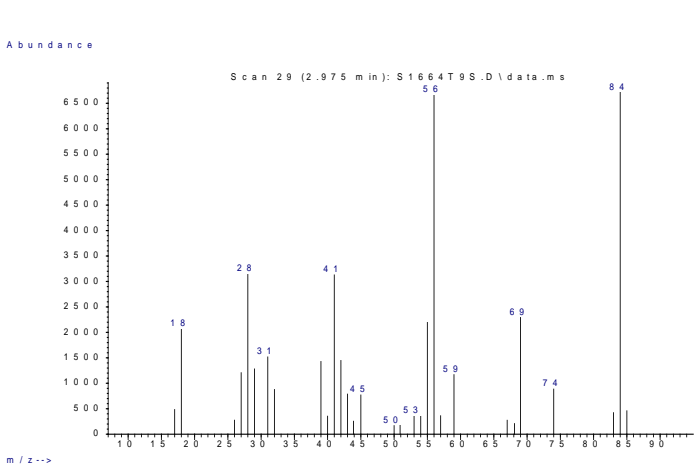
Integration Parameters: events.e
Integrator: ChemStation

Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
Title :

Signal : TIC: S1664T9S.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. %	% of max.	total	
1	2.966	10	26	53	BB 2	36188	861962	100.00%	100.000%		
Sum of corrected areas:							861962				

DEFAULT.M Mon Dec 19 07:46:46 2016



Library Search Report

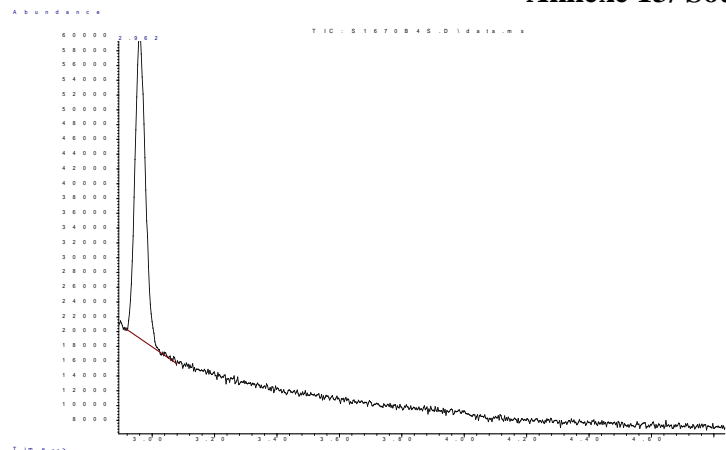
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
Data File : S1664T9S.D
Acq On : 1 Dec 2016 2:37
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc :
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 50
C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.1 Minimum Quality: 0
Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: Chemstation Integrator - events.e

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	2.966	100.00	C:\Users\EFTQH\Desktop\iblio\NIST02.L			
			Cyclohexane	1436	000110-82-7	93
			Cyclohexane	1433	000110-82-7	81
			Cyclohexane	1434	000110-82-7	81

DEFAULT.M Mon Dec 19 07:46:42 2016

Annexe 13/ Souche1670-benzène



Area Percent Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S1670B4S.D

Acq On : 17 Nov 2016 9:51

Operator :

Sample : MME MEFTAH

Misc : 45.5.10.150.2.FL0.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20

ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1

Integration Parameters: events.e

Integrator: ChemStation

Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M

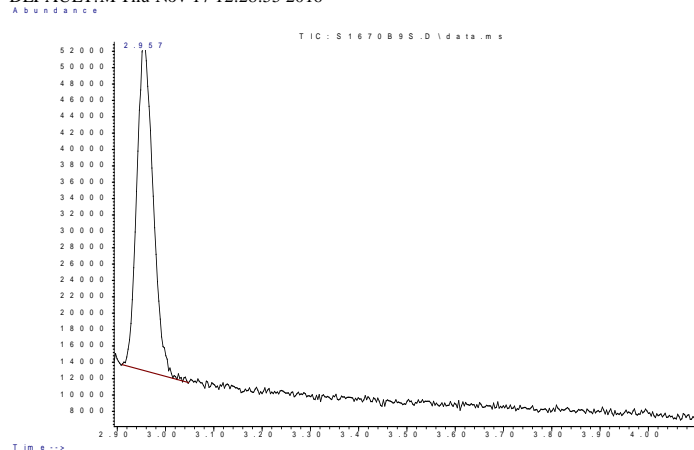
Title :

Signal : TIC: S1670B4S.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. %	% of total
1	2.962	10	25	65	BB 3	41017	963187	100.00%	100.000%

Sum of corrected areas: 963187

DEFAULT.M Thu Nov 17 12:28:55 2016



Area Percent Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S1670B9S.D

Acq On : 17 Nov 2016 10:11

Operator :

Sample : MME MEFTAH

Misc : 45.5.10.150.2.FL0.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20

ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1

Integration Parameters: events.e

Integrator: ChemStation

Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M

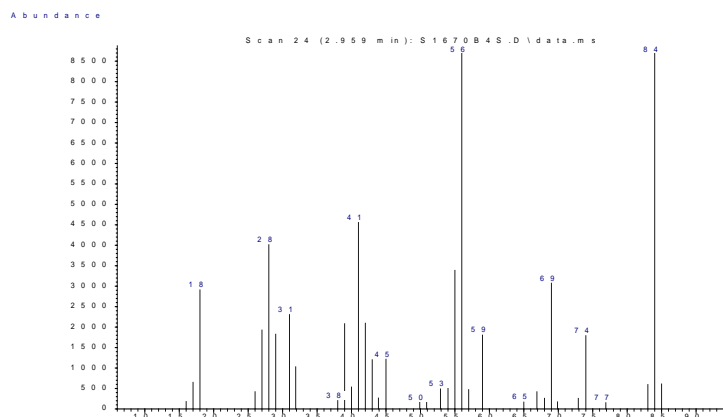
Title :

Signal : TIC: S1670B9S.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. %	% of total
1	2.957	7	23	54	BV 2	40129	946759	100.00%	100.000%

Sum of corrected areas: 946759

DEFAULT.M Thu Nov 17 12:30:39 2016



Library Search Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S1670B4S.D

Acq On : 17 Nov 2016 9:51

Operator :

Sample : MME MEFTAH

Misc : 45.5.10.150.2.FL0.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20

ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.1 Minimum Quality: 50

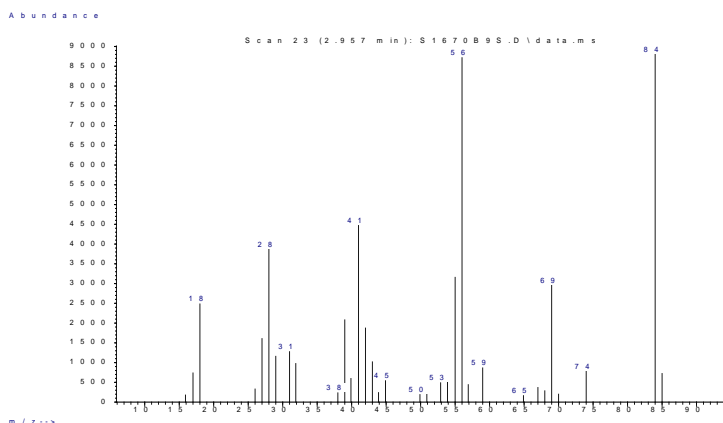
C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex

Integration Events: Chemstation Integrator - events.e

PK#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	2.962	100.00	C:\Users\EFTQH\Desktop\biblio\wiley7n.1			
			Cyclohexane	3536	000110-82-7	96
			Cyclohexane	3537	000110-82-7	76
			Cyclohexane	3535	000110-82-7	76

DEFAULT.M Thu Nov 17 12:29:00 2016



Library Search Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S1670B9S.D

Acq On : 17 Nov 2016 10:11

Operator :

Sample : MME MEFTAH

Misc : 45.5.10.150.2.FL0.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20

ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.1 Minimum Quality: 50

C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 0

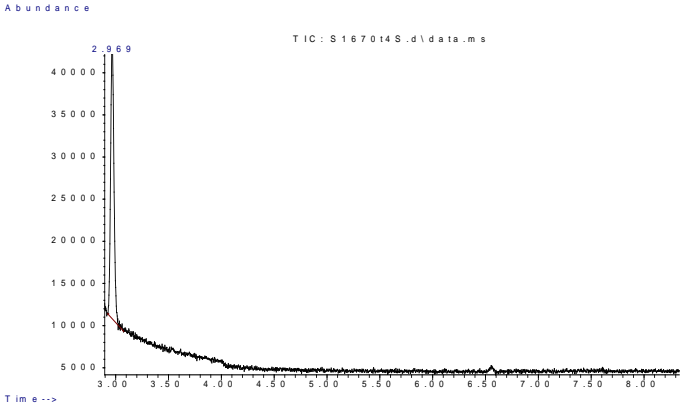
Unknown Spectrum: Apex

Integration Events: Chemstation Integrator - events.e

PK#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	2.957	100.00	C:\Users\EFTQH\Desktop\biblio\wiley7n.1			
			Cyclohexane	3535	000110-82-7	93
			Cyclohexane	3536	000110-82-7	93
			Cyclohexane (CAS) \$\$ Hexanaphthene	3533	000110-82-7	90
			\$\$ Hexamethylene \$\$ Hexahydrobenz			
			ene \$\$ Benzene, hexahydro-			

DEFAULT.M Thu Nov 17 12:30:34 2016

Annexe 14/ Souche1670-toluène



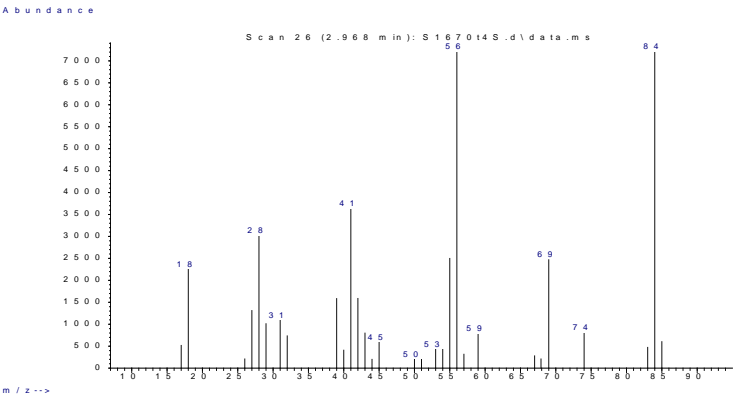
Area Percent Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
Data File : S1670t4S.d
Acq On : 1 Dec 2016 3:24
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc :
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Integration Parameters: events.e
Integrator: ChemStation
Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
Title :
Signal : TIC: S1670t4S.d\data.ms

peak #	R.T.	first min	max scan	last scan	PK	peak height	corr. area	corr. %	% of max.	total
1	2.968	11	26	63	BB 2	32451	722521	100.00%	100.000%	

Sum of corrected areas: 722521

DEFAULT.M Mon Dec 19 07:48:20 2016

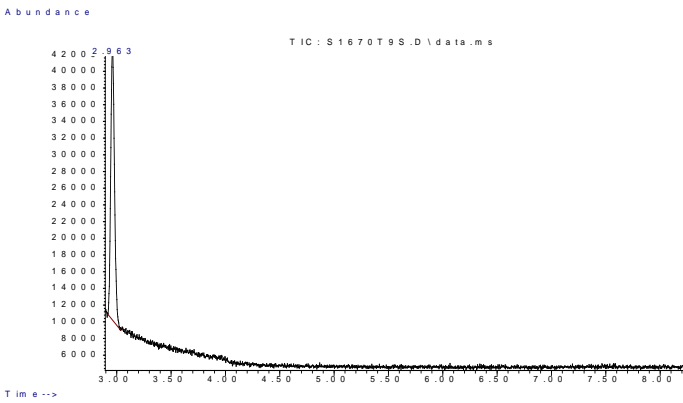


Library Search Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
Data File : S1670t4S.d
Acq On : 1 Dec 2016 3:24
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc :
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 50
C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.1 Minimum Quality: 0
Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: Chemstation Integrator - events.

PK#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	2.968	100.00	C:\Users\EFTQH\Desktop\iblio\NIST02.L			
			Cyclohexane	1436	000110-82-7	94
			Cyclohexane	1433	000110-82-7	87
			Cyclohexane	1434	000110-82-7	87

DEFAULT.M Mon Dec 19 07:48:24 2016



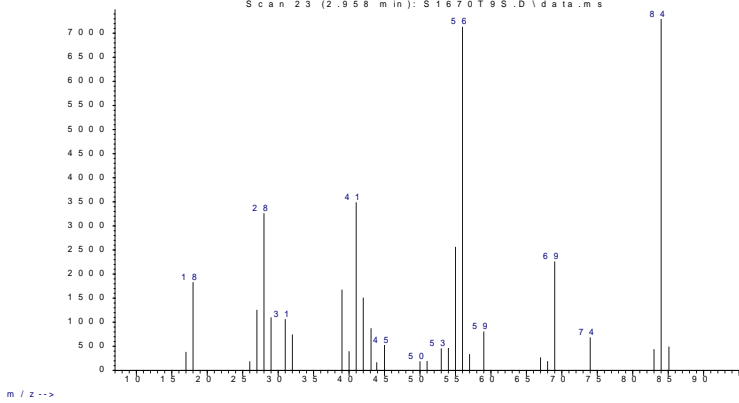
Area Percent Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
Data File : S1670T9S.D
Acq On : 1 Dec 2016 3:09
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc :
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Integration Parameters: events.e
Integrator: ChemStation
Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
Title :
Signal : TIC: S1670T9S.D\data.ms

peak #	R.T.	first min	max scan	last scan	PK	peak height	corr. area	corr. %	% of max.	total
1	2.964	9	25	49	BB 2	32649	784724	100.00%	100.000%	

Sum of corrected areas: 784724

DEFAULT.M Mon Dec 19 07:49:47 2016



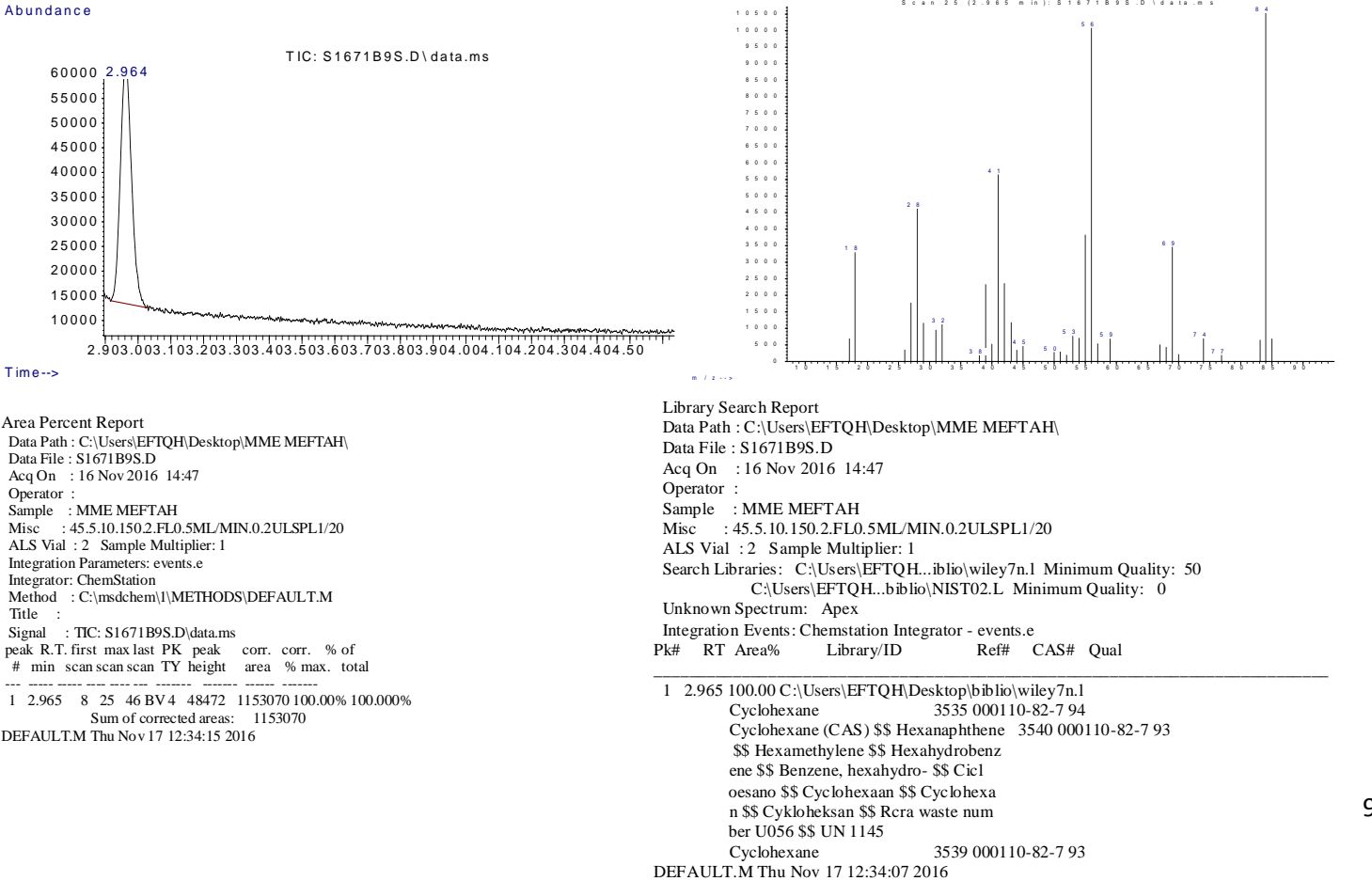
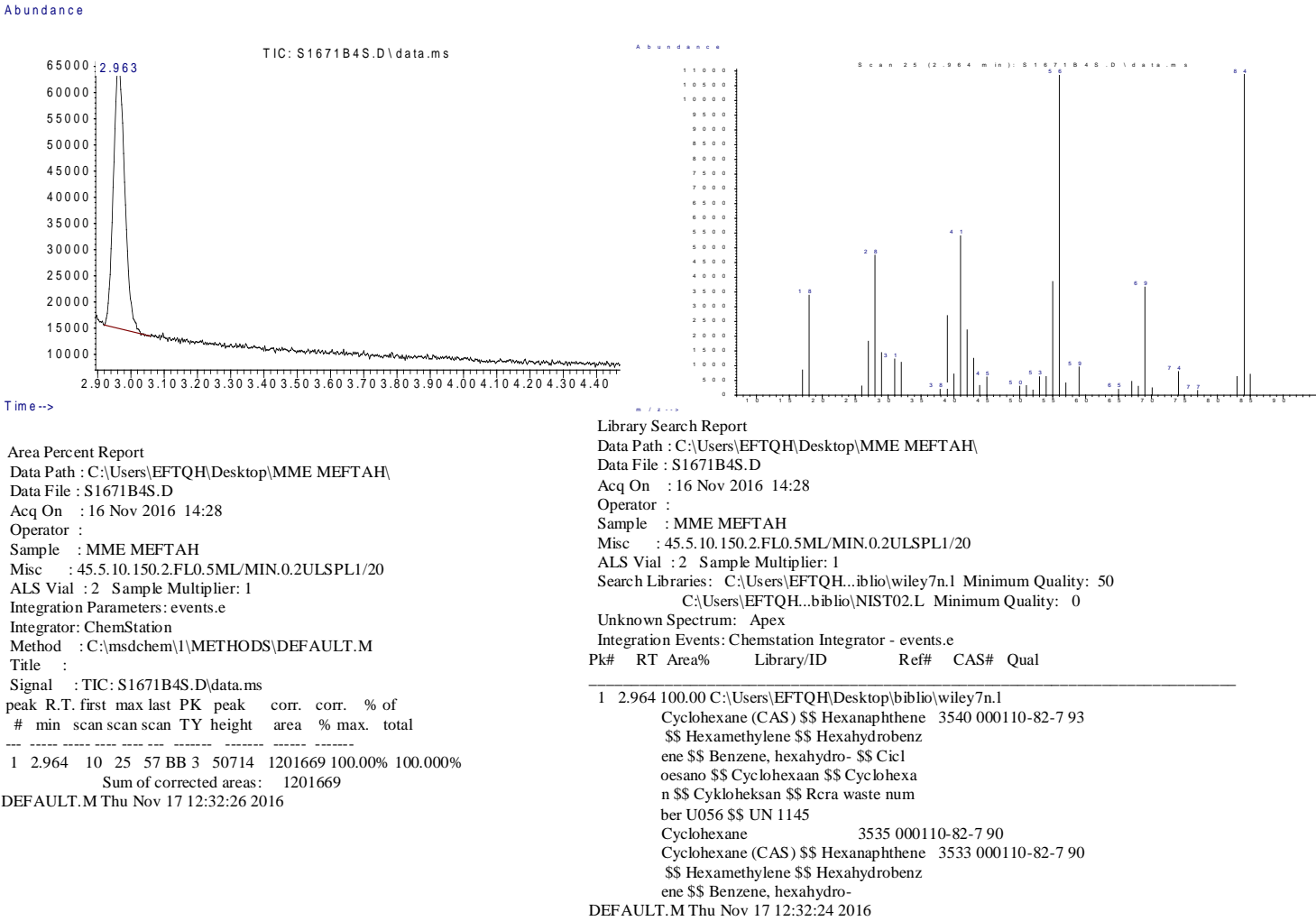
Library Search Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
Data File : S1670T9S.D
Acq On : 1 Dec 2016 3:09
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc :
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 50
C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.1 Minimum Quality: 0
Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: Chemstation Integrator - events.e

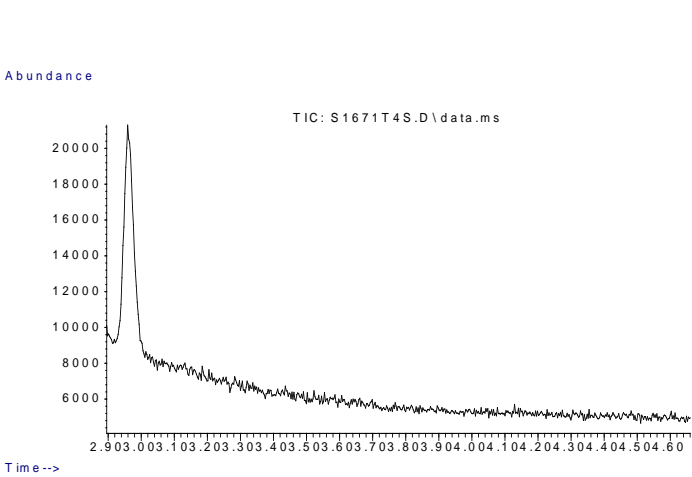
PK#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	2.964	100.00	C:\Users\EFTQH\Desktop\iblio\NIST02.L			
			Cyclohexane	1436	000110-82-7	93
			Cyclohexane	1434	000110-82-7	87
			Cyclohexane	1433	000110-82-7	87

DEFAULT.M Mon Dec 19 07:49:53 2016

Annexe 15/ Souche1671-benzène



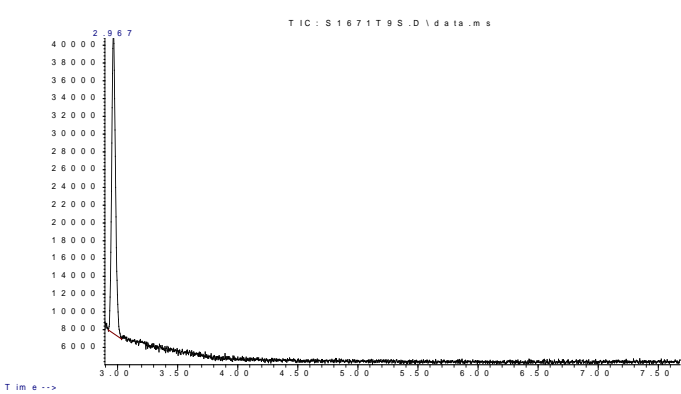
Annexe 16/ Souche1671-toluène



Area Percent Report
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
Data File : S1671T4S.D
Acq On : 1 Dec 2016 3:43
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc :
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Integration Parameters: events.e
Integrator: ChemStation
Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
Title :
Signal : TIC: S1671T4S.D\data.ms
peak R.T. first max last PK peak corr. corr. % of
min scan scan scan TY height area % max. total

No peaks were detected using the method integration parameters!

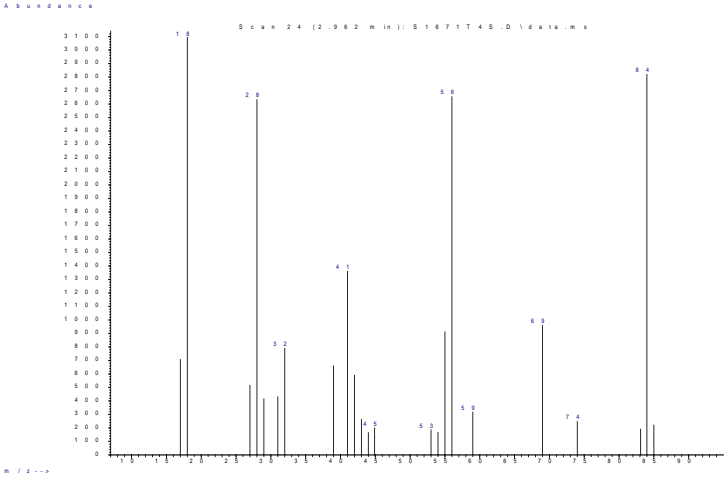
DEFAULT.M Thu Mar 08 11:36:57 2018



Area Percent Report
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
Data File : S1671T9S.D
Acq On : 1 Dec 2016 4:03
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc :
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Integration Parameters: events.e
Integrator: ChemStation
Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
Title :
Signal : TIC: S1671T9S.D\data.ms
peak R.T. first max last PK peak corr. corr. % of
min scan scan scan TY height area % max. total

Sum of corrected areas: 743729

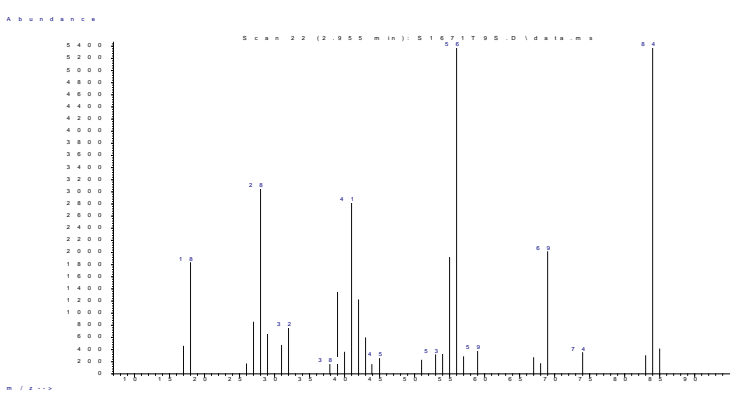
DEFAULT.M Mon Dec 19 07:53:02 2016



Library Search Report
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
Data File : S1671T4S.D
Acq On : 1 Dec 2016 3:43
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc :
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 50
C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.1 Minimum Quality: 0
Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: Chemstation Integrator - events.e

No Peaks Found !!!

DEFAULT.M Mon Dec 19 07:52:14 2016

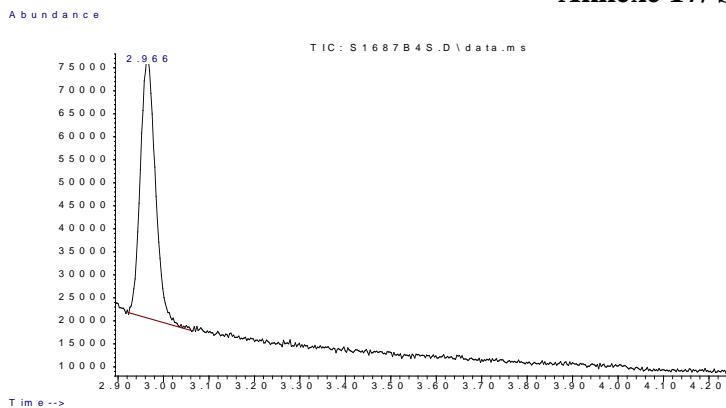


Library Search Report
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
Data File : S1671T9S.D
Acq On : 1 Dec 2016 4:03
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc :
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 50
C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.1 Minimum Quality: 0
Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: Chemstation Integrator - events.e

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	2.966	100.00	C:\Users\EFTQH\Desktop\biblio\NIST02.L			
			Cyclohexane	1436	000110-82-7	94
			Cyclohexane	1434	000110-82-7	91
			Cyclohexane	1433	000110-82-7	91

DEFAULT.M Mon Dec 19 07:53:08 2016

Annexe 17/ Souche1687-benzène



Area Percent Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
 Data File : S1687B4S.D
 Acq On : 16 Nov 2016 13:33
 Operator :
 Sample : MME MEFTAH
 Misc : 45.5.10.150.2.FL0.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20
 ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1
 Integration Parameters: events.e
 Integrator: ChemStation
 Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
 Title :

Signal : TIC: S1687B4S.D\data.ms
 peak R.T. first max last PK peak corr. corr. % of
 # min scan scan scan TY height area % max. total

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	area	corr. %	corr. % of total
1	2.966	11	26	60	BV 2	56998	1307575	100.00%	100.000%

Sum of corrected areas: 1307575

DEFAULT.M Thu Nov 17 12:35:24 2016

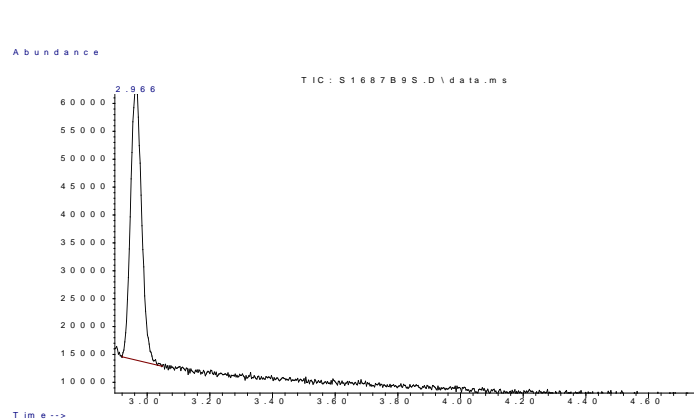
Library Search Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
 Data File : S1687B4S.D
 Acq On : 16 Nov 2016 13:33
 Operator :
 Sample : MME MEFTAH
 Misc : 45.5.10.150.2.FL0.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20
 ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1
 Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.1 Minimum Quality: 50
 C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 0
 Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: Chemstation Integrator - events.e

PK#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
-----	----	-------	------------	------	------	------

1	2.966	100.00	C:\Users\EFTQH\Desktop\iblio\wiley7n.1			
			Cyclohexane	3536	000110-82-7	95
			Cyclohexane	3539	000110-82-7	90
			Cyclohexane \$\$ Benzene, hexahydro-	3538	000110-82-7	90
			\$\$ Hexahydrobenzene \$\$ Hexamethyl			
			ene \$\$ Hexanaphthene \$\$ Cicloesano			
			\$\$ Cykloheksan \$\$ Rcr waste numb			
			er U056 \$\$ UN 1145			

DEFAULT.M Thu Nov 17 12:35:29 2016



Area Percent Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
 Data File : S1687B9S.D
 Acq On : 16 Nov 2016 13:49
 Operator :
 Sample : MME MEFTAH
 Misc : 45.5.10.150.2.FL0.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20
 ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1
 Integration Parameters: events.e
 Integrator: ChemStation
 Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
 Title :

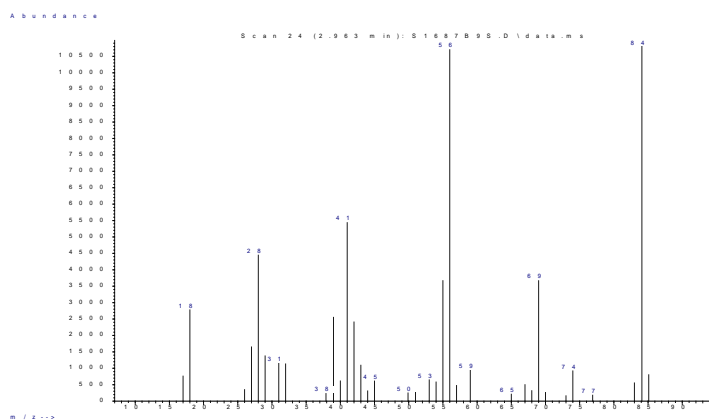
Signal : TIC: S1687B9S.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	area	corr. %	corr. % of total
--------	----------	------------	----------	-----------	-------	-------------	------	---------	------------------

1	2.966	9	25	53	BV	49279	1208773	100.00%	100.000%
---	-------	---	----	----	----	-------	---------	---------	----------

Sum of corrected areas: 1208773

DEFAULT.M Thu Nov 17 19:39:46 2016



Library Search Report

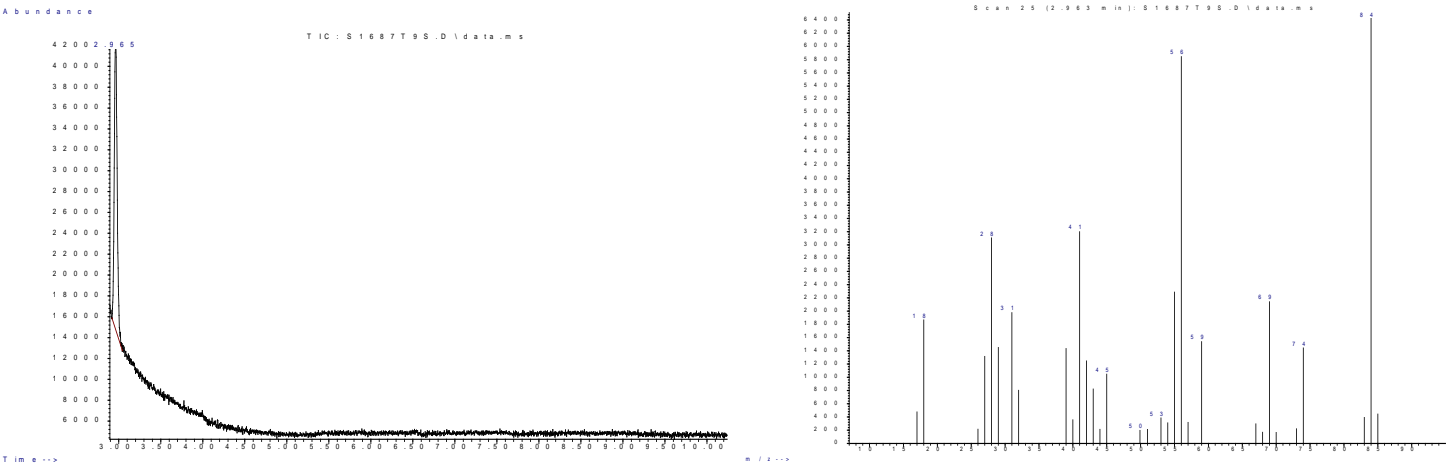
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
 Data File : S1687B9S.D
 Acq On : 16 Nov 2016 13:49
 Operator :
 Sample : MME MEFTAH
 Misc : 45.5.10.150.2.FL0.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20
 ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1
 Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.1 Minimum Quality: 50
 C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 0
 Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: Chemstation Integrator - events.e

PK#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
-----	----	-------	------------	------	------	------

1	2.966	100.00	C:\Users\EFTQH\Desktop\iblio\wiley7n.1			
			Cyclohexane	3535	000110-82-7	93
			Cyclohexane (CAS) \$\$ Hexanaphthene	3540	000110-82-7	93
			\$\$ Hexamethylene \$\$ Hexahydrobenz			
			ene \$\$ Benzene, hexahydro- \$\$ Cicl			
			oesano \$\$ Cyclohexaan \$\$ Cyclohexa			
			n \$\$ Cykloheksan \$\$ Rcr waste num			
			ber U056 \$\$ UN 1145			
			Cyclohexane	3539	000110-82-7	93

DEFAULT.M Thu Nov 17 19:39:54 2016

Annexe 18/ Souche1687-toluène



Area Percent Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
Data File : S1687T9S.D
Acq On : 1 Dec 2016 00:09
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc :
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1

Integration Parameters: events.e
Integrator: ChemStation

Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
Title :

Signal : TIC: S1687T9S.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % area	% of max.	% total
1	2.966	10	26	53	BV 3	27573	674310	100.00%	100.000%	

Sum of corrected areas: 674310

DEFAULT.M Mon Dec 19 07:58:13 2016

Library Search Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
Data File : S1687T9S.D
Acq On : 1 Dec 2016 00:09
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc :
ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1

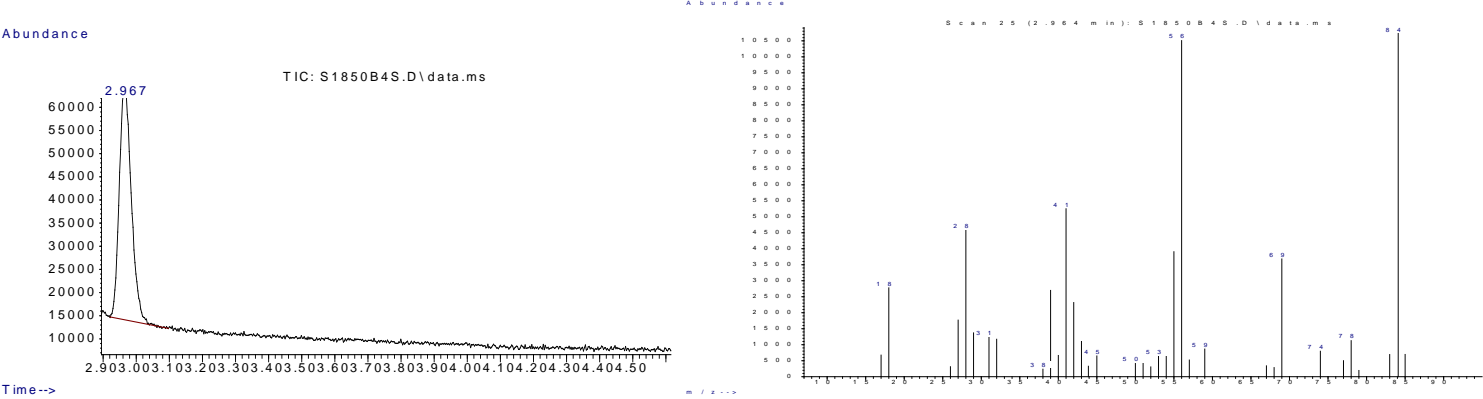
Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 50
C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.l Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: Chemstation Integrator - events.e

PK#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	2.966	100.00	C:\Users\EFTQH\Desktop\iblio\NIST02.L Cyclohexane	1433	000110-82-7 76	
			Cyclohexane	1434	000110-82-7 76	
			Cyclohexane	1436	000110-82-7 70	

DEFAULT.M Mon Dec 19 07:58:18 2016

Annexe 18/ Souche1850-benzène



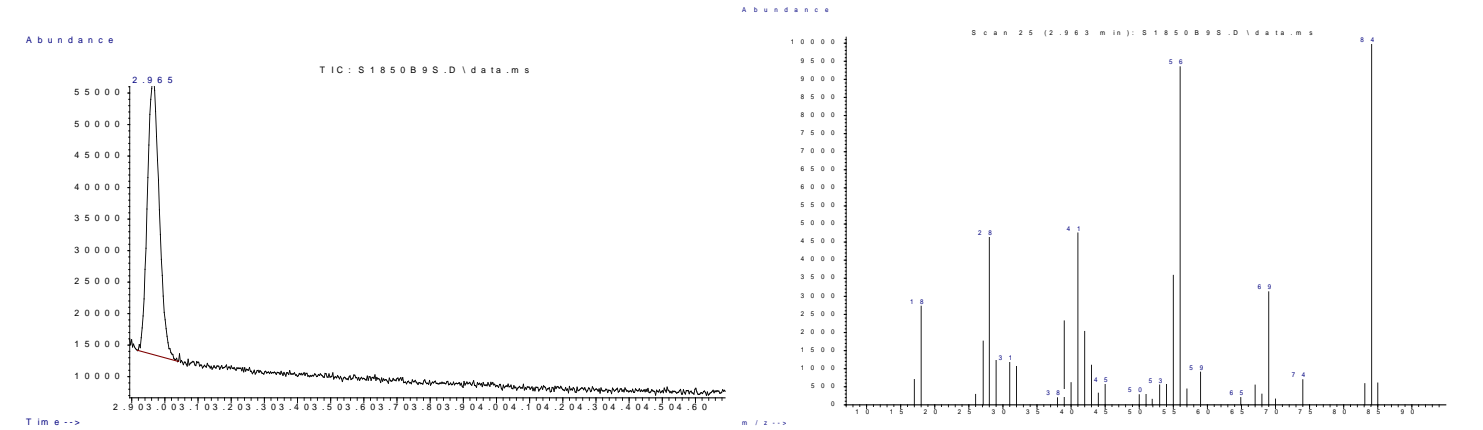
Area Percent Report
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S1850B4S.D
Acq On : 16 Nov 2016 15:01
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc : 45.5.10.150.2.FLO.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20
ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1
Integration Parameters: events.e
Integrator: ChemStation
Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
Title :
Signal : TIC: S1850B4S.D\data.ms
peak R.T. first max last PK peak corr. corr. % of
min scan scan scan TY height area % max. total

1 2.967 10 26 71 BB 4 51012 1281203 100.00% 100.000%
Sum of corrected areas: 1281203
DEFAULT.M Thu Nov 17 19:42:39 2016

Library Search Report
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S1850B4S.D
Acq On : 16 Nov 2016 15:01
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc : 45.5.10.150.2.FLO.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20
ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1
Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.l Minimum Quality: 50
C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 0
Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: Chemstation Integrator - events.e

PK#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#
1	2.967	100.00	C:\Users\EFTQH\Desktop\iblio\wiley7n.l Cyclohexane	3535	000110-82-7 93
			Cyclohexane (CAS) \$\$ Hexanaphthene	3540	000110-82-7 93
			\$\$ Hexamethylene \$\$ Hexahydrobenz		
			ene \$\$ Benzene, hexahydro- \$		
			Cicl oesano \$\$ Cyclohexaan \$		
			Cyclohexa n \$\$ Cykloheksan \$		
			Rcra waste num ber U056 \$		
			UN 1145 Cyclohexane (CAS) \$		
			Hexanaphthene \$	3533	000110-82-7 93
			Hexamethylene \$		
			Hexahydrobenz ene \$		
			Benzene, hexahydro-		

DEFAULT.M Thu Nov 17 19:42:44 2016



Area Percent Report
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S1850B9S.D
Acq On : 16 Nov 2016 15:15
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc : 45.5.10.150.2.FLO.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20
ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1
Integration Parameters: events.e
Integrator: ChemStation
Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
Title :
Signal : TIC: S1850B9S.D\data.ms
peak R.T. first max last PK peak corr. corr. % of
min scan scan scan TY height area % max. total

1 2.966 9 26 52 BV 2 44330 1093799 100.00% 100.000%
Sum of corrected areas: 1093799
DEFAULT.M Thu Nov 17 19:46:21 2016

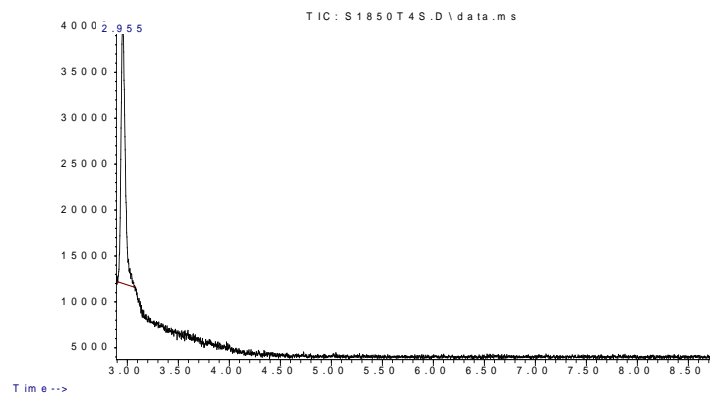
Library Search Report
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\MME MEFTAH\
Data File : S1850B9S.D
Acq On : 16 Nov 2016 15:15
Operator :
Sample : MME MEFTAH
Misc : 45.5.10.150.2.FLO.5ML/MIN.0.2ULSPL1/20
ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1
Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.l Minimum Quality: 50
C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 0
Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: Chemstation Integrator - events.e

PK#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	2.966	100.00	C:\Users\EFTQH\Desktop\iblio\wiley7n.l Cyclohexane	3535	000110-82-7 93	
			Cyclohexane (CAS) \$\$ Hexanaphthene	3540	000110-82-7 93	
			\$\$ Hexamethylene \$\$ Hexahydrobenz			
			ene \$\$ Benzene, hexahydro- \$			
			Cicl oesano \$\$ Cyclohexaan \$			
			Cyclohexa n \$\$ Cykloheksan \$			
			Rcra waste num ber U056 \$			
			UN 1145 Cyclohexane (CAS) \$			
			Hexanaphthene \$	3533	000110-82-7 93	
			Hexamethylene \$			
			Hexahydrobenz ene \$			
			Benzene, hexahydro-			

DEFAULT.M Thu Nov 17 19:46:26 2016

Annexe 18/ Souche1850-toluène

Abundance



Area Percent Report

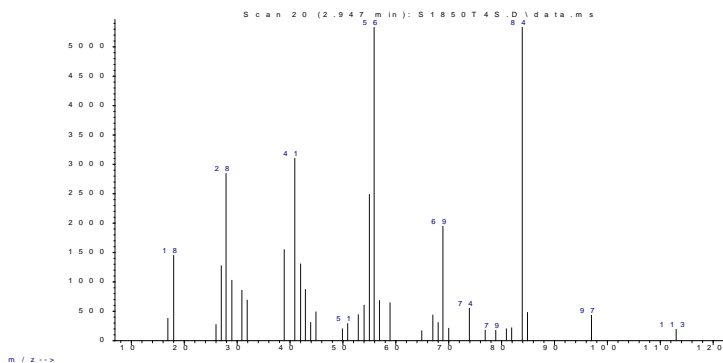
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
 Data File : S1850T4S.D
 Acq On : 4 Dec 2016 21:52
 Operator :
 Sample : MME MEFTAH
 Misc :
 ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
 Integration Parameters: events.e
 Integrator: ChemStation
 Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
 Title :
 Signal : TIC: S1850T4S.D\data.ms

peak #	R.T.	first scan	max scan	last scan	PK	peak TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	2.956	6	23	62	BB 3	28199	819127	100.00%	100.000%	

Sum of corrected areas: 819127

DEFAULT.M Mon Dec 19 08:00:35 2016

Abundance



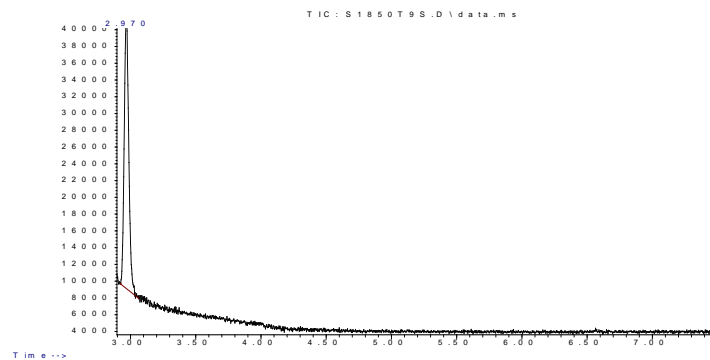
Library Search Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
 Data File : S1850T4S.D
 Acq On : 4 Dec 2016 21:52
 Operator :
 Sample : MME MEFTAH
 Misc :
 ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
 Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 50
 C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.l Minimum Quality: 0
 Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: Chemstation Integrator - events.e

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	2.956	100.00	C:\Users\EFTQH\Desktop\iblio\NIST02.L			
			1-Pentene, 2-methyl-	1464	000763-29-1	90
			Cyclohexane	1436	000110-82-7	87
			Cyclohexane	1434	000110-82-7	87

DEFAULT.M Mon Dec 19 08:00:39 2016

Abundance



Area Percent Report

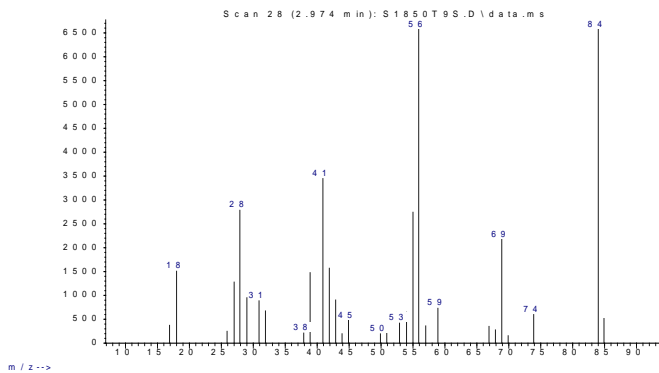
Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
 Data File : S1850T9S.D
 Acq On : 4 Dec 2016 22:11
 Operator :
 Sample : MME MEFTAH
 Misc :
 ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
 Integration Parameters: events.e
 Integrator: ChemStation
 Method : C:\msdchem\1\METHODS\DEFAULT.M
 Title :
 Signal : TIC: S1850T9S.D\data.ms

peak #	R.T.	first scan	max scan	last scan	PK	peak TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	2.971	10	27	58	BV 2	32079	782371	100.00%	100.000%	

Sum of corrected areas: 782371

DEFAULT.M Mon Dec 19 08:02:37 2016

Abundance



Library Search Report

Data Path : C:\Users\EFTQH\Desktop\mme meftah T\TOLUENE\
 Data File : S1850T9S.D
 Acq On : 4 Dec 2016 22:11
 Operator :
 Sample : MME MEFTAH
 Misc :
 ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1
 Search Libraries: C:\Users\EFTQH...iblio\NIST02.L Minimum Quality: 50
 C:\Users\EFTQH...iblio\wiley7n.l Minimum Quality: 0
 Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: Chemstation Integrator - events.e

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	2.971	100.00	C:\Users\EFTQH\Desktop\iblio\NIST02.L			
			Cyclohexane	1436	000110-82-7	93
			Cyclohexane	1434	000110-82-7	90
			Cyclohexane	1433	000110-82-7	86

DEFAULT.M Mon Dec 19 08:02:42 2016



RESEARCH PAPER

OPEN ACCESS

In vitro degradation of benzene by the use of ubiquitous bacteria

Afef Meftah^{*1}, Foudil Khelifa², Abdallahbourhane Djebar³, Khaldoun Bachari⁴

¹Department of Marine Science, Faculty of Science, University of Badji Mokhtar, Annaba, Algeria

²Institut Pasteur of Algeria Annex Constantine, Constantine, Algeria

³Department of Marine Science, Faculty of Science, University of Badji Mokhtar, Annaba, Algeria

⁴Center for Scientific and Technical Research in Physical-Chemical Analysis (CRAPC),
BouIsmaïl, Algérie

Key words: Aromatic hydrocarbons, Benzene, GC/MS HP6890/HP 5973 MS (Agilent Technologies), MALDI-Tof (Bruker Daltonics), Ubiquitous bacteria

<http://dx.doi.org/10.12692/ijb/11.6.139-150>

Article published on December 12, 2017

Abstract

This study focuses on specifying a number of ubiquitous non-fastidious bacteria isolated from urine hospitalized patients for their abilities to degrade benzene. Using the MALDI-Tof technique (Bruker Daltonics), these opportunist bacteria have been identified. The bacteria were inoculated and incubated in sterile water contaminated with pure benzene (99.98% purity) for 63 days, at room temperature with continuous oxygenation. Analysis by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) HP6890/HP 5973 MS (Agilent Technologies) allowed us to determine the concentration of benzene and its derivatives. The results showed that not only the strains were able to completely degrade benzene in a single derivative: cyclohexane after less than 30 days. But also reveals variations in cyclohexane concentrations from one strain to another. The 2 strains belonging to the family Moraxellaceae S1670 and S1671 degrade benzene faster with concentrations 0.0475 µg/µl and 0.0727 µg/µl respectively, While both strains S5 and S476 of the Enterobacteriaceae family, had consumed totally and more easily cyclohexane with the lowest concentrations 0.0316 µg/µl and 0.0449 µg/µl respectively, this research confirmed that benzene and cyclohexane were completely consumed without producing other identifiable intermediate metabolites.

*** Corresponding Author:** Afef Meftah ✉ meftah.afef@gmail.com

Introduction

Human activity (industrial, agricultural, fishing, tourism etc.) is one of the major environmental aggressions. According to the commitments from the Blue Book of the Oceans Round Table, 80% of the pollution comes from terrestrials activities, and 20% from maritime activities. However, the most conventional the oldest and the most mediatized of marine pollution remains indisputably hydrocarbon pollution (ATSDR, 2007).

Hydrocarbons whether total or aromatic, monocyclic or polycyclic, contain a very large number of organic compounds. The most toxic are mono/polycyclic Aromatic Hydrocarbons, as they are classified as carcinogenic, mutagenic and reprotoxic. In addition to their ubiquitous nature, their high toxicity justifies their classification as Persistent Organic Pollutants (POP) and their inclusion as priority substances on the lists of the European Commission, the United States Environmental Protection Agency and the World Health Organization (Marchand *et al.*, 1996, Khodaei K *et al.*, 2017).

Different solutions have been proposed to treat environments contaminated with mono/polycyclic hydrocarbons, Physical and chemical processes such as stripping, flotation, thermal desorption, solvent extraction, ultrasound, electrochemical treatment (Fritsche and Hofrichter, 2008), have proven their limit do to their high expenses and the difficulties for their applications.

Current researches are focusing on elimination of aromatic hydrocarbons by bioprocesses; the interest of these new techniques mainly lies in their non-polluting aspect and the absence of chemical sub-products (Lan, 2009). Bacteria which degrade Hydrocarbon are not a new invention; they have existed since millions of years. They are omnipresent in seawater on a global scale, but only in small quantities and feed on traces of hydrocarbons naturally present in the environment. Given the number of anthropogenic pollution, the challenge for these bacteria would consist to degrade large volumes of aromatic hydrocarbons at a given site.

Despite their potential ecological importance, little knowledge about the biological processes of these bacteria.

We are interested in the biodegradation of monoaromatic hydrocarbons such as benzene, toluene, ethylbenzene, as they are considered as the most common monoaromatic pollutants. Except that, benzene is the most robust in almost all field studies, as a carcinogen and therefore the most toxic (Farhadian M *et al.*, 2006; Farhadian M *et al.*, 2008) It is within this context that our work studied the biodegradation of benzene by pure locally isolated strains already having the capacity to degrade aromatic hydrocarbons, so that the quantitative and qualitative monitoring of benzene and the growth of our strains would be Synchronous, for the purpose of large exploitation on a global scale.

Our objectives in this study were to identify and to target aero-anaerobic facultative bacteria that are ubiquitous and tenacious, capable of degrading high concentrations of benzene under unfavorable conditions. To this end, an experimental approach was developed consisting of isolating 10 bacterial strains and injecting them into sterile and contaminated sea water with benzene.

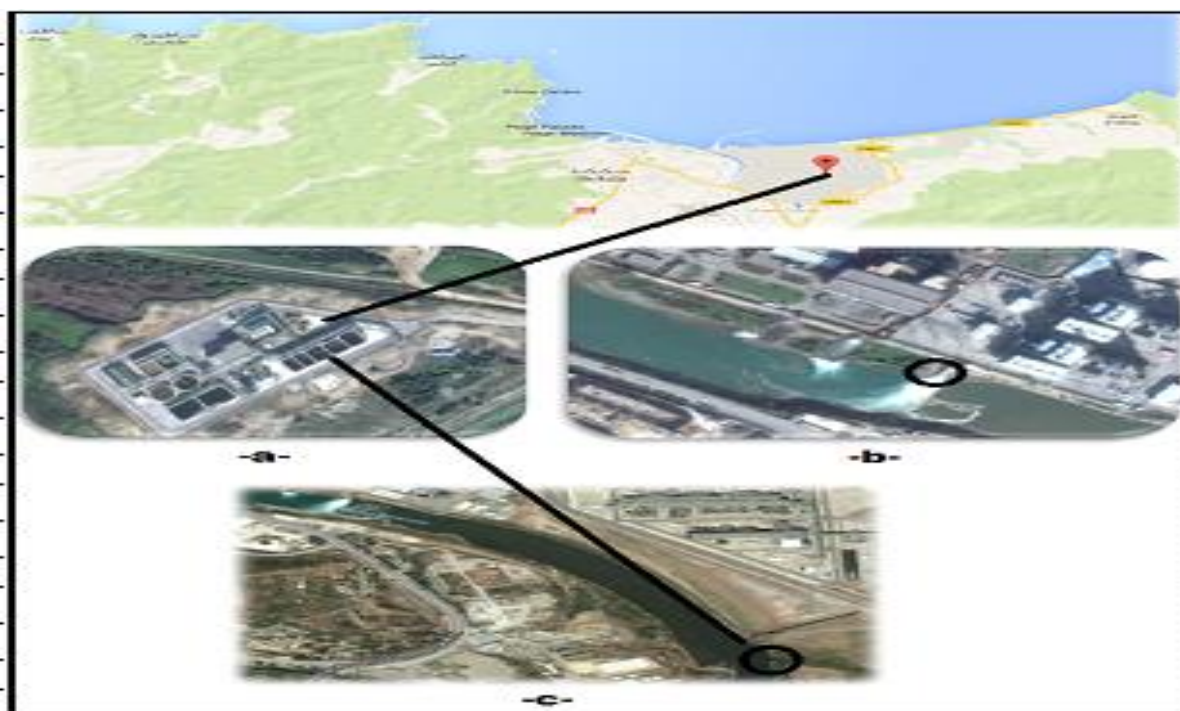
Materials and methods

Description of the field site

To preserve the hostile conditions of seawater polluted by industrial discharges, water samples were taken from the junction point of three discharge sites: effluent treatment plant 1100 (Effluent Treatment Plant 2) -b- Oued Zeramna -c- Oued Saf-saf, from the industrial zone of Skikda (Fig. 1).

Bacterial strains used

Microorganisms such as bacteria, fungi and microalgae play a key role in the elimination of mono-aromatic hydrocarbons *in situ*. However, as bacteria are faster and easier to handle (Table 2), their use is preferred (Roger and Jacq, 2000; Prenafeta-Boldu *et al.*, 2002; Schulze and Tiehm, 2004; Nikolova and Nenov, 2005).



a-[ETP2 1101: 36°52'00.4"N 6°57'57.7"E], b- [Ouadzeramna 36°52'41.2"N 6°56'08.9"E],
c- [Ouadsafsaf 36°87'23.4"N 6°94'25.7"E].

Fig. 1. Location of study and sampling sites (Google map 2015).

Given the difficulties to cultivate bacteria found naturally in aquatic and telluric environments contaminated by aromatic hydrocarbons, we have used ubiquitous species isolated from human pathological samples (Urine) having specificity to degrade aromatic hydrocarbons. The use of bacteria isolated from human samples for purely environmental purposes is attempted for the first time.

Based on bibliographic data, their common properties as well as the fact that they belong to the same genus in varieties of different environments, we selected about 10 *Nos* bacteria which were isolated from different urine specimens at the laboratory of the Military University Regional Hospital of Constantine (Table 3). Whose 6 belongs to the Enterobacteriaceae family, 2 to the Moraxellaceae family, 1 to the Pseudomonadaceae family and one to the Enterococaceae.

Proteomic biochemical characteristics

Family of Enterobacteriaceae

It is a very large family that represents more than half

of laboratory isolates, is mostly hosts of the gastrointestinal tract, but some such as *Serratia* are met predominantly in the external environments (Avril JL *et al.*, 1992).

Family of Moraxellaceae

The family *Moraxellaceae* is a member of the order *Pseudomonadales*, currently countaining the genus *Acinetobacter*, *Moraxella* and *Psychrobacter*. Many of these microorganisms are part of this family have questionable identities, generating difficulties in the interpretation of publications (Shuai Li *et al.*, 2017).

Acinetobacter are ubiquitous bacteria and are part of the normal flora of humans and animals (Avril JL *et al.*, 1992).

Family of Pseudomonadaceae

This family currently includes 04 genres: *Pseudomonas* and *Xanthomonas*, most of them are phyto-pathogenic, they are also found in the context of hospital-acquired infections and *Frateria* and *Zoogloea* exclusively saprophyte (Avril JL *et al.*, 1992).

Family of Enterococcaceae

They are commensals of gastrointestinal flora, there are about thirty species: *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* are the most frequently isolated in pathological situation (Avril JL *et al.*, 1992).

The isolated bacterial species were identified by the Api®20 E galleries. Confirmation was made by Maldi-Tof mass spectrometry (Bruker, biotyper 2.0).

MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser

Desorption/Ionization-Time Of Flight

MALDI-Tof is a technique that was introduced as an ionization method for a wide range of biological molecules in 1998 by Hillen Kamp and Karas and has since become a generalized analytical tool for analyzing proteins (Hillenkamp and Karas, 1991).

The sample (young culture) to be analyzed by MALDI-TOF is prepared by mixing the sample with an excess solution of an organic absorbent compound called a matrix. When the matrix crystallizes during drying, the sample trapped in the co-crystallized matrix also is bombarded with a laser beam. Desorption and ionization with the laser beam generates mono-proton ions from analytes in the sample. The protonated ions are then accelerated to a fixed potential and the latter are separated from each other on the basis of the mass/charge ratio (m/z). The loaded analytes are then detected and measured using time-of-flight (TOF) analyzers (Neelja *et al.*, 2015).

During the MALDI-TOF analysis, the m/z ratio of an ion is measured by determining the time it takes to travel the length of the flight tube (Yates, 1998) and to produce a mass spectrum. The resulting mass spectrum is a kind of unique and specific fingerprint of the analyzed microorganism protein composition (Protein Microorganism Fingerprint), which can be compared to a spectral database (Descy *et al.*, 2010). The identification of bacteria by MALDI-TOF MS is made by comparing the MS spectrum (PMF) of an unknown microbial isolates in comparison to the MS spectrum of the known microbial isolates contained in the database.

For the identification of germs at the species level, a typical mass range of m/z of 2-20 kDa is used, which mainly represents ribosomal proteins with some maintenance proteins. Ribosomal proteins are the most abundant, accounting for about 60-70% of the dry weight of a microbial cell. The mass range of 2-20 kDa is used to identify a particular microorganism by associating its PMF with the PMF of the ribosomal proteins contained in a large open database (Drancourt M *et al.*, 2010) Thus, the identity of a microorganism can be established by gender and in many cases by species (Fagerquist *et al.*, 2010).

Implementation of experiments on the biodegradation of benzene in seawater In Vitro

Preliminary tests

Seawater samples collected were sterilized and then divided into 11 sterile vials, one of which was negative control (T_0). Each vial contains 1000 ml of sterilized sea water by autoclaving, to which was added pure benzene (99.98% purity as shown in Table 04). The flasks were well stirred to obtain a representative sample, thus the initial benzene concentration was 250 mg/l. Each vial was subsequently inoculated with bacteria from our list (Table 3) at a rate of about 8×10^{10} vial bacteria.

The inoculated bacteria were cultured on ordinary agar medium and the enrichment was carried out on BHIB broth to facilitate bacterial multiplication (proteose peptone 10.0 g, veal brain's infusion 12.5 g, infusion of heart of beef 5.0 g, glucose 2.0 g, chloride of sodium 5.0g, sodium hydrogenphosphate 2.5g, pH = 7.4).

The vials were hermetically sealed with rubber stoppers to avoid contamination and also to minimize the evaporation of benzene and incubated for 63 days at 25 ° C with continuous oxygenation using an aquarium motors. Daily cultures were carried out to monitor the purity of the species. After 4 weeks, the first sample was taken, than a second sample was taken after 9 weeks in order to evaluate the biodegradation of the benzene.

Physico-chemical techniques

Analysis of benzene by GC/MS

The association of gas chromatography with mass spectrometry is an analytical technique of choice. Due to the high sensitivity of this technique and the quality of the results obtained, it's used to identify many components of complex mixtures such as monocyclic aromatic hydrocarbons (Yassaa *et al.*, 1999). The analysis of benzene and its degradation products was carried out by Gas Chromatography (GC) using an HP6890 (Agilent Technologies) equipped with a column MDN12 (30 mx0.25 mm, 25 µm d stationary phase thickness, Supleco) in which passes ultra-pure helium (Helium purity: 6.0), the vector gas, at 0.5 ml/min. the GC is coupled to an HP 5973 Mass Spectrometry (MS) (Agilent Technologies) mass detector operating with 70eV ionization energy and a 2000 volt voltage. The instrument was set to Total-Ion-Chromatogram (TIC) mode to detect the intensities of all mass spectral peaks belonging to the same scan, including background noise and sample components.

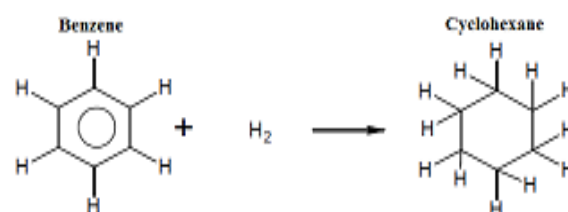
Analysis of benzene

To extract the organic matter, 1 ml from the original sample T₀ (negative control) as well as 1 ml of each sample was mixed with 0.5 ml of diethyl ether. The whole is carefully shaken for 15 min in order to reach the extraction equilibrium, 1 µl of the supernatant was injected into the column with a flow rate of 0.5 ml/min. The oven temperature was increased from 45 °C. to 150 °C. according to a gradient of 10 °C/min of pitch and then maintained for 10 min at 150 °C. This program has been optimized for the separation of

monocyclic aromatic hydrocarbons (Yassaa *et al.*, 1999). The monocyclic aromatic hydrocarbons were indicated between 2 and 17.5 min and detected by the mass spectrometer in order to be identified. The concentration of benzene was calculated by injecting 0.5 µl of pure benzene (purity of 99.98%), based on a calibration curve obtained from a standard mixture (supplied by Agilent).

Analysis of Cyclohexane by GC / MS

Among the benzene derivatives, cyclohexane (Table 5). That is obtained by passing a gas stream rich in hydrogen in benzene containing a catalyst of hydrogenation; each molecule of benzene fixes three molecules of hydrogen. Thus cyclohexane is obtained.



Cyclohexane standards were prepared S1, S2, S3, S4, S5, S6 of different concentrations 7.785×10^{-1} , 7.785×10^{-4} , 7.785×10^{-7} , 7.785×10^{-5} , 7.785×10^{-3} , 7.785×10^{-2} respectively.

Results

MALDI-OF analysis

For the majority of our bacteria, we were able to identify the species with a credible score (Table 6). the identification by Maldi Tof (Bruker Daltonics) had allowed the confirmation of the results obtained by the Api®20 galleries.

Table 1. Geographical coordinates of the discharge sites of the industrial zone, Wilaya of Skikda-Algeria.

Site's name	Geographical location
a-Effluent Treatment Plant 2 (ETP2 1101)	36°52'00.4"N 6°57'57.7"E
b-Zeramnaouad	36°52'41.2"N 6°56'08.9"E
c-Saf-safouad	°87'23.4"N 6°94'25.7"E

The two species S1670 and S1664 showed a highly probable identification score: 2.397 and 2.367 respectively. While 7species which are S1671, S1620,

S5, S1663, S1687, S2 and S476 indicate secure genus identification whose score is between [2.277-2.058]. However, strain S1850 has the lowest score of 1.976.

Results of the Gas Chromatography and Mass Spectrometry (GC / MS)

Expression of results before treatment

Analysis of To by GC/MS confirmed the presence of benzene, even before starting the experiment, with a concentration of 0.097 µg/µl (Fig. 3).

Expression of results after 4 weeks

By analyzing our samples one by one after 4 weeks of incubation, the results obtained indicate the almost total biotransformation of benzene to cyclohexane, under normal conditions, by all the strains, at different concentrations.

Table 2. Some microorganisms involved in the degradation of monoaromatic hydrocarbons (Be: Benzene, To: Toluene, Eb: Ethylbenzene, Xy: Xylenes, oXy: o-xylene, pXy: p-xylene, mXy: m-xylene).

Bacteria	Hydrocarbons used	References
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	Be, To, Eb, Xy	Deeb and Alvarez-Cohen (1999)
<i>Rhodococcus</i> sp. <i>RR1, RR2</i>	Be, To, Eb, mXy, pXy	Deeb and Alvarez-Cohen (2000)
<i>Ralstonia pickettii</i> <i>PKO1</i>	To	Parales <i>et al.</i> (2000)
<i>Rhodococcus</i> sp. <i>strain DK17</i>	Be, To, Eb, oXy	Farhadiana <i>et al.</i> (2007)
<i>Pseudomonas</i> sp. <i>ATCC 55595</i>	Be, pXy	Collins and Daugulis (1999)
<i>Burkholderiacepacia G4</i>	To	Paralesa <i>et al.</i> (2000)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Be	Kim <i>et al.</i> (2003)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Be, To, Eb, oXy	Shim <i>et al.</i> (2002,2005)
<i>Pseudomonas putida F1</i>	Be, To, Eb	Paralesa <i>et al.</i> (2000)
<i>Pseudomonas putidasouche mt-2</i>	To, mXy, pXy	Morascha <i>et al.</i> (2002)
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Be, To, Eb, Xy	Nielsen <i>et al.</i> (2006)
<i>Blastochloris sulfovirdis</i> <i>ToP1</i>	To	Van Hamme <i>et al.</i> (2003)
<i>Desulfobacterium cetonicum</i>	To	Shim <i>et al.</i> (2002,2005)

Table 3. The bacteria used in the trial.

Reference	Species
S05	<i>Citrobacter freundii</i>
S476	<i>Citrobacter youngae</i>
S1620	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
S1664	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
S02	<i>Klebsiella oxytoca</i>
S1687	<i>Serratia marcescens</i>
S1670	<i>Acinetobacter baumannii</i>
S1671	<i>Acinetobacter baumannii</i>
S1850	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
S1663	<i>Enterococcus faecalis</i>

The highest concentrations of cyclohexane are 0.0964 µg/µl, 0.0864 µg/µl and 0.0846 µg/µl assigned to the bacteria S1663 (*Enterococcus faecalis*), S476 (*Citrobacter youngae*) and S1664 (*Klebsiella pneumoniae*), respectively. However, S1670 (*Acinetobacter baumannii*),

S1620 (*Klebsiella pneumoniae*), and S1671 (*Acinetobacter baumannii*) the cyclohexane concentrations were lowest respectively 0.0475 µg/µl, 0.0599 µg/µl and 0.0727 µg/µl (Table 8). For the remaining their concentrations fluctuate between 0.0817 µg/µl and 0.0835 µg/µl.

Expression of results after 9 weeks

After 9 weeks of incubation, a decrease in cyclohexane concentrations was observed in all strains with varying proportions. It is S05 (*Citrobacter freundii*) which consumes cyclohexane more rapidly than the others with a concentration of 0.0316 µg/µl, while S1664 (*Klebsiella pneumoniae*) is the slowest with a concentration of 0.0842 µg/µl.

Discussion

Monoaromatic hydrocarbons in particular benzene are compounds mutagenic and reprotoxic. Benzene is considered the most recalcitrant which makes it very difficult to oxidize both chemically and biologically.

This compound has been shown to serve as carbon and energy sources for aerobic bacteria growing with nitrate, manganese, ferric iron, sulfate, or oxygen as the sole electron acceptor (Chakraborty and Coates, 2004).

Table 4. characteristics of added Benzene in our samples.

Parameter	Tank number	Non-aromatic products	Benzene
Product			
Benzene	38	0.02 %	99.98 %

Table 5. Description and identification of the cyclohexane used.

Product identification	
Product form	Substance
Trade name	Cyclohexane for synthesis
Chemical name	Cyclohexane
Index number	200-661-000
CE number	203-806-2
CAS number	111-82-7
REACH registration number	BA 110-82-7-0109-011
Raw formula	C ₆ H ₁₂
Molar mass	84.16 g/mol

This has been confirmed by the results of Hunkeler *et al*, the added oxidants were almost completely consumed during the last year of engineered in situ bioremediation, and dissolved Fe(II), Mn(II) and CH₄ were detected (Table 9). The availability of oxidants probably still limited the total rate of biodegradation in the source area during the final period of engineered in situ bioremediation. However, the total flux of dissolved petroleum hydrocarbons decreased from 5 mol/day at the beginning to 0.2 mol/day at the end of the study (Hunkeler *et al.*, 2002).

Which corroborate with Scow and Hicks research thus Kao *et al*, The biodegradation is naturally

enhanced by providing nutrients, electron acceptors and microorganisms degrading aromatic hydrocarbons (Scow and Hicks, 2005). Kao and Prosser have adopted a mass flux approach to calculate contaminant mass reduction and field-scale decay rate at a gasoline spill site. The mass flux calculation shows that up to 87% of the dissolved total benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) isomers removal was observed via natural attenuation at this site. Results reveal that natural biodegradation was the major cause of the BTEX mass reduction among the natural attenuation processes, and approximately 88% of the BTEX removal was due to the natural biodegradation process. The calculated total BTEX first-order attenuation and

biodegradation rates were 0.036 and 0.025% per day, respectively. The results reveal that natural biodegradation was the main cause of mass reduction of BTEX in natural attenuation processes, and that about 88% of BTEX removal was due to the natural

biodegradation process. The first-order attenuation and biodegradation rates calculated for the total BTEX were 0.036 and 0.025% per day, respectively (Kao and Prosser, 2001).

Table 6. The scores of each species identified by MALDI-TOF (or even the meanings of the scores in Table 7 above).

Analyte name	Analyte ID	Organism (best match)	Score value	Organism (second best match)	Score value
A7 (++) (C)	S5	<i>Citrobacter freundii</i>	2.261	<i>Citrobacter freundii</i>	2.199
A8 (++) (B)	S476	<i>Citrobacter youngae</i>	2.058	<i>Citrobacter freundii</i>	2.018
A10 (+++)(A)	S1670	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2.367	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2.221
D3 (+++)(C)	S1664	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.397	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.283
D4 (++) (C)	S1620	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.270	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.226
D5 (++) (A)	S1663	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.158	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.157
D6 (++) (C)	S2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.151	<i>Raoultella omithinolytica</i>	1.933
D7 (++) (A)	S1671	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2.277	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2.15
D10 (++) (A)	S1687	<i>Serratia marcescens</i>	2.157	<i>Serratia marcescens</i>	2.022
A9 (+) (B)	S1850	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.976	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.976

Table 7. Meaning of the scores obtained.

Range	Description	Symbols	Color
2.300...3.000	Highly probable species identification	(+++)	Green
2.000...2.299	Secure genus identification probable species identification	(++)	Green
1.700...1.999	Probable genus identification	(+)	Yellow
0.000...1.699	Not reliable identification	(-)	Red

In this study, the degradation *in vitro* of benzene using ubiquitous strains under ordinary conditions was found to be more than effective. Indeed, the added benzene was completely eliminated by all our

strains after less than 30 days with the appearance of a single compound in our water, which is cyclohexane.

Table 8. Concentrations of cyclohexane after 4 weeks and 9 weeks of incubation.

Time Stains	After 04 weeks (µg/µl)	After 09 Weeks (µg/µl)
S 1850	0.0821	0.0632
S 05	0.0812	0.0316
S 476	0.0864	0.0449
S 02	0.0817	0.0531
S 1687	0.0835	0.0746
S 1664	0.0846	0.0824
S 1671	0.0727	0.0705
S 1663	0.0964	0.0446
S 1670	0.0475	0.0457
S 1620	0.0599	0.0483

It is a hydrogenation of benzene, with different concentrations, which can be explained by the fact that each of our bacteria degrades not only benzene but also derivatives derived from benzene.

While knowing that hydrogenation of benzene can only be carried out under conditions specific of temperature, pressure and particular asset catalyst.

Table 9. Rate of supply (F) and rates of consumption (ΔF) of species involved in microbial processes in the subsurface (Hunkeler *et al.*, 2002).

Compounds Years	O ₂		NO ₃ ⁻		Mn _(II)	Fe _(II)	SO ₄ ²⁻		CH ₄	PHC
	F	ΔF	F	ΔF	ΔF	ΔF	F	ΔF	ΔF	ΔF
1993	3 2	-26	89	-80	1.0	5.6	17	-5.6	19	0.5
1994	1 7	-15	24	-21	0.8	8.1	12	-9.2	19	-
1995	1 6	11	21	-10	0.1	2.4	10	-2.6	7.8	0.2
1996	2 1	-14	22	-7	0.4	3.5	10	-1.5	7.8	0.2
1997	2 0	-13	22	-7	0.3	3.9	10	-2.2	5.8	-

All rates are in mol/day. - : not determined. O₂: oxygen. NO₃⁻: Nitrate. Mn_(II): Manganese. Fe_(II): ferrous. SO₄²⁻: Sulfate. PHC: Petroleum Hydrocarbons.

In this study, benzene is completely converted to cyclohexane under normal conditions, it is also noted that the concentration of cyclohexane decreases without the formation of other toxic secondary products.

Indeed, strains S1670 (*Acinetobacter baumannii*), S1671 (*Acinetobacter baumannii*) and S1620

(*Klebsiella pneumoniae*) degrade benzene faster than cyclohexane according to the results obtained. After 4 weeks, cyclohexane concentrations were 0.0475 µg/µl, 0.0727 µg/µl and 0.0599 µg/µl respectively. Whereas after 63 days the concentrations decreased slightly as follows 0.0457 µg/µl, 0.0705 µg/µl and 0.0483 µg/µl.

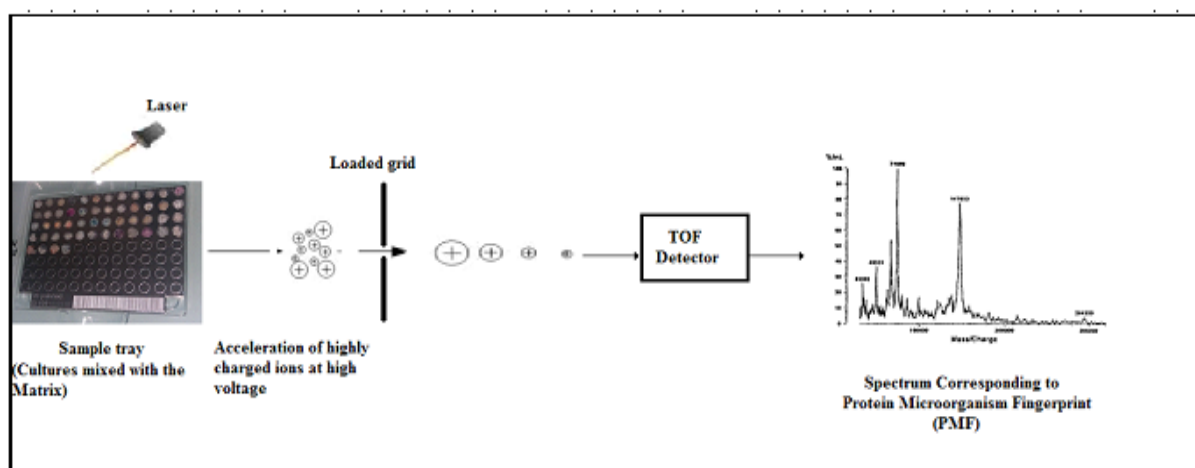


Fig. 2. Diagram showing the principle of MALDI-TOF MS.

According to researches of Reinhard, the rates of benzene's biodegradation through bacteria were negligible (Reinhard *et al.*, 2005), while the

experiments of Anderson and Lovely have proved the degradation of benzene within 25 a 35 days (Anderson and Lovley, 2000).

The S1663 strain (*Enterococcus faecalis*) degrades benzene much less rapidly than cyclohexane, as shown by concentrations 0.0964 µg/µl (after 30 days) and 0.0446 µg/µl (after 63 days).

The same behavior is observed with S05 (*Citrobacter freundii*) and S476 (*Citrobacter youngae*), which had

found difficulties to degrade benzene, but degrade more readily cyclohexane. Grbic-Gralic and Vogel found that total benzene's biodegradation occurs only in the absence of any other carbon substrate, and that when other monoaromatic hydrocarbons are present with higher amounts than benzene, degradation of benzene did not happen.

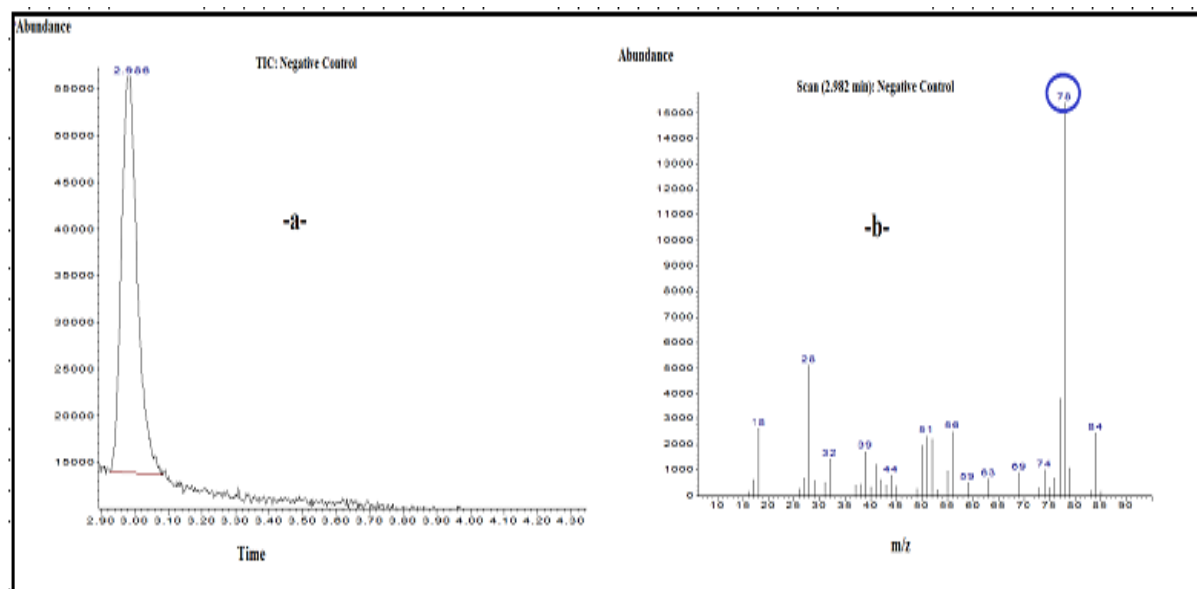


Fig. 3. GC/MS spectrum of negative control at To: theoretical retention time 2.98 min- $m/z = 78$. The signature m/z of the benzene is surrounded in blue.-a-Gas Chromatography -b-Mass Spectrometry.

This shows that bacteria degrade benzene only as a last resort, because benzene is the most resistant

pollutant in almost all field studies, as a carcinogen and therefore the most toxic (Grbic-Gralic and Vogel, 1987).

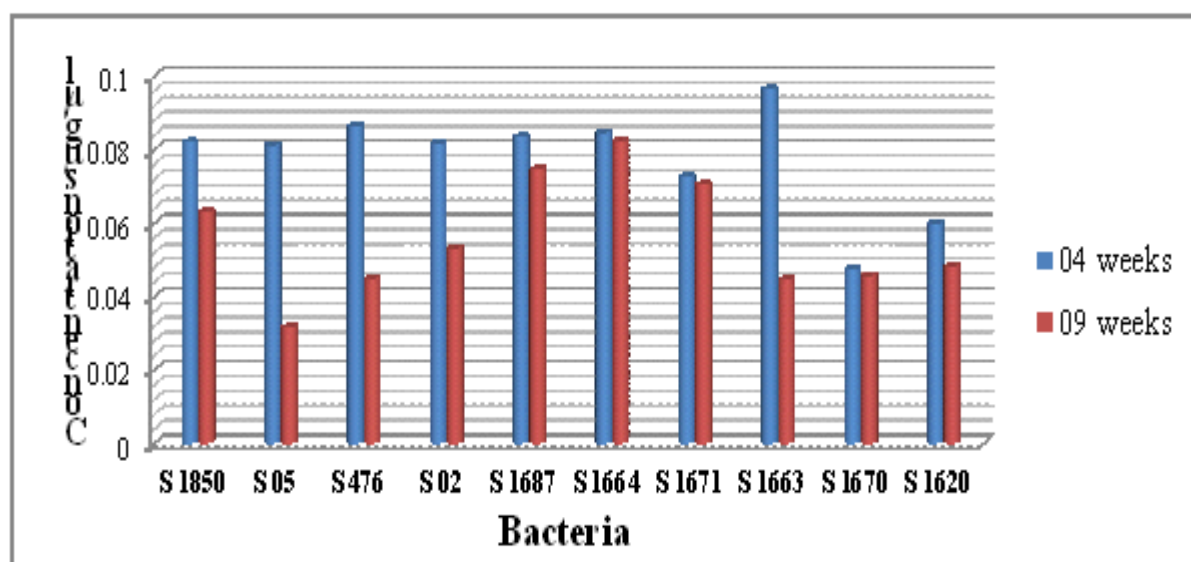


Fig. 4. Kinetics of biodegradation of benzene by the culture of different bacterial species. (S1850: *Pseudomonas aeruginosa*, S05: *Citrobacter freundii*, S476: *Citrobacter youngae*, S02: *Klebsiella oxytoca*, S1687: *Serratia marcescens*, S1664: *Klebsiella pneumoniae*, S1671: *Acinetobacter baumannii*, S1663: *Enterococcus faecalis*, S1670: *Acinetobacter baumannii*, S1620: *Klebsiella pneumoniae*).

For the remains of the bacteria of this study, S02 (*Klebsiella oxytoca*), S1687 (*Serratia marcescens*), S1664 (*Klebsiella pneumonia*) and S1850 (*Pseudomonas aeruginosa*) they proceed to a proportionately considerable elimination of cyclohexane, after having completely eliminated the benzene.

Conclusion

This study has allowed evaluating the performance of aerobic degradation of benzene through 10 non-fastidious bacteria in the aqueous phase. The results of the study reveal the absolute elimination of benzene with the appearance of a single derivative cyclohexane in all bacteria. The most important is the decreasing of cyclohexane concentrations as a function of time, without the formation of secondary component. This indicates the reliability of the biological treatment without the necessity of using other types of processes (physic-chemical techniques).

References

- Anderson RT, Lovely DR.** 2000. Anaerobic bioremediation of benzene under sulfate-reducing conditions in a petroleum contaminated aquifer. *Environmental Science and Technology*. **34**, 2261-2266.
- ATSDR.** 2007. Agency for Toxic Substance and Disease Registry. Toxicological Profile For Xylene. Atlanta. GA. 438.
- Avril JL, Dabernat H, Dens F, Monteil H, Piemonty Y, Le faou A, Jaulhac B, Riot B.** 1992. Bactériologie clinique. 2^{ème} Edition, Paris, Editeur des préparations grandes écoles médecine. **no32**. 522p.
- Chakraborty R, Coates JD.** 2004. Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Applied Microbiology Biotechnology*. **64**, 437-446.
- Descy J, Meex C, Melin P, Hayette PM, Huynen P, De Mol P.** 2010. Mass spectrometry MALDI-TOF in clinical bacteriology or how to identify a bacterium in one minute. *Revue Medicale de Liege*. **65**, 29-34.
- Drancourt M.** 2010. Detection of microorganisms in blood specimens using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*. Jun 8.
- Fagerquist CK, Garbus BR, Miller WG, Williams KE, Yee E, Bates AH.** 2010. Rapid identification of protein biomarkers of *Escherichia coli* O157:H7 by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight-mass spectrometry and top-down proteomics. *Analytical Chemistry*. **82**, 2717-2725.
- Farhadian M, Larroche C, Borghei M, Troquet J, Vachelard C.** 2006. Bioremediation of BTEX-contaminated groundwater through bioreactors, 4^{ème} colloque Franco-Roumain de chimie appliquée. Université Blaise Pascal. Clermont-Ferrand. France. 28 June-2 July 2006. P. 438.
- Farhadian M, Vachelard C, Duchez D, Larroche C.** 2008. In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater. *Bioresource Technology* **99**, 5296-5308.
- Fritsche W, Hofrichter M.** 2008. Aerobic degradation by microorganisms, *Biotechnology Set*, Second Edition, 144-167 P.
- Grbic-Galic D, Vogel TM.** 1987. Transformation of Toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. *Applied Environmental Microbiology*. **53**, 254-260.
- Hunkeler D, Hohener P, Zeyer J.** 2002. Engineered and subsequent intrinsic in situ bioremediation of a diesel fuel contaminated aquifer. *Journal of Contaminant Hydrology* **59**, 231-245. [https://doi.org/10.1016/S0169-7722\(02\)00059-1](https://doi.org/10.1016/S0169-7722(02)00059-1).
- Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT.** 1991. Matrix-Assisted laser desorption/ionization Mass spectrometry of biopolymers. *Analytical Chemistry* **63**, 1193A.
- Kao CM, Prosser J.** 2001. Evaluation of natural attenuation rate at a gasoline spill site. *Journal of Hazardous Materials* **82**, 275-289.

- Khodaei K, Nassery HR, Asadi MM, Mohammadzadeh H, Mahmoodlu MG.** 2017. BTEX biodegradation in contaminated groundwater using a novel strain (*Pseudomonas* sp. BTEX-30). *International Biodeterioration and Biodegradation*. **116**, 234-242.
- Lan H T.** 2009. Electrochemical destruction of polycyclic aromatic hydrocarbons contained in highly contaminated matrices. PhD thesis. University of Quebec. Canada, 73-79.
- Neelja S, Manish K, Pawan KK, Jugsharan SV.** 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*. **6**, 791.
- Nielsen DR, Mc Lellan PJ, Daugulis AJ.** 2006. Direct estimation of the oxygen requirements of *Achromobacter xylosoxidans* for aerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons (BTEX) in a bioscrubber. *Biotechnology Letters*. **28**, 1293-1298.
- Niklova N, Nenov V.** 2005. BTEX degradation by fungi. *Water Science and Technology*. **51**, 87-93.
- Parenfeta-Boldu FX, Vervoort J, Grotenhuis JT, Van Groenestijn JW.** 2002. Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene (BTEX) hydrocarbons by the Fungus *Cladophialophora* sp strain T1. *Applied Environmental Microbiology* **68**, 2660-2665.
- Reinhard M, Bowman RS, Steinle-Darling E, LeBron CA.** 2005. In situ biotransformation of BTEX compounds under methanogenic conditions. *Ground water Monitoring and Remediation*. **25**, 50-59.
- Roger P, Jacq V.** 2000. Introduction à la bioremédiation des sols, des eaux et de l'air. Université de Provence Aix-Marseille 1. 99p.
- Schulze S, Tiehm A.** 2004. Assessment of microbial natural attenuation in groundwater polluted with gasworks residues. *Water and Science Technology* **50**, 347-353.
- Scow K M, Hicks KA.** 2005. Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater. *Current Opinion in Biotechnology*. **16**, 246-253.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2005.03.009>.
- Shuai L, Haitao L, Tianjie Q, Xixin Y, Boli W, Jitao Guan, Yu L.** 2017. Comparative transcriptomics analyses of the different growth states of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **85**, 564-574.
- Yang X, Beckmann D, Fiorenza S, Niedermeier C.** 2005. Field study of pulsed air sparging for remediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil and groundwater. *Environmental Science and Technology*. **39**, 7279-7286.
- Yassaa N, Mekati BY, Cecinato A.** 1999. Evaluation qualitative des hydrocarbures aromatiques mono cyclique dans l'air urbain d'Alger par deux techniques d'extraction. *Pollution atmosphérique*. n° **164**, 93-102p.
- Yates JR.** 1998. Mass spectrometry and the age of the proteome. *Journal of Mass Spectrometry*. **33**, 1-19.
<http://dx.doi.org/10.1002>.