

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS

GLOSSAIRE

LISTE DES ILLUSTRATIONS

INTRODUCTION.....1

Partie I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les Hydrocarbures.....3

I.1. Définition 3

I.2. Classification..... 3

I.2.1. Hydrocarbures saturés 3

I.2.1.1. Les alcanes linéaires 3

I.2.1.2. Les alcanes ramifiés..... 3

I.2.1.3. Cycloalcanes 4

I.2.2. Hydrocarbures aromatiques..... 4

I.2.3. Composés polaires 5

I.2.4. Asphaltènes 5

I.3. Les Hydrocarbures et l'environnement..... 5

I.3.1. Origine de la pollution 5

I.3.2. Les différents types de pollution 5

I.3.3. Le devenir des hydrocarbures dans l'environnement..... 6

I.3.4. Les risques environnementaux causés par la pollution des sols par les hydrocarbures. 6

I.3.5. Effets des hydrocarbures sur l'environnement et la santé 7

I.3.6. Traitements des sols pollués par les hydrocarbures 8

II. Bioremédiation des hydrocarbures9

II.1. Traitements biologiques..... 9

II.1.1 Définition.....9

II.2.	Principe de la bioremédiation	9
II.3.	Types de biodégradation	10
II.3.1.	Biodégradation aérobie	10
II.3.2.	Biodégradation anaérobie	10
II.4.	Les microorganismes dépolluants le sol	10
II.5.	Les facteurs influençant la biodégradation	11
II.6.	Les méthodes de bioremédiation	12
II.6.1.	Bioaugmentation	12
II.6.2.	Biostimulation	12
II.6.3.	Atténuation naturelle	12
III.	<i>Rhodococcus</i>	12
III.1.	Taxonomie des <i>Rhodococcus</i>	12
III.2.	Caractères généraux de <i>Rhodococcus</i>	13
III.2.1.	Bioremédiation des hydrocarbures par <i>Rhodococcus</i>	14

Partie 2 : MATERIELS ET METHODES

I.	Matériels	17
I.1.	Matériels d'expérimentation	17
I.2.	Souches microbiennes	17
I.3.	Matériels de laboratoire	17
II.	Méthodes	17
II.1.	Echantillonnage des microorganismes	17
II.1.1.	Méthodes	18
II.2.	Isolement	18
II.2.1.	Préparations de la suspension mère	18
II.2.2.	Ensemencement de la suspension mère	19
II.2.3.	Observation	19
II.3.	Purification	19

II.4.	Conservation des souches	19
II.5.	Identification des souches.....	19
II.5.1.	Etude des caractères cultureux et morphologiques	20
II.5.1.1.	Etude des caractères macroscopique.....	20
II.5.1.2.	Etude des caractères microscopiques	20
II.5.1.2.1.	Examen à l'état frais.....	20
II.5.1.2.2.	Coloration GRAM.....	20
II.5.1.3.	L'étude des caractères physiologiques.....	21
II.5.1.3.1.	Type respiratoire	21
II.5.1.3.2.	Recherche de la catalase	21
II.5.1.4.	Etudes des caractères biochimiques	22
II.5.1.4.1.	Milieu Hajna Kligler	22
II.5.1.4.2.	Milieu Citrate Simmons.....	23
II.5.1.4.3.	Milieu Lysine fer	23
II.5.1.4.4.	Mannitol mobilité nitrate	24
II.5.1.4.5.	Auxanogramme de carbone	24
III.	Bioremediaion des hydrocarbures par <i>Rhodococcus erythropolis</i>.....	25
III.1.	Description du microcosme.....	25
III.1.1.	Sol	25
III.1.2.	Hydrocarbures	25
III.1.3.	Inoculum bactérien	25
III.1.4.	Milieu expérimental	25
III.2.	Méthodes analytiques.....	27
III.2.1.	Dosage des hydrocarbures résiduels dans le sol.....	27
III.2.1.1.	Principe	27
III.2.1.2.	Méthodes	27
III.2.1.2.1.	Extraction des hydrocarbures résiduels	27
III.2.1.2.2.	Le taux de dégradabilité	28

III.2.1.2.3. Mode de calcul pour le dénombrement	28
--	----

Partie 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Résultats	29
I.1. Isolement	29
I.2. Purification	29
I.3. Conservation.....	30
I.4. Identification	30
I.5. Etude des caractères cultureux	30
I.6. Etudes des caractères morphologiques	31
I.7. Etudes des caractères physiologiques.....	31
I.7.1. Type respiratoire	31
I.7.2. Recherche de la catalase	32
I.8. Etude des caractères biochimiques.....	32
I.8.1. Test sur milieu Hajna-Kligler.....	32
I.8.2. Test sur Citrate Simmons.....	33
I.8.3. Test sur Lysine-Fer	33
I.8.4. Test sur milieu Mannitol Mobilité Nitrate.....	34
I.8.5. Métabolisme glucidique	34
II. Bioremédiation et dégradation des hydrocarbures résiduels.....	37
II.1. Teneurs des hydrocarbures résiduels	37
II.2. Evaluation du taux de dégradabilité.....	37
III. Discussions.....	40

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

ANNEXES

RESUME

ABSTRACT

LISTE DES ABREVIATIONS

°C	:	Degré Celsius
B(%)	:	Biodégradabilité
E.P.A	:	Environment Protection Agency
g	:	Gramme
GN	:	Gélose Nutritive
HCr	:	Hydrocarbures résiduels
HAP	:	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
LDA	:	Lysine Désaminase
LDC	:	Lysine Décarboxylase
NaCl	:	Chlorure De Sodium
ml	:	Millilitre
MMN	:	Mannitol Mobilité Nitrate
pH	:	Potentiel D'hydrogène
UFC	:	Unité Formant Colonie
UV	:	Ultra-Violet
VF	:	Viande Foie

GLOSSAIRE

Abiotique : Processus qui n'implique aucune réaction biologique. Il est également utilisé pour définir un lieu impropre à abriter ou à voir la vie se développer. Au contraire de biotique, synonyme de vivant.

Anthropique : Se dit d'un paysage, d'un sol, d'un relief dont la formation résulte essentiellement de l'intervention de l'homme.

Excavation : Action de creuser dans le sol.

Epandage : Action d'étendre en dispersant.

Enzyme : Substance organique qui catalyse une réaction biochimique.

Bioaugmentation : Ajout des micro-organismes dans la zone polluée afin d'augmenter le taux de biodégradation des contaminants.

Biodégradation : Processus de dégradation des composés à base de carbone effectué par des microorganismes.

Biomasse : Ensemble des organismes vivants (animaux, végétaux ou microorganismes) subsistant en équilibre dans un milieu donné.

Bioremédiation : Type de décontamination impliquant les microorganismes.

Biostimulation : Adjonction d'agents stimulant les microorganismes endogènes pour la biodégradation.

Biotechnologie : Ensemble des techniques et des procédés qui permettent de tirer profit des organismes vivants.

Catalase : Enzyme (oxydoréductase héminique) qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène : $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$

Contamination : Le fait d'introduire artificiellement dans un milieu naturel une substance potentiellement dangereuse, quelle que soit sa teneur (contaminant).

Métabolisme : Ensemble des réactions chimiques qui se déroulent au sein d'un être vivant pour lui permettre notamment de se maintenir en vie, de se reproduire, de se développer et de répondre au stimulus de son environnement.

Métabolite : Composé stable, issu de la transformation biochimique d'une molécule initiale, par le métabolisme.

Microcosme : Fraction minime d'écosystème complètement isolée de l'environnement extérieur et dans lequel l'expérimentation se fait dans des conditions proches de la réalité.

Milieu de transfert : Lieu de migration des substances qui peuvent subir différentes réactions d'échange.

Mutation : Modification rare, accidentelle ou provoquée, de l'information génétique (séquence d'ADN ou d'ARN) dans le génome.

Niche environnementale : « position » occupée par un organisme, une population ou plus généralement une espèce dans un écosystème.

Pollution : Il y a pollution si le contaminant atteint une teneur potentiellement dangereuse, ou lorsqu'elle atteint les valeurs limites fixées par les normes.

Pollutions ponctuelles : Dépôts ou épandage de polluants sur une surface restreinte, que l'on peut assimiler à une source.

Pollutions diffuses : Retombées ou épandages de polluants sur une grande surface.

Pyrolyse : Décomposition chimique par la chaleur

Versatilité métabolique : Caractère changeant du métabolisme.

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

Figure 1	: Structure chimique des hydrocarbures pétroliers.....	4
Figure 2	: Pollution ponctuelle.....	6
Figure 3	: Pollution diffuse.....	6
Figure 4	: Processus influençant le devenir de polluant dans le sol.....	7
Figure 5	: Voies métaboliques de biodégradation des HAP.....	15
Figure 6	: Dégradation d'un hydrocarbure en milieu aérobie.....	16
Figure 7	: Zone d'échantillonnage.....	18
Figure 8	: Préparation du milieu expérimentale.....	26
Figure 9	: Colonies sous rayon UV λ 254 nm.....	29
Figure 10	: Souche MS112 purifiée sur milieu PCA.....	30
Figure 11	: Type respiratoire de la souche.....	32
Figure 12	: Test sur milieu Hajna Kligler.....	33
Figure 13	: Test sur milieu citrate Simmons.....	33
Figure 14	: Test sur milieu lysine fer.....	34
Figure 15	: Réaction négative de la souche MS112 sur milieu MMN.....	34
Figure 16	: Evolution de la concentration HCr avec le taux de dégradabilité.....	38
Figure 17	: Croissance de la bactérie <i>Rhodococcus erythropolis</i> MS112.....	39
Figure 18	: Concentration en biomasse microbienne et des hydrocarbures résiduels.....	39

Liste des tableaux

Tableau 1: Les 16 HAP cibles selon l'US E.P.A . Suspectés d'être cancérogènes.....	8
Tableau 2: Facteurs ayant une influence sur la biodégradabilité d'un polluant	11
Tableau 3 : Listes des espèces de <i>Rhodococcus</i> avec leurs sites d'isolement et leurs habitats	13
Tableau 4 : Caractères cultureux des colonies isolées	30
Tableau 5: Caractéristiques morphologiques de la souche MS112	31
Tableau 6 : Caractères physiologiques de la souche.....	31
Tableau 7 : Résultats du métabolisme glucidique.....	35

Tableau 8 : Caractères biochimiques de la souche MS112	35
Tableau 9 : Récapitulatifs de l'identification de la bactérie <i>Rhodococcus erythropolis</i>	36
Tableau 10 : Concentration des hydrocarbures résiduels au cours du traitement.....	37
Tableau 11: Taux de dégradabilité des hydrocarbures résiduels au cours du traitement.....	37
Tableau 12 : Cinétique de croissance de la souche.....	38

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'ère des hydrocarbures a sans aucun doute apporté de grands avantages pour le développement industriel et le mode de vie moderne, mais le coût du progrès s'avère actuellement plus élevé que prévu (SVETLANA *et al.*, 2005).

La contamination du sol par les hydrocarbures a augmenté progressivement avec l'utilisation croissante des produits pétroliers (MANDRI et LIN, 2007).

Durant la dernière décennie, la pollution de l'environnement par les produits pétroliers et ses dérivés a attiré l'attention. La présence de différents véhicules et des machines industrielles sont les causes de l'utilisation massives des hydrocarbures (HUSAINI *et al.*, 2008).

L'impact réel de ces hydrocarbures pour l'environnement est parfois sous-estimé. Les conséquences qui peuvent en découler sur le sol et sur l'équilibre écologique sont souvent négligées.

La contamination de l'air, du sol et de l'eau par les hydrocarbures et leurs dérivés sont dangereux pour l'équilibre environnemental mais aussi pour la santé humaine. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) attirent spécialement l'attention car ils sont toxiques, mutagènes et cancérigènes (BUMPUS, 1989 ; CERNIGLIA et SUTHERLAND, 2001).

La contamination des sols par les hydrocarbures prend une place importante dans l'environnement. Selon United States Environmental Protection Agency (US. EPA), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont les contaminants les plus traités avec le Benzen (BUSWELL, 1994).

Depuis quelques années, la problématique des terrains contaminés dans le monde est un enjeu considérable. La réhabilitation de ces sites pose un sérieux problème aux municipalités et aux propriétaires. Ce problème touche plusieurs domaines : l'industrie chimique, le transport, et l'industrie automobile ou pétrolière (production et raffinage) (SCHADECK *et al.*, 2007).

Il est donc nécessaire de mettre en œuvre des méthodes de traitement des sites contaminés. Plusieurs techniques de dépollution sont déjà mises au point. Ils sont classés en fonction de la nature des procédés employés, à savoir : les procédés physiques, chimiques, thermiques et biologiques ; ce dernier consiste à utiliser des microorganismes, le plus souvent des bactéries (mais aussi des champignons et des végétaux), pour favoriser l'atténuation totale ou partielle des polluants (COLOMBANO *et al.*, 2008).

En dépit de l'utilisation multiple des procédés physico-chimiques dans la restauration des sols pollués par les produits pétroliers, la bioremédiation reste la solution la plus efficace et la plus demandée car

elle est la mieux maîtrisée et la moins coûteuse. La bioremédiation est simple à entretenir, applicable sur de grandes surfaces, rentable et conduit à la destruction complète du polluant (ABDELY, 2007).

La richesse de notre pays en diversité écologique et microbienne ainsi que l'absence des travaux sur la bioremédiation nous a initié à entreprendre cette étude.

L'objectif de cette recherche est d'isoler une souche de *Rhodococcus erythropolis* autochtone de Madagascar et d'étudier sa performance pour la dépollution des sols pollués par les hydrocarbures.

Cette étude de performance pour la dépollution se fera par la suivie de la croissance de la population microbienne ainsi que l'effet dépolluant de cette souche par l'évolution du taux d'hydrocarbure le long du traitement.

La présente étude comporte trois parties :

La première est consacrée à la recherche bibliographique sur la contamination par les hydrocarbures, la bioremédiation, et les caractères cultureux de la souche *Rhodococcus erythropolis* ;

La deuxième, les matériels et méthodes décrivant les techniques et les procédés utilisés pour réaliser cette expérience ;

La troisième, les résultats et discussions suivie de la conclusion et des perspectives.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les Hydrocarbures

I.1.Définition

Les hydrocarbures sont des composés exclusivement d'atomes de carbone (C) et d'hydrogène (H). Il s'agit de composés organiques de formule brute : $C_n H_m$ où n et m sont des entiers naturels. De par leur abondance naturelle, ils font partie des produits chimiques les plus importants pour l'humanité et sont notamment utilisés comme source d'énergie primaire (FRANAENNEC *et al*, 1998).

I.2.Classification

Les hydrocarbures constituent la fraction la plus importante d'un brut pétrolier, ils représentent entre 65 et 95 % de la plupart des pétroles bruts. Ces hydrocarbures peuvent être classés en quatre familles principales qui sont présentes en proportions variables selon leur origine: les hydrocarbures saturés (30 à 70 %), les hydrocarbures aromatiques et polyaromatiques (20 à 40 %), les composés polaires (5 à 25 %) et les asphaltènes (0 à 10 %) (SOLTANI, 2004).

La figure 1 page 4 montre les principales familles d'hydrocarbure avec leurs structures chimiques.

I.2.1. Hydrocarbures saturés

Cette famille des hydrocarbures saturés inclut : les alcanes linéaires, les alcanes ramifiés, les cycloalcanes

I.2.1.1. Les alcanes linéaires

Les alcanes linéaires ou les paraffines sont des hydrocarbures à chaînes linéaires saturées comme l'hexane (C_6H_{14}) ou l'heptane (C_7H_{16}). Ils constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40%) des hydrocarbures dans un brut de pétrole (GUERMOUCHE, 2014).

I.2.1.2. Les alcanes ramifiés

Les alcanes ramifiés les plus abondants sont les iso-alcanes (groupement méthyle en position 2). Les autres composés ramifiés antéiso (groupement méthyle en position 3) ou polyramifiés tels que les isoprénoides (exemple: pristane, phytane) sont beaucoup moins nombreux.

Ces composés se trouvent dans le pétrole brut à des proportions sensiblement égales à celles des n-alcanes (GUERMOUCHE, 2014).

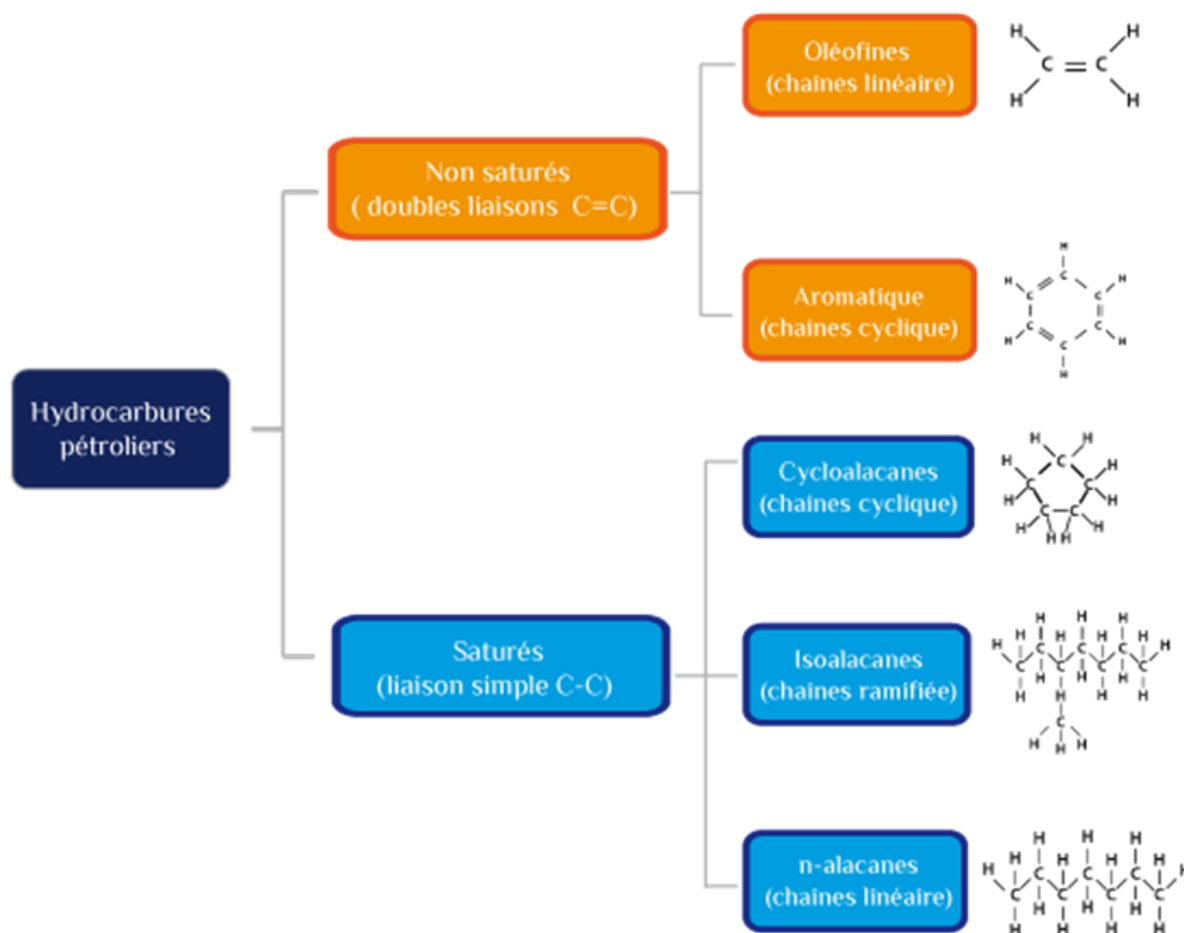


Figure 1: Structure chimique des hydrocarbures pétroliers (COLOMBANO *et al*, 2008).

I.2.1.3. Cycloalcanes

Les cycloalcanes renferment des composés cycliques (5 ou 6 atomes de carbone), saturés et le plus souvent substitués. Quelques dérivés polycycliques sont aussi présents et certains d'entre eux tels les stéranes et les triterpanes sont caractéristiques d'un pétrole brut. Cette famille peut représenter entre 30 et 50 % des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut (GUERMOUCHE, 2014).

I.2.2. Hydrocarbures aromatiques

Plusieurs familles d'hydrocarbures aromatiques et polyaromatiques dont le nombre de noyaux varie de 2 à 6 sont présentes dans les pétroles bruts. Ces composés sont dominés par des composés mono-, di- et tri-aromatiques.

En général, les hydrocarbures aromatiques sont moins abondants que les alcanes, et ne représentent que 10 à 30 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier (SOLTANI, 2004).

I.2.3. Composés polaires

Cette fraction correspond à des molécules hétérocycliques, telles que:

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

Les dérivés soufrés sont dans la plupart des cas plus abondants que les composés oxygénés ou azotés (GUERMOUCHE, 2014).

I.2.4. Asphaltènes

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

I.3. Les Hydrocarbures et l'environnement

I.3.1. Origine de la pollution

La présence des hydrocarbures dans l'environnement est très diversifiée, mais la principale cause est anthropique. Les activités humaines passées ou présentes, et en particulier les activités industrielles, agricoles, domestiques libèrent dans l'environnement une grande variété de substances potentiellement dangereuses, appelées globalement contaminants ou polluants.

Ces substances sont rejetées vers les milieux de transfert et d'exploitation qui sont l'air, l'eau et le sol.

I.3.2. Différents types de pollution

Il peut y avoir deux types de pollution du sol (JEANNOT *et al.* , 2001). La figure 2 et la figure 3 illustrent ces différents types de pollution :

- la pollution ponctuelle : ce sont les dépôts ou épandage de polluants sur une surface restreinte, que l'on peut assimiler à une source.
- la pollution diffuse : ce sont des retombées ou épandages de polluants sur une grande surface

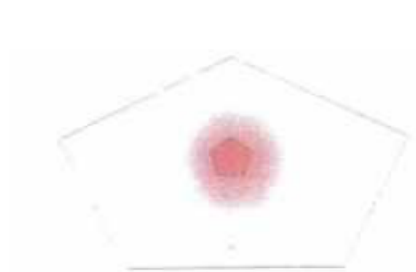


Figure 2 : Pollution ponctuelle

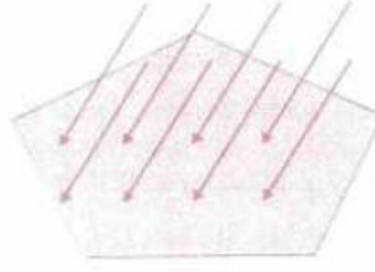


Figure 3 : Pollution diffuse

Pour chacun de ces types, il y a deux origines de pollution :

- Les pollutions accidentelles : C'est le déversement ou le dépôt ponctuel de polluants, où une grande quantité de polluant est déversée en fonctions du temps ;
- Les pollutions chroniques : C'est l'apport continu de contaminants par fuite ou lessivage, dont les effets cumulés peuvent être plus importants que ceux d'une pollution accidentelle.

I.3.3. Le devenir des hydrocarbures dans l'environnement

Les hydrocarbures déversés dans l'environnement peuvent subir différentes altérations biotiques et abiotiques, induites par des processus chimiques physiques et biologiques. Ainsi, ils vont le déplacer, le transformer ou bien l'éliminer (MAES *et al*, sd).

I.3.4. Les risques environnementaux causés par la pollution des sols par les hydrocarbures

Du fait de l'utilisation massive des produits pétroliers, les hydrocarbures constituent les polluants organiques les plus fréquents des sols (VANDECASTEELE, 2005).

Le comportement et la migration des hydrocarbures dans le sol sont influencés par différents processus ; il s'agit essentiellement des :

- Réactions d'échange (volatilisation, adsorption-désorption, complexation, dissolution-précipitation...) entre les phases solides (constituants minéraux et organiques du sol), liquide (eau interstitielle) et gazeuse (porosité non remplie d'eau) du sol ;

- Réactions de dégradation : photolyse, hydrolyse chimique, biodégradation ;
- Phénomènes de transfert des polluants et de leurs produits de dégradation vers l'atmosphère par volatilisation, vers les eaux de surface par ruissellement, vers les eaux souterraines par lixiviation ou écoulement gravitaire, et vers les plantes par absorption racinaire (MAES *et al.*, ; LEMIERE *et al.*, 2001).

Ces différents processus sont illustrés dans la figure 4

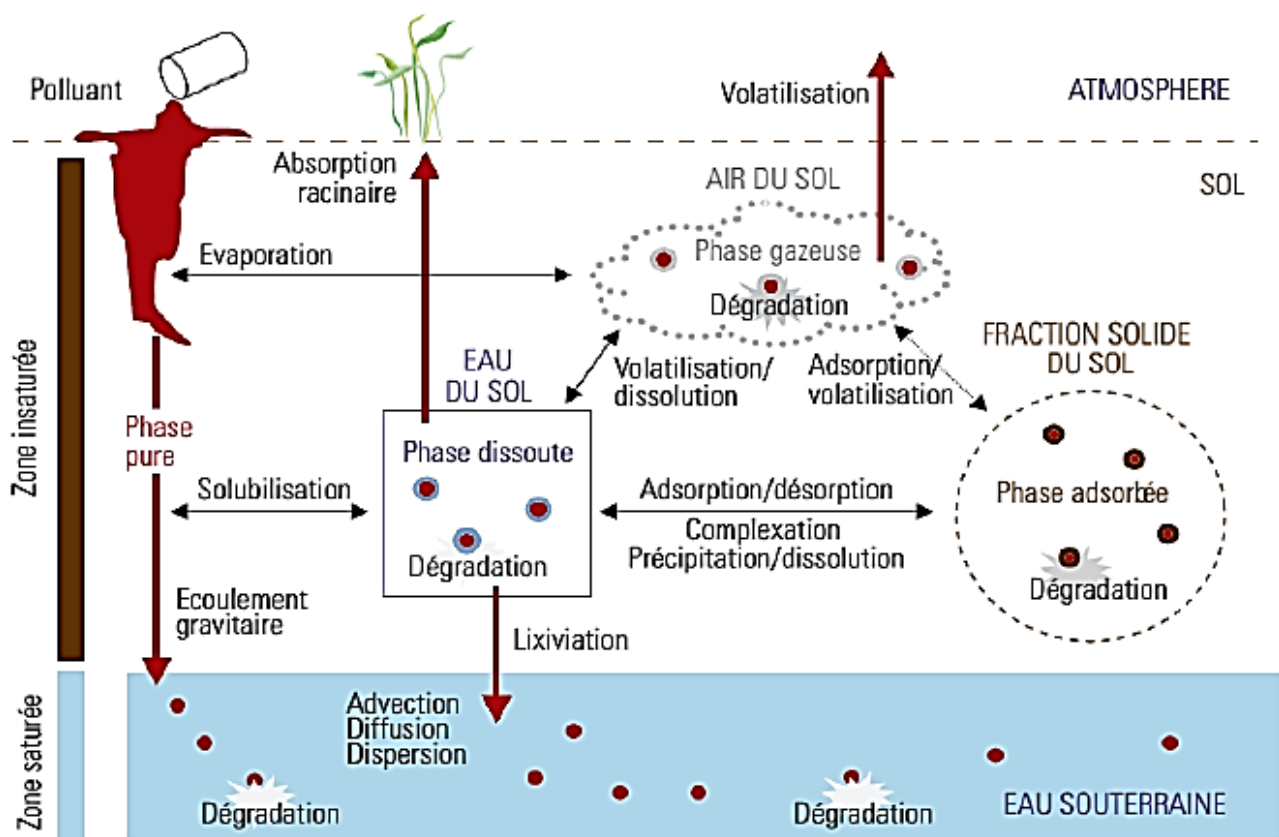


Figure 4 : Processus influençant le devenir de polluant dans le sol (MAES *et al.*).

I.3.5. Effets des hydrocarbures sur l'environnement et la santé

L'un des problèmes majeurs et continus de l'environnement est la contamination par les hydrocarbures résultant des activités liées aux pétroliers et du pétrole. La contamination des sols par les hydrocarbures provoque des dégâts des systèmes locaux, puisque l'accumulation de polluants dans les animaux et des plantes peut causer la mort des êtres vivants ou des mutations (JAMES *et al.*, 2012).

Les hydrocarbures sont classés parmi les produits chimiques organiques dangereux dont certains de leurs effets toxiques sont reconnus comme fortement cancérigènes, génotoxiques, immunotoxiques, mutagéniques. Ils représentent une menace pour la santé publique (ERIKSSON et al. , 2003).

Chez l'homme, les hydrocarbures polyaromatiques deviennent toxiques après une oxydation enzymatique, provoquant la formation des métabolites électrophiles solubles. Ces métabolites peuvent alors avoir un impact négatif sur les acides nucléiques ainsi que sur les protéines. Ce qui implique un dérèglement de la division cellulaire donnant ainsi la formation de tumeurs (SZELIGA et DIPPLE, 1998). Ils sont généralement groupés selon la liste de l'agence américaine pour la protection de l'environnement (US E.P.A.) des polluants prioritaires (Tableau 1). Cette liste contient des produits, dont la taille varie de 2 à 6 noyaux benzéniques cancérigènes ou suspectés de l'être (Andrews *et al.*, 1978 ; Sims et al., 1988 ; Fujikawa et al., 1993).

Tableau 1: Les 16 HAP cibles (US E.P.A)

Nom	Nombre de cycle
Naphtalène	2
Acénaphthylène, Acénaphène, Fluorène, Phénanthrène, Anthracène	3
Fluoranthène, Pyrène, Benzo(a)anthracène*, Chrysène*	4
Benzo(b)fluoranthène*, Benzo(k)fluoranthène*, Benzo(a)pyrène*, Dibenzo(a,h)anthracène	5
Benzo(g,h,i)pérylène, Indéno(1,2,3-cd)pyrène*	6

* Suspectés d'être cancérigènes

Ces hydrocarbures se rencontrent essentiellement dans les produits complexes formés lors de la combustion incomplète ou de la pyrolyse de matériaux organiques. Ainsi, ils sont présents dans les suies et fumées de toutes origines, dans les gaz d'échappement des moteurs à explosion, dans la fumée de cigarette, etc ... Ils sont présent à des concentrations très diverses dans le goudron de houille et ses dérivés (huiles anthracéniques et brai), dans les huiles minérales, les extraits aromatiques, le bitume. Cette liste n'est pas exhaustive (INRS, 1979, 1984).

I.3.6. Traitements des sols pollués par les hydrocarbures

Afin d'atténuer la diffusion des hydrocarbures dans le sol, il existe différentes méthodes. Le choix d'une méthode particulière de dépollution dépend de certains paramètres comme le type de

polluant, la variabilité de son comportement (volatilité, adsorbabilité, polarité...), la diversité du milieu pollué (nature du sol, de l'accessibilité...), le statu de la pollution (récente ou ancienne), et l'étendue de la zone polluée. Il est donc nécessaire de faire au préalable un diagnostic.

Les techniques de réhabilitation des sols sont divisées en quatre grandes familles selon la nature du traitement : procédés physiques, thermiques, chimiques et biologiques. Une distinction supplémentaire est faite au sein de ces grandes familles selon que la technique est applicable dans le sol en place « *in situ* » (utilisée pour traiter des sites en activité ou lorsque la zone polluée est trop étendue pour avoir recours à l'excavation), ou après excavation des sols « *ex situ* ». Les techniques « *ex situ* » peuvent se scinder en « hors site » ou « sur site ». « Hors site », si le sol est évacué vers un centre de traitement spécialisé, « sur site » si le sol excavé est redéposé sur le site pour être traité. (VIDALI, 2001).

II. Bioremédiation des hydrocarbures

Parmi les différentes techniques de dépollution des sols, la bioremédation est une alternative intéressante aux autres procédés du fait de son impact environnemental réduit et de son faible coût (DAVEREY et PAKSHIRAJAN, 2011).

II.1. Traitements biologiques

Il s'agit de procédé biologique utilisant les organismes vivant (bactéries, champignons, levures, plantes) pour dégrader les polluants. Ces techniques peuvent être complémentaires. La décontamination par voie biologique consiste à stimuler un phénomène naturel pour augmenter le rendement de dégradation des polluants ; qui sera utilisé comme source de carbone.

II.1.1. Définition

La bioremédiation est définie comme la dégradation chimique de molécules organiques par les microorganismes ; pour réduire ou éliminer les risques environnementaux résultant de l'accumulation de produits chimiques toxiques et d'autres déchets dangereux (GIBSON et SAYLER, 1992).

II.2. Principe de la bioremédiation

La bioremédiation est une technique respectueuse de l'environnement utilisée pour restaurer les sols et les eaux à leur état d'origine ; ce traitement se fait par l'utilisation des micro-organismes indigènes à la zone contaminée, ou par des souches isolés de l'extérieur et portées au site contaminé (JAMES et KARUNA ; 2012).

Sous l'activité enzymatique de ces microorganismes, une substance pourra subir la biodégradation en se transformant en métabolites plus petits et finalement, en dioxyde de carbone et en eau (SCOW, 2003).

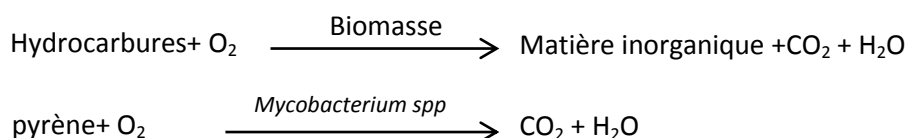
II.3. Types de biodégradation

Pour permettre au microorganisme d'effectuer la bioremédiation, il faut considérer deux voies de dégradation :

- Biodégradation aérobie
- Biodégradation anaérobie

II.3.1. Biodégradation aérobie

En présence d'oxygène (milieu aérobie), elle consiste en la minéralisation des composés carbonés, principalement les hydrocarbures, en dioxyde de carbone, eau, composés inorganiques et protéines cellulaires (SNEZANA *et al.*, 2013).



Le pyrène est catabolisé par une *Mycobacterium spp.* pour produire du CO₂ ; les intermédiaires incluent le pyrène cis-4,5-dihydrodiol, la 4-hydroxypérinaphténone, l'acide 4-phénanthroïque, l'acide phtalique, l'acide cinnamique, mais aussi un trans-dihydrodiol (HEITKAMP *et al.*, 1988a, 1988b ; Boldrin *et al.*, 1993).

II.3.2. Biodégradation anaérobie

En condition anaérobie, l'activité métabolique des microorganismes adaptés produit des substances organiques simples qui ne sont pas complètement oxydées, telles que des acides organiques et d'autres composés comme le méthane et l'hydrogène gazeux. Ces derniers peuvent être récupérés pour produire de l'énergie (SNEZANA *et al.*, 2013).

II.4. Les microorganismes dépolluants le sol

La dégradation des alcanes et leurs dérivés par les microorganismes, était déjà étudiée depuis le début du 20^{ème} siècle. (BEILEN et WITHOLT, 2005).

De nombreux genres bactériens ont été recensés et décrits comme aptes à dégrader des hydrocarbures : (MORLETT-CHAVEZ *et al.*, 2010 ; TARAYRE, 2012).

- <i>Aeromonas</i>	- <i>Beneckea</i>	- <i>Klebsiella</i>	- <i>Peptococcus</i>
- <i>Acetobacter</i>	- <i>Brevibacterium</i>	- <i>Lactobacillus</i>	- <i>Pseudomonas</i>
- <i>Achromobacter</i>	- <i>Burkholderia</i>	- <i>Leucothrix</i>	- <i>Rhodococcus</i>
- <i>Acinetobacter</i>	- <i>Corynebacterium</i>	- <i>Micrococcus</i>	- <i>Sarcina- Serratia</i>
- <i>Actinomyces</i>	- <i>Cycloclasticu</i>	- <i>Moraxella</i>	- <i>Shewanella</i>
- <i>Alcaligenes</i>	- <i>Cytophaga</i>	- <i>Mycobacterium</i>	- <i>Spherotilus</i>
- <i>Alcanivorax</i>	- <i>Erwina</i>	- <i>Myxobacterium</i>	- <i>Xanthomonas</i>
- <i>Bacillus</i>	- <i>Flavobacterium</i>	- <i>Nocardia</i>	

La capacité de se développer sur les hydrocarbures ne se limite pas uniquement sur les bactéries, certains sites contaminés contiennent également de nombreux champignons et levures capables de les dégrader (VANDECASTEELE, 2005).

II.5. Les facteurs influençant la biodégradation

Le pétrole brut peut se dégrader dans des conditions appropriées, le succès du procédé de bioremédiation dépend de la capacité à déterminer les conditions et les établir dans l'environnement contaminé. Les facteurs environnementaux essentiels pour la bioremédiation sont cités dans le tableau 2 (JAMES et KARUNA, 2012).

Tableau 2: Facteurs ayant une influence sur la biodégradabilité d'un polluant (Inspiré de COLOMBANO *et al.*, 2010)

FACTEURS DE BIODÉGRADABILITÉ	Exemple
La présence de microorganismes compétents;	<i>Rhodococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Alcaligènes</i>
La disponibilité d'accepteurs d'électrons nécessaires à l'action microbienne;	Nitrate, sulfate
La teneur en eau;	50 à 70% de la capacité de rétention d'eau du sol
Le potentiel hydrogène (pH);	La meilleure gamme est de 6,5 à 7,5
La température;	0-40°C
La disponibilité de nutriments minéraux	(azote (N), phosphore (P), potassium (K), ...);
La nature, la concentration et la bioaccessibilité des polluants.	

II.6. Les méthodes de bioremédiation

Les principales techniques utilisées dans la bioremédiation sont les suivantes:

II.6.1. Bioaugmentation

La bioaugmentation consiste à introduire des cultures microbiennes spécialisées à la surface du milieu contaminé ; ce processus a pour objectif d'augmenter la biodégradation des contaminants organiques. Les microorganismes sont généralement cultivés séparément dans des conditions bien définies. Ils sont sélectionnés sur la base de leur aptitude à dégrader les composés organiques présents dans le site à dépolluer (ABDELY, 2007 ; ALVAREZ et ILLMAN, 2006).

II.6.2. Biostimulation

Cette technologie consiste à stimuler l'activité des populations microbiennes indigènes (présentes dans le sol) par apport de nutriments ((NH₄)₂SO₄, K₂HPO₄) et par ajustement des conditions du milieu (ABDELY, 2007).

II.6.3. Atténuation naturelle

Il s'agit de la biodégradation naturelle des polluants par les microorganismes présents dans le sol (HANNA, 2004). Cette technique part du principe que la microflore indigène d'un site pollué a su s'adapter à la pollution considérée et peut utiliser les polluants comme nutriments. La population bactérienne capable d'utiliser ces polluants prolifère et devient ainsi dominante (MULLIGAN et YONG 2004).

III. Rhodococcus

III.1. Taxonomie des Rhodococcus

Durant les dernières années, la classification du genre *Rhodococcus* a été bouleversée, avec les espèces qui ont été reclassés et les nouvelles espèces décrites (BELL K. *et al.*, 1998). Le genre *Rhodococcus* appartient au sous ordre des corynebacterineae, à la famille des Nocardiaceae (GÜRTLER et SEVIOUR, 2005).

La classification de l'espèce *Rhodococcus erythropolis* est la suivante :

Règne : PROCARYOTES
Embranchement : ACTINOBACTERIA
Classe : PROTEOBACTERIES
Ordre : ACTINOMYCETALES
Sous ordre : CORYNEBACTERINEAE
Famille : NOCARDIACEAE

Actuellement 31 espèces de *Rhodococcus* ont été reconnues et nommées (EUZEBY, 2011).

Le Tableau 3 montre les espèces de *Rhodococcus* avec les sites où elles ont été isolées.

Tableau 3 : Listes des espèces de *Rhodococcus* récemment reconnues avec leurs sites d'isolement et leurs habitats (GÜRTLER V. et SEVIOUR J., 2005).

Nom validé <i>Rhodococcus</i> sp	Habitat d'origine et lieu d'isolement	Références
<i>Rhodococcus aetherivorans</i>	Boue d'un bioréacteur de traitement de déchets chimique	GOODFELLOW <i>et al.</i> (2004)
<i>Rhodococcus aetherivorans</i>	Atmosphère d'un laboratoire Russe	LI <i>et al.</i> (2004)
<i>Rhodococcus cercidiphylli</i>	Echantillon de feuille	GAITANIS <i>et al.</i> (2008)
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	Défécation d'un herbivore/boue activée	ROWBOTHAM et CROSS (1977)
<i>Rhodococcus kyotonensis</i>	Rhizosphère du sol	LI <i>et al.</i> (2007)
<i>Rhodococcus maanshanensis</i>	Sol	ZHANG <i>et al.</i> (2002)
<i>Rhodococcus opacus</i>	Sol	ALVAREZ <i>et al.</i> (1996), Klatte <i>et al.</i> (1994b)
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Sol/ mousse de boue activée	GOODFELLOW et ALDERSON (1977, 1979)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	Sol/ mousse de boue activée	TSUKAMURA (1974), ZOPF (1891)
<i>Rhodococcus Yunnanensis</i>	Sol forestière	ZHANG <i>et al.</i> (2005)
<i>Rhodococcus zopfii</i>	Bioréacteur de traitement de toluène/phénol	Stoecker <i>et al.</i> (1994)

III.2. Caractères généraux de *Rhodococcus*

Les membres du genre *Rhodococcus* sont définis comme des bactéries à Gram positives, aérobies, immobiles. La morphologie de la cellule de cette bactérie varie durant son cycle de développement. Certaines souches peuvent paraître en tant que cocci, puis changent en coccobacille.

Les *Rhodococcus* sont aussi caractérisées comme Chimioorganotrophes, catalase positive et peuvent croître à 30°C. L'apparence des *Rhodococcus* sur un milieu solide est très variable. Les colonies apparaissent comme lisses, rugueuses, muqueuses, elles ont une large pigmentation blanche, rose, orange, rouge, sa transparence dépend de l'âge et de la souche (GOODFELLOW, 1989).

III.2.1. La bioremédiation des hydrocarbures par *Rhodococcus*

Le genre *Rhodococcus* est naturellement présent dans des environnements contaminés. Il a un métabolisme particulier qui lui donne sa capacité de biodégradation et la transformation d'un large type de polluant comme les hydrocarbures et les pesticides. Elles sont partiellement acido-résistantes, à métabolisme oxydatif et capables d'utiliser un large éventail de composés organiques comme unique source de carbone et d'énergie (WARHURST et FEWSON, 1994; LARKIN *et al.* 2005; MARTINKOVA *et al.* 2009).

Les alcanes à longue chaîne (C₁₀-C₂₀) sont très bien utilisés par les microorganismes, plus rapidement que les alcanes moyens. Les bactéries remplissant ce rôle appartiennent en particulier aux groupes des *Corynebacterium*, *Mycobacterium* et *Nocardia* (CMN); notamment au genre *Rhodococcus*, c'est le cas de la souche *Rhodococcus* Q15 capable d'utiliser une large gamme des alcanes (C₁₀ à C₂₁) et à des températures allant de 0 à 30°C (WHYTE *et al.*, 1998).

La bioremédiation des hydrocarbures aromatiques dans les conditions aérobies est réalisée par les microorganismes (procaryotes ou eucaryotes) possédant des systèmes enzymatiques différents, tels que les dioxygénases, les monooxygénases et les lactases (WIDDEL et RABUS, 2001).

Plusieurs voies de dégradation sont utilisées par les microorganismes. Ces voies sont illustrées dans la figure 5, p. 15.

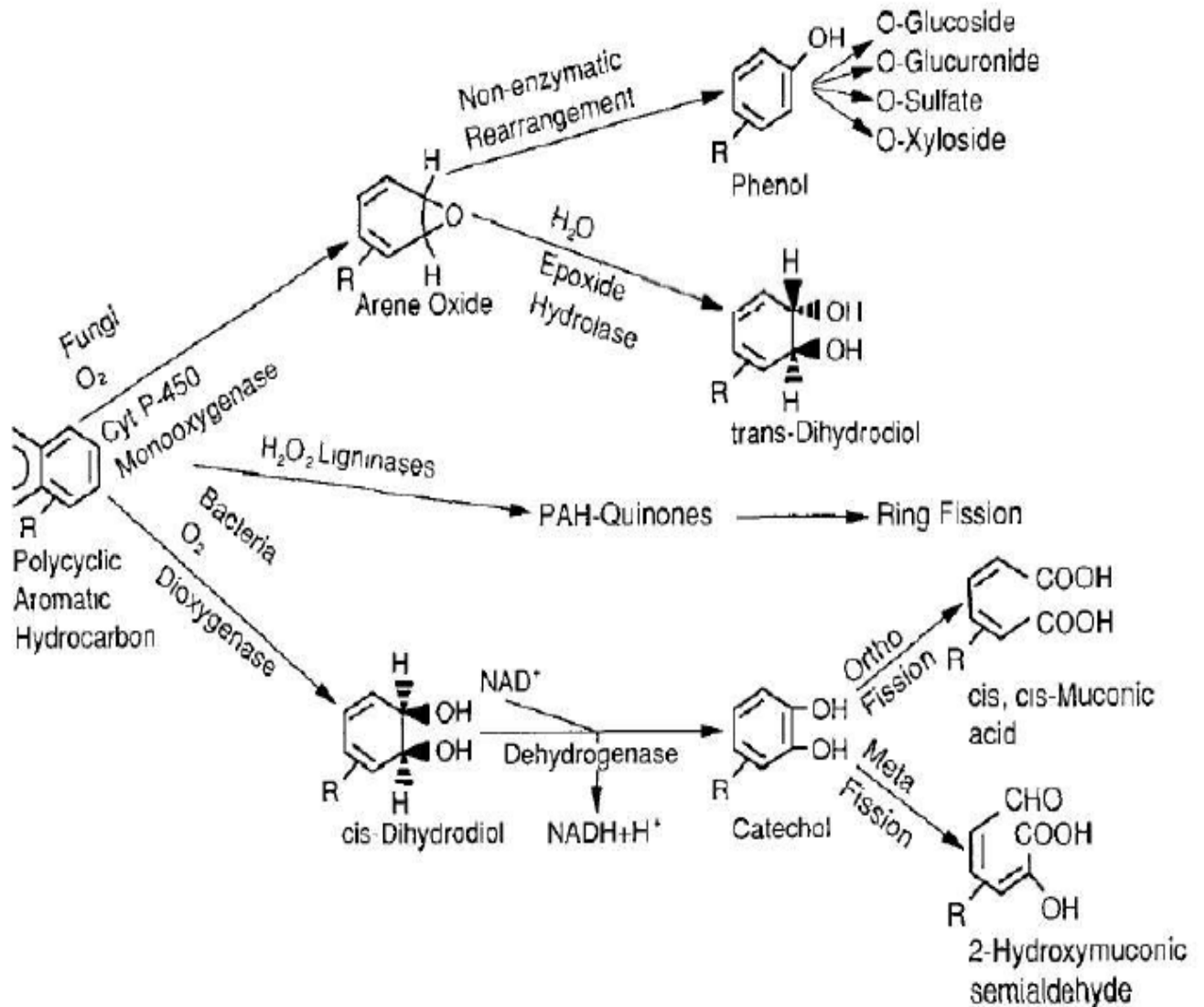


Figure 5: Voies métaboliques de biodégradation des HAP (CERNIGLIA, 1992).

Le genre *Rhodococcus* détient plusieurs enzymes qui lui permettent plusieurs réactions chimiques nécessaires aussi bien dans le domaine de l'environnement que dans l'industrie de la biotechnologie (BELL K. *et al.*, 1998).

La figure 6 (P.16) décrit l'équation type de la biodégradation d'un hydrocarbure en milieu aérobie ; l'hydrocarbure est oxydé, une partie est assimilée par la bactérie et une autre partie sera utilisée dans la production de l'énergie (catabolisme) (WIDDEL et RABUS, 2001).

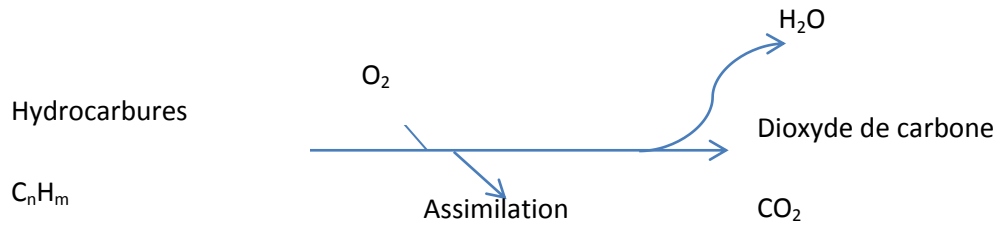


Figure 6 : Dégradation d'un hydrocarbure en milieu aérobie (WIDDEL et RABUS, 2001).

Les souches comme *R. erythropolis* sont capables d'effectuer déshydrogénation, oxydation, hydroxylation, déhalogénéation, et époxydation. (DE CARVALHO, 2005).

Chez les bactéries, la bioremédiation des hydrocarbures aromatiques est réalisée en deux étapes qui consistent en une réaction d'incorporation des deux atomes d'oxygène sur le noyau aromatique. Ce qui implique, en premier lieu, la dihydroxylation, et en deuxième lieu, l'ouverture finale du noyau aromatique. Ces deux opérations sont catalysées par des enzymes de type dioxygénase comme le montre la figure 6 (BERTINI *et al.*, 1996; BUTLER et MASON, 1997).

MATERIELS et METHODES

MATERIELS et METHODES

I. Matériels

I.1. Matériels d'expérimentation

Pour effectuer cette étude, les matériels suivants ont été utilisés :

- Sol : Pour constituer le milieu expérimental, un sol stérile est utilisé, un sol sans contamination,
- Sciure de bois : collecté d'une scierie, la sciure de bois de *Pinus radiata* exempt de contamination et de produits chimiques est utilisée.
- Hydrocarbure : L'huile de vidange a été utilisée pour cette étude, une huile fournie par l'ASJA.

I.2. Souches microbiennes

Pour ce travail, les souches recherchées sont du genre *Rhodococcus* pour ce faire, il faudrait faire encore des isollements.

I.3. Les matériels de laboratoire

Les matériels de laboratoire utilisés lors de cette étude sont constitués par les verreries (bécher, boîte de Pétri, erlenmeyer, tube à essai à coton cardé, tubes vissés, éprouvette graduée, lame, lamelle, pipette, ballon à fond plat, cristalliseur), les matériels (anse d'inoculation, balance de précision, bec Bunsen, micropipettes, microscope optique, vortex, plaque chauffante, pince à bois, poire, portoir, rotavapor, sachets stérile, spatule, soxhlet, rotavapor) et les gros matériels (étuve et autoclave).

II. Méthodes

II.1. Echantillonnage des microorganismes

Pour la réalisation de cette étude, des prélèvements de sol ont été effectués sur différents points. Les prélèvements ont été effectués le 24 avril 2017 dans la région Vakinankaratra, district Antsirabe II, commune rurale d'Andranomanelatra, fokontany de Morahita éloigné de toutes contaminations humaines. Les coordonnées géographiques sont les suivantes : 19° 48' 43.1" S ; 47° 04' 51.1" E.S.

La figure 7 P.18, montre le lieu d'échantillonnage

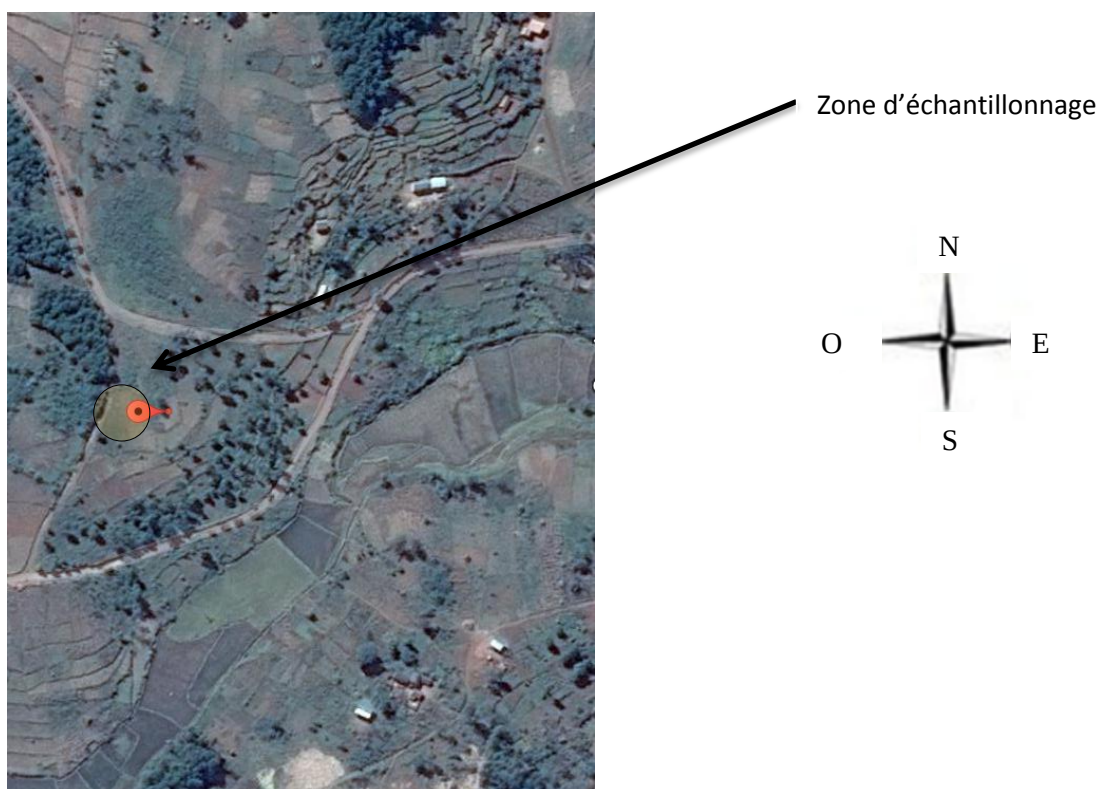


Figure 7 : Zone d'échantillonnage (GOOGLE MAP, 2017)

II.1.1. Méthodes

L'échantillonnage est effectué dans les conditions optimales d'asepsie. Les prélèvements des sols ont été réalisés avec une spatule stérile à partir de la surface et à 20 cm de profondeur. Les sols de couleur rose à orange ont été privilégiés étant donné que le genre *Rhodococcus* produit des bêta-carotène. Les échantillons ont été ensuite mis dans des sachets stériles et marqués.

Les échantillons sont transportés au laboratoire et laissés à température ambiante pour éviter les stress abiotiques.

II.2. Isolement

L'isolement est une manipulation qui consiste à séparer les différents types de souches de bactérie contenus dans un mélange. Ainsi, cette étape a pour but de séparer et d'isoler toutes les souches d'intérêt.

II.2.1. Les préparations de la suspension mère

10 g de sol sont pesé puis mis en suspension dans 100 ml d'eau physiologique (Na Cl 9‰) stérile. Le mélange est laissé au repos pendant 5 minutes.

II.2.2. Ensemencement de la suspension mère

Pour chaque échantillon, 1ml d'inoculum, correspondant à la suspension mère ou à une de ses dilutions, estensemencé à la surface d'un milieu Plate Count Agar (PCA) contenu dans une boîte de Pétri.

II.2.3. Observation

Après une incubation de 24h à 30°C, l'observation de la surface des milieux permet de constater les résultats de l'isolement. Chaque germe de la solutionensemencée est matérialisé par une colonie à la surface du milieu. Les colonies de *Rhodococcus* (observation macroscopique : forme arrondie, taille >2mm, couleur rose, bombé,...) ont été privilégiées pour l'isolement.

Afin de mettre en évidence la microflore et d'affiner la sélection des souches isolées, les colonies sur boite sont passées sous rayon ultraviolet (longueur d'onde $\lambda = 254$) pour voir leur fluorescence. Seules les colonies non fluorescentes sont isolées.

II.3. La purification

La purification est une opération ayant pour but de ré-isoler séparément les différents types de colonies déterminés après la caractérisation afin d'obtenir des cultures pures.

La purification des souches consiste à repiquer successivement des colonies sélectionnées dans des boites de pétri contenant du PCA. Le repiquage se poursuit jusqu'à l'obtention d'une culture homogène où toutes les colonies sont identiques entre elles et identique au type de bactéries initialement ciblées. La méthode d'épuisement a été utilisée pour les repiquages.

II.4. Conservation des souches

Les souches isolées sont conservées dans des tubes à essai contenant de la gélose nutritive inclinée. Les souches sontensemencées sur la pente des tubes par la méthode des stries, puis incubées à 30°C pendant 24 heures. Les tubes ayant une croissance microbienne seront conservés à 4°C (MARCHAL et BOURDON, 1982).

II.5. L'identification des souches

L'identification des souches isolées est réalisée en se basant sur les études des caractères morphologiques, culturaux, physiologiques et biochimiques.

II.5.1. Etude des caractères culturels et morphologiques

II.5.1.1. Etude des caractères macroscopique

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification. Les éléments d'identifications macroscopiques sont:

- La forme des colonies : Rondes, irrégulières,...
- La taille des colonies par la mesure du diamètre: Ponctiformes ou non ponctiformes.
- La chromogénèse: Couleur de la colonie.
- Le relief : Convexe, concave, plate.
- L'opacité: Opaque, translucide ou transparente.
- La surface: Lisse, rugueuse, sèche, dentelée,

II.5.1.2. Etude des caractères microscopiques

II.5.1.2.1. L'examen à l'état frais

Ce test permet de déterminer la forme, l'arrangement et la mobilité des bactéries. Une préparation à partir d'une goutte de suspension bactérienne et de l'eau physiologique est mise entre lame et lamelle. L'observation se fait au microscope optique à x40 et à forte grossissement x100 (DELARRAS, 2008).

II.5.1.2.2. Coloration GRAM

C'est une double coloration qui nous permet de connaître la forme, l'arrangement. Cette coloration est réalisée systématiquement sur des colonies purifiées pour préciser le caractère GRAM+ OU GRAM-.

En effet, les bactéries à Gram positifs, par leurs caractères alcool-résistants dus à la structure de leur paroi, apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries à Gram négatifs, dont la paroi est perméable à l'alcool, sont colorées en rose ou en rouge (après recoloration par la Fuschine de Ziehl).

Mode opératoire :

La technique de coloration Gram comporte 4 étapes :

Coloration

Une ansée de la souche à étudier, étalée sur une lame bien propre, est recouverte d'une solution de violet de Gentiane pendant 10 à 60s.

Mordantage

Le violet est enlevé en l'entraînant avec la solution de lugol. Ce dernier est laissé sur la lame quelques secondes

Décoloration

Le frottis est lavé avec de l'alcool jusqu'à ce que la lame ne présente plus de colorant. La lame est ensuite rincée abondamment avec de l'eau de robinet.

Recoloration

La lame est recouverte avec la solution de Fuschine pendant 10 à 30 secondes, puis rincé abondamment avec l'eau et séché avec du papier Joseph. L'observation est effectuée au microscope.

II.5.1.3. L'étude des caractères physiologiques**II.5.1.3.1. Type respiratoire**

Le type respiratoire des bactéries est en relation avec la zone qui présente le développement des colonies. Le comportement de la souche vis-à-vis de son substrat et de l'oxygène est observé, donnant ainsi son type respiratoire.

Il existe différents types de microorganisme selon leur affinité avec l'oxygène :

Les microaérophiles : ont besoin d'une faible quantité d'oxygène pour se développer

Les aérobies stricts : ne se développe qu'en présence d'oxygène

Les anaérobies stricts : ne croissent qu'en l'absence d'oxygène

Les aéro-anaérobies facultatives : capables de se développer en présence ou en absence d'oxygène dans le milieu de culture mais qui préfèrent l'aérobie.

Les anaéro-aérobies facultatives : capable de se développer en présence ou en absence d'oxygène dans le milieu de culture mais qui préfèrent l'anaérobie.

Mode opératoire

Le milieu gélosé Viande Foie est coulé dans un tube vissé puis l'ensemencement se fait par pique centrale. La culture est ensuite incubée à 30°C pendant 24 heures.

II.5.1.3.2. Recherche de la catalase

C'est la recherche de la présence de l'activité enzymatique de la catalase de la souche. La catalase est une enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) avec dégagement de O₂.

Mode opératoire

Sur une lame stérile et à l'aide d'une anse, une colonie bactérienne est déposée en y ajoutant une goutte d'eau oxygénée. La présence de la catalase est observée immédiatement par la présence des bulles de gaz qui correspondent à l'oxygène dégagé (BOURDON, 1982).

II.5.1.4. Etudes des caractères biochimiques

L'étude des caractères biochimiques permettent de voir les réactions enzymatiques des souches et de comprendre leur métabolisme. Les caractères biochimiques permettent différencier les espèces, même étroitement apparentées entre elles. Cette étude se base sur plusieurs tests de la galerie pasteur. Ils sont effectués sur différents milieux : Hajna Kligler, Citrate Simmons, Lysine Fer,

Mannitol Mobilité. Le test biochimique est complété par le métabolisme glucidique par l'auxanogramme de carbone.

II.5.1.4.1. Sur milieu Hajna Kligler

Sur ce milieu, quatre caractères peuvent étudiés en même temps :

La fermentation du glucose

La fermentation du glucose provoque une diminution du pH qui se traduit par le virage au jaune (culot) de l'indicateur coloré le rouge de phénol.

La production de gaz

La production des gaz (CO_2 , H_2) au cours de la fermentation totale du glucose entraîne l'apparition de bulle ou de poche gazeuse.

L'utilisation du lactose

Pour utiliser le lactose, la bactérie a besoin de deux enzymes, une β -galactoside perméase et β -galactosidase. La perméase favorise la pénétration du lactose dans la cellule et β -galactosidase (endoenzyme) coupe la molécule de lactose en glucose et en galactose. Ce métabolisme acidifie le milieu et traduit par un virage au jaune de la pente.

La production de sulfure d'hydrogène (H₂S)

Les composés soufrés tels que le thiosulfate sont réduits en sulfure d'hydrogène par le thiosulfate réductase, présent surtout chez les microorganismes anaérobies. Cette réduction s'accompagne d'un précipité noir du milieu, du culot à la pente.

Mode opératoire

Le milieu Hajna Kligler en pente dans un tube vissé estensemencé en faisant une pique centrale dans le culot suivie d'une strie le long de la pente. L'incubation est effectuée à 30°C pendant 24 heures.

II.5.1.4.2. Le milieu Citrate Simmons

Principe

Le milieu citrate de Simmons (de couleur verte), qui ne contient que du citrate (C₆H₂O₂) comme seule source de carbone. Les bactéries possédant la Citrate perméase vont alors dégrader le milieu, provoquant son alcalinisation. Ce phénomène se manifeste par le virage au bleu de l'indicateur de pH (le bleu de bromothymol).

Mode opératoire

Le milieu en gélose pente estensemencé à l'aide de l'anse, par striation du fond vers l'ouverture du tube. L'incubation se fait pendant 24 heures à 30°C.

II.5.1.4.3. Le milieu Lysine fer

Il s'agit d'un milieu solide de couleur violette dû à la présence de l'indicateur de pH le Bromocrésol

Principe

Ce test permet d'observer la présence de deux enzymes : La lysine désaminase (LDA) et la lysine décarboxylase (LDC). Ainsi, en fonction de la coloration du culot et de la pente quatre cas peuvent se présenter :

- Culot violet : LDC +
- Culot jaune : LDC –
- Pente rouge vineuse : LDA +
- Pente violette : LDA –
- Précipité noire : présence de H₂S

Mode opératoire

Avec une anse de platine, l'inoculum est enfoncé dans le culot et strié à la surface de la pente. L'observation se fera après 24 heures d'incubation à 30°C.

II.5.1.4.4. Mannitol mobilité nitrate

Ce milieu semi-solide de couleur rouge permet de voir l'utilisation du mannitol et du nitrate. La réduction du nitrate par le nitrate réductase est mise en évidence, par la présence des nitrites formés, qui donnent une coloration rose en présence du réactif de Griess.

Principe

Le Mannitol est un produit de réduction de D-Mannose. Sa dégradation conduit à la formation du fructose provoquant l'acidification du milieu. Le milieu Mannitol mobilité permet de rechercher la fermentation du Mannitol et la mobilité des bactéries.

- La fermentation du Mannitol entraîne le virage du milieu au jaune du rouge de phénol
- Les souches mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement créant un trouble

Mode opératoire

Dans le tube vissé, l'ensemencement se fait par une pique centrale du milieu jusqu'à 1cm du fond du tube. Cette culture est incubée à 30°C pendant 24heures.

II.5.1.4.5. Auxanogramme de carbone*Principe*

Le métabolisme glucidique des microorganismes est testé par l'auxanogramme de carbone. L'utilisation d'un glucide comme seule source de carbone se traduit par l'acidification du milieu par le CO₂ ou par les acides organiques produits. En générale, c'est l'indicateur de pH (rouge de phénol) qui permettra la visualisation de l'acidification par l'apparition du chromogène jaune. Les glucides utilisés sont le saccharose, le fructose, le lactose, le rhamnose, le cellobiose, l'arabinose, la xylose.

Mode opératoire

L'ensemencement de l'inoculum se fait par strie centrale du fond vers l'ouverture du tube. Chaque sucre est testé est conditionné dans un tube puis étuvé pendant 24 heures à 30°C.

III. Bioremediaion des hydrocarbures par *Rhodococcus erythropolis*

Le traitement biologique des sols consiste à utiliser des organismes pour transformer des substances chimiques toxiques en substances non toxiques (ABDELLY, 2006)

Pour cette expérimentation, il est nécessaire de suivre la biodégradation de l'huile de vidange dans le sol et la prolifération de la biomasse. La variation de différents paramètres physico-chimiques et microbiologiques a été suivie sur une période de 90 jours.

III.1. Description du microcosme

Le microcosme est défini comme étant une fraction minime de l'écosystème complètement isolée de l'environnement extérieur et dans lequel l'expérimentation peut se faire dans des conditions proches de la réalité (GILLET, 1986).

III.1.1. Le sol

Avant le début de l'expérimentation, le sol est passé à l'autoclave pendant 6 heures à 121°C à 2 barres, afin de garantir l'élimination des microorganismes indigènes, et d'étudier l'efficacité du traitement. Ainsi, éviter les activités antagonistes entre les différentes espèces.

III.1.2. Les hydrocarbures

Concernant l'hydrocarbure utilisé, L'huile de vidange a été choisie vu que la contamination par ce type d'hydrocarbure est parfois négligée et passe inaperçue. Il s'agit d'une huile de lubrification de moteur usé. Pour notre étude, l'huile de vidange a été fournie par l'Université ASJA.

III.1.3. L'inoculum bactérien

Cette partie consiste à la réalisation d'une culture à partir de la souche sélectionnée. Cette préparation consiste en prélevant trois ansées d'une colonie à partir d'une culture jeune (24 heures) et en l'ensemencant dans un Erlenmeyer contenant 250 ml d'eau peptonée tamponnée (EPT). Elle contient les éléments nécessaires à la survie de ces microorganismes comme les polypeptides et les acides aminés. La culture est portée à l'incubateur à 30°C pendant 24 heures.

III.1.4. Milieu expérimental

Le sol préalablement stérilisé est étalé dans un bac en verre d'une superficie de 441 cm² et un volume de 2646 cm³. Pour la contamination du sol en hydrocarbure, l'épandage de 20g d'huile de vidange ont été effectuée sur 500g de sol le 05 avril 2017. L'huile de vidange est ensuite mélangé au sol.

Pour aérer le milieu, 100g de sciure de bois y ont été ajoutée, le tout est mélangé.

Quarante millilitre (40 ml) de l'inoculum avec une biomasse de 18.10^7 UFC/ml ont été inoculée dans le milieu. Pour satisfaire le besoin en élément azoté, 2g de levure de bière préalablement autoclavée (à 121°C, 2bares, 20 mn) et broyée ont été ajoutées.

Un mélange hebdomadaire est effectué pour permettre une oxygénation et une homogénéisation du milieu.

Le microcosme est couvert par du papier aluminium et mis à l'abri de la lumière dans une salle à température ambiante (27°C). Pour garantir l'humidité du sol, 20ml d'eau distillée stérile sont ajoutées chaque semaine.

Les différentes manipulations concernant la préparation du milieu expérimental sont illustrées par la figure 8.



Figure 8: Préparation du milieu expérimental

III.2. Méthodes analytiques

III.2.1. Dosage des hydrocarbures résiduels dans le sol

Afin de mesurer le taux de dégradation de l'hydrocarbure, il est nécessaire d'effectuer un dosage. La méthode d'extraction par Soxhlet suivie d'une évaporation sur rotavapor a été utilisée pour mesurer le taux des hydrocarbures résiduels (HCr).

III.2.1.1. Principe

La méthode 3540 de l'Environment Protection Agency (EPA), repose sur le principe de soxhlet qui est basé sur l'extraction liquide-solide par recirculation continue sur l'échantillon de sol de solvant porté à ébullition et recondensé.

III.2.1.2. Méthodes

III.2.1.2.1. Extraction des hydrocarbures résiduels

Avant l'extraction, l'échantillon est passé à l'étuve à 105°C pour éliminer l'eau et ainsi déterminer sa teneur en humidité, qui est donné par la formule suivante :

$$H\% = (P_1 - P_0) / P_0$$

- P₀ : poids de la prise d'essai du sol (g).
- P₁ : poids de la prise d'essai de sol après séchage à 105°C (g).

Cinq gramme (5g) de l'échantillon sont placés dans un cartouche d'extraction. 150 ml d'hexane sont placés dans un ballon (pesé à l'avance) d'extraction de 250 ml contenant 3 pierres-ponces. Le ballon est fixé à l'extracteur de Soxhlet et l'extraction sous reflux est menée pendant 16 heures à 130°C.

L'extraît obtenu est placé sur l'évaporateur rotatif à 80°C jusqu'à l'évaporation totale du solvant (Hexane).

Le ballon est laissé refroidi sous dessiccateur pour éliminer les restes de vapeur d'Hexane. La pesée se fait régulièrement jusqu'à la stabilité de la masse.

$$H_{cr} = \frac{(m_2 - m_0)}{m_1} \times 1000$$

- m₀ : masse du ballon vide
- m₂ : masse du ballon avec l'extraît
- m₁ : masse de l'échantillon

III.2.1.2.2. Le taux de dégradabilité

Le taux de dégradation des hydrocarbures exprimé en % est calculé à partir de la formule suivante :

$$\text{Taux de dégradation (\%)} = \frac{(C_i \text{ HCr} - C_f \text{ HCr})}{c_i \text{ HCT}} \times 100$$

- $C_i \text{ HCr}$: Concentration initiale en hydrocarbure résiduels
- $C_f \text{ HCr}$: concentration finale en hydrocarbure résiduels

III.2.1.2.3. Mode de calcul pour le dénombrement

Afin de dénombrer la microflore bactérienne existant dans les différents échantillons, nous avons procédé à une culture sur milieu de gélose nutritive. Pour se faire, une série de dilutions variant de 10^{-1} à 10^{-10} a été préparée.

La concentration bactérienne est évaluée par dénombrement sur un milieu gélose nutritive. Le calcul de la concentration en micro-organisme N présent dans l'échantillon est :

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0.1n_2)d.V}$$

$\sum c$: la somme de toutes les colonies comptées sur toutes les boîtes retenues (le nombre de colonie doit être compris entre 15 à 300).

V : le volume d'inoculum appliqué à chaque boîte (ml)

n_1 : le nombre de boîtes retenues à la première dilution

n_2 : le nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution

d : le taux de dilution de la première dilution retenue pour les comptages sur boîtes

RESULTATS ET DISCUSSIONS

RESULTATS et DISCUSSIONS

I. Résultats

I.1. Isolement

Après 24h d'incubation à 30°C de la culture de la suspension mère de sol, la caractérisation des colonies a permis de déterminer le nombre de type de colonie présent à la surface du milieu.

Lors de L'isolement, 2 types de colonies ont été observés, dont un s'apparentant à l'espèce *Rhodococcus* et l'autre souche fluorescentes à UV sur la figure 9, à l'espèce *Pseudomonas fluorescens*.

Colonies isolées
de *Rhodococcus*

Colonies fluorescentes
de *Pseudomonas fluorescens*

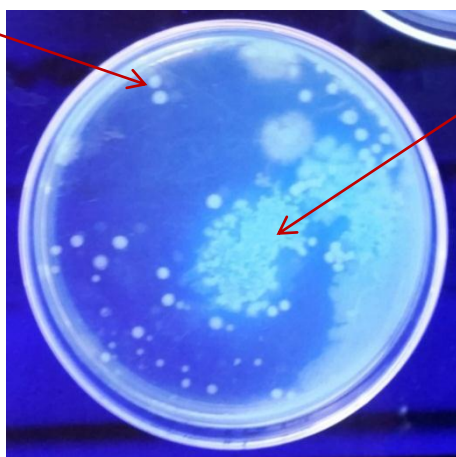


Figure 9 : Colonies sous rayon UV λ 254 nm

I.2. Purification

Les colonies présentant les caractères des colonies du genre *Rhodococcus* (une chromogénèse rose, convexe, ronde, opaque, régulière) ont été repiquées. Seule cette souche a été purifiée.

La colonie sélectionnée a été purifiée par repiquage successif à la surface du milieu PCA. Une fois pure, la culture est constituée des colonies caractéristiques identiques. C'est cette culture pure (souche pure) qui sera utilisée à la suite de cette expérience :

Au total sur 10 échantillons de sol, un seul a permis de distinguer des colonies présumées être du genre *Rhodococcus* avec un nombre 2×10^2 UFC/g, une souche a été purifiée.

La souche est codée par la première lettre du nom du manipulateur (M) et celle de l'échantillon (S) sol, suivi du numéro attribué à la souche.



Figure 10 : Souche MS112 purifiée sur milieu PCA

I.3.Conservation

Les souches pures obtenues sont conservées à + 4 °C au réfrigérateur pour leurs utilisations ultérieures.

I.4.Identification

L'identification des souches isolées est déduite à partir des études sur les caractères cultureux, morphologiques, physiologiques et biochimiques.

I.5.Etude des caractères cultureux

Les souches sont observées à l'œil nu et les résultats de leurs caractéristiques sont rapportés dans le tableau suivant.

Tableau 4 : Caractères cultureux des colonies isolées

	couleur	relief	taille	forme	consistance	opacité	aspect de la surface	allure du contour
MS112	+/- rose	Convexe	2mm	Ronde	Crémeuse	opaque	lisse	Régulière

En effet les caractères culturels de la souche MS112 s'apparentent au genre *Rhodococcus* (le relief, la taille, la forme, la couleur). La coloration des colonies varie selon les souches, la coloration peut être jaune, orange et rouge (GÜRTLER et SEVIOUR, 2005).

I.6. Etude des caractères morphologiques

L'observation microscopique a été réalisée suivant deux étapes : une observation à l'état frais et après la coloration Gram. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 5.

Tableau 5: Caractéristiques morphologiques de la souche MS112

	A l'état frais				Coloration Gram	
	mobilité	Forme des cellules	des	Mode de regroupement	de Coloration	Gram
MS112	-	Cocci		Isolé	Violette	+

Les membres du genre *Rhodococcus* sont à Gram positif, immobile (JONES et GOODFELLOW 2010). La souche a une forme cocci et elle est isolée.

I.7. Etude des caractères physiologiques

Le type respiratoire avec la recherche de l'enzyme catalase forment les caractères physiologiques. Les résultats obtenus lors de cette étude sont résumés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Caractères physiologiques de la souche

	Type respiratoire	Catalase
112	Aérobic stricte	+

(+): réaction positive

I.7.1. Type respiratoire

Après 24h d'incubation, les colonies ne se développent qu'à la surface du milieu. Ce qui montre que la souche MS112 étudiée est aérobic stricte. D'après ce test, la souche ne peut se développer en absence d'oxygène (O₂).

Les membres du genre *Rhodococcus* sont des bactéries qui vivent en milieu aérobie, Leurs présences sont constatées dans toutes les niches environnementales que ce soit dans le sol, dans la mer (LARKIN *et al.*, 2010).

Les résultats observés sont illustrés dans la figure 11.

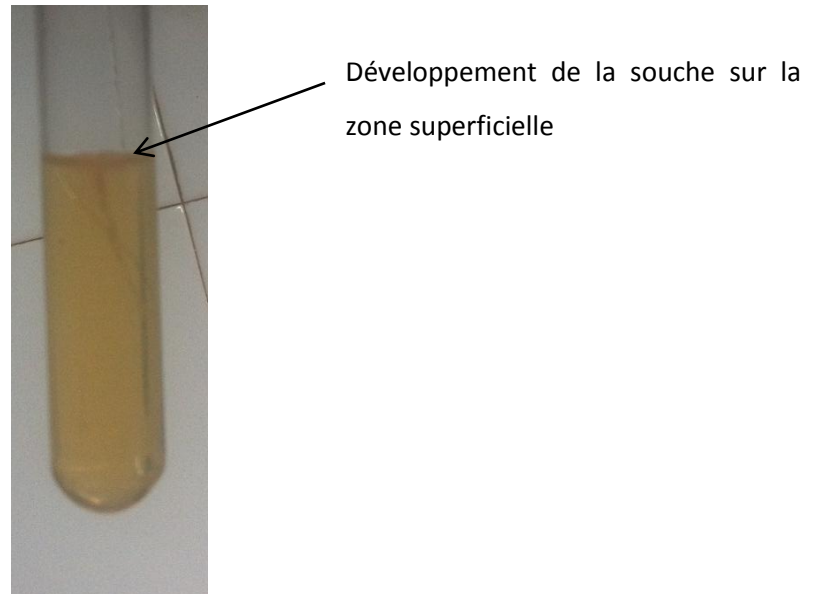


Figure 11 : Type respiratoire de la souche

I.7.2. Recherche de la catalase

En présence du H_2O_2 , la souche a présenté une réaction d'effervescence. Ainsi, la souche MS112 possède l'enzyme catalase.

I.8. Etude des caractères biochimiques

Après cultures des souches dans différents milieux d'identification et une incubation de 24h à 30°C,

I.8.1. Test sur milieu Hajna-Kligler

Les résultats montrent que la souche MS112 utilise le glucose comme source de carbone, et qu'elle ne fermente pas le lactose. L'absence de production de gaz a été aussi observée. L'absence de précipité noir dans le tube montre qu'il n'y avait pas eu formation de H_2S . Ce qui signifie que la souche n'utilise pas l'enzyme thiosulfate réductase. La figure 12, p. 32 illustre ces résultats.

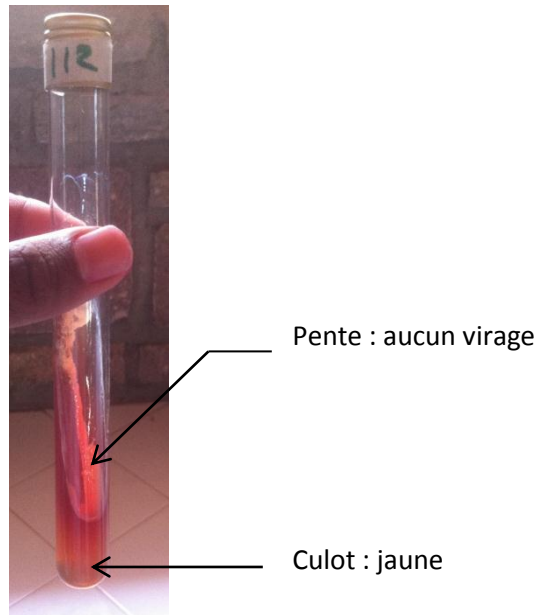


Figure 12 : Test sur milieu Hajna Kligler

I.8.2. Test sur Citrate Simmons

La souche assimile le citrate comme source de carbone puisqu'elle se développe sur le milieu et colore ce dernier en bleu. La figure 13 montre les résultats pour ce test.

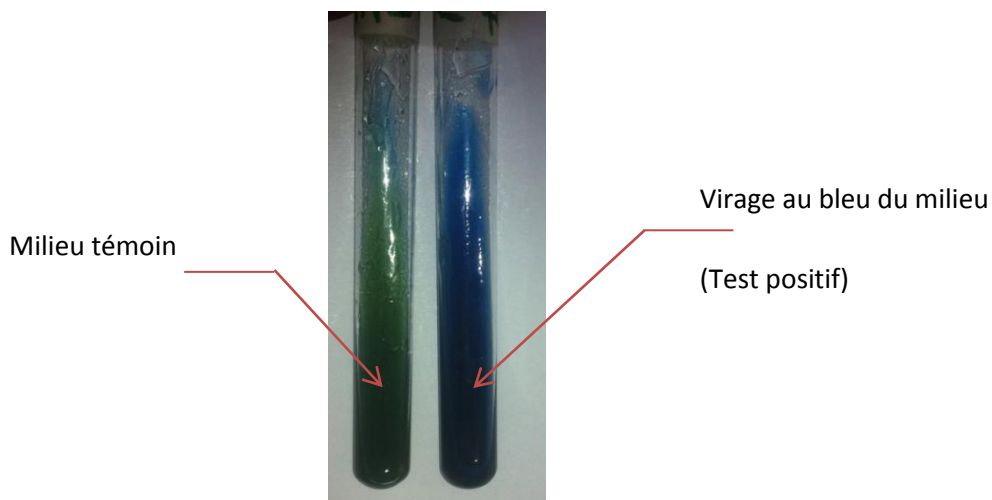


Figure 13 : Test sur milieu citrate simmons

I.8.3. Test sur Lysine-Fer

L'étude de la souche MS112 sur milieu Lysine Fer donne une réaction négative. Donc les deux enzymes (LDA, LDC) sont absentes chez cette souche. En effet, le culot est resté jaune et la pente violette. Les résultats du test sont représentés par la figure 14 P. 34.

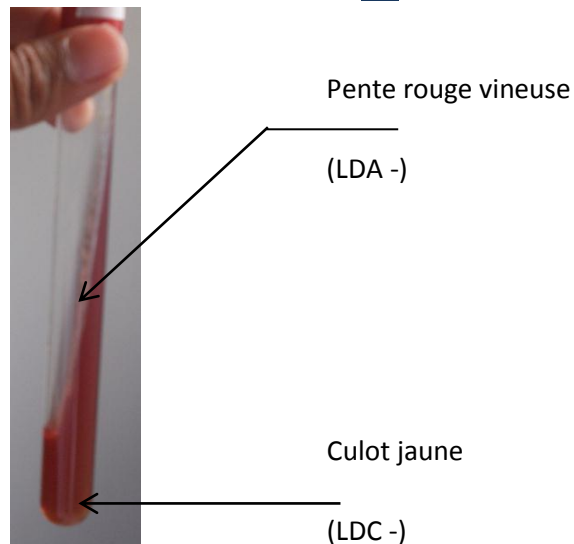


Figure 14 : Test sur milieu lysine fer

I.8.4. Test sur milieu Mannitol Mobilité Nitrate

L'absence de virage au jaune de l'indicateur de pH signifie que la bactérie n'utilise pas le mannitol comme source de carbone. La souche est immobile car elle se développe le long de la ligne d'ensemencement. La coloration rose en surface du milieu montre la présence du nitrate réductase

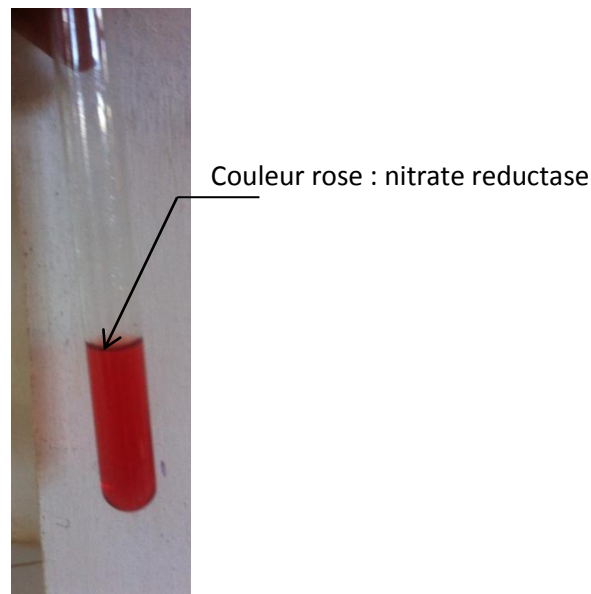


Figure 15 : Réaction négative de la souche MS112 sur milieu MMN

I.8.5. Le métabolisme glucidique

La souche MS112 est capable d'assimiler le thréaloze et saccharose, les autres sucres n'ont pas été métabolisés par la bactérie. La nature et le nombre de sucres que la souche est capable (ou incapable) d'assimiler montrent des caractères spécifiques des enzymes présentes au cours de son métabolisme et peuvent révéler le genre et l'espèce auxquels elles appartiennent.

Le tableau 7 montre les différents les résultats sur l'assimilation de la souche *Rhodococcus erythropolis* MS 112 des sucres.

Tableau 7 : Résultats du métabolisme glucidique

Métabolisme glucidique								
Réactions								
	Saccharose	maltose	Lactose	Glucose	trehalose	Cellobiose	Arabinose	Xylose
Souche MS112	+	-	-	-	+	-	-	-

Les résultats des caractères biochimiques sont résumés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Caractères biochimiques de la souche MS112

Milieux	Metabolisme glucidique								Hajna-Kligler	Lysine-Fer	Mannitol-Mobilité-Nitrate			CS				
Réactions	Saccharose	maltose	Lactose	Glucose	trehalose	Cellobiose	Arabinose	Xylose	Lactose	Glucose	Gaz	LDC	LDA	H ₂ S	Mannitol	Mobilité	Nitrate	citrate
112	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+

CS : Citrate simmons, H₂S : Sulfure d'hydrogène, LDA : Lysine désaminase, LDC : Lysine décarboxylase ;

(-) : Réaction négative ; (+) : Réaction positive

Le tableau 9 P. 36 représente le récapitulatif de l'identification de la bactérie.

Tableau 9 : Récapitulatifs de l'identification de la bactérie *Rhodococcus erythropolis*.

ETUDES		PARAMETRES	RESULTATS
Caractères cultureux		La couleur	+/-rose
		Le relief	Convexe
		La taille	2mm
		La forme	Ronde
		La consistance	Crémeuse
		La transparence	Opaque
		L'aspect de la surface	Lisse
		L'allure du contour	Régulière
Caractères morphologiques	Examen à l'état frais	Mobilité	immobile
		Forme des cellules	Cocci
		Mode de groupement	Isolé
	Coloration Gram	Coloration	violette
		Gram	+
Caractères physiologiques		Type respiratoire	Aérobic strict
		Catalase	+
Caractères biochimiques	Auxanogramme	Saccharose	+
		Maltose	-
		Lactose	-
		Glucose	-
		Tréhalose	+
		Cellobiose	-
		Arabinose	-
		Xylose	-
		Hajna Kligler	Lactose
	Glucose		+
	Gaz		-
	Lysine-Fer	LDC	-
		LDA	-
		H ₂ S	-
	Mannitol-Mobilité-Nitrate	Mannitol	-
		Mobilité	-
		Nitrate	+
	Citrate de Simmons	citrate	+

(-) : Réaction négative ; (+) : Réaction positive

Ainsi, d'après ces résultats, la souche isolée codée MS112 appartient à l'espèce *Rhodococcus erythropolis*.

II. Bioremédiation et dégradation des hydrocarbures résiduels

II.1. Les teneurs des hydrocarbures résiduels

L'extraction au Soxhlet a permis d'extraire les hydrocarbures non volatiles et les semi volatiles. Cette méthode est appliquée pour l'extraction des HAP de sols fortement contaminés (JEANNOT *et al.*, 2001).

Après le 3 mois de traitement, la valeur de la concentration en hydrocarbures résiduels est passée de 40 à 30 g/kg de sol (tableau 8). Les prélèvements ont été effectués le 5 du mois d'Avril, Mai et Juillet.

Tableau 10 : Concentration des hydrocarbures résiduels au cours du traitement

	05 Avril	05 Mai	05 Juillet
Concentration en HCr (g/kg de sol)	40	39	30

Une légère diminution de cette concentration (39g/kg de sol) a été observée pour le premier mois.

Les teneurs en hydrocarbures résiduels sont largement supérieures à la valeur fixée par la norme hollandaise (0,1 g/kg de sol) (GABET, 2004). Ces résultats confirment bien la pollution de ces sols par les hydrocarbures. Les concentrations sont encore largement supérieures à la norme.

II.2. Evaluation du taux de dégradabilité

La mesure du taux de dégradabilité des hydrocarbures durant le traitement a donné les résultats dans le tableau 11.

Tableau 11: Taux de dégradabilité des hydrocarbures résiduels au cours du traitement

	05 Avril	05 Mai	05 Juillet
Taux de dégradabilité (%)	0	2,5	25

Le taux de dégradation des hydrocarbures durant l'expérience varie de 2,5% à 25%. La biodégradation a été faible durant le premier mois de traitement 2,5%. Par contre, pour les deux derniers mois de l'expérimentation, le taux de dégradabilité est passé de 2,5% à 20%

C'est au troisième mois du traitement qu'il y eu un taux de dégradabilité significative (25%).

La Figure 16 illustre l'évolution de la concentration en HCT et du taux de dégradabilité au cours du traitement.

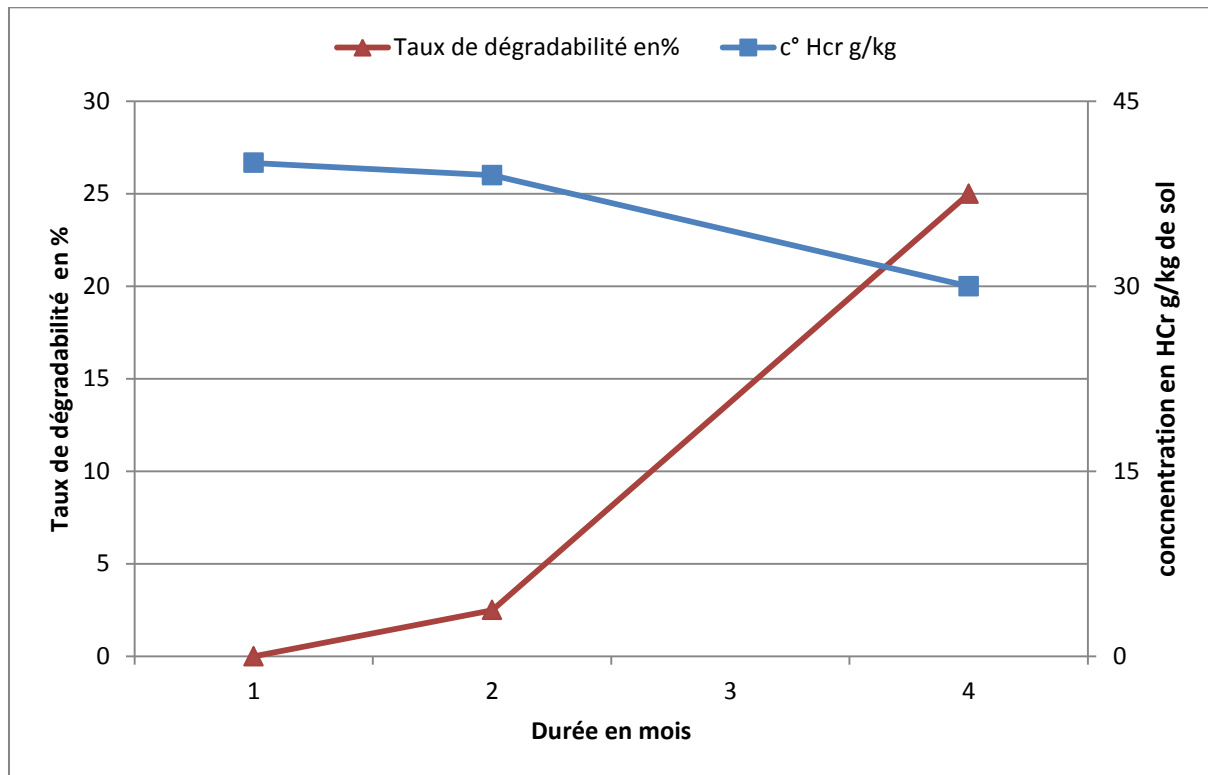


Figure 16 : Evolution de la concentration HCT avec le taux de dégradabilité

Les résultats du dénombrement sont donnés par le tableau 12

Tableau 12 : Cinétique de croissance de la souche

	Avril	Mai	Juillet
UFC/ml	720×10^7	237×10^5	316×10^{10}

La cinétique de croissance bactérienne est représentée par la figure 17 p. 39.

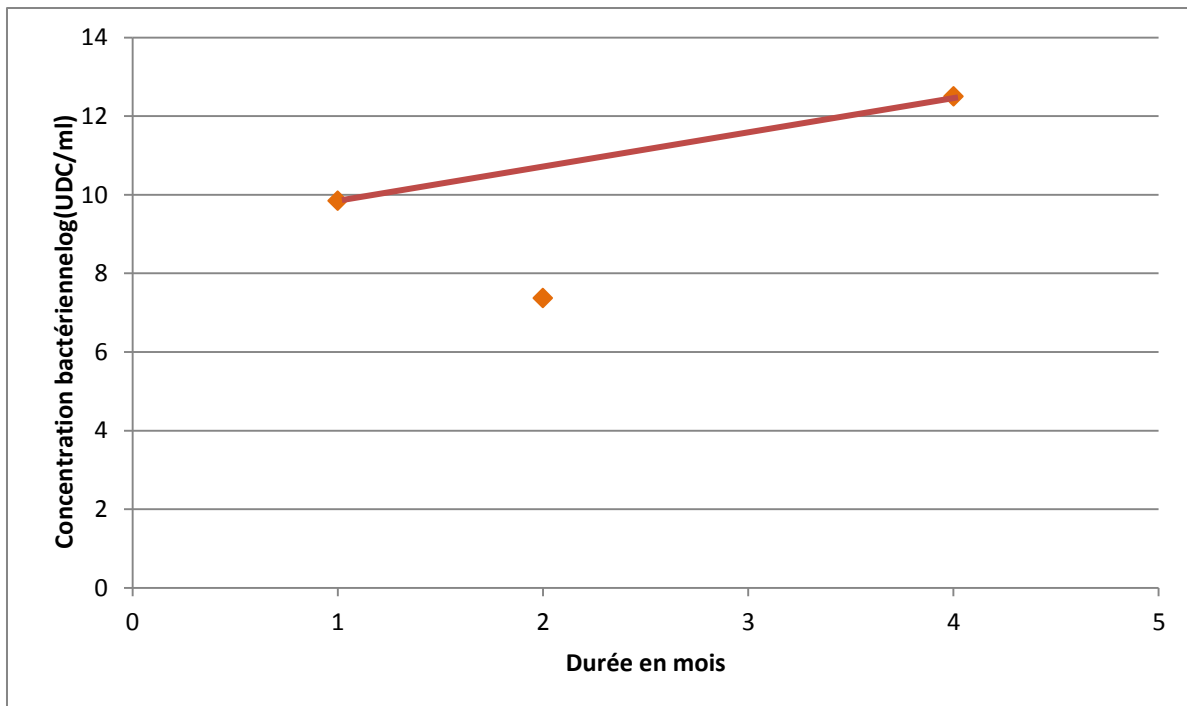


Figure 17 : Croissance de la bactérie *Rhodococcus erythropolis* MS112

La comparaison de la concentration en HCT et de la concentration en biomasse est illustrée dans la figure 18.

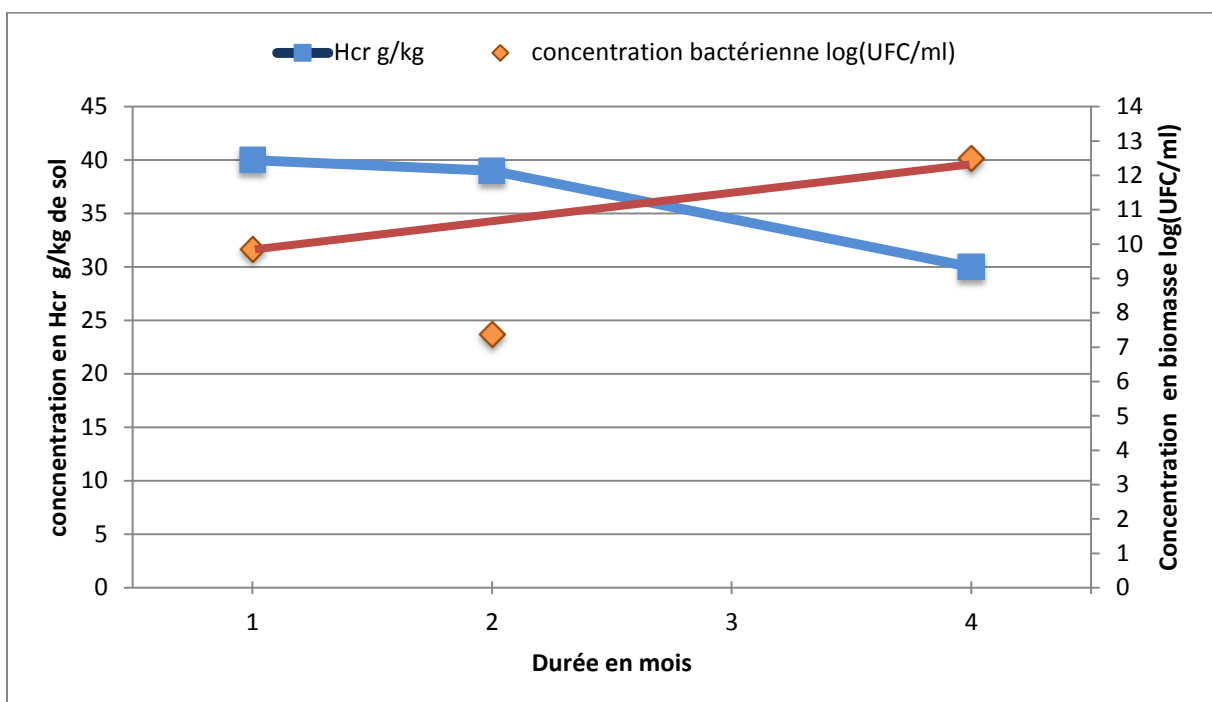


Figure 18 : Concentration en biomasse microbienne et des hydrocarbures résiduels

III. Discussions

Cette expérience a permis d'identifier la souche MS112 comme étant *Rhodococcus erythropolis*. Ces caractères biochimiques ont été comparés à la souche *Rhodococcus erythropolis* CNCM I-2204 utilisé par MONOT et ces collaborateurs en 2002. Cette similarité se trouve au niveau des caractères morphologiques, culturels, physiologiques, biochimiques mais surtout du point de vue du métabolisme glucidique.

A partir de ces caractéristiques, il est difficile d'identifier précisément une souche. C'est pour cette raison que des tests chimio-taxonomiques doivent être additionnés. Ces tests consistent à l'analyse des compositions de la paroi de la bactérie. Ils peuvent être complétés par une identification moléculaire.

Selon GÜRTLER *et al.* (2005), plusieurs espèces du genre *Rhodococcus* sont isolées des sols pollués. Leur présence dans ces milieux est due à leur versatilité métabolique. Les mono- et dioxygénases sont caractérisées biochimiquement et génétiquement chez beaucoup d'espèces de ce genre.

En ce qui concerne la dégradation de HAP par des souches bactériennes purifiées, la littérature est abondante. Une souche de *Rhodococcus* sp. a été isolée par WALTER *et al.* (1991) sur du pyrène comme source carbonée. Elle était capable de le minéraliser à 72% en deux semaines, d'utiliser le phénanthrène, l'anthracène, le fluoranthène comme autres sources de carbone, alors que le naphthalène, le dibenzofurane, le fluorène et le dibenzothiophène étaient seulement cométabolisés.

La faible diminution de la concentration en hydrocarbures résiduels durant le premier mois est due à l'adaptation de la souche *R. erythropolis* MS112. Vu que cette dernière a été isolée d'un site non contaminé par les hydrocarbures, il lui faudrait donc un temps pour s'accommoder à ce nouvel environnement.

Les autres auteurs affirment que ce laps de temps est une période d'adaptation des microorganismes à la pollution et à ce nouveau milieu. Le phénomène d'adaptation peut être défini comme les changements intervenant à la suite d'une perturbation, et visant à rétablir un nouvel équilibre dans la communauté microbienne. (SPAIN, 1990).

Trois types d'adaptation sont généralement proposés pour la biodégradation des pesticides et autres polluants (SPAIN, 1990) :

- des micro-organismes dégradant le produit sont présents dans le sol, mais leur taux de population est faible. Cette population va alors progressivement augmenter à un niveau suffisant pour provoquer une disparition significative du produit (AELION *et al.*, 1987).

- ces micro-organismes sont présents, mais les enzymes nécessaires à la dégradation doivent être synthétisées. La phase de latence sera alors plus longue que précédemment.

- une adaptation génétique s'ajoute aux phénomènes précédents. Elle se traduit sous la forme d'un transfert de gènes codant pour les enzymes de dégradation, ou par l'acquisition de nouvelles capacités par l'intermédiaire de mutations. La phase de latence est alors souvent très longue.

Durant le deuxième mois du traitement, même si la concentration de la biomasse a diminuée, la concentration en hydrocarbures résiduels a légèrement diminuée.

La souche *R. erythropolis* MS112 va alors subir différents changements au niveau génétique ; afin que son métabolisme lui permette d'utiliser les ressources présentes. La croissance de la biomasse à partir du deuxième mois du traitement signifie que la souche utilise l'hydrocarbure comme source de carbone.

La croissance de la biomasse microbienne dès le début du deuxième mois de traitement signifie que la souche s'est adaptée au milieu.

L'augmentation de groupes bactériens au niveau d'un environnement pollué pourrait dénoter une capacité à dégrader le polluant (MILITON, 2007).

La capacité de *Rhodococcus erythropolis* MS112 à dégrader les hydrocarbures est ainsi confirmée ; étant donné que c'était l'unique bactérie inoculée dans le milieu.

WANNOUSSA (2005), dans ses travaux sur la souche *Rhodococcus erythropolis* T902.1 a observé que sa capacité à dégrader les hydrocarbures aromatiques biphenyle, naphthalène, phénanthrène et pyrène diminue avec l'augmentation du nombre de cycles : les taux de biodégradation de ces composés sont respectivement de 53%, 54%, 32% et 15% en 18 jours.

Dans notre cas, la souche *Rhodococcus erythropolis* MS112 n'a atteint un taux de dégradation de 25% qu'après 60 jours de traitement.

D'après KLIMKOWICZ et MALISZEWSKA (2003), les microorganismes dans les sites longtemps pollués par les hydrocarbures, présentent une forte capacité d'adaptation au polluant. Leur sensibilité vis-à-vis des composés organiques peut ainsi être diminuée de plusieurs ordres de grandeur.

BARRIUSO *et al.*, (1996 ; 2000) ont démontré que la dégradation des hydrocarbures dans un sol ayant déjà été exposé à ces molécules est plus rapide que dans un sol ultérieurement non exposé.

La bioremédiation est cependant un procédé de dégradation assez lent, ce qui nécessite encore de nombreuses investigations en vue d'améliorer les performances des microorganismes impliqués (WANNOUSSA, 2005).

Même si les résultats ne sont qu'approximatifs, la présence d'une activité de biodégradation est constatée et prometteuse. Les conditions expérimentales adoptées semblent donc être favorables à la bioremédiation.

CONCLUSION et PERSPECTIVES

CONCLUSION

Cette étude est axée sur l'isolement d'une souche de *Rhodococcus erythropolis* MS112 de la région de Vakinankaratra – Madagascar, ainsi que sur l'utilisation de cette souche dans la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures (l'huile de vidange).

L'identification de la souche a été basée sur ses caractères cultureux, morphologiques, physiologiques et sur ses activités métaboliques.

Bien que ce travail soit une phase préliminaire dans le cadre des études sur la bioremédiation. Les diverses méthodes de travail utilisées, nous a permis de nous familiariser avec les matériels de laboratoire et surtout, acquérir et maîtriser les techniques microbiologiques de base ; notamment, celles relatives à l'isolement et à l'identification des germes ainsi qu'à l'initiation aux procédés de bioremédiation.

L'utilisation de la bioremédiation et les recherches qui peuvent s'y attacher doivent être renforcées avec l'implantation en masse des industries minières et des puits de forage dans notre pays.

La mise en place d'une politique de traitement des polluants est un devoir pour les industriels. L'Etat doit l'instaurer dans un cadre légal. Afin de garantir le respect de l'environnement.

Même si la bioremédiation soit une méthode efficace contre la dépollution, il s'agit encore d'un procédé de longue haleine.

Pour compléter ce travail, les perspectives suivantes sont envisageables :

- Effectuer des études complémentaires de la souche ;
- Confirmer l'identification de la souche par des tests d'assimilations d'autres substrats et par des techniques plus améliorées et précises comme l'utilisation de la biologie moléculaire par la Polymérase Chain Réaction (PCR) ;
- Etudier l'efficacité de cette souche avec un autre consortium de microorganisme ;
- Isoler et identifier des bactéries d'autres régions de Madagascar.
- Identifier les molécules assimilées par la souche MS112 lors du traitement ;
- Effectuer des dosages en hydrocarbures avec d'autres méthodes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ABDELY C., (2007). Bioremédiation/phytoremédiation. Thèse. Département des sciences naturelles. Institute supérieur de l'éducation et de la formation continue. Université de Tunisie.
2. AELION C.M., SWINDOLL C.M., PFAENDER K., (1987), Appl. Environ. Microbiol., Vo1.53, n09, 2212-2217 daptation to and biodegradation of xenobiotic compounds by microbial communities from a pristine aquifer.
3. ALVAREZ G., (2010). Propriétés interfaciales des composés amphiphiles d'une brut lourde influence sur le comportement des émulsions. Thèse de Doctorat. Université de Paris-sud XI (France).
4. BARRIUSO E, CALVET R, SCHIAVON M, SOULAS G., (1996). Les pesticides et les polluants organiques dans les sols. Etude et gestion des sols. 3 : p.279-295.
5. BELL K. S. , PHILIP J. C., D.W.J. AW and CHRISTOFI N., (1998). A review, The genus *Rhodococcus*;
6. BERTINI I., CREMONINI M., FERRETI S., LOZZI I., LUCHINAT C., VIEZZOLI M. (1996). Arene Hydroxylases: metalloenzymes catalysing dioxygenation of aromatic compounds. J.Coord. Chem. Rev.151: 145–160.
7. BUMPUS J. A., (1989).“Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Phanerochaete chrysosporium,” Applied and Environmental Microbiology, vol. 55, no. 1, pp. 154–158.
8. BUSWELL J. A., (1994). Potentian of spent mushroom substrate for bio remediation purposes. Compost Science and Utilization, 2(3): 31-36.
9. BUTLER C. et MASON J. (1997) Structure-function analysis of the bacterial aromatic ring-hydroxylating dioxygenases. *J. Adv. Microb. Physiol.* 38: 47–84.
10. CERNIGLIA C. E. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation 3: 351-368.
11. CERNIGLIA C. E. et SUTHERLAND J. B., (2001). “Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by ligninolytic and non-ligninolytic fungi,” in Fungi in Bioremediation, G.M. Gadd,Ed., , Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp. 136–187.
12. COLOMBANO S., GUERIN V., SAADA A., HIEZ D. et BOMER H. (2008). Journée Technique d'information et de retour d'expérience de la gestion des sols pollués. Les Diagnostiques - Objectifs, enjeux & moyens. In Gouvernement de France. Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie.

13. DAVEREY A. et PAKSHIRAJAN K. (2011). Recent advances in bioremediation of contaminated soil and water using microbial surfactants. In : Ahmad I., Ahmad F., and Pichtel, J(eds). Microbes and microbial technology, Springer Science+Business Media LLC, New York, United States of America: 207-228.
14. DE CARVALHO C., DA FONSECA M.. (2005). The remarkable *Rhodococcus erythropolis*. Applied Microbiology and Biotechnology. 67: 715 – 726.
15. ERIKSSON M., SODERSTEN E., YU Z., DALHAMMAR G. and MOHN W. (2003). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons at low temperature under aerobic and nitrate-reducing conditions in enrichment cultures from northern soils. Appl. Environ. Microbiol. (69)1:275-284.
16. EUZÉBY JP. (2011, November 4). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Rhodococcus*. Retrieved November 16, 2001, from <http://www.bacterio.cict.fr/qr/rhodococcus.html>.
17. FRANAENNEC J.P. ; LEPRINCE P. ; TREMBOUZE P. ; FAVENNEC J.P. ; EDERN Y, (1998). Le raffinage de pétrole. Pétrole brut –produit pétrolier-schéma de fabrication tom5 .technip . Fuel. Applied and Environmental Microbiology; 66(10) :4205 – 421.
18. GIBSON D.T. et SAYLER G.S. (1992). Scientific Foundation for Bioremediation: Current Status and Future Needs. American Academy of Microbiology, Washington, DC., USA.
19. GOODFELLOW M., (1989). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Philadelphia, PA: Williams and Wilkins. Section 26: nocardioform actinomycetes – Genus *Rhodococcus*. p. 2362-2371
20. GUERMOUCHE A., (2014). Caractérisation moléculaire de bactéries impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures. Thèse doctorat. Université d'Oran.
21. GÜRTLER V. and SEVIOUR J. (2005). Systematics of members of Genus *Rhodococcus* (Zopf 1891) Emend Goodfellow et al. 1998, The Past, Present and Future, Ollivier B. and Magot Michel (eds) petroleum microbiology, ASM PRESS, Washington, D.C. p.7-8.
22. HANNA K. (2004). Étude de faisabilité de l'utilisation de molécules "cage" dans la dépollution des sols : solubilisation et extraction de polluants organiques par les cyclodextrines. Thèse doctorat. Université Lyon. France.
23. HEITKAMP M.A., FRANKLIN W., CERNIGLIA C.E., (1988a), Appl. Environ. Microbiol., Vol.54, 2549-2555 : Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium.
24. HEITKAMP M.A., FREEMAN J.P., MILLER D.W., CERNIGLIA C.E., (1988b), Appl. Environ. Microbiol., Vol. 54, 2556-2565 : Pyrene degradation by a *Mycobacterium* : identification of

ring oxidation and ring fission products.

25. INRS (1979), Cahiers de Notes Documentaires, n095, 341-343 : Fiche toxicologique n°144.
Benzo(a)pyrène.
26. INRS (1984), Cahiers de Notes Documentaires, nOI17, 591-594 : Fiche toxicologique n°204.
Naphtalène.
27. JAMES G., KARUNA K., ARJOON, (2012). Bioremediation of Petroleum and Petroleum Products. Ed.WILEY.592.p.
28. JEANNOT R., LEMIERE B., CHIRON S. avec la collaboration de : AUGUSTIN F., DARMENDRAIL D., (2001), Guide méthodologique pour analyse des sols pollués (Document du BRGM 298).Editions BRGM.
29. JONES A. and GOODFELLOW M. (2010) Genus II. *Rhodococcus* (Zopf 1891) emend Goodfellow et al. 1998. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 4, 2nd edn. Springer, Berlin, pp 1–65.
30. KLIMKOWICZ P-A et MALISZEWSKA K-B., (2003). Effect of anthracene and pyrene on dehydrogenases activity in soils exposed and unexposed to PAHs. Water.air. and soil pollution, 145, p.169-186.
31. KUONY S. (2005) Thèse de l'Université Joseph fourier – Grenoble I. France. Caractérisation d'arene dioxygénases impliquées dans la biodegradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques chez mycobacterium sp. 6py1. <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00009997>.
32. LARKIN M. J., Kulakov L.A., Allen CC (2005) Biodegradation and Rhodococcus—masters of catabolic versatility. Curr Opin Biotechnol 16:282–290
33. LEMIERE B., SEGUIN J., Le GUERN C., GUYONNET D, BARANGER P., (2001) Guide sur le comportement des polluants dans les sols et les nappes. Ed BRGM. France.
34. GAITANIS Li J, ZHAO GZ, CHEN HH, QIN S, XU LH, JIANG CL, LI WJ (2008), *Rhodococcus cercidiphylli* sp. nov., a new endophytic actinobacterium isolated from a Cercidiphyllum japonicum leaf. Syst Appl Microbiol 31:108–113
35. GILLET J.V. . Risk assessment methodologies for biotechnology impact assessment. Environmental Management, 1986, 10, p. 515-532.
36. MAES E, SCHADECK S. et BRAHY V., sd. La contamination locale des sols. Portail d'environnement Wallonie.
37. MANDRI T. et LIN J. (2007), Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, African Journal of Biotechnology, vol. 6, no. 1, pp. 23–27.
38. MARTINKOVA L., UHNAKOVA B., PATEK M., NESVERA J., KREN V. (2009) Biodegradation potential of the genus Rhodococcus. Environ Int 35:162–177

39. MILITON C., (2007). Caractérisation des communautés procaryotiques impliquées dans la bioremédiation d'un sol pollué par des hydrocarbures et développement d'outils d'analyse à haut débit: les biopuces ADN. Thèse Doctorat. Université Blaise Pascal. France.
40. MORLETT-CHAVEZ J.A, ASCACIO-MARTÍNEZ J.A, RIVAS-ESTILLA A.M, Velázquez-Vadillo J.F, Haskins W, Barrera-Saldaña H.A, Acuña-Askar K. (2010). Kinetics of BTEX biodegradation by a microbial consortium acclimatized to unleaded gasoline and bacterial strains isolated from it. *International Biodeterioration & Biodegradation* 64. 581-587.
41. MONOT F., SAMIR A.A. et WARZYWODA M., (2002). Biological culture containing *Rhodococcus erythropolis* and/or *Rhodococcus rhodnii* and process for desulfurization of petroleum fraction. U.S. PATENT DOCUMENTS, Patent NO.: US 6,337,204 B1.
42. SCOW K.M, (2003). Rate of biodegradation, in: W.J. Lyman, W.F. Rosenblatt, (Eds.) *Handbook of Chemical Property Estimation Methods*, McGraw-Hill, New York.
43. SCHADECK S., VANDERHEYDEN. V, KREIT. JF, SITEREM. SA (2007) pollution locale des sols en région wallonne. Dossier scientifique réalisé dans le cadre de l'élaboration du rapport analytique 2006-27 sur l'état de l'environnement wallon.
44. SIMS R., (1990). Soil Remediation Techniques at Uncontrolled Hazardous Waste Sites. *Air Waste Mgmt. Assoc*, 40(5): 703-732.
45. SNEZANA M, BOZO D et SRDAN R. (2013). Petroleum Hydrocarbon Biodegradability in Soil – Implications for Bioremediation. INTECH. ISBN 978-953-51-0927-3.
46. SOLTANI M., (2004). Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse de doctorat de l'université Paris 6, spécialité chimie analytique, p. 284.
47. SPAIN J.C., (1990). Enhanced biodegradation of pesticides in the environment: Microbial adaptation in aquatic ecosystems. A.C.S. Symposium Series.
48. SVETLANA T., et ANYA S., (2005). LE PÉTROLE. Guide de l'énergie et du développement à l'intention des journalistes. Open Society Institute.
49. SZELIGA J. and DIPPLE A. (1998) DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol epoxides. *J. Chem. Res. Toxicol.* 11:1–11.
50. VANDECASTEELE J P, (2005). Microbiologie pétrolière Concepts. Implications environnementales. Applications industrielles. Editions Technip.
51. VIDALI M., DE VRIES R., KALKHOVE S., VELDINK G. and VLIENGENTHART J., (2009). Characterization of oxylipins and dioxygenase genes in the asexual fungus *Aspergillus niger*. *BMC Microbiology* 9:1-9.

52. VAN BEILEN J. B. and WITHOLT B., (2005). Diversity, function and biocatalytic application of alkane oxygenases, Bioremediation of hydrocarbon contaminated environments, Ollivier B. and Magot Michel (eds) petroleum microbiology, ASM PRESS, Washington, D.C. p. 216.
53. WALTER U., BEYER M., KLEIN J., REHM H.-J., (1991), Appl. Microbiol. Biotechnol., Vo1.34, 671-676: Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UWI.
54. WANNOUSSA W., (2005). Bioremédiation du biphényle par *Rhodococcus erythropolis* T902.1 en présence de nanoparticules métalliques encapsulées dans une matrice de SiO₂, Thèse de doctorat, Académie Universitaire Wallonie – Europe, Université de Liège.
55. WARHURST A., FEWSON C.A., (1994). Biotransformations catalyzed by the genus *Rhodococcus*. CritRev Biotechnol 14:29–73.
56. WIDDEL F., RABUS R., (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. Current Opinion in Biotechnology. 12:259–276.
57. WHYTE L.G., HAWARI J, ZHOU E, BOURBONNIERE L, INNIS WE, GREER CW (1998) Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp. Appl Environ Microbiol 64:2578–2584.

ANNEXES

ANNEXE I

MATERIELS DE LABORATOIRE

Verrerie

- Tube à essais
- Boîte de Pétri
- Erlenmeyer
- Ballon à fond rond ou plat
- Eprouvette graduée
- Pipette Pasteur
- Lame et lamelle

Matériels

- Spatule
- Balance de précision
- Plaque chauffante
- Autoclave
- Racloire
- Microscope optique
- Bec Bunsen
- Incubateur
- Autoclave
- hotte à flux laminaire
- Rotavapor
- Soxhlet
- Réfrigérateur
- étuve 30 à 150°C.

ANNEXE II

LE MILIEU D'ENRICHISSEMENT:

Eau peptonée:

- Peptone pancréatique de caséine	1,0 g
- Chlorure de Sodium	8,5 g
- Eau	1000 ml
- pH	7

Dissoudre 25,5g dans 1l d'eau distillée. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Autoclaver à 121°C pendant 21 minutes.

MILIEU DE CULTURE

Composition des milieux d'identification biochimique

❖ Plate Count Agar

- Tryptone :	5g
- Extrait autolytique de levure :	2.5g
- Glucose	1.0g
- Agar :	12g
- pH :	7,1
- Préparation :	20.5 g par litre de solution

❖ Milieu Citrate de Simmons

- Citrate de sodium :	1g
- Bleu de bromothymol :	0,08g
- Chlorure de sodium :	5g
- Sulfate de magnésium :	0,2g
- Hydrogénophosphate de potassium :	1g
- Dihydrogénophosphate d'ammonium :	1g
- Agar :	15g
- pH :	7,1
- Préparation :	23g par litre de solution

❖ Milieu Hajna-Kligler

- Peptone :	15g
- Extrait de viande :	3g
- Extrait de levures :	3g
- Peptone pepsique de viande :	5g
- Glucose :	1g
- Lactose :	10g
- Rouge de phénol :	0,024g
- Chlorure de sodium	5g
- Sulfate de fer II (Pasteur) :	0,2g
- Thiosulfate de sodium:	0,3g
- Agar :	11g
- pH=	7,5
- Préparation:	53,5g par litre de solution

❖ Milieu lysine fer

- Peptone de gélatine :	5g
- Extrait de levure :	3g
- L-lysine :	10g
- Glucose :	1g
- Citrate de fer III ammoniacal :	0,5g
- Bromocrésol pourpre :	20mg
- Thiosulfate de sodium :	40mg
- Agar :	13,5g
- pH :	6,7
- Préparation :	34g par litre de solution

❖ Milieu Mannitol mobilité Nitrate

- Hydrolysats tryptique de caséine :	10g
- Mannitol :	7,5g
- Rouge de phénol :	0,4mg
- Nitrate de potassium :	1g
- Agar :	3,5g
- pH :	7,6
- Préparation :	22g par litre de solution

Nom : RAMIADAMAHEFA

Prénoms : Mamitiana Zo

Mail : mramiadamahefa@gmail.com

Encadreur : Dr TSIRINIRINDRAVO Herisetra Lalaina, Dr RAHARIJAONA Tovo Robin

**BIOREMEDIATION DES SOLS POLLUES PAR LES HYDROCARBURES
PAR LA SOUCHE *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS***

RESUME

L'augmentation progressive de la consommation et de l'utilisation des hydrocarbures sont une menace pour l'environnement. Le traitement des sols pollués est une des solutions pour un développement durable. L'utilisation d'une souche microbienne pour l'élimination des contaminants a été choisie pour cette étude. Ce travail vise à isoler et caractériser une souche de *Rhodococcus erythropolis* de région de Vakinankaratra – Madagascar et de l'utiliser pour la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures (huile vidange). L'expérimentation a été faite dans des conditions contrôlées pendant une durée de 3 mois. Les résultats montrent qu'il y a eu réduction de la teneur en hydrocarbures résiduels, avec un taux de dégradabilité pouvant atteindre 25%. La biomasse microbienne a eu aussi une croissance significative atteignant un nombre 316×10^{10} UFC/ml. En somme, cette souche de *Rhodococcus erythropolis* MS 112 est une souche potentielle pour la bioremédiation.

Mots clés : Bioremédiation, sol, pollutions, hydrocarbures, *Rhodococcus erythropolis*.

Nom : RAMIADAMAHEFA

Prénoms : Mamitiana Zo

Mail : mramiadamahefa@gmail.com

Encadreur : Dr TSIRINIRINDRAVO Herisetra Lalaina, Dr RAHARIJAONA Tovo Robin

**BIOREMEDIATION OF POLLUED SOIL BY HYDROCARBONS
BY STRAIN OF *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS***

ABSTRACT

The increasing of consumption and using hydrocarbons is threat for the environment. The treatment of polluted soils is solution for sustainable development. For this study, the microbial strain is used to eliminate the contaminant. The aim of this work is to isolate and to characterize one strain of *Rhodococcus erythropolis* from the region of Vakinankaratra – Madagascar and apply it for bioremediation of polluted soils by hydrocarbons (used oil). Experimentation was conducted in controlled conditions during three months. Results showed the reduction of residual hydrocarbons content, with 25% of biodegradability. Microbial biomass was increasing (316×10^{10} UFC/ml). For summary, the strain of *Rhodococcus erythropolis* MS112 is potential strain for bioremediation.

Keywords: Bioremediation, soil, pollution, hydrocarbons, *Rhodococcus erythropolis*..