

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2022

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Présenté par :

BENABDELBAKI Abdelrezak et KADOUCHE Rabah

Thème

***Application des bactéries hydrocarbonoclastes dans la
récupération du pétrole***

Soutenu le : 06 /07 / 2022

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

Mme. MOUDACHE Messaad

MCA.

Univ. de Bouira

Présidente

Mme. MOURI-HADIDI Lila

MCB.

Univ. de Bouira

Examinatrice

Mme. YALAOUI-GUELLAL Drifa

MCA.

Univ. de Bouira

Promotrice

Année Universitaire : 2021/2022

Remerciements

En tout premier lieu, nous remercions notre Dieu ALLAH le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la force pour achever ce travail.

*Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à notre promotrice **Mme YALAOUI-GUELLAL Drifa** d'avoir accepté de nous encadrer, ainsi que pour les conseils, les orientations et le temps qu'elle nous a consacré à la réalisation de ce mémoire.*

*Un très grand merci à **Mme. MOUDACHE Messaad** d'avoir accepté de présider notre jury.*

*Nous remercions également **Mme. MOURI-HADIDI Lila** d'avoir accepté d'examiner notre travail. Merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.*

Un grand merci à tout le monde qui a participé de près à la réalisation de ce mémoire



Dédicace

Je dédie ce modeste travail

Aux deux êtres les plus chères de ma vie, mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études, qu'ALLAH vous protège.

A mes chers frères, Aymene et Wassim pour leur appui et leur encouragement, A toute ma famille, merci du fond du cœur. A mon oncle SAID, A mes tantes (BAKHI, SAADA, FATIHA, HADA, CHAFIA), mes cousins et mes cousines, pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire.

A mes amis Maroune, Mahmoud, Moha, Aymene, Samy, Rachid, Samy GUETTICH, Yacine et aussi la fafa. Merci d'être toujours là pour moi.

Je cite particulièrement mon cher binôme BENABDELBAKI Abdelrrezak qui m'a aidé non seulement dans ce projet fin d'étude mais durant ma carrière d'étudiant dans l'université.

*A tous mes camarades surtout la promotion 2021 /2022 Master II
Biotechnologies microbienne*

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

K. Rabah



Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

Mon très cher père

Pour m'avoir soutenu moralement et matériellement jusqu'à ce jour, pour son amour, et ses encouragements. Que ce travail, soit pour vous, un faible témoignage de ma profonde affection et tendresse, qu'Allah le tout puissant te préserve, t'accorde bonheur et te protège de tout mal.

Ma très chère mère

A la main pure qui enlevé de notre chemin les épines de l'échec, A celle qui m'a soutenu quand j'étais faible et à celle qui ma abreuvé d'amour dans ma faiblesse, A celle qui a tiré l'avenir pour moi avec des lignes de confiance et d'amour, autant de phrases aussi expressives soient elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi, Qu'ALLAH te protège et te donne la santé et bonheur.

Ma chère femme

A la source de mon amour et de ma compagne de vie, a la rose de mon jardinier et a la légende de mon amour et de ma chère histoire d'amour.

Mes frères

Aymen, Mostapha, Houda et Chehrazad.

Mes chères amies

Hakim, Islem, Moha, Aymen, Samy, Rachide, Samy GUETTICH. Merci d'être toujours là pour moi.

Mon binôme

A mon binôme KADOUCHE Rabah qui m'a aidé non seulement dans ce projet fin d'étude mais durant ma carrière d'étudiant dans l'université.

*A tous mes camarades surtout la promotion 2021 /2022 Master II
Biotechnologies microbienne*

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

B. Abdelrezak

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....1

Partie 1 : Synthèse bibliographique

I. Application des microorganismes dans la dégradation des hydrocarbures pétroliers 3

I.1. Hydrocarbures pétroliers 3

I.1.1. Définition du pétrole 3

I.1.2. Historique..... 3

I.1.3. Origine 4

I.1.4. Composition chimique 4

I.1.5. Classification..... 5

I.1.6. Interaction des sols avec les hydrocarbures 7

I.1.7. Bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures pétroliers 8

I.1.7.1. Bioaugmentation 10

I.1.7.2. Biostimulation..... 11

I.1.7.3. Bioatténuation 12

I.1.8 Interaction entre les micro-organismes et les hydrocarbures dans le sol 12

I.1.9. Biodégradation microbiologique des polluants hydrocarbonés 13

I.1.9.1. Biodégradation bactérienne..... 13

I.1.9.2. Biodégradation fongique..... 14

I.1.10. Voies métaboliques de la dégradation des hydrocarbures pétroliers 15

I.1.10.1. Biodégradation aérobie 15

I.1.10.2. Minéralisation complète ou voie de dioxygénase 18

I.1.10.3. Biodégradation anaérobie..... 18

I.1.10.4. Cométabolisme..... 19

II. Récupération assistée du pétrole par les microorganismes 21

II.1. Formation d'un gisement pétrolier..... 21

II.1.1. Composition chimiques du pétrole 22

II.2. Récupération assistée du pétrole 24

II.2.1. Récupération tertiaire 25

II.2.1.1. Récupération assistée du pétrole par les méthodes thermiques 25

II.2.1.2 Récupération assistée du pétrole par les méthodes chimiques..... 25

II.3. Récupération assistée du pétrole par procédé microbien	26
II.3.1. Définition et historique de la MEOR.....	26
II.3.2. Approches de la MEOR.....	27
II.3.2.1. Injection de bactéries exogènes avec des nutriments.....	28
II.3.2.2. Stimulation des microorganismes indigènes.....	28
II.3.3. Mécanismes de la MEOR	29
II.3.3.1. Modification du comportement du flux	29
II.3.3.2. Modification de l'écoulement des fluides au sein de la roche réservoir.....	31
II.4. Produits bactériens utiles dans la récupération assistée du pétrole	32
II.4.1. Biosurfactants	32
II.4.2. Bioémulsifiants	35
II.4.3. Gaz.....	35
II.4.4. Acides organiques.....	36
II.4.5. Solvants	36
II.5. Stratégies de MEOR.....	36
II.5.1. Stimulation des bactéries indigènes	38
II.5.2. Injection des bactéries exogènes avec les nutriments	38
II.5.3. Injection de métabolites produits <i>ex situ</i>	39
II.6. Avantages de MEOR.....	39
Partie 2 : Procédures expérimentales	
III. Matériels et méthodes	40
III.1. Matériel.....	40
III.2. Méthodes	40
III.2.1. Revivification des souches et vérification de la pureté des souches	40
III.2.2. Aspect macroscopique des souches.....	40
III.2.3. Etude microscopique des souches	41
III.2.3.1. Coloration de Gram	41
III.2.4. Identification biochimique	41
III.2.4.1. Test de catalase.....	42
III.2.4.2. Test Nitro Phényl Galactopyranoside (NPG)	42
III.2.4.3. Test ADH, LDC et ODC	43
III.2.4.4. Utilisation de citrate	44
III.2.4.5. Production de sulfure d'hydrogène (H ₂ S)	44
III.2.4.6. Recherche de l'urée	44
III.2.4.7. Recherche de la tryptophane-désaminase (TDA).....	45
III.2.4.8. Production de l'indole	45
III.2.4.9. Test de Voges-Proskauer (VP)	45

III.2.4.10. Dégradation de la gélatine	46
III.2.4.11. Assimilation des glucides	46
III.2.4.12. Réduction de nitrate en $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$	46
III.2.5. Potentiel de biodégradation de pétrole par les souches étudiées	46
III.2.5.1 Détermination de la biomasse bactérienne totale	47
III.2.5.2. Mesure de l'indice d'Émulsification (E_{24}).....	48
III.2.5.3. Détermination de la biodégradation des hydrocarbures	48
III.2.6. Production de Biosurfactant	49
III.2.7. Extraction des biosurfactants.....	49
III.2.8. Récupération du pétrole par les biosurfactants (MEOR).....	50
IV. Résultats et Discussion.....	51
IV.1. Aspect macroscopique des souches étudiées	51
IV.2. Etude microscopique des souches étudiées	51
IV. 3. Identification biochimique des souches étudiées	51
IV.4. Potentiel de biodégradation du pétrole par les souches étudiées.....	52
IV.4.1. Biodégradation du pétrole brut.....	52
IV.4.2. Estimation de la biomasse bactérienne totale.....	54
IV.4.3. Mesure de l'indice d'Émulsification (E_{24})	55
IV.5. Production de biosurfactants	57
IV.6. Récupération du pétrole par les biosurfactants (MEOR)	58
VConclusion	72
Références bibliographiques.....	74

Annexe

Résumé

Liste des tableaux

Tableau I. Avantages et limites de la technique de biodégradation	9
Tableau II. Genres de bactéries qui utilisent les hydrocarbures comme seule source de carbone et d'énergie	14
Tableau III. Caractéristiques physico-chimiques de certains pétroles bruts d'origines diverses	23
Tableau IV. Produits microbiens et leurs rôles dans la récupération assistée du pétrole	33
Tableau V. Applications courantes des biosurfactants dans l'industrie pétrolière.....	35
Tableau VI. Quelques caractéristiques biochimiques des bactéries étudiées	52
Tableau VII. Poids sec des biosurfactants produits par les souches étudiées.....	57

Liste des figures

Figure 1. Structure moléculaire de base des principaux hydrocarbures pétroliers	5
Figure 2. Deux phases de matière organique.....	7
Figure 3. Différence entre la technique bioaugmentation et la biostimulation	9
Figure 4. Voie aérobie de la dégradation des hydrocarbures pétroliers.	17
Figure 5. Dégradation anaérobie de Toluène	19
Figure 6. Coupe représentatif d'un système pétrolier classique.....	22
Figure 7. Différentes méthodes utilisées dans la récupération	24
Figure 8. Déplacement de l'huile par diminution de la tension superficielle par des biosurfactants dans le mécanisme de la récupération assistée du pétrole	34
Figure 9. Principes de la récupération assistée du pétrole par des microorganismes	37
Figure 10. Test de catalase	42
Figure 11. Réaction de β galactosidase	43
Figure 12. Réaction de décarboxylase	43
Figure 13. Réaction de décarboxylase.....	44
Figure 14. Réaction de la tryptophane-désaminase (TDA)	45
Figure 15. Réaction du test d'indole.....	45
Figure 16. Test de dégradation de pétrole par des monoculture et culture mixte des souches S1, S2, S3, S4, S5 et S12	47
Figure 17. Etapes de la production de biosurfactants (Yalaoui-Guellal et al., 2017).....	49
Figure 18. Etapes de l'extraction de biosurfactants (Yalaoui-Guellal et al., 2018).....	50
Figure 19. Récupération du pétrole des sables et des sols.....	51
Figure 20. Potentiel de biodégradation du pétrole par les différentes souches étudiées	53
Figure 21. Croissance bactérienne sur MSM à 2% de pétrole brute en fonction du temps.....	54
Figure 22. Indice de l'émulsification (E24) des souches étudiées et cultivées sur le pétrole comme seule source de carbone.....	56
Figure 23. Indice de l'émulsification (E24) des souches étudiées et cultivées sur le glucose comme seule source de carbone.....	58
Figure 24. Pourcentage de récupération (R%) du pétrole par les différentes souches.	59

Liste des abréviations

- ADH** : Arginine Dihydrolase
- API** : American Petroleum Institute
- ASP** : Alkali-Surfactant-Polymère
- BN** : Bouillon nutritif
- BPC** : British petroleum company
- BRN** : bactéries réductrices de nitrate
- BS** : Biosurfactant
- BSR** : Bactéries Sulfato-Réductrices
- BTEX** : Benzène, Toluène, Ethylène et Xylène
- EOR** : Enhanced Oil Recovery
- GN** : Gélose Nutritive
- HAPs** : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.
- IFT** : Tensions interfaciale
- LDC** : Lysine Dé Carboxylase
- MEOR** : Microbial Enhanced Oil Recovery
- MSM** : Milieux Seles Minéraux
- NADH** : Hydrure de Nicotinamide Adénine
- NPG** : Nitro Phényl Galactopyranoside
- ODC** : Ornithine DéCarboxylase
- RPM**: Rotation Par Minute
- SP** : Du latin Species Pluralis, Espèce non Précise
- SDS** : Sodium Dodecyl Sulfate
- TDA** : Tryptophane Sulfure D'hydrogène
- VP** : Voges-Proskauer

Introduction

L'une des méthodes modernes améliorées d'extraction du pétrole brut, qui a reçu une grande attention, est l'utilisation de certaines souches de bactéries, grâce à l'activité de ces microbes qui sont exploités pour libérer le pétrole lourd collé aux roches et réduire sa viscosité, ce qui conduit à la reprise du pompage du pétrole des puits qui a arrêté la production, cette méthode est appelée la récupération assistée du pétrole par procédé microbien (MEOR : Microbial Enhanced Oil Recovery).

Généralement, certaines souches de bactéries trouvées dans les boues pétrolières déposées profondément dans le sol sont utilisées, ou de nouveaux types de bactéries génétiquement modifiées sont développés, et elles décomposent le pétrole lourd ou le pétrole très lourd avec une viscosité élevée pour le transformer en pétrole moins visqueux qui peut être facilement extrait des puits. Les chercheurs recourent à favoriser la croissance de ces bactéries dans des laboratoires spécialisés, puis les injectent dans le puits de pétrole avec l'eau d'injection alimentée en nutriments nécessaires à la croissance de ces micro-organismes et parfois en oxygène, puis le puits est fermé pendant plusieurs jours et peut se prolonger à plusieurs semaines, et pendant cette période les bactéries se multiplient sur les surfaces des roches et dans les pores et les fines fissures dans lesquelles l'huile lourde est coincée. Ces microorganismes ont la capacité de synthétiser des biomolécules appelées biosurfactants qui sont des molécules amphiphiles ([Marchant et Banat, 2012](#)).

La plupart de ces molécules sont des agents extra cellulaires, ils sont sécrétés par les champignons, levures et bactéries en croissance dans les milieux de culture à la suite de leur biosynthèse ([Salihu et al., 2009](#)). Cette production des tensioactifs par les microorganismes suscite un grand intérêt par les scientifiques ceci est dû principalement aux avantages présentés par ces biomolécules tensioactives par rapport à leur homologue chimique ; leur biodégradabilité, faible toxicité, l'efficacité dans les conditions extrême (pH, température, salinité), et la production en présence des ressources renouvelables ([Makkar et al., 2011](#)).

D'autre part le pétrole constitue une source évidente de diverse pollution qui sont susceptibles d'être à l'origine de la délinquance écologique et les meilleures méthodes d'assainissement pour dépolluer les milieux pollués par les hydrocarbures présents dans le pétrole est la bioremédiation qui consiste à l'utilisation des microorganismes souterrains pour dégrader les polluants liés à des substances organiques telle que les hydrocarbures, ces dernières sont des polluants organiques nocifs pour l'homme et l'environnement, elle a également la capacité de pouvoir mutagène et/ou cancérigène ([Chiker et al., 2011](#)).

Ce travail a été mené dans cette optique, il est constitué de deux parties :

La première est réservée à la synthèse bibliographique relative à l'utilisation des microorganismes dans la bioremédiation et la biodégradation des hydrocarbures pétroliers, et le processus de MEOR.

La deuxième partie est consacrée aux procédures expérimentales dont la première étape décrite l'enrichissement de six souches bactériennes et leur potentiel de biodégradation de pétrole, ainsi leur production de biosurfactant et leur utilisation dans la récupération de pétrole et le potentiel de biodégradation de pétrole, suivie par interprétations de tous les résultats obtenus.

Nous terminerons cette étude par conclusion générale suivie par une liste de références bibliographique et annexes.

Partie I:
Recherche bibliographique

Chapitre I

Chapitre I

I. Application des microorganismes dans la dégradation des hydrocarbures pétroliers

I.1. Hydrocarbures pétroliers

I.1.1. Définition du pétrole

Le nom huile vient de deux mots latins : *petra*, pierre, et *oléum*, huile (pétrole). Il se présente généralement sous la forme d'un liquide brun foncé, gras, visqueux, presque opaque caractérisé par une odeur plus ou moins prononcée (Hue, 1885).

Le pétrole peut également être défini comme une huile minérale, naturelle, combustible qui est produite au cours d'un processus prolongé de décomposition et de transformation de la matière organique enfouie au cours des temps géologiques. Cette source organique de pétrole est mise en évidence par la présence de molécules optiquement actives qui ne peuvent être synthétisées que par biosynthèse. La composition de ce fluide dépend à la fois des propriétés de la matière organique et de son évolution dans différentes conditions de température et de pression (Ellingsen et Feryforgues, 1998).

I.1.2. Historique

Le pétrole, ce liquide porte plusieurs noms, les Romains l'appelaient bitume ; les Américains l'appelaient pétrole ; dans le Caucase il s'appelait naphta, alors qu'en Asie il gardait juste son ancien nom de bitume (Hue, 1885).

Les premières traces d'utilisation humaine du pétrole remontent à l'ancienne Mésopotamie. Lorsqu'il est abondant dans le sous-sol, le pétrole forme des affleurements, et une fois capté en surface, le pétrole est utilisé comme combustible d'éclairage pour assurer l'étanchéité des navires, et même dans les domaines médicaux et pharmaceutiques, le pétrole semble être privilégié pour ces usages médicaux. Apprécié pour ses vertus dans le traitement des rhumatismes et des maux de tête (Drousset, 1999). Ce n'est qu'en 1859 que la grande aventure pétrolière commence. Cette année a été marquée par la découverte du premier gisement exploitable à Titusville, en Pennsylvanie, aux États-Unis, où le premier forage pétrolier de l'histoire a été réalisé par le colonel Drake. Le pétrole a coulé des profondeurs, propulsant l'humanité dans une nouvelle ère, celle de l'énergie bon marché.

À partir des années 1960, le pétrole a remplacé le charbon comme matière première du secteur de l'énergie. En effet, l'économie charbonnière du XIXe siècle a été détruite et remplacée par l'économie du siècle suivant, largement basée sur l'or noir (Corre, 2000).

I.1.3. Origine

Le pétrole est une roche liquide carbonée ou une huile minérale constituée de nombreuses molécules composées principalement d'atomes de carbone et d'hydrogène, appelés hydrocarbures. La décomposition de la matière organique végétale et animale, après son dépôt et son enfouissement sous d'autres couches sédimentaires, entraîne la perte d'oxygène de l'environnement, ce qui déclenche une réaction de réduction. Puis, sous l'effet conjugué de la chaleur (60°C) et de la pression (enfouis entre 1 200 et 1 800 mètres environ), la conversion en hydrocarbures commence (Tissot et Welte, 1984).

Cette huile se forme moins densément que la roche qui l'entoure, elle migre donc vers la surface. Si le pétrole est arrêté par une roche imperméable au cours de sa progression, il se concentrera pour former des poches à l'origine du réservoir actuel (Tissot et Welte, 1984).

I.1.4. Composition chimique

Le pétrole brut est l'un des mélanges les plus complexes de composés organiques sur la terre. Les progrès récents de la spectrométrie de masse à ultra-haute résolution ont identifié plus de 17 000 constituants chimiques distincts et ont inventé le terme petroomics pour exprimer la complexité de cette nouvelle découverte (Hassanshahian et Cappello, 2013).

Les hydrocarbures pétroliers contiennent principalement des molécules composées d'atomes de carbone et d'hydrogène. Ce sont les alcanes acycliques (ou paraffines), les cycloalcanes, les alcènes et les aromatiques (Harayama et al, 1999). D'autres constituants mineurs sont également présents dans les hydrocarbures pétroliers, tels que les métaux et les composés polaires contenant de l'azote, du soufre ou de l'oxygène. Les molécules polaires de faible poids moléculaire sont appelées résines, et les plus lourdes sont classées comme asphaltènes (Balba et al, 1998).

La composition élémentaire des hydrocarbures pétroliers est présentée dans la Figure 01.

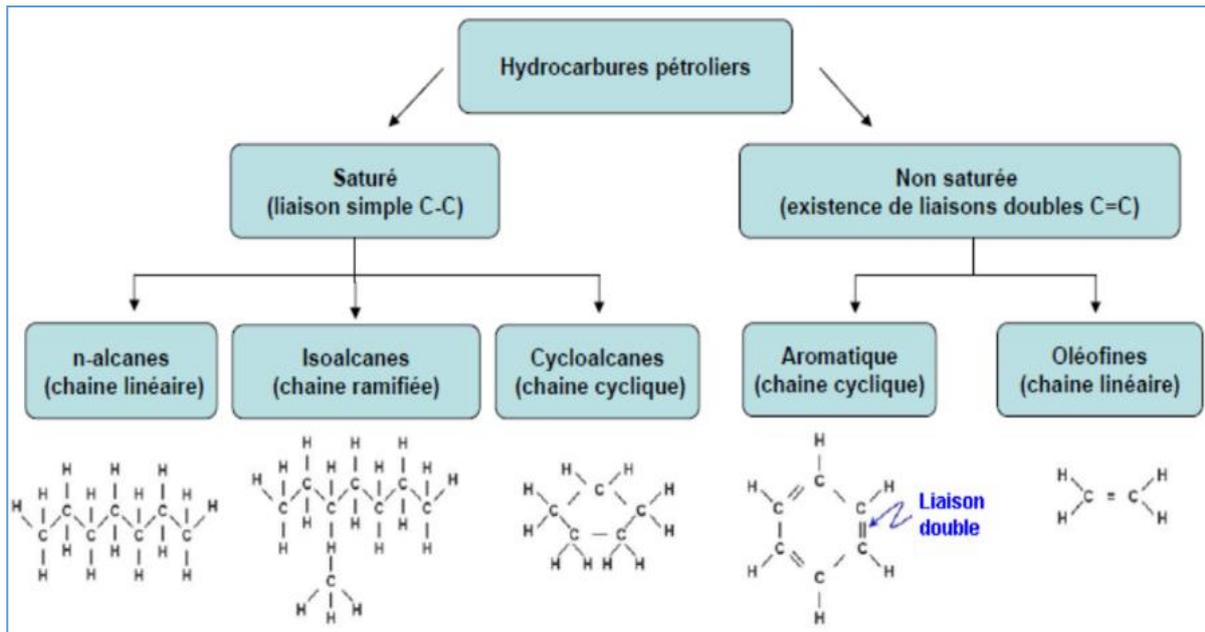


Figure 1. Structure moléculaire de base des principaux hydrocarbures pétroliers (Colombano et al, 2008).

I.1.5. Classification

Les hydrocarbures sont de nature organique et ont une formule chimique de type C_nH_m , c'est à dire qu'ils ne sont constitués que d'atomes de carbone et d'hydrogène, ils sont structurellement très divers et omniprésents dans tous les types de pétrole brut, sauf ceux que l'on trouve uniquement dans les produits raffinés alcènes ou alcènes (Laxalde, 2012).

En plus des hydrocarbures, des composés organiques contenant des hétéroatomes sont également présents dans le pétrole brut en petites quantités.

* **Élément de Soufre:** Le soufre est l'hétéroélément le plus courant dans le pétrole brut, et sa teneur et sa concentration peuvent varier de 0 % à 8 % en poids. Cette teneur est liée à la densité du pétrole brut (léger ou lourd) (Soltani, 2004).

* **Les éléments azotés et oxygénés :** ils existent sous différentes formes et sont présents en moindre quantité que les composés soufrés. En effet, l'azote représente 0 à 1 % et l'oxygène 0 à 0,5 % (Boudreau et al., 2019).

* **Métaux :** Ils sont présents à l'état de traces, comme le vanadium qui représente 75 % du métal, suivi du nickel. D'autres métaux tels que le fer, le zinc, le cuivre, le manganèse, le cobalt et le chrome ont également été détectés à l'état de traces (concentrations allant de 1

ppm à 1000 ppm). Ces métaux sont concentrés dans des fractions telles que les résines et les asphaltènes (Colombano et al., 2014).

De plus, selon la méthode d'analyse SARA, les composants du pétrole brut les plus couramment rencontrés peuvent être regroupés selon leur solubilité dans les solvants organiques : (saturés, aromatiques, résines and asphaltènes) (Colwell et al., 1977 ; Wren et Venosa, 1996) sont répartis dans les quatre familles suivantes :

* **Hydrocarbures saturés** : leurs atomes de carbone sont liés par des liaisons simples et sont principalement composés de (Colombano et al., 2014)

* **Hydrocarbures saturés aliphatiques** : Ce sont des alcanes à chaîne droite (n-alcanes) et des alcanes à chaîne ramifiée, ces molécules sont appelées respectivement paraffines et isoparaffines dans l'industrie pétrolière.

* **Cycloalcanes** : Ce sont des composés cycliques ramifiés ou non ramifiés appelés cycloalcanes ou cycloalcanes dans l'industrie pétrolière.

* **Hydrocarbures aromatiques** : Cette famille regroupe tous les composants dont les noyaux vont de 2 à 6 (Soltani, 2004). Ils sont divisés en deux groupes distincts, à savoir :

- Hydrocarbures aromatiques monocycliques contenant un seul cycle benzénique, tels que le benzène, le toluène, l'éthylbenzène et le xylène, ce dernier étant appelé BTEX (Feknous, 2017).
- Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) englobent une gamme de molécules de complexité très variable et comprennent plusieurs cycles aromatiques adjacents.

* **Asphaltènes** : Ce groupe comprend des composés de haut poids moléculaire, insolubles dans les solvants (n-pentane ou n-hexane), caractérisés par leurs structures mal connues, en partie à cause de leur difficulté d'utilisation. D'autre part, la complexité de leur composition chimique repose sur des cycles aromatiques fusionnés et de courtes chaînes aliphatiques contenant des hétéroatomes (O, N, S) (Liao et al., 2009).

* **Résines** : Constituent la partie polaire et sont solubles dans les solvants à base de n-alcanes, y compris les composés contenant un ou plusieurs hétéroatomes (O, N, S) (Eddouaouda, 2012). Dans cette catégorie, on distingue les composés contenant des impuretés telles que les

éléments soufre, azote et oxygène, ainsi que divers métaux. Ces éléments sont concentrés dans des fractions lourdes comme les résines et les asphaltènes (Colombano et al., 2014).

I.1.6. Interaction des sols avec les hydrocarbures

Le sol est composé de matières organiques et inorganiques séparées par des pores contient de l'eau ou de l'air. Les interactions entre les hydrocarbures et les minéraux des surfaces, tel que l'argile, le limon et le sable, ne sont significatives quand sa teneur en matière organique est de 0,1%. Par conséquent, elle est très importante dans le devenir et le comportement des polluants organiques (Stroud et al., 2007; Van Elsas et al., 2006).

La matière organique est divisée en deux phases (Figure 02): La première est le carbone mou (caoutchouc), qui se dilate et a une structure flexible comme principaux acides humiques et fulviques (en substances humiques chélatent les nutriments minéraux élémentaires). Le deuxième est le carbone dur (vitreux) est défini comme ayant de l'humus, du kérogène et carbone pyrolytique. L'adsorption d'hydrocarbures dans la région vitreuse est caractérisée par un piégeage irréversible d'hydrocarbures (Stroud et al., 2007; Van Elsas et al., 2006).

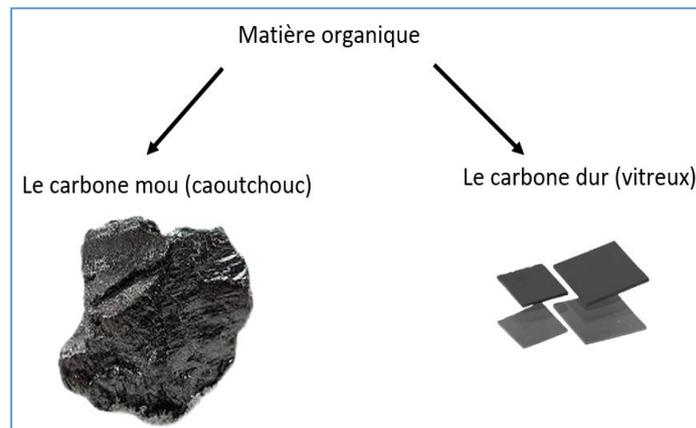


Figure 2. Deux phases de matière organique.

Le pétrole brut est un liquide naturel, visqueux et inflammable, sa composition chimique varie considérablement, il est généralement brun foncé ou noir (bien qu'il puisse être jaune ou vert). D'un point de vue technique, les pétroles bruts sont généralement classés selon leur origine, la densité de l'American Petroleum Institute (API) et leur teneur en soufre (S). Pétrole brut dans les pétroles bruts à teneur en soufre relativement faible sont appelés pétroles bruts "Doux", tandis que ceux à teneur en soufre de grandes quantités de soufre sont connues sous le nom de bruts "acides". Le pétrole brut est un mélange de diverses substances

organiques, principalement des hydrocarbures et des composés organiques (Varjani & Upasani, 2017).

I.1.7. Bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures pétroliers

La bioremédiation est une biodégradation ou décontamination biologique par l'intervention des microorganismes efficace pour purifier l'environnement contaminé par des produits polluants dangereux. La méthode consiste à digérer ces polluants et à les transformer en composants moins complexes et moins dangereux. Les hydrocarbures pétroliers et les déchets issus de l'extraction et du traitement du pétrole (boue et résidus de forage) peuvent être bio purifiés. La biodégradation est définie comme la réduction biocatalytique de la complexité du composé. En fait, la biodégradation est le processus par lequel la matière organique est décomposée en composés plus simples par des microorganismes vivants. Lorsque la biodégradation est terminée, le processus est appelé "minéralisation" (Joutey et al., 2013).

La bioremédiation, est donc l'emploi de procédés pour réduire et éliminer les polluants industriels qui contaminent le cycle biogéochimique des substances naturelles, c'est une option avantageuse pour diminuer la pression exercée sur l'environnement et pour réduire le niveau de pollution présents dans l'air, l'eau ou le sol.

Les avantages de la bioremédiation sont nombreux (Tableau 1), le principal avantage est qu'elle est respectueuse de l'environnement et qu'il ne reste pratiquement aucune substance inoffensive dans la nature après le traitement (Dzionic et al., 2016).

Tableau I. Avantages et limites de la technique de biodégradation (Philp et Atlas, 2005).

Avantages	Limites
Respecte l'environnement	Solubilité du pétrole brut
Application pour le traitement des larges surfaces	Durée du traitement
Applicable dans divers environnements	Quantité de biomasse nécessaire pour l'application des larges surfaces
Les résidus décomposés peuvent être utilisés comme fertilisants	Disponibilité des nutriments
Potentiel de développement de la bioénergie à partir de la biomasse microbienne	Exigence d'experts dans le domaine de la bioremédiation du pétrole brut
Efficace en termes d'élimination des contaminants	
Bénéficiaire	

Il existe trois principales méthodes de la bioremédiation : la bioaugmentation, la biostimulation et la bioatténuation (Figure 03).

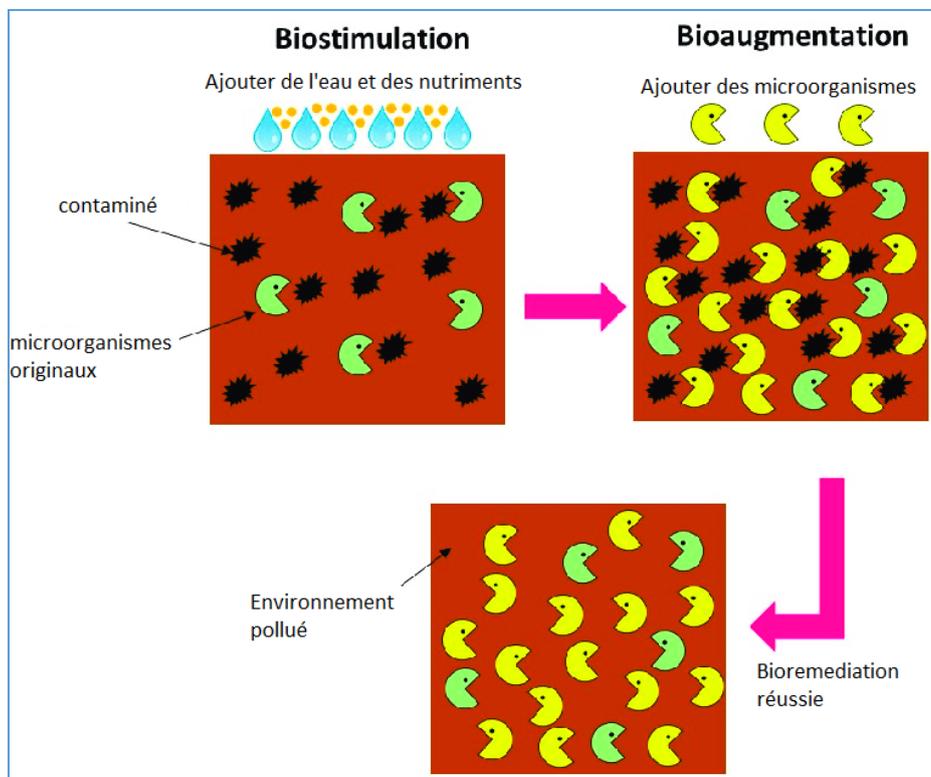


Figure 3. Différence entre la technique bioaugmentation et la biostimulation (Sales da Silva et al, 2020)

I.1.7.1. Bioaugmentation

La bioaugmentation consiste à introduire des cultures microbiennes dans des environnements contaminés dans le but d'augmenter la biodégradation des hydrocarbures. La technologie est basée sur l'ajout de souches pures pré-adaptées ; l'ajout d'un consortium pré-adapté ; l'introduction de bactéries transgéniques et l'ajout de gènes biodégradables emballés pertinents aux vecteurs pour le transfert dans des micro-organismes natifs par conjugaison (El Fantroussi et Agathos, 2005).

En règle générale, les micro-organismes sont sélectionnés sur la base de leur capacité métabolique à dégrader les hydrocarbures et de leurs caractéristiques fondamentales qui permettent aux cellules d'être fonctionnellement actives et persistantes dans les conditions environnementales souhaitées. La méthode optimale de sélection des micro-organismes compétents doit être basée sur la connaissance préalable des communautés microbiennes habitant le site à traiter (Thompson et al., 2005).

L'utilisation d'un consortium microbien plutôt que d'une culture pure pour la bioremédiation est plus avantageuse car elle fournit la diversité métabolique et la résistance nécessaires aux applications sur le terrain (Rahman et al., 2002). Les inoculant microbiens sont des suspensions cellulaires homogènes produites dans des conditions optimales et souvent stressées au contact d'habitats naturels complexes. Dans des situations pratiques, les populations introduites commencent à diminuer peu après l'addition en raison de plusieurs stress abiotiques et biotiques (Hocine et al., 2018).

En fait, le stress causé par les changements des paramètres abiotiques peut inclure des températures extrêmes, la teneur en eau, le pH, l'épuisement des nutriments et les niveaux de contaminants potentiellement toxiques dans les sols contaminés (Gentry et al., 2004).

Les paramètres biologiques, en particulier les problèmes d'adaptation des micro-organismes inoculés ; substrat insuffisant ; compétition avec la microflore native ; utilisation préférentielle d'autres substrats organiques par rapport aux contaminants ; la présence de prédateurs tels que les nématodes peut nuire au maintien et à la croissance des micro-organismes introduits, Ainsi les souches microbiennes artificiellement ajoutées peuvent décliner rapidement (Goldstein et al., 1985; Van Veen et al., 1997 ; Singer et al., 2005; Viñas et al., 2005).

I.1.7.2. Biostimulation

La biostimulation implique l'activité de modification de l'environnement en ajoutant des nutriments tels que l'azote, le phosphore, l'oxygène ou le carbone (par exemple sous forme de mélasse) au site pour stimuler les populations microbiennes locales du sol contaminé, ils sont également disponibles en quantités suffisamment faibles pour limiter l'activité microbienne (Guerin, 1999 ; RoLing et al., 2002; Delille et al., 2004; Kalantary et al., 2014).

La biodégradation des hydrocarbures dans le sol peut être limitée par de nombreux facteurs, notamment les nutriments, le pH, la température, l'humidité, l'oxygène, les propriétés du sol et la présence de contaminants (Bundy et al., 2002 ; Atagana, 2008; Al-Sulaimani et al., 2010).

Il existe plusieurs autres facteurs qui déterminent en grande partie la vitesse à laquelle les hydrocarbures se dégradent dans des conditions naturelles, tels que l'intensité du mélange physique, le pré-traitement comme : le lavage à la côte, l'enlèvement manuel, le râtelage manuel, la bioremédiation à l'aide d'agents de biostimulation, le labourage mécanique (Sugai et al., 1997).

La température a un effet considérable sur la biodégradation en raison de son effet sur la viscosité, la solubilité dans l'eau et la composition chimique des hydrocarbures. Elle affecte également le taux de dégradation des hydrocarbures et la composition de la communauté microbienne (Atlas, 1981 ; Horel et Schiewer, 2009).

La faible solubilité des hydrocarbures dans l'eau est un facteur limitant de la biodégradation microbienne. L'utilisation de biosurfactants pour améliorer les taux de biodégradation a été intensivement étudiée (Ron et Rosenberg, 2002 ; Rahman et al., 2002b ; Bordoloi et Konwar, 2009).

Nikolopoulou et Kalogerakis (2008), ont démontré que la biostimulation avec des engrais N/P et des biosurfactants permet une adaptation meilleure et plus rapide des micro-organismes naturels à la pollution par les hydrocarbures, assurant des périodes de latence relativement courtes et des taux de dégradation plus rapides. Selon les caractéristiques du site contaminé, combiner bioaugmentation, biostimulation et ajout de biosurfactants peut être une stratégie d'accélération prometteuse la bioremédiation (Baek et al., 2007).

Le principal avantage de la biostimulation est que la bioremédiation nécessite des micro-organismes indigènes déjà présents qui sont bien adaptés à l'environnement sous-sol, et sont bien répartis spatialement dans la sous-surface (Adams et al., 2014).

I.1.7.3. Bioatténuation

L'atténuation naturelle ou bioatténuation est la réduction des concentrations de polluants dans l'environnement par des processus biologiques (biodégradation aérobie et anaérobie, phénomènes physiques et réactions chimiques telles que l'échange d'ions). Dans de bonnes conditions, les micro-organismes peuvent provoquer ou favoriser des réactions chimiques qui modifient la forme des contaminants, entraînant peu ou pas de risque pour la santé. La décomposition naturelle se produit sur la plupart des sites pollués. Cependant, les bonnes conditions doivent exister sous terre pour décontaminer correctement ces sites. Sinon, la purification ne sera pas assez rapide ou complète (EPA, 1999).

Les scientifiques surveillent ces conditions pour s'assurer que la décomposition naturelle fonctionne. Cette étape s'appelle Monitored Natural Decay (MNA). Lorsque l'environnement est pollué par des produits chimiques, la nature peut prendre différentes manières de le nettoyer. De minuscules insectes ou micro-organismes qui vivent dans le sol et les eaux souterraines utilisent certains produits chimiques pour se nourrir. Lorsqu'ils digèrent complètement les produits chimiques, ils peuvent les transformer en eau et en gaz inoffensifs. Les produits chimiques colleront au sol et les maintiendront en place. Cela ne nettoiera pas les produits chimiques, mais les empêchera de contaminer les eaux souterraines et de s'infiltrer dans le site. Si la décomposition naturelle n'est pas assez rapide ou complète, la bioremédiation sera améliorée par la biostimulation ou la bioaugmentation (EPA, 2001).

I.1.8 Interaction entre les micro-organismes et les hydrocarbures dans le sol

Utilisation des hydrocarbures comme substrats pour lutter contre la croissance des micro-organismes qui les utilisent comme sources de carbone et chercheurs dans les domaines de l'énergie et de la microbiologie pétrolière (Matteï, 1995).

Il existe deux caractéristiques de base qui définissent les microorganismes oxydants des hydrocarbures:

Le premier est une oxygénase, qui est un groupe spécifique lié à la membrane, et le second *est* un mécanisme qui optimise le contact microbe à microbe. Les bactéries oxydantes

les hydrocarbures ont reçu une attention considérable dans l'environnement naturel en raison de la possibilité de traiter les déversements avec leur potentiel de biodégradation d'hydrocarbures. En raison de la grande quantité de pétrole brut et de ses dérivés transportés sur de longues distances et consommés en grande quantité, les hydrocarbures sont maintenant devenus une classe très importante de substrats pour l'oxydation microbienne (Chikere et al., 2011).

Le devenir biologique des hydrocarbures dans le sol peut être suivi des nombreux parcours, dans des conditions idéales, les hydrocarbures entièrement minéralisés en dioxyde de carbone et en eau, produisant une certaine biomasse, mais plus souvent une biodégradation incomplète (Bekenniche, 2021).

I.1.9. Biodégradation microbiologique des polluants hydrocarbonés

I.1.9.1. Biodégradation bactérienne

La capacité à métaboliser les hydrocarbures se manifeste dans de nombreux types de micro-organisme. Il existe une littérature abondante sur la dégradation microbienne des hydrocarbures, et il est maintenant admis qu'aucune espèce ne se dégrade pas seule. Totalement une classe complexe d'hydrocarbures, même si l'on croit généralement que les bactéries et les champignons sont les principaux détergents pour les hydrocarbures, les bactéries ils ont démontré qu'ils sont plus polyvalents que les champignons, il peut donc jouer un rôle plus important dans la biodégradation des hydrocarbures (Bekenniche, 2021).

Nous nous appuyons sur des publications prérequis, les bactéries les plus importantes dans le domaine de la biodégradation des hydrocarbures appartiennent au genre *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Collimonas*, *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Flavobacterium*, *Gordonia*, *Micrococcus*, *Mycobactérie*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Variovorax* et autres (Hamamura et al., 2006 ; Obayori et Salam, 2010).

Les bactéries ont un avantage dans la biodégradation des hydrocarbures sous la terre. Une partie de leurs performances réside dans la possession de plasmides dégradants et autres éléments génétiques mobiles, production de tensioactifs et la possession d'enzymes (Tableau 2) cataboliques spécifiques comme l'oxygénase et l'hydroxylas (Chikere et al., 2011).

Tableau II. Genres de bactéries qui utilisent les hydrocarbures comme seule source de carbone et d'énergie (Chikere et al., 2011).

Genre	Substrat	Gène / enzyme de dégradation
<i>Aeromonas</i>	Diesel	Alcane hydroxylase
<i>Bacillus</i>	Toluène, pétrole brut,	Alcane hydroxylase, gènes plasmidiques pour les dioxygénases
<i>Pseudomonas</i>	Gasoil, pétrole brut	Alcane hydroxylase, gènes plasmidiques pour les dioxygénases
<i>Serratia</i>	pétrole brut	Alcane hydroxylase
<i>Stenotrophomonas</i>	Pyrène	gènes plasmidiques pour les dioxygénases
<i>Enterobacter</i>	Alcane	Alcane hydroxylase
<i>Nocardia</i>	Alcane, pétrole brut	Alcane hydroxylases
<i>Acidecella</i>	Naphtalène	gènes plasmidiques pour les dioxygénases
<i>Acidovorax</i>	Phénanthrène	gènes plasmidiques pour les dioxygénases
<i>Agrobacterium</i>	Essence aromatiques	gènes plasmidiques pour les dioxygénases
<i>Micrococcus</i>	Héxadécane	Alcane hydroxylases
<i>Xanthobacter</i>	Dibenzothiophène	Gènes transmis par les plasmides pour les dioxygénases étroitement liées à NAH7
<i>Terrabacter</i>	Fluorène	gènes plasmidiques pour les dioxygénases
<i>Desulfobacterium</i>	Xylène	Benzyl succinate synthase chromosomique

I.1.9.2. Biodégradation fongique

Les champignons (levures et champignons filamenteuses) jouent un rôle important dans la dégradation du microbiote, car comme les bactéries, ils métabolisent la matière organique dissoute, ils sont les principaux organismes responsables de la dégradation du carbone dans la biosphère. Cependant, contrairement aux bactéries, les champignons peuvent se développer dans des solutions à faible humidité et à faible pH, ce qui les aide à décomposer la matière organique. Les champignons équipés de complexes multienzymatiques extracellulaires sont les plus efficaces, notamment pour dégrader les polymères naturels (Joutey et al., 2013).

a. Biodégradation par des levures

La levure est connue pour jouer un rôle important dans l'élimination des métaux toxiques. Il existe de nombreux rapports sur l'absorption des métaux lourds par la levure. Plusieurs études ont montré que la levure peut accumuler des métaux lourds comme Cu, Ni, Co, Cd et Mg, excellente alternative métallique contrairement à certaines bactéries (Wang et Chen, 2006).

b. Biodégradation par des champignons filamenteux

La plupart des champignons filamenteux ne peuvent pas se minéraliser tous les hydrocarbures aromatiques. Ils les transforment simplement en produits indirects à faible toxicité, chez les champignons filamenteux impliqués dans la biodégradation les hydrocarbures aliphatiques comprennent *Cladosporium* et *Aspergillus*, tandis que les champignons appartenant aux genres *Cunninghamella*, *Penicillium*, *Fusarium* et *Aspergillus* peuvent intervenir dans la décomposition des hydrocarbures aromatiques (Bekenniche, N., 2021).

Les champignons : *Amorphoteca*, *Neosartorya* et *Talaromyces* isolés d'un sol contaminé par du pétrole brut se sont avérés être un groupe potentiel de dégradation des hydrocarbures. Un groupe de champignon, à savoir *Aspergillus*, *Cephalosporium* et *Penicillium*, se sont également révélés être des décontaminants du pétrole brut (Steliga, 2012).

I.1.10. Voies métaboliques de la dégradation des hydrocarbures pétroliers

I.1.10.1. Biodégradation aérobie

Au cours des processus aérobies, de nombreuses bactéries ont développé des stratégies enzymatiques leur permettant d'incorporer un ou deux atomes d'oxygène dans les molécules cibles (Figure 04). Cette réaction d'oxydation rend les hydrocarbures plus hydrophiles et donc plus sensibles à la dégradation métabolique bactérienne en alcools primaires (alcanol), dans le cas des hydrocarbures aliphatiques, ou en phénols, dans le cas des molécules aromatiques. Chez certaines espèces, les époxydes (oxacycloalcanes) sont les premiers intermédiaires. La réaction suivante nécessite de l'énergie, qui est généralement générée par l'oxydation d'intermédiaires biologiques réduits tels que l'hydrure de nicotinamide adénine dinucléotide (NADH), qui est réoxydé par l'accepteur d'électrons. Pour la dégradation des alcanes, différents systèmes enzymatiques d'attaque primaire sont connus. Isolement et caractérisation

d'un système oméga-hydroxylase composé de trois protéines (rubredoxine réductase, rubredoxine et oméga-hydroxylase) à partir de *Pseudomonas* (Ensign, 2001).

Dans certaines espèces bactériennes ou fongiques, ainsi que dans les cellules de mammifères, il existe des enzymes qui dépendent du cytochrome P450 comme oxydase terminale. Les principaux intermédiaires de la dégradation des alcanes sont les acides gras, qui sont générés à partir des alcanols via les aldéhydes. Ces acides peuvent être décomposés davantage par la voie typique de dégradation des acides carboxyliques, dans laquelle les molécules sont progressivement raccourcies. Cependant, les acides gras peuvent également être excrétés par les cellules et s'accumuler dans l'environnement. Une fois libérés, ils ont un effet ambigu. D'une part, les acides gras peuvent agir comme source de carbone pour les bactéries de la communauté, favorisant ainsi la dégradation des hydrocarbures. D'autre part, les acides gras (longueur de chaîne 14 C) peuvent inhiber la croissance et le métabolisme des hydrocarbures car ils interfèrent avec les membranes cellulaires (Atlas et Bartha., 1973). Cela provoque un effet toxique et réduit la croissance.

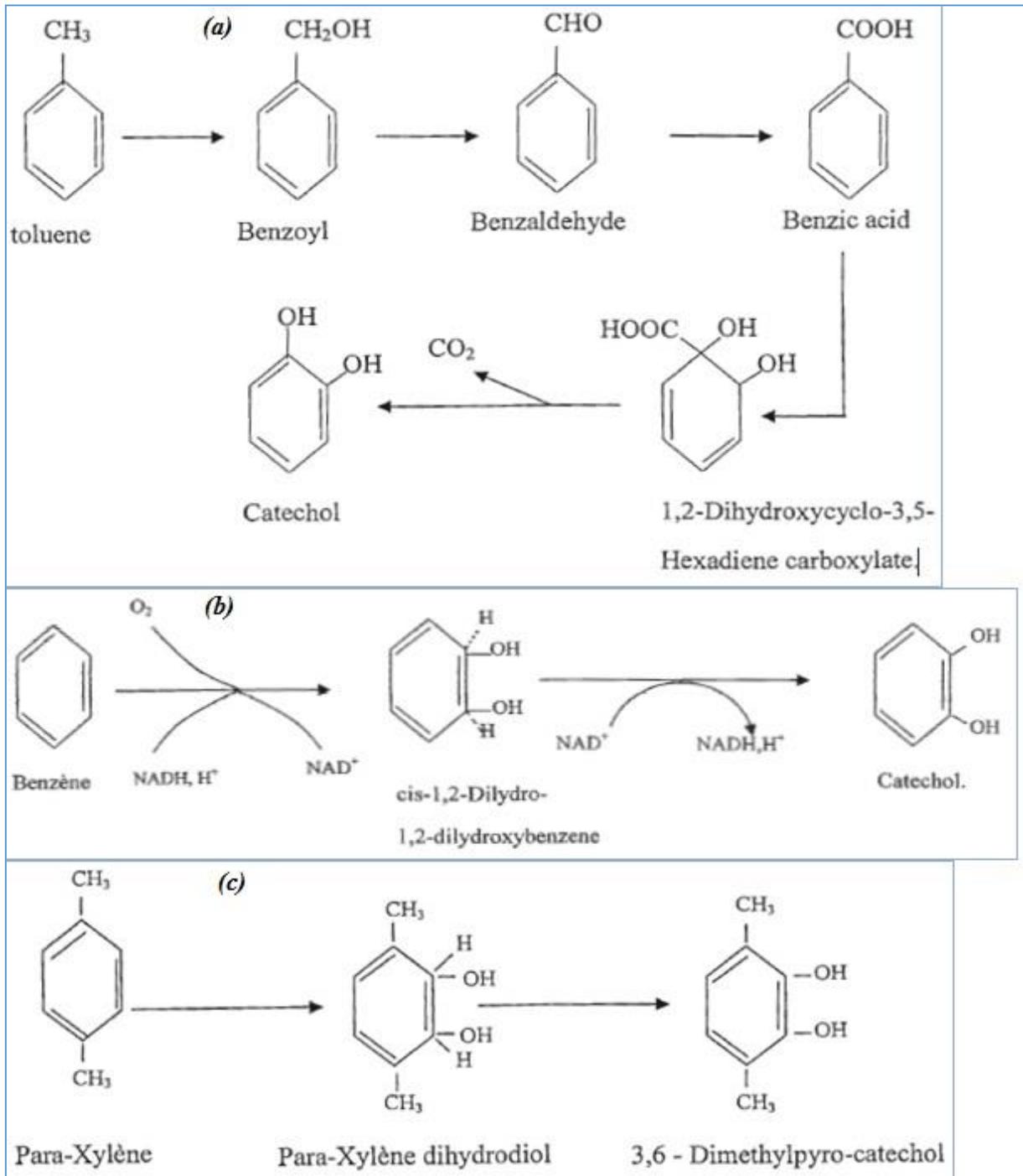


Figure 4. Voie aérobie de la dégradation des hydrocarbures pétroliers.

(a). Dégradation du toluène (Glazer et Nikaildo, 1998 ; Scragg, 2005), (b). Oxydation du benzène (Glazer et Nikaildo, 1998) et (c). Oxydation de para-Xylène par *P. putida* (Labrecque, 2003).

I.1.10.2. Minéralisation complète ou voie de dioxygénase

Les micro-organismes ont des capacités enzymatiques qui leur permettent d'oxyder des composés aromatiques et polyaromatiques, dont la taille peut varier du benzène au benzo(a)-pyrène (Cerniglia, 1984). Les hydrocarbures aromatiques sont attaqués par les dioxygénases dans le substrat pour former des dihydrodiols en configuration cis (Gibson et al, 1975). Le pyruvate est l'un des principaux intermédiaires de cette voie. Les principaux produits finaux de cette filière sont la biomasse et le dioxyde de carbone. L'inconvénient de cette voie est que seuls quatre systèmes cycliques sont minéralisés. Les systèmes avec plus de cycles semblent têtus (Maneerat et Kulnaree, 2007).

I.1.10.3. Biodégradation anaérobie

Les hydrocarbures sont maintenant reconnus comme une source conditionnelle de carbone et d'énergie permettant la croissance de microorganismes en conditions anaérobie. La dégradation des hydrocarbures par les microorganismes dans des conditions aérobies est bien connue depuis plus d'un siècle, alors que l'utilisation de ces composés dans des environnements anoxiques (sédiments profonds et réservoirs de pétrole) n'a été étudiée que durant la dernière décennie. En effet, il est largement admis que pour les bactéries dégradant les hydrocarbures en aérobiose, la présence d'oxygène moléculaire est exigée pour l'activation enzymatique initiale des hydrocarbures (Britton, 1984; Gibson et Subramanian, 1984). Cette activation se traduit par l'introduction d'un ou plusieurs groupements hydroxyles dans la molécule apolaire.

L'absence de l'oxygène moléculaire dans les environnements anoxiques implique une nouvelle stratégie d'activation enzymatique spécifique pour convertir les hydrocarbures apolaires en des composés contenant un groupement polaire (Heider et al, 1999) (hydroxyle, carbonyle ou carboxyle) dans les composés organiques est indispensable pour toute réaction d'oxydation ultérieure (Spormann et Widdel, 2000; Widdel et Rabus, 2001).

Plusieurs exemples sont décrits dans la littérature, tels que des hydrocarbures aliphatiques, des monoaromatiques comme le toluène (Elshahed, et McInerney, 2001), des alkylbenzènes la sous famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques comprenant le m-, o- et le p-xylène et les triméthylbenzènes (Häner et al, 1997; Phelps et Young, 1999), le benzène (Burland et Edwards, 1999; Rooney-Varga et al, 1999).

Le naphthalène et le phénanthrène (Zhang et Young, 1997; Meckenstock et al, 2000), le méthyl-naphthalène et la tétraline (Annweiler et al, 2000; Annweiler et al, 2002), les alcanes

ramifiés (Bregnard et al, 1997) et les mélanges d'hydrocarbures (Grishchenkov et al, 2000) peuvent être métabolisés dans des conditions anaérobies. Ces réactions peuvent avoir lieu sous des conditions réductrices du Fe (III), de dénitrification et de réduction des sulfates, par des bactéries photosynthétiques anoxygéniques ou dans des consortiums syntrophiques de bactéries réductrices de protons et méthanogènes (Van Hamme et al, 2003).

Parmi les autres accepteurs terminaux d'électrons qui sont utilisés pendant le métabolisme des hydrocarbures anaérobies, citons les oxydes de manganèse (Langenhoff et al, 1997), les acides humiques du sol (Cervantes et al, 2001), et le fumarate dans un processus d'oxydation fermentative (Meckenstock, 1999). La dégradation anaérobie de toluène (Figure 05) est la plus étudiée, cette dégradation est rapportée dans des conditions dénitrifiantes, ferro-réductrices, sulfate-réductrices et méthanogènes (Van Hamme et al, 2003).

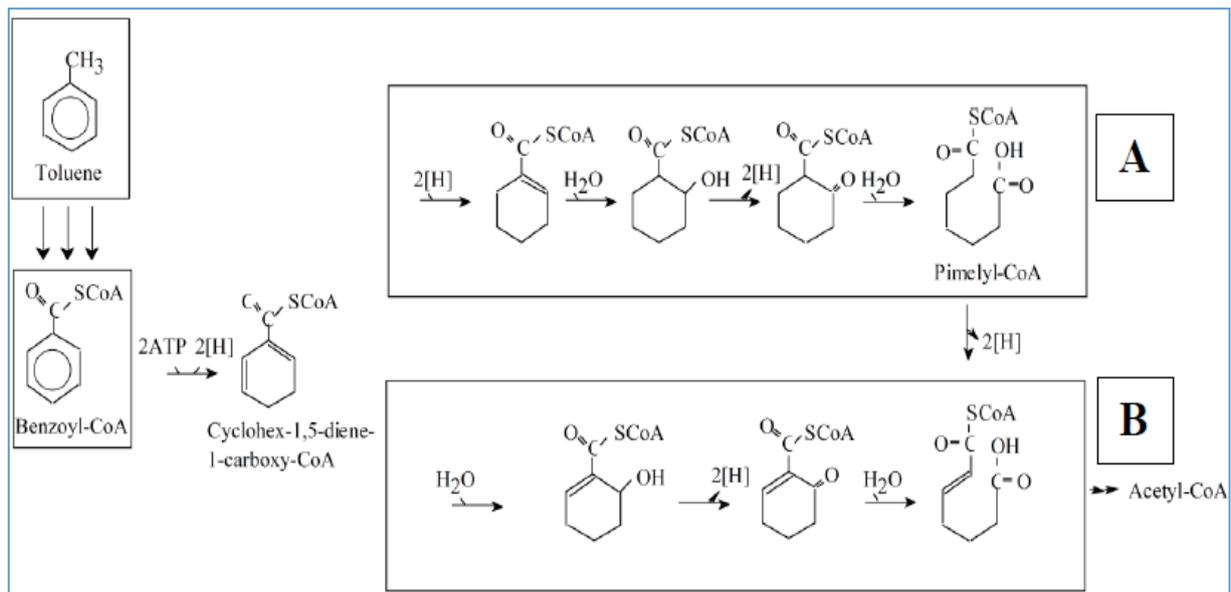


Figure 5. Dégradation anaérobie de Toluène (Egland et al, 1997; Breese et al, 1998).

Après la conversion du benzoyl-CoA en cyclohex-1,5-diène-1-carboxy-CoA, ce produit est traité différemment avec deux bactéries différentes, *R. palustris* (A) et *Thauera aromatica* (B).

I.1.10.4. Cométabolisme

Les hydrocarbures peuvent être biodégradés directement en tant que source de carbone ou indirectement par cométabolisme. Le cométabolisme est un processus par lequel des micro-organismes dégradent accidentellement des polluants à l'aide d'enzymes ou de

cofacteurs lors du métabolisme de substrats de croissance ou d'autres composés assimilables qui ne sont pas des sources d'énergie et de nutriments (Dalton et Stirling, 1982; Hazen, 2010).

Les microorganismes nécessitent la source principale de substrats, tandis que les contaminants sont considérés comme des substrats secondaires. Par conséquent, les produits de dégradation associés au cométabolisme ne stimulent pas la croissance bactérienne dans la population concernée. Dans le cas des communautés microbiennes, il peut y avoir une forme de symbiose dans laquelle la première espèce dégrade le substrat. Comme les métabolites produits ne sont pas utilisés par les bactéries, cette source d'énergie peut être utilisée par une seconde espèce comme les champignons (Bouchez et al, 1999).

Les HAP de bas poids moléculaire peuvent être complètement biodégradés, en revanche les HAP de haut poids moléculaire, c'est-à-dire avec plus de cycles, ne peuvent pas être directement dégradés. Leur biodégradation nécessite l'intervention de nombreux microorganismes (Chen et Aitken, 1999) ainsi que la présence d'une source de carbone supplémentaire : cette dégradation se ferait par cométabolisme (Heitkamp et al, 1988).

Chapitre II



II. Récupération assistée du pétrole par les microorganismes

II.1. Formation d'un gisement pétrolier

Le pétrole est le résultat de plusieurs transformations naturelles de matières organiques fossiles (plancton, animaux et plantes) déposées dans le milieu aquatique marin ou lacustre, puis mélangées à des sédiments (argile, sable, sel.....etc.) pour former des couches qui s'enfoncent naturellement. Une fois cette matière organique confinée dans des sédiments imperméables (roches à grains fins comme l'argile, le calcaire, ...etc.), s'y développent des conditions anaérobies qui favorisent l'activité catabolique des bactéries anaérobies, entraînant la formation de composés de haut poids moléculaire appelés kérogène (Corre, 2000).

Ces molécules subissent alors une série de transitions appelées diagenèse, au cours desquelles des hétéroatomes sont éliminés sous forme de dioxyde de carbone, d'eau et d'azote (Morejon, 2017). La production de ce mélange, non assimilable par les micro-organismes et insoluble dans les solvants organiques usuels, se fait en couches peu profondes, sous conditions de température et de pression basses (Température inférieure à 60 °C) (Eddouaouda, 2012).

Ces gisements riches en kérogène forment le socle rocheux. Comme ce dernier est enfoui plus profondément, la pression et la température augmentent (Boussad, 2016), à ce stade le kérogène subit un craquage thermique à 60 à 120°C. Ce processus correspond à la dégénérescence (Eddouaouda, 2012), un phénomène qui se produit à des intervalles de profondeur entre 2000 et 3000 mètres (appelé la fenêtre à pétrole), qui produit, en plus de l'eau, des molécules d'hydrocarbures liquides ainsi que d'autres mélanges appelés pétrole. Au-dessus de 3800m, le kérogène est converti en hydrocarbures gazeux, on dit donc tableau arrière (Ollivier et al., 2014).

Le pétrole piégé dans la roche mère finit par la quitter, migrant lentement vers le haut, profitant des microcavités et des fractures du sous-sol. Parfois, il remonte à la surface et suinte et forme une mare d'huile ou se solidifie en bitume. Dans d'autres cas, il s'accumule dans des interstices et des fractures microscopiques dans des roches poreuses et perméables appelées roches réservoirs, et si ces dernières sont recouvertes de barrières rocheuses imperméables appelées morts-terrains, la migration sera empêchée (Boussad, 2016 ; Corre, 2000).

De plus, accumuler des quantités suffisantes de pétrole nécessite la présence de géométries fermées provoquées par de multiples déformations rocheuses, appelées pièges, qui sont soit de type stratigraphique, soit structural. Enfin, si le piège n'évolue pas dans le temps,

il forme un réservoir où le pétrole est conservé jusqu'au jour où il pourra être récupéré (Malo et al., 2015). Les pièges peuvent contenir à la fois du pétrole et du gaz, auquel cas ils sont disposés en fonction de leurs densités. La figure 06 représente un système pétrolier.

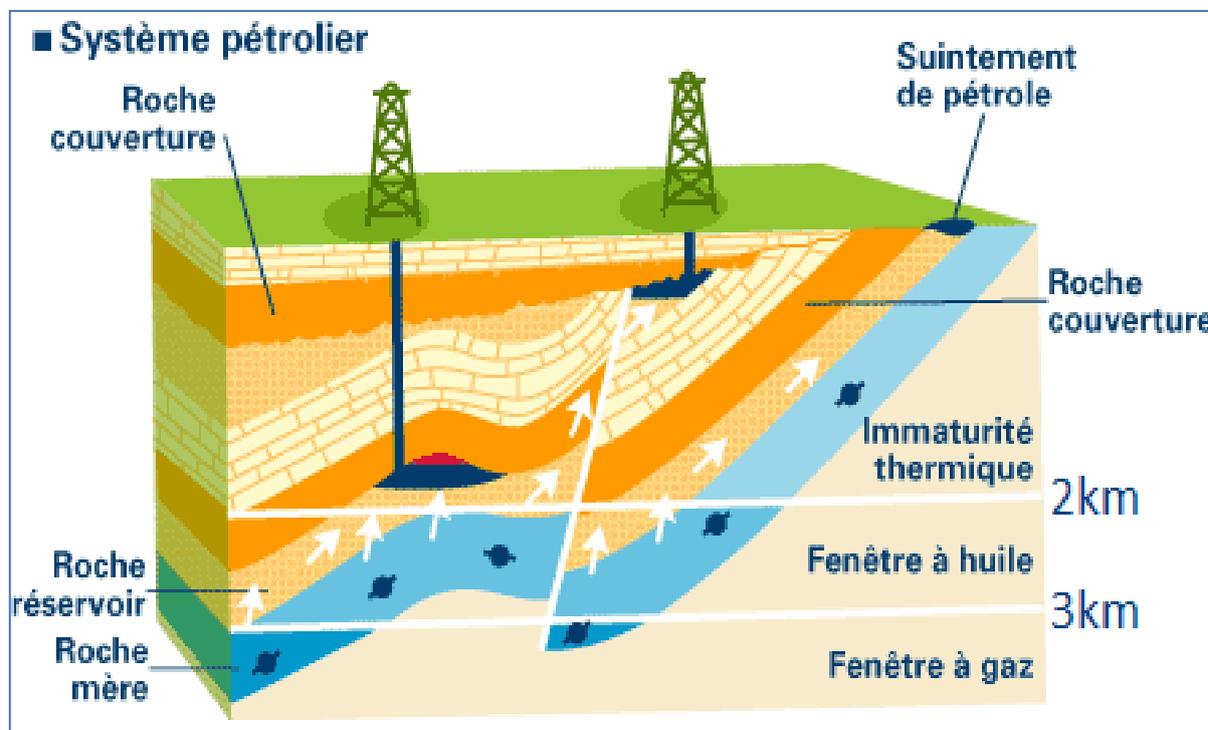


Figure 6. Coupe représentatif d'un système pétrolier classique (Chadouli, 2013).

II.1.1. Composition chimiques du pétrole

En donnant une idée de la répartition des hydrocarbures (principalement des composés pétroliers) dans différents compartiments, la compréhension des propriétés physico-chimiques du pétrole est importante, voire indispensable, pour en déduire son devenir et son comportement lors d'un déversement, et il est également possible de prédire la qualité de l'huile et sa classification. Les propriétés physico-chimiques du pétrole ou des produits pétroliers sont liées à plusieurs paramètres, qui varient selon les zones de production et peuvent même varier d'un gisement à l'autre. Ils dépendent aussi des proportions relatives des ingrédients qui les composent (Dupuis et Ucan-Marin, 2015). Les propriétés les plus fréquemment mentionnées sont : la densité, la viscosité, le point d'éclair, la teneur en soufre, le point d'ébullition et la volatilité. Le tableau ci-dessous représente certaines des propriétés de différents pétroles bruts.

Tableau III. Caractéristiques physico-chimiques de certains pétroles bruts d'origines diverses (Boukherissa, 2008; Guibet, 1997).

Nom du Pétrole ou sa provenance	Densité g/cm ³	Teneur en Soufre (%)	Viscosité mm ² /s	Point D'écoulement (°C)
Algérie	0.8159	0.1105	2.78 à 37.8	<-45
Sud- américain	0.8976	0.9907	Très visqueux	-21
Arabian light (Arabie Saoudite)	0.858	1.79	10 à 21	-35
Zakum (AbuDhabi)	0.822	1.05	4.3 à 20	-21
Koweït (Koweït)	0.869	2.52	10 à 38	-15

a. Densité

La densité du pétrole dépend de la densité de ses constituants et elle détermine la flottabilité du pétrole. Presque tous les hydrocarbures liquides sont plus légers que l'eau. American Petroleum Institute (API) est une unité de mesure utilisée dans le système anglo-saxon pour mesurer la densité des liquides, en particulier des pétroles bruts, on dit couramment des pétroles bruts lourds en dessous de 20° API, en moyenne à 20 à 30° API et lumière au-delà, mais ces limites varient selon les pays (Le Jury, 2016). Le pétrole brut est considéré comme "Léger" lorsque la densité est faible, "Lourd" lorsque la densité est élevée.

b. Viscosité

La viscosité mesure la résistance à l'écoulement d'un liquide, et donc son taux de dispersion dans l'environnement marin. Son unité de mesure est le centistoke (Cst). Elle diminue lorsque la température augmente, elle est augmentée par l'évaporation des composés volatils, l'oxydation photochimique et surtout la formation d'émulsions inverses qui altèrent le comportement initial du produit (Le Jury, 2016).

c. Point d'éclair

Le point d'éclair, ou en d'autres termes, le point d'inflammabilité, est un concept pétrolier qui correspond à la température la plus basse à laquelle un produit libère suffisamment de vapeur pour exploser à l'air libre, mais pas assez pour permettre une combustion auto-entretenu. Ce paramètre nous indique la volatilité de l'huile (Fingas, 2013).

d. Solubilité

Elle donne une idée de la capacité des molécules organiques à se dissoudre dans l'eau. Son ordre de grandeur est : $\mu\text{g/l}$ (faible solubilité) ; mg/litre (moyenne solubilité) ; g/l (forte solubilité). En général, la solubilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) est très faible, entre 30 mg/l Composés légers et $10 - 4 \text{ mg/l}$ de composés plus lourds (Wauquier, 1998 ; Le Jury, 2016).

La biodégradabilité des pétroles bruts dépend fortement de leur composition à une température donnée, une huile légère est plus biodégradable qu'une huile plus lourde, plus l'huile est raffinée, plus la dégradation est rapide (Sauret, 2011).

e. Teneur en soufre

Le soufre est l'élément le plus abondant après le carbone et l'hydrogène et joue un rôle important dans la densité et la viscosité du fluide. Il existe sous forme élémentaire S, sulfure d'hydrogène H_2S ou sous forme thiol ou thiol (Boukherissa, 2008).

II.2. Récupération assistée du pétrole (EOR, Enhanced Oil Recovery)

L'extraction de pétrole est le processus par lequel le pétrole utilisable est extrait et retiré du sous-sol. Le pétrole est récupéré (extrait) à l'aide de diverses méthodes qui dépendent principalement de facteurs géologiques. Ces méthodes (Figure 07) soient conventionnelles (primaire et secondaire). Soit non conventionnelles (thermiques, chimiques, microbiennes).

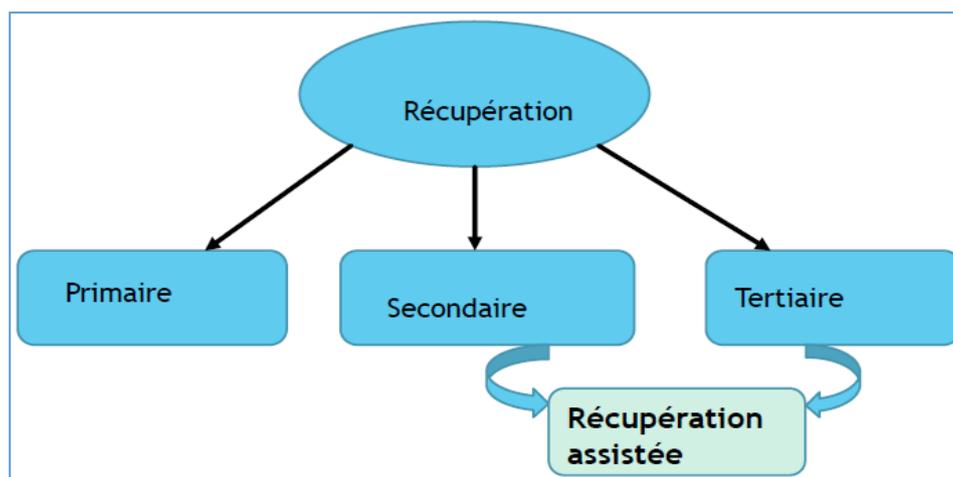


Figure 7. Différentes méthodes utilisées dans la récupération

Les méthodes primaires qui consistent l'exploitation et utilisation de la pression naturelle (récupération passive), mais le brut récupéré à travers de cette méthode n'est pas beaucoup plus que 30% (Tisseyre, 2014), et les méthodes secondaires englobent l'injection

des fluides à l'aide d'un puit d'injection (consiste l'injection gaz et l'injection d'eaux (water flooding) (eau de surface, eau de mer et eau des saumures souterrains), pour le but d'augmenter la pression dans le réservoir et sont écoulement vers les puits de production (Nazina et Borzenkov, 2004).

Ces méthodes sont plus coûteuses par rapport les méthodes primaires mais elles offrent un rendement supplémentaire d'environ 10 à 15% (Juarez Morejon, 2017). Tôt ou tard, la récupération secondaire devient inefficace. En effet, en raison de certaines conditions, une grande quantité de pétrole reste piégé dans le réservoir, ce pétrole est appelé pétrole résiduelle. Dans ce cas, il convient donc de stimuler la production, car jusqu'à 60% reste non récupéré, ce qui pousse les personnels du domaine à la mise au point des voies plus complexes de récupération non conventionnelle, il s'agit de la récupération tertiaire (EOR) (Youssef et al., 2009).

II.2.1. Récupération tertiaire (EOR)

La récupération tertiaire, connue sous le nom de Récupération Assistée du Pétrole (RAP) en anglais, Enhanced Oil Recovery (EOR). Cette méthode implique l'utilisation des systèmes thermiques, chimiques ou microbiens, dans le but d'améliorer la mobilité des huiles résiduelles dans les réservoirs matures en changeant les propriétés physico-chimiques du pétrole et du réservoir. En outre, les distinctives physico-chimiques du pétrole brut dans le réservoir détermineraient quelle méthode EOR sera utilisée (Nikolova et Gutierrez, 2004).

II.2.1.1. Récupération assistée du pétrole par les méthodes thermiques

L'EOR thermique est un processus qui permet de fournir de la chaleur au réservoir et vaporiser une partie de l'huile. Cette méthode est adaptée pour les huiles lourdes et les sables bitumineux. Parmi les méthodes thermiques utilisées, les suivantes: combustion in situ, drainage par gravité assisté par vapeur (SAGD), inondation de vapeur, stimulation cyclique de vapeur (CSS) (Thomas, 2008).

II.2.1.2 Récupération assistée du pétrole par les méthodes chimiques

L'EOR chimique est une méthode mieux adaptée aux pétroles légers. Dans une inondation chimique, des produits chimiques sont injectés avec le flux d'eau pour améliorer l'efficacité de déplacement. Les principaux processus d'inondation chimiques sont:

a. Inondation de polymère

Elle consiste à injecter une solution visqueuse de polyacrylamide ou de polysaccharide, ils sont introduits sous forme de limace discrète dans les cours d'eau. Cette méthode est couramment utilisée dans l'industrie pétrolière (Demirbas et al., 2015).

b. Inondation des surfactants

Les surfactants sont largement utilisés dans divers pays du monde, les plus souvent utilisés sont les tensioactifs commerciaux et les sulfonates d'huile synthétisés chimiquement (Thomas, 2008).

c. Inondation alcaline

Dans l'inondation alcaline, des solutions aqueuses, alcalines chimiques, comme l'hydroxyde, le carbonate ou l'orthosilicate de sodium sont injectées sous forme de limace. Ces dernières réagissent avec les composants acides du pétrole brut et produisent des tensioactifs in situ. Parfois des émulsifiants peuvent aussi avoir lieu (Mayer et al., 1983).

d. Inondation micellaire

L'inondation micellaire a eu plus de succès dans le terrain que d'autres processus d'inondation chimique. Les principaux composants de cette méthode sont une limace de microémulsion et une limace polymère (Gogarti et al., 1968).

e. ASP (Alcali-Surfactant-Polymère)

L'inondation alcaline-surfactant-polymère est nouvellement testée aux niveaux des laboratoires ainsi que sur terrain (Shutang et al., 1996).

L'impact de l'EOR sur la production de pétrole peut être significatif et efficace. Cependant, d'un point de vue économique, ces méthodes sont marginales en raison de leur coût élevé. D'autre part, ils sont nocifs pour l'environnement.

II.3. Récupération assistée du pétrole par procédé microbien (MEOR : Microbial Enhanced Oil Recovery)

II.3.1. Définition et historique de la MEOR

La MEOR est un processus biologique qui exploite les capacités métaboliques de certains microorganismes pour déplacer le pétrole brut dans les pores des roches des réservoirs matures (Yen, 1990 ; Lazar et al., 2007 ; Zhang et Xiang, 2010). Ce processus peut

être utilisée avec des coûts d'exploitation très faibles et peut produire jusqu'à 50% et les plus important sont pas néfastes à l'environnement (Lazar et al., 2007 ; Sen, 2008).

L'historique de la MEOR est démarré pour la première fois par la proposition du chimiste américain Arnold Orville Beckman, et en 1947 la géologie Zobell commence à étudier le rôle des microorganismes sous la surface de sol pour libérer les hydrocarbures (pétrole et gaz) de roche. Il a identifié des bactéries naturel capable le dégrader le pétrole et faire couler plus facilement (Ritter, 2015).

Les entreprises pétrolier (BPC British petroleum company) Shell (société multinational) et Stat Oil (société européenne pétrole) appelé (Equinor) investissent de plus en plus dans la mise au point d'approche faisant appeler aux microorganismes. Si elle gagnant leur pari, leur cout d'exploitation qui est moins dès que si elles d'utilisent d'autre d'approches de (MEOR) (Lazar et al., 2007), Toutes ces recherches montrent que certaines bactéries peuvent se développée dans condition de réservoir en présence de la culture et produire des métabolites cellulaires peuvent déplacer le pétrole emprisonné dans les pores de la roche de réservoir qui permettre ainsi la récupération de pétrole (Updegraff, 1957)

Le premier essai de la MEOR sur terrain est réalisé en lieux dans (ARKANSAS) en 1954. En outre, les recherches dans le domaine de la MEOR ont connu un essor à partir de la crise pétrolière de 1970 (Bryant et Burchfield, 1989 ; Lazar, 1991 ; Brown, 1992 ; Ivanov et al., 1993 ; Hitzman et Sperl, 1994 ; McInerney et Sublette, 1997 ; Bryant et Lockhart, 2002 ; Li et al., 2002 ; Maudgalya et al., 2005 ; Lazar et al., 2007).

II.3.2. Approches de la MEOR

La MEOR comprend la récupération tertiaire du pétrole, où des micro-organismes ou leurs métabolites sont utilisés pour récupérer le pétrole résiduel. Les microbes produisent des polymères et des biosurfactants, qui abaissent la tension superficielle entre le pétrole et la roche en réduisant les forces capillaires qui empêchent le mouvement du pétrole à travers les pores de la roche. Les biosurfactants contribuent également à l'émulsifiassions et à la décomposition des films d'huile dans les roches (Khaklfallahet et al., 2021).

MEOR implique différentes stratégies, telles que l'injection de micro-organismes producteurs de biosurfactants dans le réservoir et la diffusion in situ, l'injection de nutriments dans le réservoir pour stimuler la croissance de micro-organismes sauvages producteurs de biosurfactants, ou la production d'organismes supplémentaires dans des réservoirs surfactant.

Le biosurfactants est produit dans un réacteur puis injecté dans un réservoir. Ces processus améliorent la récupération de pétrole à partir de réservoirs épuisés, prolongeant ainsi la durée de vie du réservoir. La récupération assistée par des microbes est moins chère que la récupération assistée par des produits chimiques car les micro-organismes produisent des produits efficaces à partir de substrats ou de matières premières peu coûteux (Rita de Cássia et al., 2014).

II.3.2.1. Injection de bactéries exogènes avec des nutriments

Cette stratégie consiste àensemencer le réservoir avec des souches bactériennes en présence d'une solution nutritive à travers des puits d'injection. Les bactéries doivent utiliser les nutriments injectés pour se multiplier dans le réservoir et produire des métabolites d'intérêt ainsi que de la biomasse. Par définition, la physiologie de ces microorganismes doit être adaptée aux conditions physico-chimiques du sous-sol et à la présence de populations indigènes très compétitives lors de son établissement (Youssef et al., 2009 ; Gao et al., 2016b). Ainsi, cette approche peut stimuler spécifiquement la croissance et le développement de bactéries utiles dans le réservoir (Youssef et al., 2007b ; Volk et Hendry, 2010).

Cependant, l'impact de cette stratégie sur la production pétrolière a été de courte durée. De plus, l'augmentation de la production d'huile par injection de bactéries exogènes persiste rarement au-delà de 30 jours (Deng et al., 1999). Dans d'autres réservoirs, des expériences de traceurs dans deux champs différents ont indiqué que le temps de transport des bactéries de l'injection aux puits de production était de 2 à 7 mois (Vadie et al., 1996 ; Moor et al., 2001). En supposant que les microbes sont encore vivants, il semble peu probable que les bactéries injectées soient encore fonctionnelles après ce temps, après cette distance. Enfin, les nutriments contenus dans les solutions de co-injection, tels que les phosphates et les nitrates, ont tendance à se séparer des microbes co-injectés de la taille d'un micron (1 à 10 µm). Ainsi, lorsque des nutriments sont injectés dans un réservoir à porosité réduite, ces nutriments diffusent plus rapidement, activant les micro-organismes natifs déjà présents dans le réservoir (Volk et Hendry, 2010).

II.3.2.2. Stimulation des microorganismes indigènes

Une autre approche utilisée dans MEOR est l'infusion de nutriments seuls pour stimuler la croissance et/ou l'activité métabolique des bactéries natives dans le réservoir (Youssef et al., 2009). Cette approche semble la plus prometteuse pour toute une stratégie à l'échelle du

gisement, car elle implique des microbes déjà présents dans le réservoir (Bao et al., 2009 ; Gudiña et al., 2012 ; Patel et al., 2015 ; Gaytan et al., 2015).

Typiquement, une population bactérienne donnée est stimulée en ajoutant des nutriments qui favorisent la croissance de la population cible. Dans le cas du MEOR, les nutriments utilisés se répartissent en deux grandes catégories : les sources de carbone et les accepteurs terminaux d'électrons. L'une des stratégies couramment utilisées pour stimuler la croissance microbienne est l'injection de nitrate. Le nitrate est un accepteur terminal d'électrons pour les micro-organismes qui dégradent les hydrocarbures anaérobies (Kuyukina et al., 2005).

De plus, il a été démontré que les nitrates améliorent la production de biosurfactants chez *Alcaligenes*. MS-103 isolé de réservoirs de carburant en Iran (Salehizadeh et Mohammadizad, 2009).

Les nitrates inhibent également l'activité des bactéries sulfato-réductrices (BSR), qui produisent des sulfures qui provoquent la corrosion des conduites (Grassia et al., 1996 ; Nunoura et al., 2006 ; Gieg et al., 2008 ; Zhang et Xiang, 2010). En effet, l'injection de nitrate stimule les bactéries réductrices de nitrate (BRN), qui concurrencent les BSR pour les donneurs d'électrons. Étant donné que la réduction des nitrates est énergétiquement plus favorable que la réduction des sulfates, le BRN devrait être plus performant que le BSR (Youssef et al., 2009). Cela a été démontré dans des champs au Canada, en Chine et aux États-Unis (Gieg et al., 2008). L'injection de nitrate peut stimuler sélectivement les micro-organismes d'intérêt et inhiber les agents réducteurs de sulfate dans le réservoir de Shengli (Chine) (Bao et al., 2009).

II.3.3. Mécanismes de la MEOR

Les mécanismes qui facilitent la récupération de l'huile sont complexes et peuvent impliquer plusieurs processus biochimiques. Ils peuvent se répartir en deux grandes catégories : ceux modifiant les propriétés des interfaces eau-pétrole-roche et ceux modifiant l'écoulement des fluides (eau et pétrole) au sein de la roche réservoir.

II.3.3.1. Modification du comportement du flux

Dans les réservoirs pétroliers, les microorganismes (communautés natives et exogènes) utilisent des sources de carbone telles que le pétrole et produisent de la biomasse ainsi que plusieurs métabolites (d'autres métabolites produits ex situ sont parfois rencontrés). Ce

phénomène donne lieu à plusieurs interactions à long terme qui conduisent à des changements dans les propriétés du pétrole, permettant la transformation du pétrole non récupérable en pétrole mobile qui peut s'écouler dans les puits de production et ainsi atteindre une production accrue (Boussad, 2016). Les principaux mécanismes qui modifient l'écoulement de flux sont:

a. Production des biopolymères

Dans la nature, l'huile et l'eau piégées ont des viscosités différentes (eau à faible viscosité et huile à haute viscosité). C'est l'un des facteurs qui rend les deux fluides non miscibles et retient l'huile dans les microcapillaires de la roche réservoir. D'autre part, la récupération du pétrole est due à une faible viscosité du pétrole ou à une viscosité élevée de l'eau (Springham, 1984).

La viscosité est un facteur physico-chimique très puissant qui affecte grandement la récupération du pétrole. Il est lui-même contrôlé par diverses activités métaboliques, dont les biopolymères les plus puissants. Les biopolymères, généralement dérivés de bactéries, jouent un rôle majeur dans l'augmentation de la viscosité de l'eau, facilitant ainsi l'écoulement du pétrole vers les puits de production (Springham, 1984).

b. Métabolisme in situ des hydrocarbures

Le mécanisme de dégradation microbienne, de biocraquage ou de traitement de la paraffine de l'huile est un terme différent pour la conversion des hydrocarbures à longue chaîne en hydrocarbures à chaîne courte par certains micro-organismes. Ceci favorise une diminution de la viscosité (Lazar et al., 1999 ; Maure et al., 2005).

En revanche, cette méthode a été utilisée pour traiter les dépôts de paraffine dans les puits et sur les équipements de production. En effet, des études ont montré une diminution de la saturation en huile résiduelle dans les carottes de grès (Nazina et al., 1995).

Typiquement, la stimulation *in situ* du métabolisme des hydrocarbures est réalisée par la dégradation anaérobie est également possible en injectant de l'oxygène et des nutriments inorganiques. Cependant, cela semble être un processus très lent et unimaginable (Spormann et Widdel, 2001).

II.3.3.2. Modification de l'écoulement des fluides (eau et pétrole) au sein de la roche réservoir.

La conversion du pétrole brut en méthane et CO₂ est un processus biologique naturel. Ces gaz sont principalement produits par les microorganismes natives ou exogènes lors de l'activité microbienne, ils peuvent augmenter la production du pétrole (Van Hamme et al., 2003).

En effet, le méthane est produit par la transformation de certains métabolites issus de la dégradation aérobie des hydrocarbures dans les zones peu profondes du réservoir. De plus, l'azote est principalement produit par des bactéries réductrices de nitrate, qui peuvent réduire le nitrate en NO₂ ou N₂. Le nitrate peut inhiber la production de méthane (Siegert, 2010).

D'autre part, il est important de souligner que la production de dioxyde de carbone par les bactéries aérobies est fortement limitée par la faible solubilité de l'oxygène dans l'eau, et la grande quantité de méthane produite par la dégradation anaérobie du pétrole brut sera limitée. Le méthane est plus soluble dans le pétrole, surtout à haute pression (Bryant et Lockhart, 2002).

Deux différentes méthodes d'action des gaz ont été envisagées:

a. Altération de la viscosité

Il est bien connu que la production de biogaz entraîne une diminution de la viscosité de l'huile, ce qui facilite le remplacement de l'huile. Une augmentation de la viscosité de l'eau ou une diminution de la viscosité de l'huile peut améliorer le mouvement de l'huile dans le réservoir. Les métabolites microbiens qui augmentent la viscosité de l'eau sont des polymères. D'autre part, les solvants organiques, les acides organiques ou les gaz peuvent réduire la viscosité de l'huile (Arroua, 2016).

b. Gonflement des huiles

Le gonflement de l'huile est un autre processus qui implique l'utilisation de gaz microbiens. Dans ce cas, le gaz peut entraîner un gonflement de l'huile. En effet, l'augmentation du pétrole est suffisamment importante pour réduire sa densité et augmenter son volume, de sorte qu'il s'écoule plus facilement et se draine de plus en plus (Gray et al., 2008).

Le rôle du CO₂ dans ce processus n'est pas important en raison de sa grande solubilité dans l'eau. Pour certains, cette stratégie est prometteuse pour réduire la tension interfaciale. Pour d'autres, cette stratégie est problématique et présente plusieurs inconvénients (Boussad, 2016).

II.4. Produits bactériens utiles dans la récupération assistée du pétrole

Les microorganismes sont un choix d'étude par les microbiologistes pétroliers en raison de leur capacité de générer un certain nombre de produits notamment les acides, les solvants, les gaz, les biosurfactants, les biopolymères et les émulsifiants, ces derniers sont avérés potentiellement utiles pour une meilleure récupération de pétrole (Zobell, 1947).

Des Produits microbiens et leurs rôles dans la récupération assistée du pétrole (MEOR) sont présentés dans le tableau 4.

II.4.1. Biosurfactants

Les biosurfactants sont des agents tensioactifs produits par plusieurs microorganismes, majoritairement des aérobies, mais quelques cas de production dans des conditions anaérobies ont été rapportés (Brown et al., 1986). Ce sont des composés amphiphiles capables de s'accumuler à l'interface entre deux phases non miscibles, telles que l'eau et l'huile, tout en réduisant la tension superficielle, une propriété qui en fait de bons candidats pour MEOR en tant que biosurfactants (Youssef et al., 2004).

En effet, ces molécules font l'objet d'une grande attention de la part des scientifiques depuis de nombreuses années, d'autant plus que ces dernières ont les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais avec des avantages supplémentaires, notamment qu'elles sont biodégradables, non toxiques, efficaces, peuvent même être synthétisés et sous-produits des déchets (Eddouaouda, 2012).

Tableau IV. Produits microbiens et leurs rôles dans la récupération assistée du pétrole (MEOR) (Lazar et al., 2007).

Produits microbiens	Microorganismes	Application dans la MEOR
Gaz (H₂, N₂, CO₂, CH₄)	<i>Clostridium spp.</i> <i>Enterobacter spp.</i> <i>Methanobacterium spp.</i>	Réduction de la viscosité de l'huile Gonflement de l'huile Augmentation de la pression du réservoir
Acides (formate, acétate, H₂Spropionate, butyrate, H₂CO₃, acides gras...)	<i>Clostridium spp.</i> <i>Enterobacter spp.</i>	Augmentation de la perméabilité par la dissolution des carbonates
Solvants (acétone, éthanol, butanol, 2-propanol)	<i>Clostridium spp.</i> <i>Zymomonas spp.</i>	Réduction de la viscosité de l'huile Diminution de l'IFT. Action des co-surfactant. Altération de la mouillabilité
Biosurfactants	<i>Acinetobacter spp.</i> <i>Bacillus spp.</i> <i>Arthrobacter spp.</i> <i>Clostridium spp.</i> <i>Rhodococcus spp.</i> <i>Pseudomonas spp.</i>	Diminution de l'IFT entre l'huile et l'eau. Emulsification. Altération de la mouillabilité.
Biopolymères	<i>Bacillus spp.</i> <i>Leuconostoc spp.</i> <i>Brevibacterium spp.</i> <i>Xanthomonas spp.</i>	Amélioration de l'efficacité du balayage par le colmatage sélectif des zones à hautes perméabilités. Augmentation de la viscosité de l'eau Contrôle la mobilité de l'eau

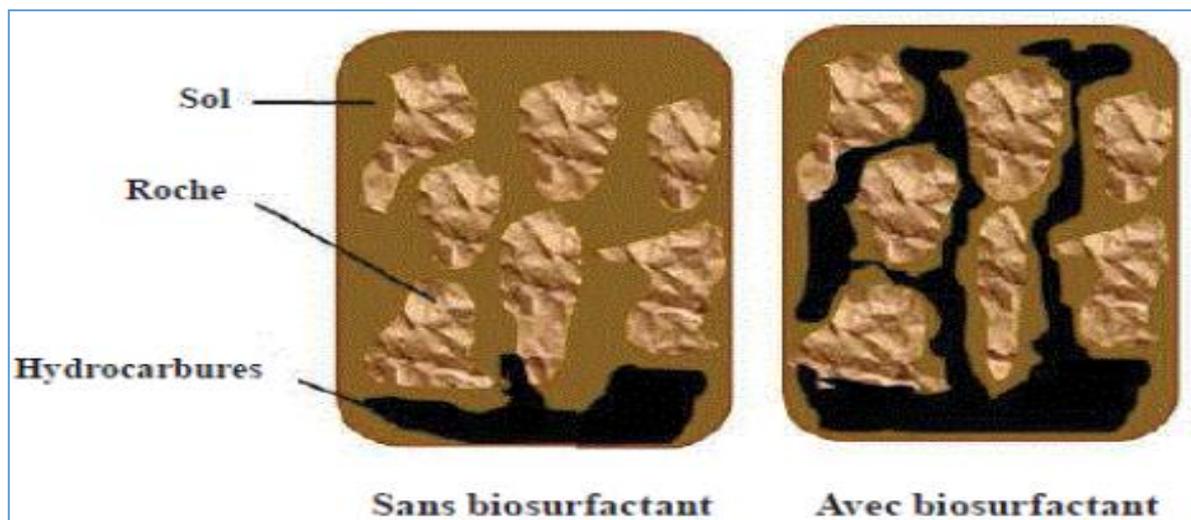


Figure 8. Déplacement de l'huile par diminution de la tension superficielle par des biosurfactants dans le mécanisme de la récupération assistée du pétrole (MEOR) (Hentati, 2018).

Les biosurfactants les plus couramment utilisés dans le MEOR (Figure 08) sont les lipopeptides produits par *Bacillus* et certains *Pseudomonas*, les glycolipides (principalement les rhamnolipides) produits par *Pseudomonas* et les tréhalolipides produits par *Rhodococcus*. (Banat, 1995 ; Bodour et Miller-Maier, 2002 ; Youssef et al., 2004).

Le tableau suivant présente les différentes applications des biosurfactants dans l'industrie pétrolière.

Tableau V. Applications courantes des biosurfactants dans l'industrie pétrolière (Mazaheri-Assadi et Tabatabaee, 2010).

Étape de la chaîne de production pétrolière	Applications
Extraction	Modification de la mouillabilité des réservoirs. Réduction de la viscosité de l'huile et les boues de forage. Contrôle du dépôt de paraffine/asphalte. Amélioration du déplacement du pétrole. Réduction de la viscosité de l'huile.
Transportation	Réduction de la viscosité de l'huile. Stabilisation des émulsions d'huile. Dépôt de paraffine/asphalte.
Nettoyage de réservoirs/conteneurs d'huile	Réduction de la viscosité de l'huile. Émulsification des boues huileuses. Dispersion d'hydrocarbures.

II.4.2. Bioémulsifiants

Les bioémulsifiants font partie des produits microbiens utilisés en MEOR, qui sont par définition des biosurfactants de haut poids moléculaire, des amphiphiles composés de polysaccharides, de protéines et de lipides. Cependant, contrairement aux biosurfactants, ces molécules ne peuvent réduire la tension superficielle ou interfaciale (Dastgheib et al., 2008 ; Youssef et al., 2009).

Les émulsifiants bactériens les plus étudiés et documentés est l'emulsan. Ce derniers est un complexe d'hétéropolysaccharides et de protéines, qui ont été mis en évidence chez *Acinetobacter* spp. RAG-1 est l'espèce qui produit ce bioémulsifiant (Rosenberg et Ron, 1999).

II.4.3. Gaz

La production de gaz naturel est souvent mentionnée comme un mécanisme important de récupération du pétrole. Des gaz tels que CH₄, CO₂ et H₂ sont produits par certaines bactéries au cours de leur métabolisme, notamment par *Clostridium*, *Enterobacter* et *Methanobacter* (Youssef et al., 2009).

Les gaz de fermentation peuvent pressuriser le puits, provoquant l'entrée de pétrole brut léger dans le réservoir, facilitant ainsi sa récupération (Van Hamme et al., 2003). De plus, la quantité d'hydrogène produite dans les écosystèmes anaérobies est assez élevée, bien qu'elle soit rapidement éliminée du réservoir pour être ensuite utilisée par d'autres micro-organismes (Youssef et al., 2009).

II.4.4. Acides organiques

Les acides organiques tels que le formiate, l'acétate, le propionate, le butyrate, les acides gras... sont des produits de fermentation microbienne précieux en raison de leur effet sur la dissolution des carbonates, ils contribuent ainsi à la porosité et à la perméabilité. L'augmentation, en d'autres termes, de l'implication de ces acides dans le processus de récupération assistée du pétrole (Adkins et al., 1992).

II.4.5. Solvants

Les solvants sont également des métabolites produits par l'activité et le métabolisme microbiens qui peuvent être impliqués dans la récupération assistée du pétrole, tels que l'éthanol, le butanol et l'acétone. En fait, l'une des propriétés les plus importantes des solvants est leur capacité à se dissoudre dans les huiles, réduisant ainsi leur viscosité (McInerney et al., 2005).

II.5. Stratégies de MEOR

Les principales stratégies de mise en œuvre de MEOR se répartissent généralement en trois catégories (Figure 09) : l'infusion de bactéries exogènes avec des nutriments ; l'infusion de nutriments pour stimuler les microbes natifs et l'infusion de métabolites produits de manière ectopique (Banat et al., 2000).

L'application réussie de ces stratégies, c'est-à-dire pour augmenter la production, nécessite une enquête systématique et une étude intensive des communautés et des paramètres physico-chimiques rencontrés sur le terrain pour éliminer autant que possible les facteurs entravant leur déploiement (Bernard et Michel, 2005, Wang, 2005).

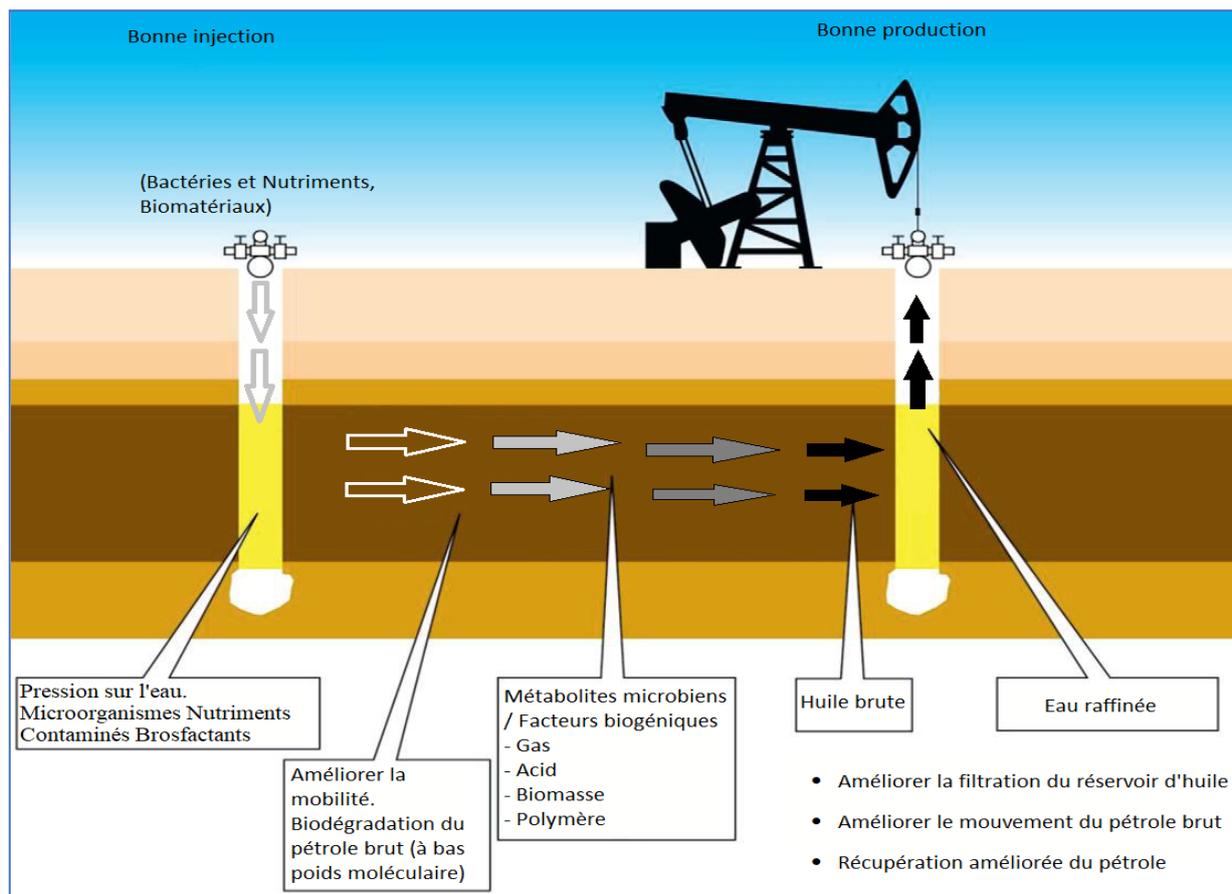


Figure 9. Principes de la récupération assistée du pétrole par des microorganismes (MEOR, Marchant et Banat, 2012 modifiée).

II.5.1. Stimulation des bactéries indigènes

Une approche utilisée dans MEOR consiste à exploiter directement les micro-organismes du réservoir, des bactéries natives pour être précis. Ceux-ci sont souvent appelés débris d'hydrocarbures. Cette utilisation est accomplie en infusant des nutriments pour stimuler la croissance et/ou l'activité métabolique de ces bactéries (Youssef et al., 2009).

Ces derniers semblent être des candidats idéaux, avec un avantage sélectif sur les micro-organismes exogènes, car ils satisfont à deux exigences, la dégradation des hydrocarbures et la survie et la production des métabolites recherchés dans cet environnement extrême (Nikolova et Gutierrez, 2020).

La biomasse et les métabolites qui en résultent (tels que les gaz, les biopolymères et les biosurfactants) modifient l'environnement du réservoir et les propriétés du pétrole brut lui-même, incitant d'avantage de pétrole à s'écouler vers les puits de production (Li et al., 2017).

Quant aux nutriments injectés, ils se répartissent en deux grandes catégories : les sources de carbone telles que la mélasse et les accepteurs terminaux d'électrons tels que les nitrates, ces derniers se révélant être un stimulateur sélectif des microorganismes d'intérêt dans les réservoirs pétroliers. (Bao et al., 2009).

D'un point de vue économique, cette stratégie est très prometteuse pour les gisements non rentables car elle implique des micro-organismes déjà présents dans le réservoir (Gaytán et al., 2015 ; Gudiña et al., 2012 ; Patel et al., 2015).

II.5.2. Injection des bactéries exogènes avec les nutriments

Cette méthode repose sur l'injection de souches bactériennes adaptées aux conditions physico-chimiques du sous-sol par des puits d'injection en présence d'une solution nutritive. Le but de cette stratégie est de maximiser la croissance et/ou la production microbienne pour modifier les propriétés physicochimiques du pétrole brut et des réservoirs en faveur de la production pétrolière (Van Hamme et al., 2003 ; Voordouw, 2011).

Les microorganismes injectés peuvent être des anaérobies stricts ou des anaérobies facultatifs, ces derniers étant co-injectés avec un substrat glucidique, généralement de la mélasse ou un acide organique tel que l'acide lactique. L'introduction de microorganismes aérobies riches en oxygène a également été proposée (Jones, 1967). De plus, plusieurs études ont promu l'utilisation de cellules affamées, qui sont plus petites et plus efficaces dans le transport que les grandes cellules (Youssef et al., 2009).

D'autre part, les nutriments sont injectés selon un calendrier bien contrôlé pour assurer la survie de la souche. De plus, si la porosité est réduite, ces nutriments peuvent se dissocier des microbes de taille micronique et diffuser à travers le réservoir, activant les microbes natifs déjà présents dans le réservoir (Volk et Hendry, 2010).

L'injection de microorganismes exogènes dans des réservoirs présente diverses difficultés, notamment au niveau technique et physiologique. En effet, ces microbes ont du mal à s'infiltrer (des études ont montré que les bactéries passent du puits d'injection au puits de production en 2 à 7 mois) et à s'adapter aux conditions extrêmes des réservoirs pétroliers (Bernard et Michel, 2005). En revanche, cette stratégie se caractérise par des temps de production courts, des coûts élevés par rapport aux stratégies précédentes, et une incertitude sur la croissance, la survie et le degré de reproduction des souches injectées, ce qui la rend très peu attractive (Boussad, 2016).

II.5.3. Injection de métabolites produits *ex situ*

La stratégie consiste à injecter les métabolites bactériens résultants dans des fermenteurs (Nazina et Borzenkov, 2020) dans le but d'augmenter la production d'huile.

Cette approche peut sauver les compagnies pétrolières lorsque les microbes natifs ne sont pas adaptés aux résultats attendus, ou lorsque les bactéries exogènes sont incapables de s'adapter aux conditions extrêmes qui existent dans les réservoirs de stockage. De plus, malgré certains inconvénients de ces métabolites, ils se classent toujours plus haut que les polymères synthétiques (Buller et Vossoughi, 1990).

Concernant les métabolites injectés, ce sont des biosurfactants, des biopolymères et des solvants, ces derniers devant être stables aux paramètres physicochimiques du puits (Das et Mukherjee, 2005 ; Joshi et al., 2008).

L'amélioration des techniques de biologie moléculaire au cours des dernières décennies a permis d'utiliser des micro-organismes recombinants, utiles pour optimiser la production de métabolites et mettre à jour leur qualité et leur structure (Mukherjee et al., 2006 ; Wang et al., 2007).

II.6. Avantages de MEOR

La récupération assistée du pétrole grâce à des outils microbiens a prouvé, malgré sa technicité, qu'elle méritait l'attention et les grandes intentions des scientifiques, d'autant plus

que cette dernière n'a pas montré beaucoup d'avantages d'un grand intérêt pour l'industrie pétrolière (Youssef et al., 2009).

- La récupération biologique du pétrole s'est avérée plus économe en énergie car les processus microbiens ne consomment pas autant d'énergie que les processus thermiques.

- Contrairement aux autres méthodes, la MEOR est indépendante du prix de pétrole.

- La MEOR offrirait l'avantage de produire du brut de bonne qualité et à faible impact environnemental puisqu'elle n'utiliserait pas de produits chimiques de synthèse.

- La MEOR peut être plus efficace que certains types ou opérations MEOR parce que des matériaux actifs seront générés dans tout le réservoir et leur efficacité ne sera pas réduite par l'adsorption pendant la migration.

- La facilité et la simplicité des procédés d'installation et d'application rendent cette technique un choix économique, en effet, elle est moins cher et plus facile.

- Les processus microbiens peuvent être stimulés in situ dans le réservoir, minimisant ou éliminant ainsi la nécessité d'accueillir de grandes installations de stockage sur place / en mer.

- Elle implique en grande partie des produits / additifs entièrement biodégradables et donc ne présentent pas le danger de s'accumuler dans l'environnement, ceci la qualifie alors écologiquement comme moins polluante que ses équivalentes.

- La croissance microbienne exponentielle permet de produire rapidement de grandes quantités de métabolites d'intérêts en utilisant des ressources peu onéreuses et renouvelables.

- La MEOR est un processus économiquement attractif pour les gisements de pétrole à production marginale et une alternative appropriée avant l'abandon des puits matures et déjà exploités. (Belaid et Friha 2020).

Partie II:
Procédures expérimentales

Procédures expérimentales

Chapitre III

III. Matériels et méthodes

III.1. Matériel

La liste des équipements, la verrerie et les milieux de cultures utilisés dans notre étude est présentée dans l'annexe N°01 et N°02 respectivement.

III.2. Méthodes

III.2.1. Revivification des souches et vérification de la pureté des souches

Six souches bactériennes, codées S1, S2, S3, S4, S5 et S12, utilisées dans cette étude ont isolées et purifiées par notre équipe de recherche de laboratoire de microbiologie de Laboratoire de Biomathématiques, Biophysique, Biochimie et Scientométrie (L3BS), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia.

La relance de ces souches a été réalisée dans des tubes contenant du Bouillon Nutrition (BN), dont sa préparation est décrite en annexe N°02. A partir des tubes de conservation de gélose inclinés contenant les souches bactériennes étudiées, quelques colonies ont été prélevées et transférées dans des tubes contenant 5 ml de BN, puis incubé pendant 24-48h à 37°C (Yañez-Ocampo et al., 2017).

La validation de la pureté des souches a été réalisée dans des boîtes de pétri contenant de la Gélose Nutritive (GN), dont le mode de préparation est décrit en annexe N°02. Cette étape est basée sur l'inoculation liquide-solide de souches bactériennes qui ont été réanimées préalablement dans des tubes de BN puis dans des boîtes de pétri contenant de GN, suivie d'une incubation dans une étuve à 37°C pendant 24-48h (Yañez-Ocampo et al., 2017).

III.2.2. Aspect macroscopique des souches

L'étude de l'aspect macroscopique est l'étape initiale qui va introduire à la vérification des bactéries, elle est basée sur la description des colonies qui sont obtenus après culture sur le milieu solide (GN). Cette étape est basée sur les caractères morphologiques des colonies qui sont observés à l'œil nu tels que : la forme, la taille, la chromogène (la couleur des pigments), l'opacité, l'élévation, l'aspect de la surface, la consistance et l'aspect de contour (Cattoir, 2016).

III.2.3. Etude microscopique des souches

Cette étude est basée sur l'observation des bactéries pour savoir leur forme, mobilité et leur mode d'association.

III.2.3.1. Coloration de Gram

a. Préparation du frottis

La préparation des frottis est basée sur des cultures de souches récemment inoculées en gélose nutritive à l'aide de pipettes Pasteur (24-48h), qui sont ensuite déposées sur des lames de verre de façon dépliée. Quelques gouttes d'eau distillée ont ensuite été ajoutées et les lames ont été passées à travers une flamme de bec Bunsen bleu pour fixer le frottis (Cattoir, 2016).

b. Etapes de coloration de Gram

* ***Coloration par le violet de gentiane*** : L'ajout de quelques gouttes de violet de gentiane au frottis préparé préalablement puis laisser agir pendant une minute, puis rinçage à l'eau distillée (Cattoir, 2016).

* ***Mordançage au Lugol*** : Immersion de la lame dans le Lugol et laissée agir pendant une minute, puis éliminer l'excès de Lugol, puis rinçage à l'eau distillée (Cattoir, 2016).

* ***Décoloration par l'alcool*** : Recouvrir le frottis par l'alcool et laisser agir 30 secondes puis rinçage avec l'eau distillé (Cattoir, 2016).

* ***Recoloration par la Fushine*** : L'ajout de quelques gouttes de la Fushine au frottis puis laissé agir 01 min rincer la lame avec l'eau distillé, séchage à la flamme bleu de bec bunsen (Cattoir, 2016).

c. Observation microscopique

Observer les lames après la coloration de Gram avec le microscope optique à l'objectif x100 avec l'ajout de 1 à 2 gouttes de l'huile à immersion (Cattoir, 2016).

III.2.4. Identification biochimique

Les bactéries codées S1, S2, S3, S4, S5 et S12 ont été soumises à une identification classique qui a été réalisée à l'aide séries de tests biochimiques tel que :

III.2.4.1. Test de catalase

Pour réaliser ce test nous avons sélectionné et prélevé des colonies de nos souches ayant poussées sur la GN, cette masse a été mise en contact direct avec une goutte d'eau oxygénée H_2O_2 sur une lame propre et stérile. Une catalase positive se traduit par le dégagement de bulle d'air qui indique la dégradation de peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. Par contre, l'absence des bulles indique que la bactérie ne possède pas l'enzyme (Reiner, K. 2010).

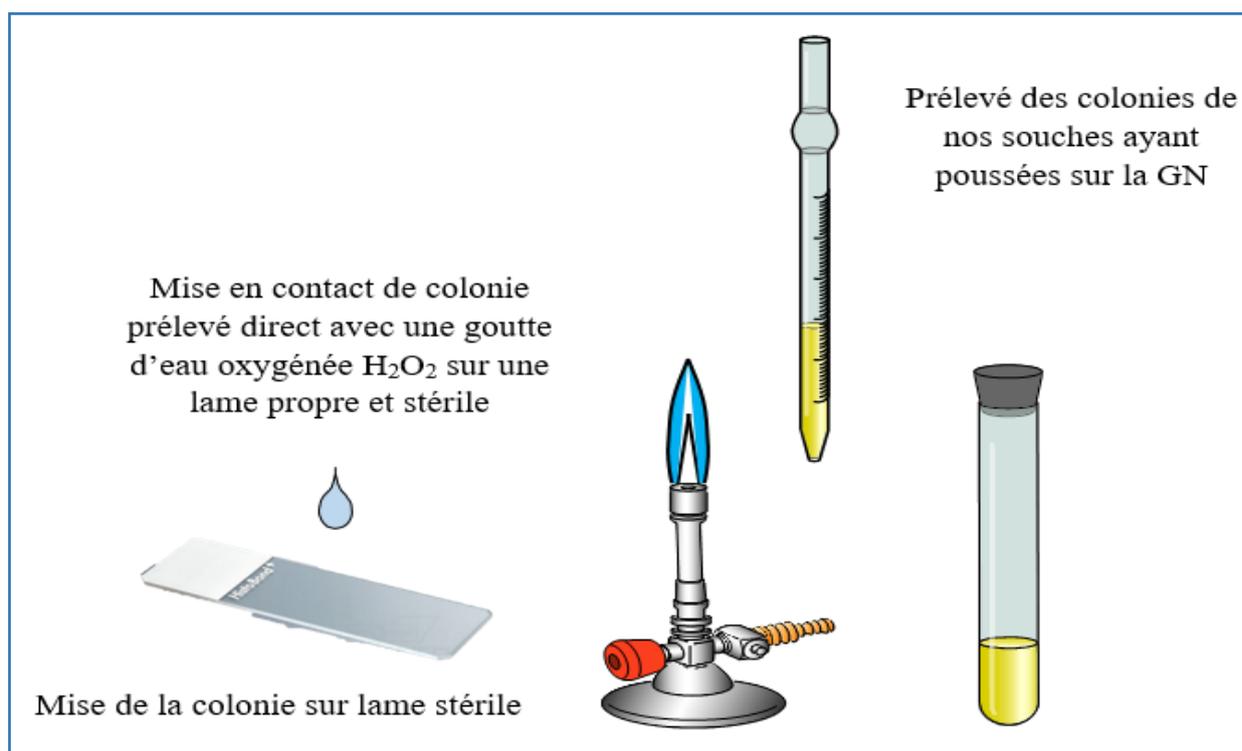


Figure 10. Test de catalase

III.2.4.2. Test Nitro Phényl Galactopyranoside (NPG)

Test Nitro Phényl Galactopyranoside (ONPG) est utilisée : Une suspension épaisse de bactéries est réalisée en eau distillée. Puis on dépose les disques d'ONPG dans cette suspension dans un milieu gélose MacConkey. A la fin incubation 30 min à $37^{\circ}C$ puis lecture.

La bêta-galactoside perméase qui permet au lactose de pénétrer dans la bactérie et aussi catalyse l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose. Si on a Milieu jaune : ONPG présent / Milieu sans couleur ONPG absent (Rouf et Syed Fazle, 2007).

Ce processus se fait selon la réaction suivante (Figure 11):

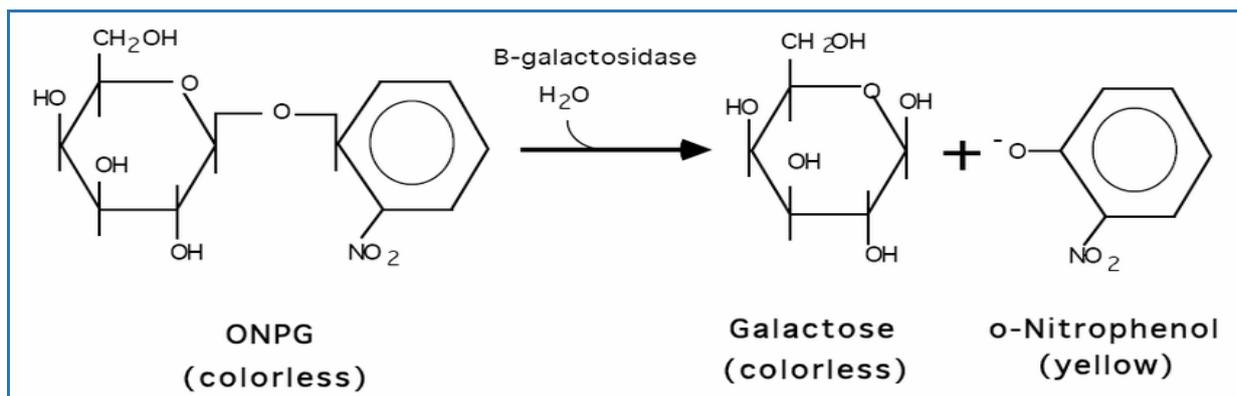


Figure 11. Réaction de β galactosidase (Rouf et Syed Fazle., 2007)

III.2.4.3. Test ADH, LDC et ODC

Les décarboxylases, scindent les acides aminés entraînant de l'amine correspondante avec la libération de CO₂ suivant la réaction (Figure 12), à partir d'une culture pure et fraîche prélevée sur milieu gélosé nutritif ou trypto-caseine-soja, préparer une suspension en eau physiologique d'une opacité équivalente au standard Mac Farland 0,5. A la fin incubation 30 min à 37°C puis lecture. Coloration jaune du milieu (virage acide) est un résultat négatif. Coloration violette du milieu (virage alcalin) : résultat positif.

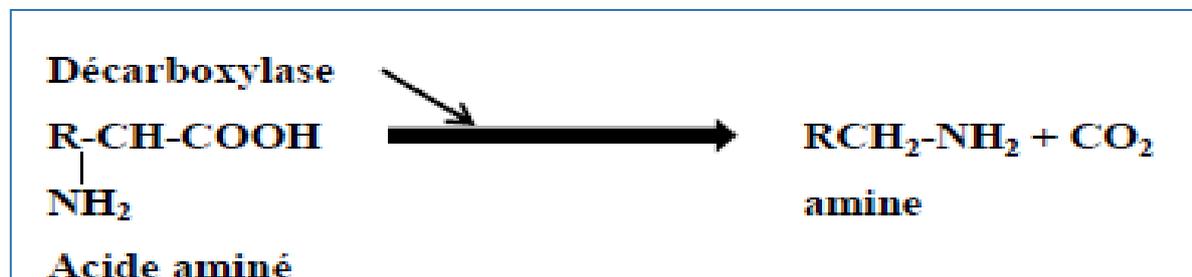


Figure 12. Réaction de décarboxylase (Joffin et Leyral.,2006)

Il s'agit d'enzymes induit, dont la synthèse est favorisée par un pH acide (ph=3.5-5.5) et de conditions d'anaérobiose (Joffin et Leyral.,2006).

Lysine décarboxylase ou LDC : Lysine \longrightarrow Cadavérine + CO₂

Ornithine décarboxylase ou ODC : Ornithine \longrightarrow Putricine + CO₂

Arginine dihydrolase ADH : Arginine \longrightarrow Agmatine + CO₂

III.2.4.4. Utilisation de citrate

Le milieu de citrate Simmons est utilisé pour détecter l'utilisation de citrate comme une seule source de carbone.

Bactéries citrate positives : Une réaction positive est indiquée par une croissance avec une couleur bleue intense dans l'inclinaison.

Bactéries citrate négatives : Une réaction négative est mise en évidence par l'absence de croissance à trace de croissance sans changement de couleur (le milieu reste vert foncé)

III.2.4.5. Production de sulfure d'hydrogène (H₂S)

La production de sulfure d'hydrogène est réalisée dans un milieu *Kligler-Hajna* et révélée par la combinaison du H₂S formé avec des ions Fe³⁺ incorporés dans le milieu, sous forme d'un précipité noir (résultat positif), pas de noircissement sur le support (incolore) (résultat négatif).

III.2.4.6. Recherche de l'urée

On recherche la présence d'une enzyme l'uréase avec le milieu *Urée Indole*. L'hydrolyse de l'urée par l'uréase (**Figure 13.**), enzyme exprimée de manière constitutive, produit de l'ammoniac et du CO₂. La formation d'ammoniac alcalinise le milieu et le changement de pH est détecté par le changement de couleur. Un résultat positif est indiqué par la présence d'une couleur rose vif (fuchsia) dans la gélose inclinée. Un résultat négatif si pas de changement de couleur dans la gélose inclinée ([Greenwood, 2012](#)).

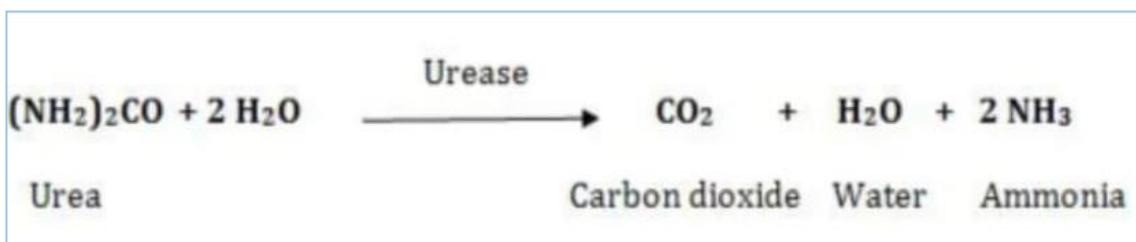


Figure 13. Réaction de décarboxylase

III.2.4.7. Recherche de la tryptophane-désaminase (TDA)

La présence de tryptophane désaminase (TDA) est mise en évidence par addition de perchlorure de fer (**Figure 14**), qui provoque une coloration brun rouge du milieu (*Urée Indole*) en cas de réaction positive et une coloration jaune orangée en cas d'absence.

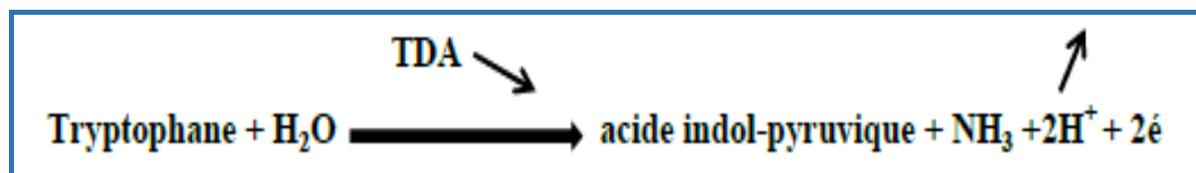


Figure 14. Réaction de la tryptophane-désaminase (TDA) (Pantaléon, 1975)

III.2.4.8. Production de l'indole

Détermine la capacité d'un organisme à produire de l'indole à partir de la dégradation de l'acide aminé tryptophane. Le tryptophane est hydrolysé par la tryptophanase pour produire trois produits possibles : l'indole, pyruvate et l'ion ammonium. Ce test s'effectue en utilisant un milieu (*Urée Indole*). L'indole produit par la bactérie est mis en évidence par le réactif de Kovacs (Pantaléon, 1975). Un résultat positif est indiqué par la présence d'une couleur rouge ou rouge-violet dans la couche d'alcool de surface du bouillon. Un résultat négatif apparaît en jaune.

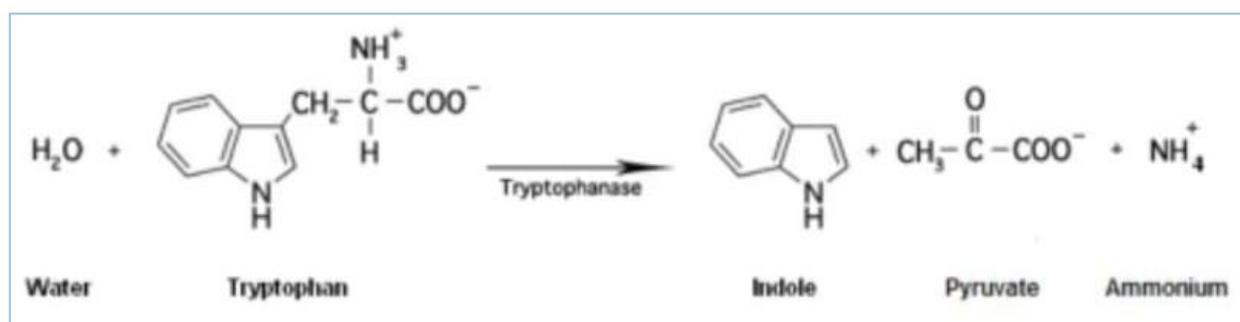


Figure 15. Réaction du test d'indole

III.2.4.9. Test de Voges-Proskauer (VP)

Le test VP détecte la production d'Acétoïne lors de la fermentation du Glucose, le milieu utilisé est le bouillon MR-VP. Dans ce test, deux réactifs, 5 % d'alpha naphthol (réactif VP - A) et 40 % d'hydroxyde de potassium (réactif VP-B) sont ajoutés au bouillon MR-VP après incubation et exposés à l'oxygène atmosphérique. Si l'acétoïne est présente (test

positive), une couleur rose-rouge s'est formée, c'est l'acétoïne est absent (test négative) y pas de changement de couleur (incolore).

III.2.4.10. Dégradation de la gélatine

La gélatine peut être incorporée dans un milieu de culture afin de mettre en évidence sa dégradation par certaines bactéries possédant une gélatinase. Cette enzyme hydrolyse le collagène en acide aminés ou en peptides (Joffin et Lyeral., 2006).

S'il y a une présence d'enzyme gélatinase résultat **positif** : on voit diffusions des pigments noirs. Si l'absence en cas de résultat **négatif** non diffusion (Technique de KOHN).

III.2.4.11. Assimilation des glucides (GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA)

C'est un test permettant de voir si bactérie est capable de consommer tel ou tel glucide. En général par mesure de la disparation dans le milieu (*La gélose TSI*) via colorimétrie. Selon la réaction de fermentation ou l'oxydation. Si elle la consomme on dit que le test est positif et la couleur jaune est apparaitre si le contraire il y a un changement de couleur en bleu ou bleu vert.

III.2.4.12. Réduction de nitrate en $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$

La production de NO_2^- est testé après culture de 24h sur le milieu nitraté, après l'addition des réactifs NR1 et NR2, pendant 2-3min lors de la présence une couleur rouge apparaitre, l'absence couleur jaune apparaitre. La réduction au stade N_2 est testé par la poudre de zinc la présence une couleur jaune apparaitre, l'absence couleur rouge apparaitre.

III.2.5. Potentiel de biodégradation de pétrole par les souches étudiées

Le potentiel de biodégradation de pétrole par les souches bactériennes étudiées a été testé et réalisée dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de MSM (Annexe N°2) et 2 ml de pétrole brut (Ijah et Antai., 2003). Dans l'analyse de la monoculture et de la culture mixte (consortium à six souches), une quantité de 2,0 % (v/v) de chaque inoculum bactérien a été ajoutée aux MSM pour l'étude de la dégradation (Figure 16).

Des flacons contrôle ont également été mis en place contenant seulement 100 ml de milieu et 2 ml de pétrole brut. Tous les flacons de culture ont été incubés à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ sous agitation à 150 rpm. Les expériences de biodégradation ont été effectuées en duplicata jusqu'à

10 jours et les échantillons de 10 ml ont été prélevés chaque 48 h pour déterminer la biomasse bactérienne totale, mesurer l'indice d'émulsification et quantifier le pétrole total dégradé par les souches testées (Yalaoui-Guellal et al., 2020).

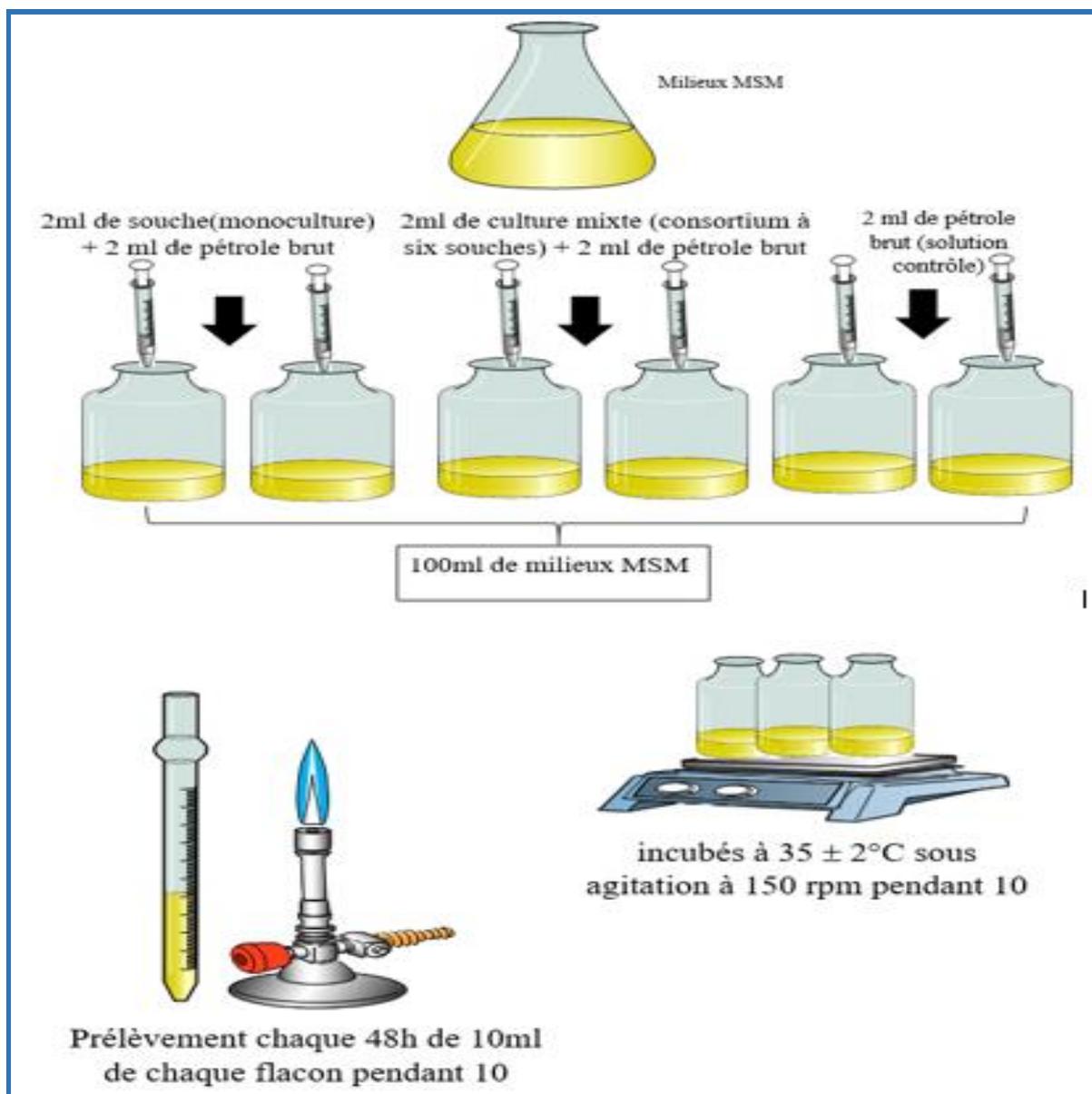


Figure 16. Test de dégradation de pétrole par des monoculture et culture mixte des souches S1, S2, S3, S4, S5 et S12

III.2.5.1 Détermination de la biomasse bactérienne totale

La biomasse microbienne a été déterminée par la méthode du dénombrement total viable (TVC) en utilisant le poids sec de la cellule. Au terme d'incubation de chaque période, les échantillons ont été centrifugés à 5000 g/20 min, ensuite le culot a été récupéré après

lavage à l'eau distillée puis séché à 80° C. La biomasse a été calculée en utilisant la formule suivante :

$$BBS = \frac{Ps - P0}{Vp}$$

Où BBS est la biomasse bactérienne exprimée en mg/ml, Ps est le poids des boîtes après séchage, P0 est le poids des boîtes vides et Vp est le volume de prélèvement (Yalaoui-Guellal et al., 2020).

III.2.5.2. Mesure de l'indice d'émulsification (E₂₄)

L'activité d'émulsification (E₂₄) a été déterminée par addition d'un volume d'huile brute au même volume de bouillon de culture sans cellules. Le mélange a été agité pendant 2 min et laissé au repos pendant 24 h. L'activité d'émulsification est donnée par l'expression suivante :

$$E24 (\%) = \left(\frac{He (mm)}{Ht (mm)} \right) * 100$$

Où E₂₄ est l'indice d'émulsion après 24h, He est la hauteur de la couche d'émulsion, Ht est la hauteur totale du liquide (Emtiazi et al., 2009).

Les émulsions formées par les isolats ont été comparées à celles formées par une solution aqueuse à 1% (p/v) d'un tensioactif synthétique (sodium Dodecyl Sulfate (SDS)) (Yalaoui-Guellal et al., 2018).

III.2.5.3. Détermination de la biodégradation des hydrocarbures

Le pétrole total dégradé a été estimé en mesurant le pétrole brut résiduel, il a été récupéré par extraction à l'hexane et le solvant a été séparée après 2h et laissé s'évaporer. Le taux de biodégradation total a été déterminé gravimétriquement à l'aide de l'expression décrite par Chaillan et ses collaborateurs (Chaillan et al., 2004):

$$B (\%) = [(W1 - WC)/W1] * 100$$

Où, W₁ est le poids du pétrole résiduel dans le contrôle stérile et W_C est le poids du pétrole résiduel dans la culture (Yalaoui-Guellal et al., 2020).

III.2.6. Production de Biosurfactant

La production de biosurfactants par l'utilisation de milieu de culture MSM, a été réalisée selon le protocole décrit par [Yalaoui-Guellal et ses collaborateurs](#). Le principe de production est de fournir aux bactéries tous les éléments dont elles ont besoin pour se développer et de fournir des rendements élevés en biosurfactants. Pour obtenir des cultures à grande échelle, du milieu MSM a été utilisé, qui a été produit dans des flacons Erlenmeyer (capacité d'un 1L) additionné de 2 % de glucose et de 0,1 g/l d'extrait de levure (Annexe N°02). Le milieu de culture MSM a été inoculé avec 1% d'inoculum de 24 h (**Figure 17**). La fermentation a été effectuée dans des flacons de 250 ml contenant 100 ml de milieu MSM. Ce milieu a été inoculé avec 1 ml de l'inoculum précédent et les flacons ont été maintenus à $34^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ avec agitation orbitale à moins de 150 tr/min pendant 7 jours ([Yalaoui-Guellal et al., 2017](#)).

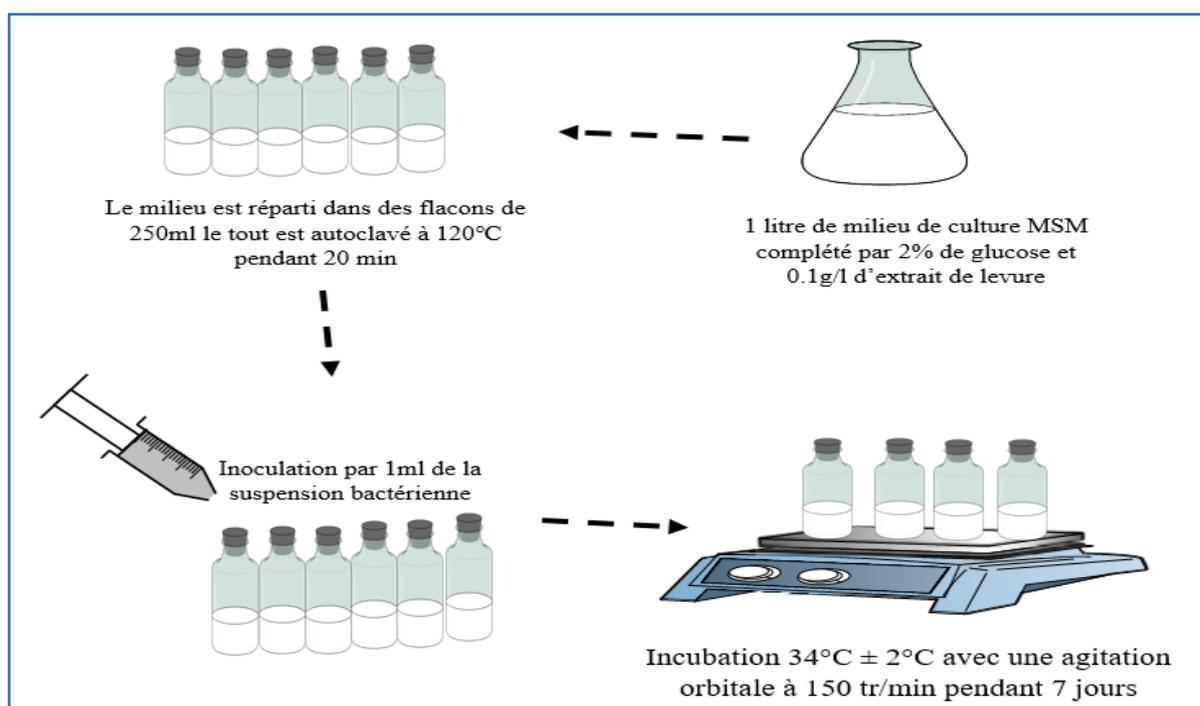


Figure 17. Etapes de la production de biosurfactants ([Yalaoui-Guellal et al., 2017](#))

III.2.7. Extraction des biosurfactants

Le moût de fermentation obtenu après 7 jours (168 heures) d'incubation a été centrifugés à $8000g/4^{\circ}\text{C}/20\text{min}$, le surnageant a été acidifié à $\text{pH } 2 \pm 0,5$ grâce à une solution d'HCl à 6N puis gardé à 4°C pendant la nuit (**Figure 18**), le précipité récupéré après une

deuxième centrifugation dans les mêmes conditions a été lyophilisé (Yalaoui-Guellal et al., 2018).

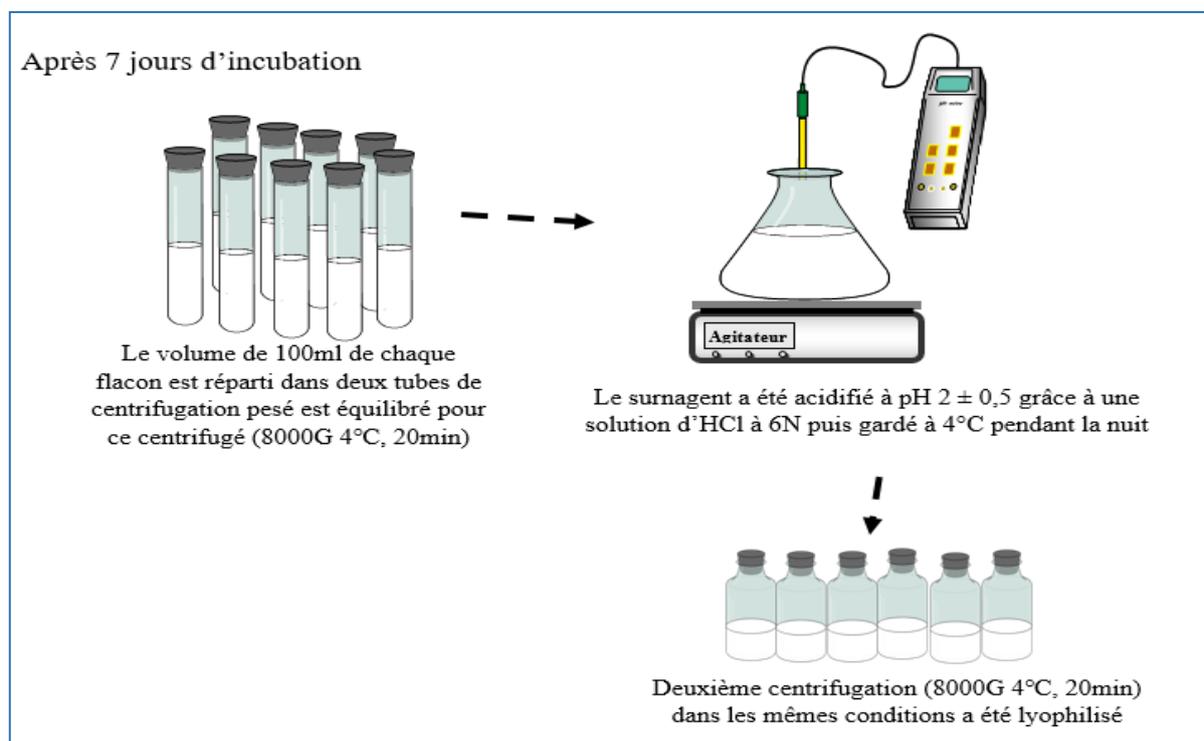


Figure 18. Etapes de l'extraction de biosurfactants (Yalaoui-Guellal et al., 2018).

III.2.8. Récupération du pétrole par les biosurfactants (MEOR)

Les échantillons des sables et des sols ont été tamisés, après le tri manuel pour éliminer les débris, avec une vitesse de rotation : 199 ± 2 rpm/g pendant 5 à 10 min avec un intervalle de 2 min. Les sols et les sables ont été récupérés avec un diamètre inférieur de 150 μm puis conservés dans des flacons en verre. La récupération du pétrole des sables et des sols a été testée après contamination de 100g des sols et des sables tamisés par 10% de pétrole brut. 40 ml de surnageant de chaque fermentation bactérienne (monoculture) ont été mélangé avec 20g de chaque échantillon des sables et des sols contaminés dans des erlenmeyers de 250 ml (**Figure 19**), l'effet de mélange de chaque monoculture a été testé par l'addition de même volume de chaque monoculture pour avoir un volume total de 40 ml pour la culture mixte (consortium) (Luna et al., 2013).

L'eau distillée et la solution de SDS ont été utilisées comme contrôle et standard respectivement. Les expériences ont été incubées à 150 rpm/28°C. Au terme de l'incubation l'ensemble du contenu des erlenmeyers a ensuite été centrifugé à 5000 rpm pendant 20min (Luna et al., 2013).

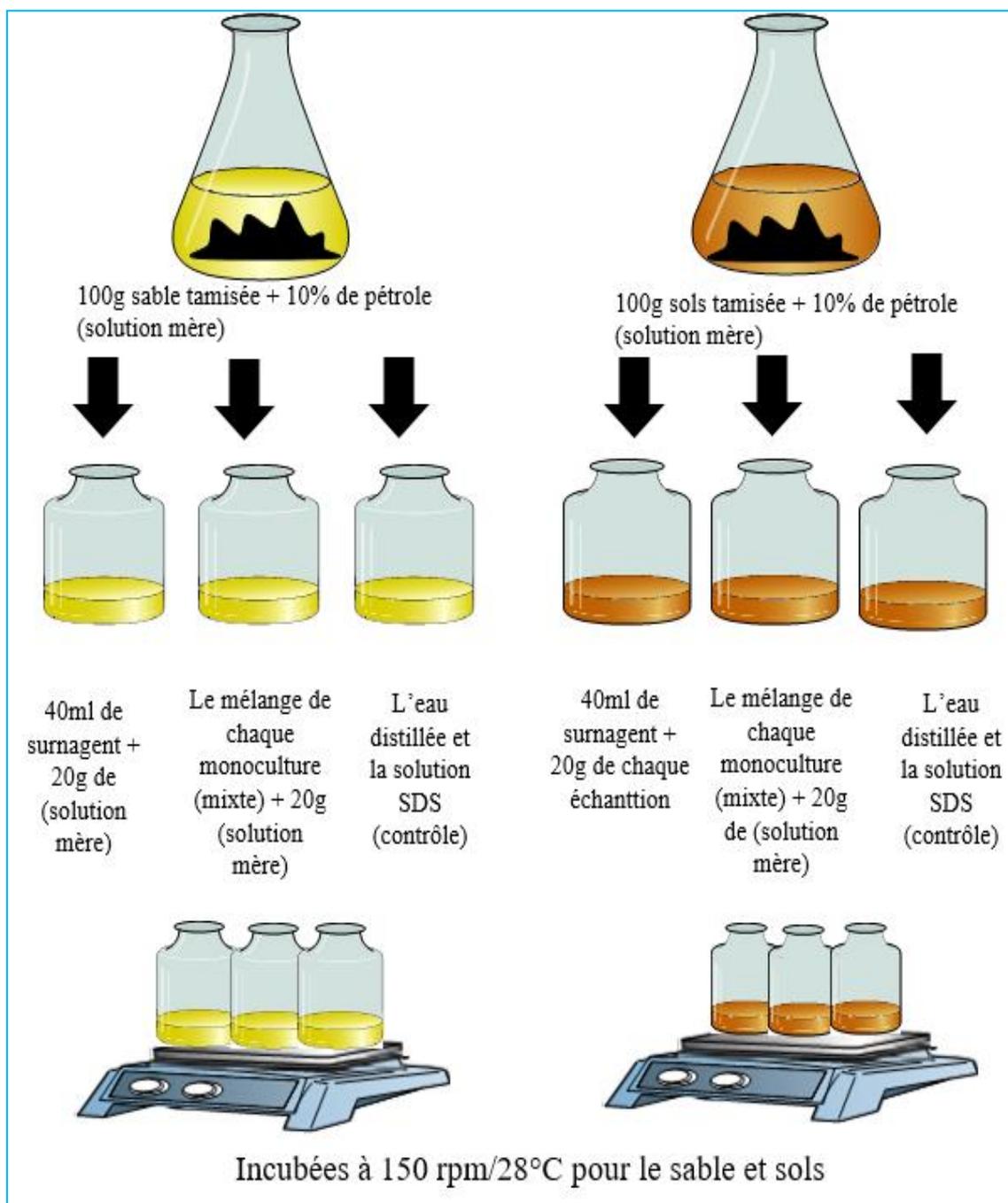


Figure 19. Récupération du pétrole des sables et des sols

Après la centrifugation on récupère le surnageant et la quantité de pétrole récupérée des sables et des sols après traitement par biosurfactant a été déterminée par gravimétrie après extraction avec de l'hexane.

Le pourcentage de la récupération (ER) de pétrole a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$ER\% = \frac{PR(g)}{Pi(g)} * 100$$

Où Pi est le poids initial du pétrole initial, Pr est le poids de pétrole récupéré après traitement dans chaque essai.

Chapitre IV

IV. Résultats et Discussion

IV.1. Aspect macroscopique des souches étudiées

L'examen macroscopique des colonies ayant poussées sur le milieu GN après l'incubation a montré différents aspects macroscopiques. Les souches S1, S3, S4 et S12 ont été de petite colonie avec contour lisse beige. Alors que souche S2 a donné des colonies de petite taille avec contour lisse et de couleur jaune. La souche S5 a formé des petites colonies rouge orange avec contour lisse.

IV.2. Etude microscopique des souches étudiées

Les résultats de l'étude de l'aspect microscopique des souches étudiées après la coloration de Gram ont révélé des formes cellulaires en cocci pour les souches S1, S3 et S5 et de forme coccobacille pour les souches S2, S4 et S12. En outre les souches S1, S3 et S12 ont été de Gram négative, et les souches S2, S4 et S5 ont été de Gram positive.

IV. 3. Identification biochimique des souches étudiées

Le **Tableau 06** montre les résultats des tests biochimiques préliminaires qui sont considérés comme des résultats d'identification classique des souches étudiées.

Les souches S2 et S4 étaient catalase négatives, par contre les souches S1, S3, S5 et S12 étaient catalase positives. En outre toutes les souches étaient ONPG, GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY et ARA positives, cependant ADH, LDC, ODC, CIT, H₂S et IND ont été négatives pour toutes les souches, alors que certains tests ont été différents.

Les résultats de l'étude de l'aspect macroscopique et microscopique ainsi que l'identification biochimique des souches étudiées ont montré une diversité morphologique et phylogénétique de ces souches.

Tableau VI. Quelques caractéristiques biochimiques des bactéries étudiées

TEST	S1	S2	S3	S4	S5	S12
ONPG	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	-	+	-	+	+
ADH	-	-	-	-	-	-
LDC	-	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-
CIT	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	+	-	-	-
TDA	-	+	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	+	+	+	+
GEL	-	+	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+
INO	+	+	+	+	+	+
SOR	+	+	+	+	+	+
RHA	+	+	+	+	+	+
SAC	+	+	+	+	+	+
MEL	+	+	+	+	+	+
AMY	+	+	+	+	+	+
ARA	+	+	+	+	+	+

+ : Réponse positive, - : Réponse négative, Production de NO₂ a été absente (-) chez S₁, Réduction de N₂ a été présente (+) chez les souches S₂ S₃ S₄ S₅ S₁₂

IV.4. Potentiel de biodégradation du pétrole par les souches étudiées

IV.4.1. Biodégradation du pétrole brut

L'étude du potentiel de la biodégradation du pétrole par les souches bactériennes étudiées a été réalisée dans un milieu MSM additionné à 2% de pétrole brut comme seule source de carbone.

Les résultats de cette étude ont montré la capacité de ces souches bactériennes d'utiliser le pétrole brut pour leur source de carbone mais avec variations (**Figure 20**).

Le pétrole total dégradé a été estimé en mesurant le pétrole brut résiduel, il a été récupéré par extraction à l'hexane et le solvant a été séparée après 2h et laissé s'évaporer. Le taux de biodégradation total a été déterminé gravimétriquement et représenté en fonction du temps dans la **Figure 20**.

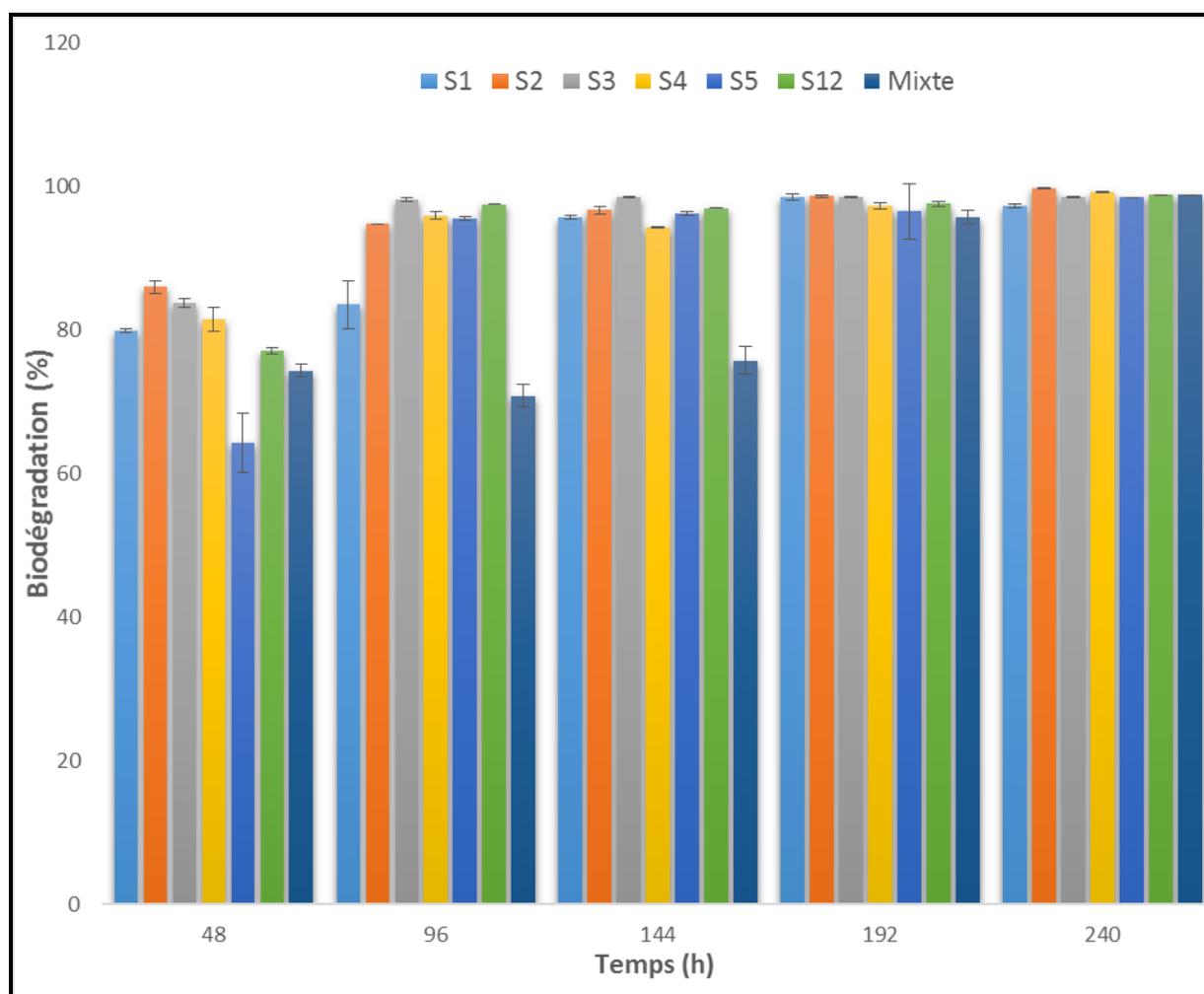


Figure 20. Potentiel de biodégradation du pétrole par les différentes souches étudiées

Le pourcentage de la biodégradation de pétrole brut par les monocultures pures de S2, S3, S4, S5 et S12 a atteint le maximum (> 90 %) au 4^{ème} jour d'incubation, suivie par la culture pure de S1 et le consortium bactérien mixte (> 90%) au 6^{ème} et 8^{ème} jour d'incubation respectivement (**Figure 20**). Ce pourcentage de dégradation est augmenté avec le temps.

Après 24 h d'incubation la biodégradation a été inférieure à 100% pour toutes les cultures, et la souche S2 a enregistré le pourcentage de biodégradation du pétrole le plus élevé ($86,02 \pm 0,87$ %). Les cultures pures des souches S2, S3, S4, S5 et S12 ont montré des valeurs de biodégradation de $94,80 \pm 0,03$ %, $98,18 \pm 0,23$ %, $95,95 \pm 0,55$ %, $95,51 \pm 0,27$ % et $97,51 \pm 0,012$ % de biodégradation respectivement après 96h d'incubation. La culture pure de

S1 et le consortium bactérien mixte ont donné des valeurs de $95,713 \pm 0,27$ % et $95,67 \pm 0,98$ % après 144 et 192 h d'incubation.

Ces résultats sont en accord avec les conclusions de [Diaz et ses collaborateurs](#) et [Kumar et ses collaborateurs](#) qui ont étudiés la dégradation de pétrole par les souches suivant *Pseudoalteromonas sp.*, *Ruegeria sp.*, *Exiguobacterium sp.*, *Acinetobacter sp.*, et *Acinetobacter sp.* Isolés à partir des sédiments de haute mer ont été identifiés à l'aide de la capacité de ces souches à utiliser efficacement le pétrole comme source de carbone, il a trouvé aussi le pourcentage de dégradation du pétrole par le consortium bactérien mixte a atteint le max de 52% suivi par des cultures pures de *Ruegeria sp.*, *Pseudoalteromonas sp.*, *Acinetobacter sp.*, et *Exiguobacterium sp.* Avec une dégradation de 41 %, 40 %, 28 % et 24 % respectivement. Ce qui a rapporté la combinaison de différentes cultures produisant un effet synergique et augmentant ainsi la biodégradation du pétrole brut ([Diaz et al., 2003](#) ; [Kumar et al., 2018](#)).

IV.4.2. Estimation de la biomasse bactérienne totale

Les résultats relatifs aux cultures bactériennes pures ont montré un faible taux de croissance en comparant avec la croissance de la culture mixte (**Figure 21**). Les cultures pures sont capables d'utiliser le pétrole brut, mais aucune de ces cultures n'est plus efficace que le consortium bactérien mixte.

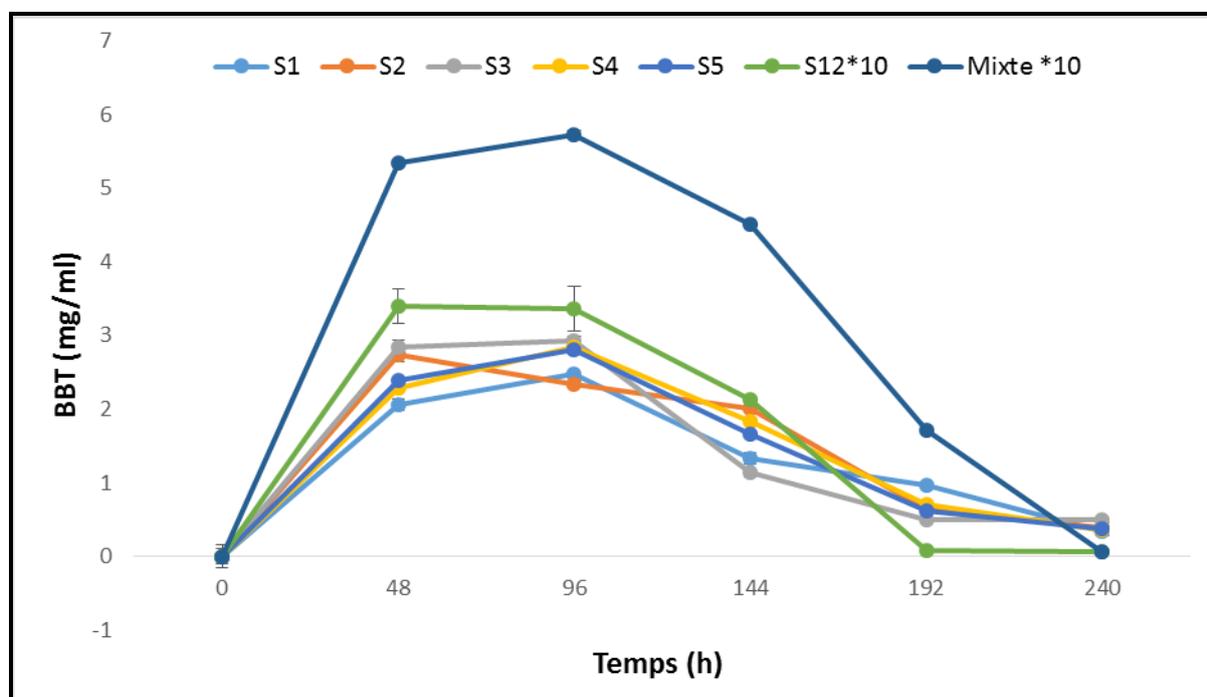


Figure 21. Croissance bactérienne sur MSM à 2% de pétrole brute en fonction du temps

Les résultats pour les cultures bactériennes pures ont montré un taux de croissance significatif avec un maximum du poids sec a été enregistré par le consortium bactérien mixte des souches qui a donné une valeur de 5.73 ± 0.04 mg/mL, suivie par la souche S12 qui était de $3,39 \pm 0,3$ mg/mL après 96 h d'incubation.

Ces résultats ont été comparés avec ceux obtenus par [Yalaoui-Guellal et ses collaborateurs](#) qui ont utilisé des souches de bactéries hydrocarbonoclastiques ont été isolées des échantillons de sédiments de Wadi Soummam avec divers hydrocarbures comme seule source de carbone. Les souches ont été caractérisées comme *Alcaligenes faecalis*, *Cellulosimicrobium sp.* Et *Rhodococcus ruber* pour évaluer leur capacité à dégrader le pétrole en incubant le pétrole brut comme source de carbone pendant 12 jours. La souche *Rhodococcus ruber* qui était de $7,83 \pm 0,05$ mg/mL, une augmentation du poids sec bactérien a été corrélée avec l'utilisation d'huile dans l'environnement ([Yalaoui-Guellal et al., 2020](#)).

IV.4.3. Mesure de l'indice d'Émulsification (E₂₄)

Les résultats de la mesure de l'indice d'émulsification obtenus, et présenté dans la **Figure 22**, ont montré que les souches ont une émulsification supérieure à 50% après 48 h d'incubation.

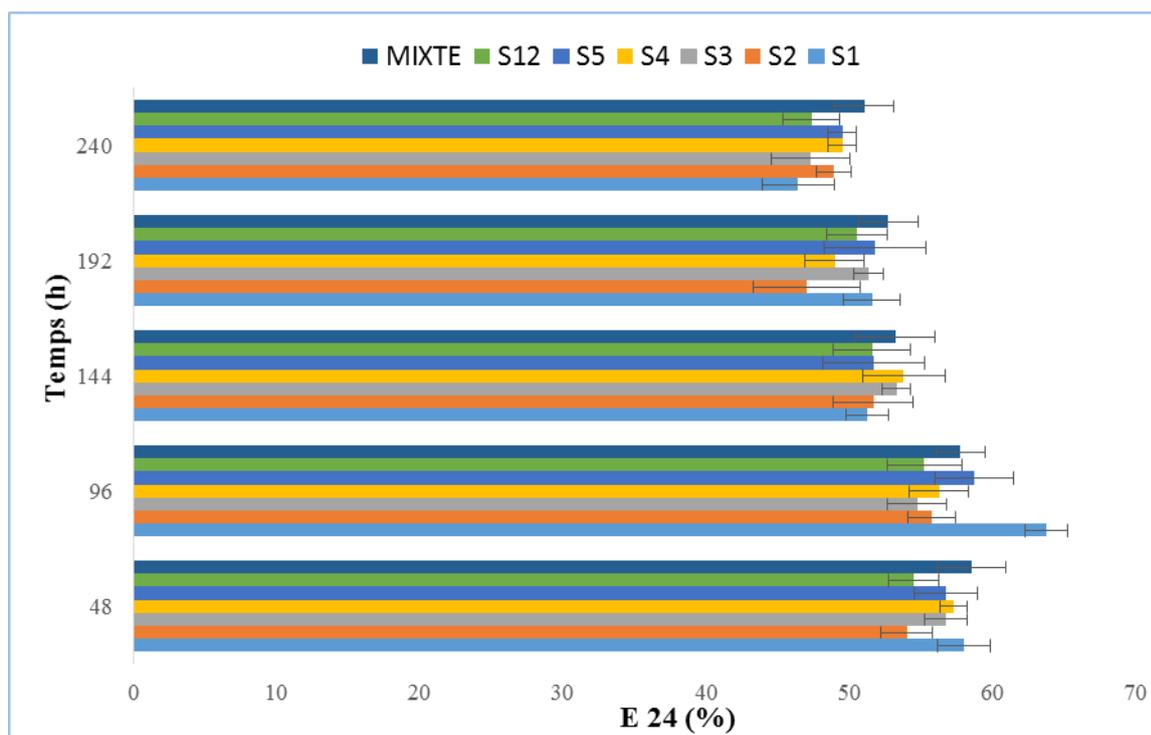


Figure 22. Indice de l'émulsification (E24) des souches étudiées et cultivées sur le pétrole comme seule source de carbone

Cette activité d'émulsification était maximale pour le consortium bactérien mixte avec une valeur de $58.5 \pm 2,39$ % suivie par la souche S1 avec un E24 de $58 \pm 1,83$ %. Après 96h (deuxième prélèvement) une augmentation significative a été constaté pour la culture pure de la souche S1 qui enregistré un taux de $63.75 \pm 1,5$ %, et pour les autres souches une légère augmentation a été signalée. Ensuite une diminution de l'activité d'émulsification (E24 %) a été remarquée où elle a donné des valeurs inférieures à 50% pour toutes les cultures pures.

Ces résultats ont été comparés avec ceux obtenus par [Yalaoui-Guellal et ses collaborateurs](#) qui a trouver l'indice d'émulsification le plus élevé (E24) chez les souches MP4 dont l'activité est de $78,50 \pm 0,50$ %, suivi de LP1-1 et MP3R qui ont $69,5 \pm 0,5$ et $61,5\% \pm 1,50\%$, respectivement. L'indice d'émulsification le moins élevé a été observé dans le LP2 avec $56 \pm 1,15$ % ([Yalaoui-Guellal et al., 2018](#)).

La stratégie biologique qui peut améliorer le contact entre les bactéries et les hydrocarbures insolubles dans l'eau est l'émulsification. Par conséquent, les bactéries qui poussent sur les hydrocarbures produisent généralement des émulsifiants qui stimulent leurs croissances et accélèrent la bioremédiation ([Ron et Rosenberg, 2002](#)). Les biosurfactants sont souvent produits par des bactéries capables de croître sur des hydrocarbures.

L'émulsifiants produits par les souches étudiées de [Yalaoui-Guellal et ses collaborateurs](#) ont montré que ca production par les souches MP4 pour émulsifier des alcanes a stimulée leurs croissances et accélère la bioremédiation.

Le potentiel de biodégradation de pétrole par la méthode gravimétrique indique que les cinq souches ont la capacité d'utiliser le pétrole comme source nutritive.

IV.5. Production de biosurfactants

La production de biosurfactant par la souche a été réalisée dans un bouillon MSM complété par 2% (v/v) de glucose et 0,1 g/L d'extrait de levure. Les cellules ont été incubées à 30°C sous agitation à 150 rpm pendant 96 h. Après extraction par précipitation acide une quantité de de biosurfactant brut lyophilisé a été obtenu et enregistré dans le tableau suivant :

Tableau VII. Poids sec des biosurfactants produits par les souches étudiées

Souches étudiées	Poids sec des biosurfactants (g/L)
S1	1,13 ± 0,0013
S2	2,24 ± 0,0014
S3	1,98 ± 0,0012
S4	1,54 ± 0,0021
S5	2,97 ± 0,0036
S12	1,75 ± 0,0026

Le poids sec de biosurfactant le plus élevé était trouvé chez la souche S5 qui a produit $2,97 \pm 0,0036$ g/L de biosurfactant brut, suivi de souche S2 ($2,24 \pm 0,0014$ g/L). Les souches S3, S4 et S12 ont produit $1,98 \pm 0,0012$, $1,54 \pm 0,0021$ et $1,75 \pm 0,0026$ g/L respectivement. La production la plus faible a été enregistrée chez la souche S1 avec $1,13 \pm 0,0013$ g/L.

Ces résultats ont été comparés par les travaux de [ElSheshtawy et Doheim](#) qui ont utilisé le glucose comme la seule source de carbone pour les souches *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* ont trouvé 2 ± 0.01 , 1.5 ± 0.02 g/l respectivement ([ElSheshtawy et Doheim, 2014](#)).

Le test d'émulsification (E24) a été réalisé pour confirmer et estimer la production des biosurfactants par les souches étudiées. La **Figure 23** montre que les souches présentent des valeurs variables d'émulsification du pétrole, indiquant la production de biosurfactants.

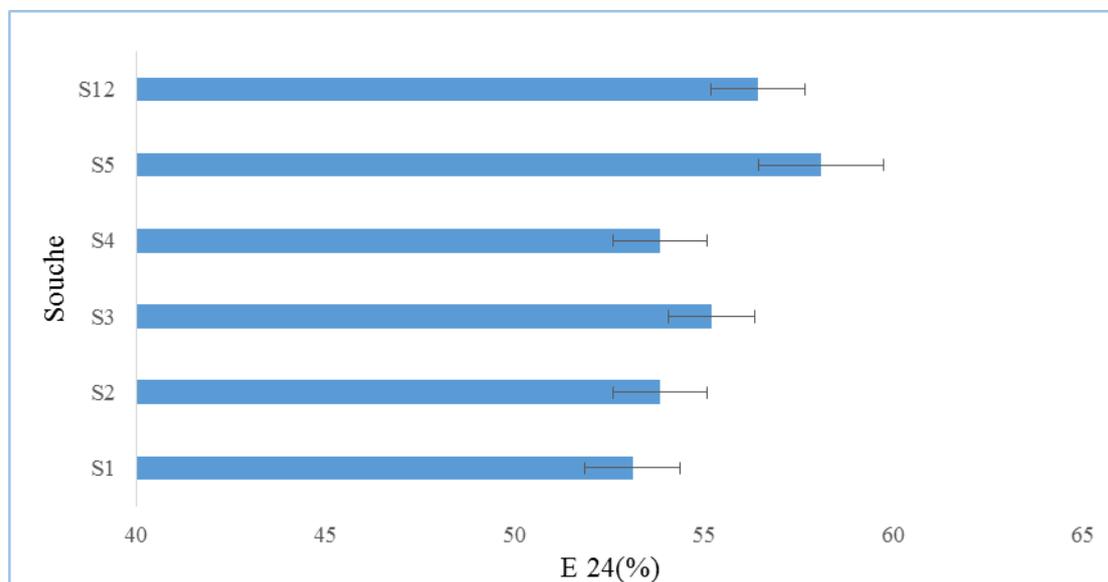


Figure 23. Indice de l'émulsification (E24) des souches étudiées et cultivées sur le glucose comme seule source de carbone

L'activité d'émulsification des S5, S12, S3 utilisées se manifestent productrices de biosurfactants avec un index d'émulsification de (58.09%, 56.42%, 55.20%) respectivement.

Ces résultats ont été comparés avec ceux obtenus par [Benchouk](#) qui a travaillé avec les isolats L1, B2, P1, P3 et P4, une levure (L1) qui appartient au genre *Candida* et des bactéries qui appartiennent aux genres *Bacillus* (B2) et *Pseudomonas* (P1, P3 et P4). Il a trouvé un taux d'activité d'émulsification de 30, 33.3, 43.33, 43.33 et 40% avec le pétrole. ([Benchouk, 2017](#)).

IV.6. Récupération du pétrole par les biosurfactants (MEOR)

La quantité du pétrole récupérée des sables et des sols après traitement par biosurfactant a été déterminée par gravimétrie après extraction avec de l'hexane.

Le pourcentage de récupération (R%) de pétrole a été présenté dans la **Figure 24** pour le sable et pour le sol.

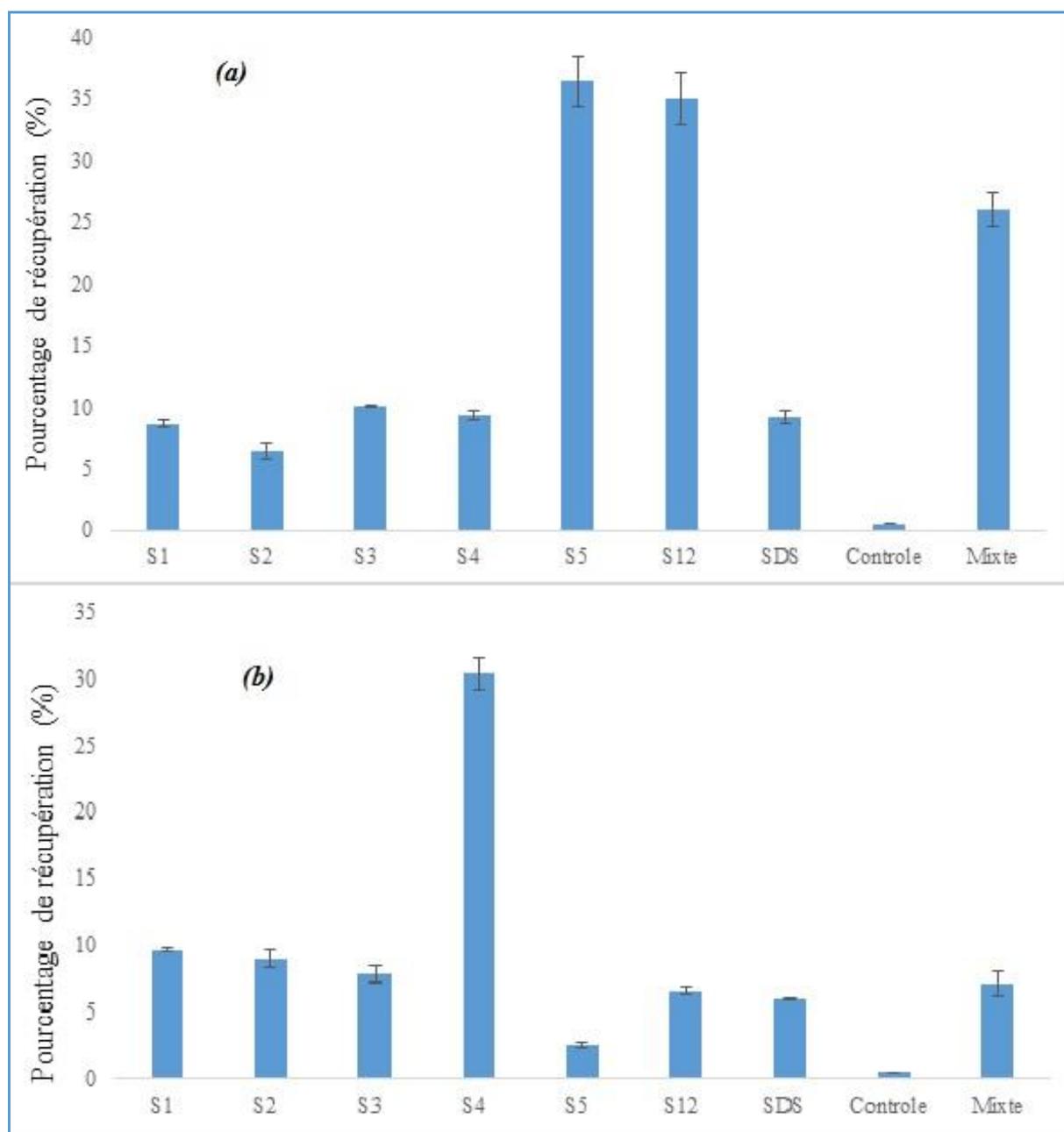


Figure 24. Pourcentage de récupération (R%) du pétrole par les différentes souches.

(a): à partir du sable, (b) à partir du sol

D'après les figures, nous avons constaté que les souches S5, S12, le consortium bactérien mixte, S3 et S4 ont enregistré le taux de récupération du pétrole à partir du sable avec des valeurs de $36,41 \pm 2,001$; $35 \pm 2,12$; $26 \pm 1,41$; $10,11 \pm 0,06$ et $9,32 \pm 0,36$ % respectivement (**Figure 24. a**). Ces valeurs étaient supérieures au standard utilisé (SDS 1%) qui a donné un taux de $9,16 \pm 0,48$ % de récupération du pétrole à partir du sable. Les souches S1 et S2 ont présenté des taux inférieurs au taux donné par le SDS.

D'après les figures, nous avons constaté que les souches S4, S1, S2 et S3 ont enregistré le taux de récupération du pétrole à partir du sol avec des valeurs de $30,34 \pm 1,19$; $9,62 \pm 0,14$; $9,08 \pm 0,65$; $7,88 \pm 0,60$ % respectivement. Ces valeurs étaient supérieures au standard utilisé (SDS 1%) qui a donné un taux de $6,02 \pm 0,13$ % de récupération du pétrole à partir du sol (**Figure 24. b**). La souche S5 ($2,61 \pm 0,23$ %) a présenté un taux inférieur au taux donné par le SDS, et la souche S12 ($6,61 \pm 0,26$ %) un peu élever par rapport au taux donné par le SDS.

Ces résultats ont été inférieurs à ceux obtenus par Luna où il a utilisé le surnageant de la culture *C. sphaerica* pour éliminer l'huile de moteur adsorbée aux échantillons de sable. Il a enregistré des taux d'élimination 95% et 10%, pour le surnageant et l'eau distillée (Luna, 2013).

D'après ces travaux, les biosurfactants émulsifiants sont fortement recommandé pour la récupération du pétrole ou l'huile de moteur en valorisant leur solubilité dans l'eau avec diminution de la tension superficielle et augmentation du déplacement de ces substances pétrolières provenant de particules du sol.

Conclusion

Le pétrole n'est pas simplement un liquide noir, c'est une des premières sources d'énergie aux mondes, et même un virage dans l'histoire de l'économie des pays qui le possèdent, surtout depuis les années 60.

Ce travail est une synthèse bibliographique de différents travaux de recherche sur l'utilisation des microorganismes hydrocarbonoclastes dans la récupération de pétrole et leur utilisation dans la bioremédiation des sites pollués par les hydrocarbures pétroliers, la présence d'étude a suscité beaucoup d'information important sur la production de biosurfactant et l'indice d'émulsification E24, et de deux grands test : Le potentiel de biodégradation de pétrole et la récupération du pétrole.

L'objectif de notre travail était de déterminer le potentiel de biodégradation de pétrole par les souches bactériennes (S1, S2, S3, S4, S5, S12). Elle consisté de la mesure de la biodégradation, la biomasse et l'indice d'émulsification.

Le test du potentiel de biodégradation par les souches S1, S2, S3, S4, S5 et S12 montré que la biodégradation de la souche S2 a enregistré le pourcentage de biodégradation du pétrole le plus élevé ($86,02 \pm 0,87$ %). Les cultures pures des souches S2, S3, S4, S5 et S12 ont montré des valeurs de biodégradation $94,80 \pm 0,03$ %, $98,18 \pm 0,23$ %, $95,95 \pm 0,55$ %, $95,51 \pm 0,27$ % et $97,51 \pm 0,012$ % respectivement après 96h d'incubation. La culture pure de S1 et le consortium bactérien mixte ont donné des valeurs $95,713 \pm 0,27$ % et $95,67 \pm 0,98$ %. Les résultats pour les cultures bactériennes pures ont montré un taux de croissance significatif avec un maximum du poids sec a été enregistré par le consortium bactérien mixte des souches qui a donné une valeur de 5.73 ± 0.04 mg/mL, suivie par la souche S12 qui était de $3,39 \pm 0,3$ mg/mL après 96 h d'incubation.

Pour le test de l'index d'émulsification pour la souche S1 et le consortium bactérien mixte des souches. la souche S1 qui enregistré un taux d'émulsification de $63.75 \pm 1,5$ %, et le consortium mixte a une valeur de $58.5 \pm 2,39$ %.

Notre deuxième approche était la mesure de l'efficacité de la récupération de pétrole à partir du sol et le sable, par le surnageant de la fermentation de la production de BS par les six souches étudiées.

La récupération de pétrole à partir du sable a été efficace avec les souches S5, S12 avec des valeurs de $36,41 \pm 2,001$ % ; 35 ± 2.12 % respectivement et le consortium bactérien

mixtes avec valeur $26 \pm 1,41\%$. A partir du sol le meilleur résultat obtenu a été imprégné avec les souches S4, S1 avec des valeurs de $30,34 \pm 1,19\%$; $9,62 \pm 0,14\%$.

La souche S5 est la plus productrice de biosurfactant qui a produit $2,97 \pm 0,0036$ g/L de biosurfactant brut, suivi de souche S2 ($2,24 \pm 0,0014$ g/L). Les souches S3, S4 et S12 ont produit $1,98 \pm 0,0012$, $1,54 \pm 0,0021$ et $1,75 \pm 0,0026$ g/L respectivement. La production la plus faible a été enregistrée chez la souche S1 avec $1,13 \pm 0,0013$ g/L.

Au cours de cette étude, nous avons pu dégager les conclusions suivantes :

- Application des souches bactériennes, dans la récupération du pétrole (la MEOR) dans le laboratoire et à l'échelle pilote.
- Réalisation de la MEOR dans des champs de production et des gisements cibles, et centraliser les recherches sur des zones particulières.
- Isolement caractérisation des nouvelles enzymes indispensables dans la dégradation du pétrole et ses dérivés
- Séquencer et identifier les gènes responsables de production des biosurfactants et approfondir les champs d'information des futures données de séquençage.

*Références
bibliographiques*

Adams, G.O., Tawari-Fufeyin, P. et Igelenyah, E. (2014). Bioremediation of spent oil contaminated soils using poultry litter. *Research Journal in Engineering and Applied Sciences*. 3(2): 124-130.

Almeida, M. F. B., Guinsburg, R., Sancho, G. A., Rosa, I. R. M., Lamy, Z. C., Martinez, F. E., de Cássia Silveira, R. (2014). Hypothermia and early neonatal mortality in preterm infants. *The Journal of pediatrics*, 164(2), 271-275.

Al-Sulaimani, Y., Al-Wahaibi, S. N. et Al-Bahry, S.N. (2010). Experimental investigation of biosurfactants produced by *Bacillus* species and their potential for MEOR in Omani oil field, In: Proceedings of the SPE EOR Conference at Oil and Gas West Asia 2010 (OGWA '10), Muscat, Oman,378-386.

Annweiler, E., Michaelis, W., et Meckenstock, R. U. (2002). Identical ring cleavage products during anaerobic degradation of naphthalene, 2-methylnaphthalene, and tetralin indicate a new metabolic pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(2):852–858.

Atagana, H.I. (2008). Compost bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil inoculated with organic manure. *African Journal of Biotechnology*. 7(10): 1516-1525.

Atlas, R.M et Bartha, R. (1973). Inhibition by fatty acids of the biodegradation of petroleum. *Antonie van Leeuwenhoek*. 39(1): 257– 271.

Atlas, R.M. (1981). Microbial-degradation of petroleum-hydrocarbons— an environmental perspective. *Microbiol Rev.* 45(1):180–209.

Atlas, R.M. et Philp, J. (2005). Bioremediation: applied microbial solutions for real-world environmental cleanup. American Society for Microbiology (ASM) Press, Washington, DC, 78–105.

Baek, K.H., Yoon, B.D., Kim, B.H., Cho, D.H., Lee, I.S., Oh, H.M. et Kim, H.S. (2007). Monitoring of microbial diversity and activity during bioremediation of crude OH-contaminated soil with different treatments. *J Microbiol Biotechnol.* 17(1): 67–73.

Balba, M.T., Al-Awadhi, N. et Al-Daher, R. (1998). Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiological Methods*. 32 : 155–164.

Banat, I. M., Makkar, R. S. and Cameotra, S. S., (2000). Potential commercial applications of microbi-al surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol.* 53: 495-508.

- Bao, M., Kong, X., Jiang, G., Wang, X. and Li, X., (2009).** Laboratory study on activating indigenous microorganisms to enhance oil recovery in Shengli Oilfield. *J Pet Sci Eng.* 66: 426.
- Bekenniche, N., Arezki, A. A., SaË, N., Djamal, A. S., Abderrahim, C., & Ali, B. A. M., (2021).** Molecular identification of crude oil-degrading bacteria isolated from polluted sites in Algeria. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 11(2): 164-171.
- Belaid, T., & Friha, K., (2020).** Synthèse bibliographique portant sur la récupération assistée du pétrole par les microorganismes. Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri.
- Benchouk, A., (2017).** Bioremédiation des sols pollués de pétrole par les microorganismes indigènes et amélioration génétique de leur pouvoir de dégradation des hydrocarbures (Doctoral dissertation, Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis). Blida, Algérie, 194.
- Bouchez-Naïtali, M., Rakatozafy, H., Marchal, R., Leveau, J.Y., et Vandecasteele, J.P. (1999).** Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *J Appl Microbiol.* 86(3) :421-8.
- Boukherissa, M. (2008).** Etude de la stabilité des asphaltènes dans le pétrole brut: *choix de dispersants et le mécanisme d'action* (Doctoral dissertation, Université Paul Verlaine-Metz).
- Boussad, A. (2016).** Caractérisation des interactions entre les bactéries des réservoirs pétroliers et les interfaces eau-hydrocarbures-roche. Thèse de doctorat. Université de Pau et des Pays de l'Adour, France, 150.
- Breese, K., Boll, M., Alt-Morbe, J., Schagger, H. et Fuchs, G. (1998).** Genes coding for the benzoyl-CoA pathway of anaerobic aromatic metabolism in the bacterium *Thauera aromatica*. *Eur. J. Biochem.* 256(1): 148-154.
- Bregnard, T. P.-A., Höhener, P., Häner, A. et Zeyer, J. (1997).** Anaerobic degradation of pristane in nitrate-reducing microcosms and enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(5): 2077–2081.
- Britton, L., (1984).** Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. In: Gibson, T.D. (Ed.), *Microbial, degradation of organic compounds*, pp. 89-129. *Marcel Dekker, New York, Basel.*
- Brown, F. G. (1992).** Microbes: the practical and environmental safe solution to production problems, enhanced production, and enhanced oil recovery. SPE 23955. *Proceedings of the*

1992 Permian Basin Oil and Gas Recovery Conference. Society of petroleum engineers, Richardson, Texas.

Brown, J. J. (2021). Microbiomes in the context of insect communities (Doctoral dissertation, Department of Zoology, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice).

Bryant, R. S. and Burchfield, T. E. (1989). Review of microbial technology for improving oil recovery. *Soc Pet Eng Reservoir Eng.* 4:151–154.

Bryant, S. L. and Lockhart, T. P. (2002). Reservoir engineering analysis of microbial enhanced oil recovery. *Soc Pet Eng Reservoir Eval Eng.* 5: 365–374.

Bundy, J.G., Paton, G.I., et Campbell, C.D. (2002). Microbial communities in different soils types do not converge after diesel contamination. *J. Appl. Microbiol.* 92 (2): 276-288.

Burland, S. et Edwards, E. (1999). Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (2): 529–533.

Cattoir, V., Denis, F., Martin, C., Ploy, M. C. et Poyart, C. (2016). Bactériologie médicale: techniques usuelles. Elsevier Health Sciences.

Cerniglia, C.E. (1984). Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv Appl Microbiol.* 30:31–71.

Cervantes, F. J., Dijksma, W., Duong-Dac, T., Ivanova, A., Lettinga, G. et Field, J. A. (2001). Anaerobic mineralization of toluene by enriched sediments with quinones and humus as terminal electron acceptors. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(10): 4471–4478. Doi: 10.1128/AEM.67.10.4471-4478.2001

Chaillan, F., Le Flèche, A., Bury, E., Phantavong, Y. H., Grimont, P., Saliot, A., & Oudot, J. (2004). Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Research in microbiology*, 155(7): 587-595.

Chen, S.H. et Aitken, M. D. (1999). Salicylate stimulates the degradation of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15. *Environ. Sci. Technol.* 33 (3): 435–439. DOI: 10.1021/es9805730

Chikere, C. B., Okpokwasili, G. C. et Chikere, B. O. (2011). Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. *3 Biotech*, 1(3) : 117-138.

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. http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/etude_de_cas_TAUW.pdf.

Colwell, R.R., Walker, J.D., Cooney, J.J. 1977. Ecological aspects of microbial degradation Compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. *Bioresource Technology*, 99.

Corre, E. 2000. Approches moléculaires de la diversité microbienne de deux environnements Culprits, problems and opportunities. *Advances in Applied Microbiology*, 66: 141-251.

Dalton, H. et Stirling D. I. (1982). Co-metabolism. *Phil. Trans. R. Soc. London B*.297 (1088):481-96.

Das, K., & Mukherjee, A. K. (2005). Characterization of biochemical properties and biological activities of biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid and non-mucoid strains isolated from hydrocarbon-contaminated soil samples. *Applied microbiology and biotechnology*, 69(2), 192-199.

Dastgheib, S. M. M., Amoozegar, M. A., Elahi, E., Asad, S., & Banat, I. M. (2008). Bioemulsifier production by a halothermophilic *Bacillus* strain with potential applications in microbially enhanced oil recovery. *Biotechnology letters*, 30(2), 263-270.

Delille, D., Coulon, F., et Pelletier, E. (2004). Effects of temperature warming during a bioremediation study of natural and nutrient-amended hydrocarbon-contaminated sub-antarctic soils. *Cold Reg Sci Technol*. 40:61–70. Doi: 10.1016/j.coldregions.2004.05.005

Demirbas, A., Alsulami, H. E., & Hassanein, W. S. (2015). Utilization of surfactant flooding processes for enhanced oil recovery (EOR). *Petroleum Science and Technology*, 33(12), 1331-1339.

Deng, D., Li, C., Ju, Q., Wu, P., Dietrich, F. L. and Zhou, Z. H. (1999). Systematic Extensive Laboratory Studies of Microbial EOR Mechanisms and Microbial EOR Application Results in changqing oilfield. Jakarta, Indonesia, SPE Publications, 54380. Des pollutions. Ecole Doctorale Sciences de l'Environnement d'Ile de France (ED129).

Díaz-Ramírez, I. J., Ramírez-Saad, H., Gutiérrez-Rojas, M., & Favela-Torres, E. (2003). Biodegradation of Maya crude oil fractions by bacterial strains and a defined mixed culture

isolated from *Cyperus laxus* rhizosphere soil in a contaminated site. *Canadian Journal of Microbiology*, 49(12), 755-761.

Diraison, M., Cobbold, P. R., Gapais, D., Rossello, E. A., & Le Corre, C. (2000). Cenozoic crustal thickening, wrenching and rifting in the foothills of the southernmost Andes. *Tectonophysics*, 316(1-2), 91-119. Doctorat en chimie analytique. Université de Pierre et Marie Curie, Paris, France, 281. Doctorat en microbiologie. Université de Bretagne Occidentale, France, 214.

Dupuis, A., Ucan-Marin, F. 2015. Analyse documentaire de la toxicologie aquatique des huiles de pétrole: un aperçu des propriétés du pétrole et de ses effets sur le biote aquatique. Document de recherche 2015/007 du MPO. *Secrétariat canadien de consultation scientifique.*, 1-63.

Durousset, M. (1999). The oil market; Le marché du pétrole.

Dzionic, A., Wojcieszynska, D., & Guzik, U. (2016). Natural carriers in bioremediation: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 23, 28-36.

Eddouaouda, k. 2012. Etude du potentiel biodégradatif de souches isolées du sol de Hassi Messaoud contaminé par du pétrole: criblage, biodégradation de HAP et production de biosurfactant. Thèse de doctorat en chimie industrielle. Université de Saad Dahlab de Blida, Algérie, 194.

Egland P.G, Pelletier D.A, Dispensa M., Gibson J. et Harwood? C.S. (1997). A cluster of bacterial genes for anaerobic benzene ring biodegradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94(12): 6484-6489.

El Fantroussi, S., & Agathos, S. N. (2005). Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation ?. *Current opinion in microbiology*, 8(3), 268-275.

Ellingsen, G., Fery-forgues, S. 1998. Application de la spectroscopie de fluorescence à l'étude du pétrole: le défi de la complexité. *Revue de l'Institut Français du Pétrole*, 2(53), 201-216.

Elshahed, M. S, et McInerney, M. J. (2001). Is interspecies hydrogen transfer needed for toluene degradation under sulfate-reducing conditions? *FEMS Microbiol. Ecol.* 35:163–169. *Energy Reviews*, 52, 1539-1558. Enhanced oil recovery. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 68, 56-64. Enhanced oil recovery-astatus report, *Journal Petroleum Technology*, 209-221

El-Sheshtawy, H. S., & Doheim, M. M. (2014). Selection of *Pseudomonas aeruginosa* for biosurfactant production and studies of its antimicrobial activity. *Egyptian journal of petroleum*, 23(1), 1-6.

Ensign, SA. (2001). Microbial metabolism of aliphatic alkenes. *Biochemistry*. 40: 5845-5853.

EPA (Environnemental Protection Agency) (1999). Use of monitored natural attenuation at superfund, rcra corrective action, and underground storage tank sites. U.S. Environmental Protection Agency Office of Solid Waste and Emergency Response Directive 9200.4-17P.

<https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-02/documents/d9200.4-17.pdf> Etudes de cas. Thèse de doctorat en géosciences. Université de Lorraine, France, 305. Extrêmes: les sources hydrothermales profondes et les réservoirs pétroliers. Thèse de fabrication. Publication de l'Institut Français du Pétrole. Edition OPHRYSS, 478 P.

Feknous, N. (2017). Essais d'isolement et d'identification des souches bactériennes à pouvoir auto-épurateur vis-à-vis des hydrocarbures. Thèse de doctorat en microbiologie. Université Badji Mokhtar d'Annaba, Algérie, 121. Field, *SPE Reservoir Engineering*, 181-188.

Fingas M. (2013). The basic of oil spill cleanup. Troisième édition, Boca Raton. CRC Press, France, 150 France, 204.

Gales, G., Chehider, N., Joulian, C., Battaglia-Brunet, F., Cayol, J-L., Postec, A., Borgomano, J., Neria-Gonzales, I., Lomans, B. P., Ollivier, B. and Alazard D. (2011). Characterization of *Halanaerocella petrolearia* gen. nov., sp. nov., a new anaerobic moderately halophilic fermentative bacterium isolated from a deep subsurface hypersaline oil reservoir. *Extremophiles* 15, 565-71.

Gao, P., Li, G., Li, Y., Li, Y., Tian, H., Wang, Y., Zhou, J. and Ma, T. (2016). An exogenous surfactant-producing *Bacillus subtilis* facilitates indigenous microbial enhanced oil recovery. *Frontiers in Microbiology* 7, 1-14.

Gaytán, I., Mejía, M.Á., Hernández-Gama, R., Torres, L.G., Escalante, C.A. Muñoz-Gentry T.J., Rensing C., et Pepper I.L. (2004). New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Crit Rev Environ Sci Technol*. 34:447-494. Doi:10.1080/10643380490452362

Gibson D.T., Mahadevan, V., Jerina, D.M., Yagi, H. et Yeh, H.J.C. (1975). Oxidation of the carcinogens benzo (a)pyrene and benz(a)anthracene to dihydrodiols by a bacterium. *Science*. 189: (4199) 295-297.

Gibson T.D. et Subramanian, V. (1984). Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. *In: Gibson, T.D. (Ed.), Microbial degradation of organic compounds*, 181-252. Marcel Dekker, New York, Basel.

Gieg, L. M., Duncan, K. E and Suflita, J. M (2008). Bioenergy Production via Microbial Conversion of Residual Oil to Natural Gas. *Appl Environ Microbiol* 74, 3022-3029.

Gieg, L., Jack, T. and Foght, J. (2011). Biological souring and mitigation in oil reservoirs. *Appl Microbiol Biotechnol* 92, 263-282.

Glazer A. N. and Nikaido H. (1998). *Microbiol Biotechnology*, Ed. W.H. FREEMAN and Camany, New York.

Gogarty, W. B., & Tosch, W. C. (1968). Miscible-type water flooding: oil recovery with micellar solutions. *Journal of Petroleum Technology*, 20(12), 1407-1414.

Goldstein R.M., Mallory L.M., et Alexander M. (1985). Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. *Appl Environ Microbiol.* 50(4): 977–983

Greenwood, N. N., (2012). *Chemistry of the Elements*. Elsevier.

Grishchenkov, V. G., Townsend, R. T., McDonald, T. J., Autenrieth, R. L., Bonner, J. S., et Boronin A. M. (2000). Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. *Process Biochem.* 35:889–896.

Gudiña, E. J., Pereira, J. F., Rodrigues, L. R., Coutinho, J. A., & Teixeira, J. A. (2012). Isolation and study of microorganisms from oil samples for application in microbial enhanced oil recovery. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 68, 56-64..

Guerin T. F. (1999). Bioremediation of phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in creosote contaminated soil using ex-situ landtreatment. *J. Hazard. Mater. B* (65):305-315.

Guibet, J. C. (1997). *Carburants et moteurs*. Tome 1 (Vol. 1). Editions Technip.

Hamamura, N., Olson, S. H., Ward, D. M., & Inskeep, W. P. (2006). Microbial population dynamics associated with crude-oil biodegradation in diverse soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 6316-6324.

Häner A., P. Höhener, et Zeyer J. (1997). Degradation of trimethylbenzene isomers by an enrichment culture under N₂O-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(3) :1171-1174

Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y., & Shutsubo, K. (1999). Petroleum biodegradation in marine environments. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 1(1), 63-70.

Hassanshahian, M., & Cappello, S. (2013). Crude oil biodegradation in the marine environments. *Biodegradation-Engineering and Technology*, 5, 102-135.

Hazen, T.C. (2010). Cometabolic bioremediation. *In: Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology* (cordoned par Kenneth N. Timmis). 2505-2514. Springer Verlag Berlin Heidelberg.

Heider J., Spormann, A. M. Beller, H. R. ET Widdel, F. (1999). Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*. 22(5): 459-473.

Heitkamp M.A., Franklin W. et Cerniglia C.E. (1988). Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2556-2565.

Hitzman, D. O. and Sperl, G. T. (1994). New microbial technology for enhanced oil Recovery and sulfide prevention and reduction. SPE/DOE 27752. *Proceedings of the 9th Symposium on Improved Oil Recovery*. Society of petroleum engineers, Richardson, Texas.

Hocine, R. Y., Ahmed, B. E. N. S. O. L. T. A. N. E., Fatiha, D. A. L. L. A. C. H. E., Rachid, D. J. I. B. A. O. U. I., & Abdelwaheb, C. H. I. B. A. N. I. (2018). Bioremédiation des sols pollués de pétrole par les micro-organismes indigènes et amélioration génétique de leur pouvoir de dégradation. Université de Mostaganem, Mostaganem.

Hue, F. 1885. Le pétrole: son histoire, ses origines, son exploitation dans tous les pays du monde. Edited by Lècène, H., Oudin, H. Californie, 307. *Hydrocarbons in anaerobic bacteria. Biodegradation*, 11, 85-105.

Ijah, U. J. J., & Antai, S. P. (2003). Removal of Nigerian light crude oil in soil over a 12-month period. *International biodeterioration & biodegradation*, 51(2), 93-99.

Ivanov, M. V., Belyaev, S. S., Borzenkov, I. A., Glumov, I. F. and Ibatullin, R. R. (1993). Additional oil production during field trials in Russia. *Dev Pet Sci* 39, 373–381.

Joffin, J. N., & Leyral, G. (2006). Microbiologie technique [Technical microbiology]. TI-Dictionnaire des techniques. 4eme édition. Bordeaux: CRDP d'aquitaine, 368.

Joshi, S., Bharucha, C., Jha, S., Yadav, S., Nerurkar, A., & Desai, A. J. (2008). Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresource technology*, 99(1), 195-199.

Joutey, N. T., Bahafid, W., Sayel, H., & El Ghachtouli, N. (2013). Biodegradation: involved microorganisms and genetically engineered microorganisms. *Biodegradation-life of science*, 1, 289-320.

Juarez Morejon, J.L. 2017. Récupération assistée du pétrole par injection de polymères hydrosolubles: nouvelle approche. Thèse de doctorat. Université de Bordeaux, France, 261.

Kalantary, R, Anoushiravan M, Esrafilil, A. Nasser, S. Ashmagh, F. R. Jorfi, S. et Ja'fari, M. (2014). Effectiveness of biostimulation through nutrient content on the bioremediation of phenanthrene contaminated soil. *Journal of Environmental Health Science & Engineering*. 12(143): 1-9. DOI 10.1186/s40201-014-0143-1

Khakifallah, Y., Madjrali, H., & Arhab, R. (2021). Caractérisation, production de biosurfactants.

Kumar, S., Kaushik, G., Dar, M. A., Nimesh, S., Lopez-Chuken, U. J., & Villarreal-Chiu, J. F. (2018). Microbial degradation of organophosphate pesticides: à review. *Pedosphere*, 28(2), 190-208.

Labrecque M. H. (2003). Etude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le Xylène. Maitrise en microbiologie agricole, Université Laval.

Langenhoff A. A. M., Brouwers-Ceiler D. L., Engelberting J. H. L., Quist J. J., Wolkenfelt J. G. P. N., Zehnder A. J. B. et Schraa G. (1997). Microbial reduction of manganese coupled to toluene oxidation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22:119–127.

Laxalde, J. 2012. Analyse des produits lourds du pétrole par spectroscopie infrarouge. Thèse de doctorat. Université de Lille 1, France, 217.

Lazar, I. (1991). MEOR field trials carried out over the world during the last 35 Years. *Dev Pet Sci* 31, 485-530.

Lazar, I., Petrisor, I. G., & Yen, T. F. (2007). Microbial enhanced oil recovery (MEOR). *Petroleum Science and Technology*, 25(11), 1353-1366.

Le Jury, D. (2016). Biodégradation des Hydrocarbures (Pétrole brut et Kérosène) par la Microflore Microbienne des Eaux de la région de Skikda (Doctoral dissertation, Université de Annaba).

Li, Q., Kang, C., Wang, H., Liu, C. and Zhang, C. (2002). Application of microbial enhanced oil recovery technique to the Daqing oilfield. *Biochem Eng J* **11**, 197–199.

Liao, Y., Geng, A., Huang, H. 2009. The influence of biodegradation on resins and asphaltenes in the Liaohe Basin. *Organic Geochemistry*, 40 (3), 312-320.

Luna, J. M., Rufino, R. D., Sarubbo, L. A., & Campos-Takaki, G. M. (2013). Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 102, 202-209.

Malo, M., Lefebvre, R., Comeau, F.A., Séjourné, S. 2015. Synthèse des connaissances portant sur les pratiques actuelles et en développement dans l'industrie pétrolière et gazière. Rapport de recherche, N°1553, Université d'Avant-garde de Québec, Canada, 127.

Maneerat S. et Kulnaree P. (2007). Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 29 (3): 783-791.

MATTEÏ Georges. (1995). Bioenergies

<https://www.gazettelabo.fr/archives/pratic/1995/2hydroc.htm>

Maudgalya, S., McInerney, M. J., Knapp, R. M., Nagle, D. P. and Folmsbee, M. M. (2005). Tertiary oil recovery with microbial biosurfactant treatment of low-permeability berea sandstone cores. SPE 94213. Proceedings of Society of Petroleum Engineers Production and Operations Symposium. Society of Petroleum Engineers, Richardson, Texas.

Mayer, E. H., Berg, R. L., Carmichael, J. D., & Weinbrandt, R. M. (1983). Alkaline injection for enhanced oil recovery-A status report. *Journal of Petroleum Technology*, 35(01), 209-221.

McInerney, M. J. and Sublette, K. L. (1997). Petroleum microbiology: biofouling, souring, and improved oil recovery. *Man. Environ. Microbiol.* Edited by Burst, T. pp. 600-607. Washington: ASM.

- McInerney, M. J., Nagle, D. P. and Knapp, R. M. (2005).** Microbially enhanced oil recovery: past, present, and future. In *Petroleum Microbiology*. Edited by Ollivier, B. and Magot, M. pp. 215–238. Washington: ASM.
- Meckenstock, R. U. (1999).** Fermentative toluene degradation in anaerobic defined syntrophic cocultures. *FEMS Microbiol. Lett.* 177:67–73.
- Meckenstock, R.U. (2000).** Anaerobic degradation of 2-methylnaphthalene by a sulfate-reducing enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (12):5329–5333.
- Meckenstock, R. U., Annweiler, E., Michaelis, W., Richnow, H. H, et Schink B. 2000.** Anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (7) :2743–2747.
- Nikolopoulou, M, et Kalogerakis, N. (2008).** Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers combined with biosurfactants and molasses. *Mar Pollut Bull.* 56:1855-1861. Doi: 10.1016/j.marpolbul.2008.07.021
- Nikolova, C, Ijaz, U. Z., et Gutierrez, T. (2020).** Use of null models to compare the assembly of northeast Atlantic bacterial community in the presence of crude oil with either chemical dispersant or biosurfactant. *bioRxiv*.
- Nunoura, T, Oida, H., Toki, T, Ashi, J, Takai, K. and Horikoshi, K. (2006).** Quantification of *mcrA* by quantitative fluorescent PCR in sediments from methane seep of the Nankai Trough. *FEMS Microbiol Ecol* **57**, 149-157
- Obayori, O. S., & Salam, L. B. (2010).** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Role of plasmids. *Of petroleum in the marine environment. Critical Reviews in Microbiology*, 4(5), 423-
- Ollivier, B., Borgomano, J., & Oger, P. (2014).** *Petroleum: from formation to microbiology. Microbial life of the deep biosphere*, 8, 161-185.
- Pantaléon, J. (1975).** Techniques bactériologiques, par JL Bourdon et N. Marchal. *Bactériologie médicale et vétérinaire. Systématique bactérienne*, par Ch. Pilet, JL Bourdon, B. Toma et N. Marchal. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 128(4), 238-240.
- Patel, J., Borgohain, S., Kumar, M., Rangarajan, V., Somasundaran, P. Sen, R. 2015.** Perspectives Pétrolière: influence des facteurs environnementaux, de la prédation et de la récurrence. *Frontiers of Microbiology*, **10**, 1-18.

Phelps C. D. et Young L. Y. (1999). Anaerobic biodegradation of BTEX and gasoline in various aquatic sediments. *Biodegradation* 10 (1): 15–25. *Polish Journal of Environmental Studies* 21(2): 471-479.

Rabus, R., Venceslau, S. S., Wöhlbrand, L., Voordouw, G., Wall, J. D. and Pereira, I. A. (2015). A post-Genomic view of the ecophysiology, catabolism and biotechnological relevance of sulphate-reducing prokaryotes. *Adv Microb Physiol* **66**, 55–32.

Rahman, K.S.M., Banat, I.M, Thahira, J, Thayumanavan, T, et Lakshmanaperumalsamy, P. (2002a). Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith, and rhamnolipid biosurfactant. *Bioresour Technol.* 81(1): 25–32.

Reiner, K. (2010). Catalase test protocol. American society for microbiology, 1-6.

RoLing, W. F, Milner, M. G, Jones, D. M, Lee, K, Daniel, F, S’annelle, R. J, & Head, I. M. (2002). Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Applied and environmental microbiology*, 68(11), 5537-5548.

Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Current opinion in biotechnology*, 13(3), 249-252. Doi:10.1016/S0958-1669(02)00316-6

Rooney-Varga, J. N, Anderson, R. T, Fraga, J. L., Ringelberg, D, et Lovley, D. R. (1999). Microbial communities associated with anaerobic benzene degradation in a petroleum-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(7): 3056–3063.

Rouf, Syed Fazole. (2007). Dissecting the role of polynucleotide phosphorylase in virulence gene expression in *Salmonella enterica*. 10.13140/RG.2.1.4754.9846.

Sales da Silva, I. G., Gomes de Almeida, F. C., Padilha da Rocha e Silva, N. M., Casazza, A. A., Converti, A., & Asfora Sarubbo, L. (2020). Soil bioremediation: Overview of technologies and trends. *Energies*, 13(18), 4664.

Sauret C. (2011). *Ecologie des communautés bactériennes marines soumises à une pollution*

Scragg A. (2005). *Environnemental Biotechnology* Ed. Oxford, New York.

Sen, R. (2008). Biotechnology in petroleum recovery: the microbial EOR. *Progress in Energy and Combustion Science* **34**, 714-724.

Shahrokh, S, et Emtiazi, G. (2009). Toxicity and unusual biological behavior of nanosilver on gram positive and negative bacteria assayed by microtiter-plate. *Eur. J. Biol. Sci*, 1(3), 28-31.

Shutang, G, Huabin, L, Zhenyu, Y, Pitts, M,J, Surkalo, H, Wyatt, K. 1996. Singer, A. C., van der Gast, C, J, et Thompson, I. P. (2005). Perspectives and vision for strain selection in bioaugmentation. *Trends Biotechnol.* 23(2): 74-77.

Soltani, M. 2004. Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram Solutions, *Journal of Petroleum Technology*, 1407-1414

Spormann, A, et Widdel, F, (2000). Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation.* 11(2-3): 85-105.

Spormann, A, M, Widdel, F, 2001. Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other strains isolated from hydrocarbon-contaminated soil samples. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, 192-199.

Stroud, J,L, Paton, G, I et Semple, K,T. (2007). Microbe–aliphatic hydrocarbon interactions in soil; implications for biodegradation and bioremediation. *J Appl Microbiol*, 102:1239- 1253.

Sugai, S, F, Lindstrom, J,E, et Braddock, J, F (1997). Environmental influences on the microbial degradation of Exxon Valdez oil on the shorelines of Prince William Sound, Alaska. *Environ Sci Technol.* 31:1564–1572

Thomas, S, 2008. Enhanced oil recovery-an Overview. *Oil Gas Science and Technology*, **63**,

Thompson, I, P, Van der Gast, C, J, Ciric, L, et Singer, A, C (2005). Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environ Microbiol.* 7(7): 909–915. Doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00804.x

Updegraff, D, M (1957). Recovery of petroleum oil. U.S. Patent No. 2.807.570.

Vadie, A, A, Stephens, J, O, et Brown, L, R (1996). Utilization of Indigenous Microflora in Permeability Profile Modification of Oil Bearing Formations. pp. 459-471. SPE/DOE Improved Oil Recovery Symposium, Tulsa, Oklahoma, SPE Publications, 35448.

Van Elsas, J, D, Jansson, J, K et Trevors, J, K (2007). Modern soil microbiology, 2nd edn. CRC Press, New York.

- Van Hamme, Jonathan, D, Ajay Singh, et Owen, P (2003).** Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*. 67(4): 503–549 DOI: 10.1128/MMBR.67.4.503–549.2003
- Van Veen, J, Van Overbeek, L. S, et Van Elsas, J, D (1997).** Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 61(2): 121-135.
- Varjani, S, J, et Upasani, V, N (2017).** A new-look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 120:71–83.
- Vinas, M, Sabaté, J, Espuny, M, J, et Solanas A, M (2005).** Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of Heavily creosote-contaminated soil. *Appl Environ Microbiol.* 71(11): 7008-7018.
- Volk, H, et Hendry, P (2010).** 3^o Oil recovery: fundamental approaches and principles of microbially enhanced oil recovery. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Edited by Timmis, K. N. Berlin: Springer. 2727-2738.
- Wang, J, et Chen, C (2006).** Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Biotechnology advances*, 24(5), 427-451.
- Wang, J, Ting, M, Zhao, L, Lv, J, Li, G, Zhang, H, Zhao, B, Liang, F, et Liu, R (2008).** Monitoring exogenous and indigenous bacteria by PCR-DGGE technology during the process of microbial enhanced oil recovery. *J Ind Microbiol Biotechnol* **35**, 619–628.
- Wang, Q., Fang, X., Bai, B., Liang, X., Shuler, P. J., Goddard, W. A. and Tang, Y. (2007).** Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. *Biotechnol Bioeng.* **98**, 842–853.
- Wauquier, J. P. (1998).** Raffinage du pétrole (Le). Tome 1. Pétrole brut. Produits pétroliers. Schémas de fabrication (Vol. 1). Editions Technip.
- Welte, D. H., & Tissot, P. B. (1984).** Petroleum formation and occurrence. Springer-verlag.
- Widdel F. et Rabus, R. (2001).** Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*.12:259-276.

Wren, B.A., Venosa, A.D. (1996). Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Canadian Journal of Microbiology*, 24, 252-258.

Yalaoui-Guellal, D. (2017). Production des biosurfactants par des souches hydrocarbonoclastes isolées des sédiments du bassin versant de la Soummam de Bejaia, Algérie, Thèse de Doctorat, Université de Bejaia, 143.

Yalaoui-Guellal, D., Brahmi, F., Touati, A., De Champs, C., Banat, I. M., & Madani, K. (2018). Production of Biosurfactants by Hydrocarbons degrading bacteria isolated from Soummam watershed Sediments of Bejaia in Algeria. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 37(1), 189-195.

Yalaoui-Guellal, D., Fella-Temzi, S., Djafri-Dib, S., Brahmi, F., Banat, I. M., & Madani, K. (2020). Biodegradation potential of crude petroleum by hydrocarbonoclastic bacteria isolated from Soummam wadi sediment and chemical-biological proprieties of their biosurfactants. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 184, 106554.

Yañez-Ocampo, G., Somoza-Coutiño, G., Blanco-González, C., & Wong-Villarreal, A. (2017). Utilization of agroindustrial waste for biosurfactant production by native bacteria from chiapas. *Open agriculture*, 2(1), 341-349.

Youssef, N., Elshahed, M. S. and McInerney, M. J. (2009). Microbial processes in oil fields: culprits, problems, and opportunities. *Adv Appl Microbiol* **66**, 141-251. Edited by Allen, I. Laskin, S. S and Geoffrey, M. G. Academic Press.

Youssef, N., Elshahed, M. S. and McInerney, M. J. (2009). Microbial Processes in Oil Fields: Culprits, Problems, and Opportunities. In *Adv Appl Microbiol*, **Vol. 66**, edited by Allen I. Laskin S. S and Geoffrey M. G. pp. 141-251. Academic Press.

Zhang, X., et Young L. Y. (1997). Carboxylation as an initial reaction in the anaerobic metabolism of naphthalene and phenanthrene by sulfidogenic consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(12):4759–4764.

Zobell, C. E. (1946). Bacteriological process for treatment of fluid-bearing earth formations. American, Petroleum Inst, United States

Annexes

Annexe N°1 : Matériels et équipements utilisés.**Liste des appareils**

- Agitateur-plaque chauffante : mélange.
- Autoclave ou Etuve : stérilisation.
- Bain marie : chauffage.
- Balance analytique : pesée.
- Bec bunsen : stérilisation.
- Centrifugeuse : séparation solide – liquide.
- Hotte chimique : protection.
- Incubateur orbital : agitation.
- Ph mètre : pH.
- Réfrigérateur : conservation.
- Vortex : agitation.
- Tamiseur

Liste des petits matériels et verrerie

- Bêchers
- Boîtes de pétri
- Boîtes en verre
- Epprouvettes de 100 ml
- Erlenmeyer de 1000ml
- Flacons de 250 ml
- Micropipettes de 20 μ l, 200 μ l, 1ml
- Papier absorbant
- Papier aluminium
- Pipette pasteur
- Tube conique
- Tube à essai
- Spatule

Annexe 02 : Les milieux de culture**Milieu Salé Minéral (MSM)**

NaCl.....	30 g
KH ₂ PO ₄	2, 0 g
NH ₄ NO ₃	1, 0 g
Na ₂ HPO ₄	3.0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.7 g
Solution de traces d'éléments...	1.0 ml
Eau distillée	1000 ml
Ph =	7,2 \pm 0,2

Milieu de gélose nutritif (g/l)

Poudre de gélose nutritif.....	28g
Eau distillée	1000 ml

Milieu bouillon (BN)

Extrait de viande.....	3g
Peptone.....	5g
NaCl.....	5g
Eau distillée.....	1000ml
Ph final	7.3 \pm 0.2

Résumé

L'objectif de notre travail est d'utiliser les bactéries hydrocarbonoclastes dans la récupération de pétrole, et mesurer le potentiel de sa biodégradation par les souches bactériennes (S1, S2, S3, S4, S5, S12). Ce travail consiste à mesurer la biodégradation, la biomasse et l'indice d'émulsification (E24). Le test de MEOR qui consiste à mesurer l'efficacité de la récupération de pétrole à partir de sol, sable et de suivre la production de BS. Le poids sec de biosurfactant le plus élevé était synthétisé après 96h par la souche S5 qui a produit $2,97 \pm 0,0036$ g /L de biosurfactant brut, suivi par la souche S2 ($2,24 \pm 0,0014$ g /L). L'activité d'émulsification des souches S5, S12 et S3 utilisées manifestent productivement le biosurfactant avec un index d'émulsification de (58,09 56,42 55,20%) respectivement. Des rendements importants en biomasse enregistrés par le consortium bactérien mixte des souches par une valeur de poids sec de $5,73 \pm 0,04$ mg/ml suivi par la souche S12 qui était de $3,39 \pm 0,3$ mg/ml. Toutes les souches et même le consortium mixte a atteint le maximum (> 90 %) au 4ème jour d'incubation dans le test de biodégradation de pétrole. Le pourcentage de la récupération à partir de sable atteint le maximum avec les souches S5, S12 avec des valeurs $36,41 \pm 2,001\%$ $35 \pm 2,12$ respectivement. Ces valeurs étaient supérieures au standard utilisé (SDS 1%) qui a donné un taux de $9,16 \pm 0,48\%$. À partir de sol les souches deux S4, S1 enregistrèrent des valeurs de $30,34 \pm 1,19\%$ $9,62 \pm 0,14\%$ respectivement. Ces valeurs étaient supérieures au standard utilisé (SDS 1 %) qui a donné un taux de $6,02 \pm 0,131$. La réalisation de ces tests a montré d'un part une capacité des souches appliquées pour utiliser le pétrole comme seule source de carbone à fin de dégrader et d'autre part une capacité de récupérer le pétrole piégé.

Mots clés : Récupération assistée de pétrole par procédé microbien, Pétrole, Hydrocarbonoclastes, Biosurfactant.

Abstract

The objective of our work is to use hydrocarbonoclastic bacteria in oil recovery, and measure the potential of its biodegradation by bacterial strains (S1, S2, S3, S4, S5, and S12). This work consists in measuring biodegradation, biomass and emulsification index (E24). The MEOR test which consists of measuring the efficiency of oil recovery from soil, sand. And track the production of BS. The highest dry weight of biosurfactant was synthesized after 96h by strain S5 which produced 2.97 ± 0.0036 g/L of crude biosurfactant, followed by strain S2 (2.24 ± 0.0014 g/L). The emulsification activity of the S5, S12 and S3 strains used productively manifest the biosurfactant with an emulsification index of (58.09 56.42 55.20%) respectively. High biomass yields recorded by the bacterial consortium of mixed strains by a dry weight value of 5.73 ± 0.04 mg/ml followed by the S12 strain which was 3.39 ± 0.3 mg/ml. All strains and even the mixed consortium reached the maximum (> 90%) on the 4th day of incubation in the oil biodegradation test. The percentage of recovery from sand reaches the maximum with strains S5, S12 with values $36.41 \pm 2.001\%$ 35 ± 2.12 respectively. These values were above the standard used (SDS 1%) which gave a rate of $9.16 \pm 0.48\%$. From soil two S4 strains, S1 record values of $30.34 \pm 1.19\%$ $9.62 \pm 0.14\%$ respectively. These values were above the standard used (SDS 1%) which yielded a rate of 6.02 ± 0.131 . The performance of these tests showed on the one hand a capacity of the strains applied to use oil as the only source of carbon for the purpose of degrading and on the other hand a capacity to recover the trapped oil.

Keywords: MEOR (Microbial Enhanced Oil Recovery), Petroleum, Hydrocarbonoclasts, Biosurfactant.

ملخص

الهدف من عملنا هو استخدام البكتيريا الهيدروكربونية في استعادة الزيت، وقياس إمكانيات التحلل البيولوجي بواسطة السلالات البكتيرية (S1، S2، S3، S4، S5، S12). ويتألف هذا العمل من قياس مؤشر التحلل الأحيائي والكتلة الأحيائية والاستحلاب (E24). اختبار MEOR الذي يتكون من قياس كفاءة استعادة النفط من التربة، الرمل، وتتبع إنتاج B. تم تصنيع أعلى وزن جاف من خافض التوتر السطحي الحيوي بعد 96 ساعة بواسطة سلالة S5 التي تنتج $2,97 \pm 0,0036$ غرام/لتر من خافض التوتر البيولوجي الخام، تليها سلالة S2 ($2,24 \pm 0,0014$ g/L). ويظهر نشاط استحلاب سلالات S5 و S12 و S3 المستخدمة بشكل منتج عامل التوتر السطحي الحيوي بمؤشر استحلاب (58,09 56,42 55,20%) على التوالي. غلات الكتلة الحيوية العالية التي سجلها الاتحاد البكتيري للسلالات المختلطة بقيمة وزن جاف قدرها $5,73 \pm 0,04$ ملغم/مل تليها سلالة S12 التي كانت $3,39 \pm 0,3$ ملغم/مل. وصلت جميع السلالات وحتى الاتحاد المختلط إلى الحد الأقصى (> 90%) في اليوم الرابع من الحضارة في اختبار التحلل البيولوجي للزيت. تصل النسبة المئوية للاسترداد من الرمال إلى الحد الأقصى مع السلالات S5، S12 مع القيم $36,41 \pm 2,001\%$ $35 \pm 2,12$ على التوالي. كانت هذه القيم أعلى من المعيار المستخدم (SDS 1%) الذي أعطى معدل $9,16 \pm 0,48\%$. من سلالتين من التربة S4، سجل S1 قيم $30,34 \pm 1,19\%$ $9,62 \pm 0,14\%$ على التوالي. كانت هذه القيم أعلى من المعيار المستخدم (SDS 1%) والتي أسفرت عن معدل $6,02 \pm 0,131$ لتر. أظهر أداء هذه الاختبارات من ناحية قدرة السلالات المطبقة لاستخدام الزيت كمصدر وحيد للكربون لغرض التحلل ومن ناحية أخرى القدرة على استعادة الزيت المحاصر في التربة.

الكلمات المفتاحية: استعادة الزيت المعززة عن طريق العملية الميكروبية، البترول، المحاليل الهيدروكربونية، خافض التوتر السطحي الحيوي.