

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE ET MICRBIOLOGIE



THESE

Présentée par

M. BELAHMADI Mohamed Seddik Oussama

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE :

DOCTORAT en SCIENCES BIOLOGIQUES

Option : Microbiologie Appliquée

THEME

Etude d'un écosystème aquatique pollué par les rejets industriels de la raffinerie pétrolière de la wilaya de Skikda et utilisation des microorganismes isolés à partir de cet écosystème pour l'élimination d'HAP contenus dans ces rejets

Devant le jury composé de :

ALI-AHMED SADOUDI Djamila	Professeur	Univ. De Tizi-Ouzou	Présidente
HOUHAMDI Moussa	Professeur	Univ. Guelma	Directeur de thèse
HOUALI Karim	Professeur	Univ. De Tizi-Ouzou	Co-Directeur de thèse
METAHRI Mohammed Said	MCA	Univ. De Tizi-Ouzou	Examineur
BOUMENDJEL Mahieddine	MCA	Univ. Annaba	Examineur
BARA Mouslim	MCA	Univ. Guelma	Examineur

Année : 2020/2021

« Une personne qui n'a jamais commis d'erreurs n'a jamais tenté d'innover. »

Albert Einstein

Dédicace

A la mémoire de mes parents et mes grands-parents...,

A mon épouse Meriem et mes deux adorables enfants Acef et Aksil

A ma sœur Asma

A tous ceux qui me sont chers

Remerciements

Louange à Dieu qui m'a donné l'esprit, le courage et l'endurance pour terminer ce travail.

J'exprime ma vive gratitude à Monsieur **HOUHAMDI M.** Professeur à l'Université 8 Mai 1945 de Guelma et à Monsieur **HOUALI K.** Professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou d'avoir dirigé ce travail durant toutes ces années et pour leurs aide et conseils.

Mes remerciements s'adressent également à Madame **ALI-AHMED SADOUDI D.** Professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou qui me fait l'honneur de présider le jury.

Je remercie également Monsieur **METAHRI M. S.** Maître de conférence A à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie sincèrement Monsieur **BOUMENDJEL M.** Maître de conférences à l'Université Badji Mokhtar d'Annaba d'avoir accepté de faire partie de ce Jury.

Mes remerciements s'adressent aussi à Monsieur **BARA M.** Maître de conférence A à l'Université 8 Mai 1945 de Guelma d'avoir accepté de juger ce travail.

Enfin, je remercie tous les collègues et amis qui ont contribué de prêt ou de loin à la réalisation de ce travail, surtout mon très cher ami et collègue **Dr. ABDESSEMED A. "Moussadek"**.

LISTE DES FIGURES

Synthèse Bibliographique

- Fig. 1 : Diagramme conceptuel des processus physiques et écologiques qui surviennent après un déversement d'hydrocarbures pétroliers dans les eaux de surface..... (p4)
- Fig. 2 : Structure moléculaire des HAP considérés comme prioritaires par US-EPA..... (p9)
- Fig. 3 : Schéma indicatif de l'attaque du Benzo (a) Pyrène par *Mycobacterium*..... (p16)
- Fig. 4 : Proposition de dégradation du pyrène par *Mycobacterium* sp. Souche KR2..... (p18)
- Fig. 5 : Voie de dégradation fongique du phénanthrène en utilisant *Irpex lacteus*..... (p20)
- Fig. 6 : Voie de biotransformation anaérobie proposée du phénanthrène par les bactéries sulfato-réductrices..... (p23)
- Fig. 7. : Voies métaboliques de biodégradation des HAP..... (p24)

Matériel et méthodes

- Fig. 8 : Localisation de l'industrie des raffineries de pétrole de Skikda et des sites d'échantillonnage..... (p32)
- Fig. 9 : Spectre UV-Visible des trois HAP..... (p38)
- Fig. 10 : Déroulement de la PCR dans le Thermocycleur..... (p44)
- Fig. 11 : plaque d'électrophorèse..... (p45)
- Fig. 12 : Migration de l'ADNr 16s sur gel d'agarose..... (p46)
- Fig. 13 : Photo du Séquenceur d'ADN..... (p47)
- Fig. 14 : Chromatogramme des séquences d'ADNr 16S..... (p48)

Résultats et Discussion

- Fig. 15 : Variations spatio-temporelle des teneurs des HCT, Anthracène, Pyrène and Benzo (a) pyrène dans l'eau..... (p60)
- Fig. 16 : Analyse en Composants Principaux (ACP) paramètres physico-chimiques, la charge microbienne et les concentrations d'hydrocarbures dans l'eau..... (p63)
- Fig. 17 : Variations spatio-temporelle des teneurs des HCT, Anthracène, Pyrène and Benzo (a) pyrène dans les sédiments..... (p65)
- Fig. 18: Analyse en composants principaux (ACP) du THC, des concentrations de HAP, des propriétés physico-chimiques et de la charge microbienne dans les sédiments..... (p68)
- Fig. 19 : Régression linéaire entre l'eau et les sédiments pour les concentrations des HCT et des HAP..... (p70)
- Fig. 20: Migration de L'ADNr 16S sur gel d'agarose..... (p72)
- Fig. 21 : Arbre phylogénétique des bactéries isolées durant la saison d'Automne..... (p80)
- Fig. 22 : Arbre phylogénétique des bactéries isolées durant la saison d'Hiver..... (p80)

Fig. 23 : Arbre phylogénétique des bactéries isolées durant la saison de Printemps.....	(p81)
Fig. 24 : Arbre phylogénétique des bactéries isolées durant la saison d'Eté.....	(p81)
Fig. 25 : Les deux micro-algues isolées et cultivées sur milieu BG11 ; A : <i>Chlorella</i> , B : <i>Anacystis</i>	(p83)
Fig. 26 : Aspect microscopique des deux espèces de micro-algues (x700) ; A : <i>Chlorella</i> , B : <i>Anacystis</i>	(p83)
Fig. 27 : Adaptation des bactéries à la dégradation des HAP ; émulsifiassions du pétrole et production de biomasse.....	(p85)
Fig. 28 : Cinétique de dégradation de différentes concentrations de du pyrène par un consortium bactérien isolé de la zone estuaire dans 40 ml de MSM.....	(p87)
Fig. 29 : Changement de la couleur du milieu de culture.....	(p87)
Fig. 30 : Cinétique de dégradation abiotiques des différentes concentrations de du pyrène...	(p89)
Fig. 31 : Densité cellulaire des différentes concentrations de dégradation du pyrène en utilisant un consortium bactérien isolé de la zone estuaire dans 40 ml de MSM.....	(p90)

LISTE DES TABLEAUX

Synthèse Bibliographique

Tableau 1. Propriétés physico-chimiques des 16 HAP prioritaires..... (p8)

Matériel et méthodes

Tableau 2: Localisation des sites d'échantillonnage..... (p30)

Tableau 3: Flux de gradient de phase mobile avec composition et temps..... (p38)

Tableau 4 : Composition chimique de milieu d'isolement des micro-algues..... (p41)

Tableau 5 : Conditions de la PCR pour l'amplification..... (p44)

Tableau 6 : Conditions de la PCR pour le séquençage..... (p46)

Tableau 7: Composition du milieu BHMS..... (p49)

Résultats et Discussion

Tableau 8 : Paramètres physico-chimiques de l'eau..... (p51)

Tableau 9 : Paramètres physico-chimiques des sédiments..... (p57)

Tableau 10 : Charge Bactérienne dans l'eau et les sédiments..... (p58)

Tableau 11 : Matrice de corrélation de Spearman (n-1) entre les paramètres de l'eau ($p < 0.05$)..
(p64)

Tableau 12 : Matrice de corrélation de Spearman (n-1) entre les paramètres des sédiments
($p < 0,05$).....(p69)

Tableau 13 : Espèces bactériennes isolées et identifiées à partir des différentes stations de
prélèvement durant les quatre saisons..... (p73)

Sommaire

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION.....	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. Pollution des milieux aquatiques.....	3
1.1.Les éléments nutritifs.....	3
1.2.Les métaux lourds.....	3
1.3.Les polluants organiques	3
1.3.1. Hydrocarbures pétroliers.....	3
1.3.1.1.Nature des hydrocarbures pétroliers.....	3
1.3.1.2.Comportement des hydrocarbures pétroliers dans l'eau de surface.....	4
➤ L'évaporation.....	5
➤ La dissolution.....	5
➤ La dispersion naturelle.....	5
➤ L'émulsifiassions.....	6
➤ La photo-oxydation.....	6
➤ La sédimentation.....	6
1.3.1.3.Effets des hydrocarbures pétroliers dans le milieu aquatique.....	6
2. Raffinerie de Skikda.....	7
3. Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP).....	7
3.1.Définition.....	7
3.2.Propriétés physico-chimiques.....	8
3.3.Propriétés chimiques.....	9
3.4.Sources des HAP.....	10
3.5.Effets des HAP.....	11
3.5.1. Effet sur la santé humaine.....	11
3.5.2. Effet sur le milieu aquatique.....	12
3.6.Données toxicologiques des HAP.....	12
4. Devenir des HAP dans l'environnement.....	13
5. La dégradation des HAP.....	13
5.1. Dégradation abiotique	13
5.1.1. Solubilisation.....	14

Sommaire

5.1.2. Evaporation.....	14
5.1.3. Emulsification.....	14
5.1.4. Photo-oxydation.....	14
5.1.5. Sédimentation	15
5.2.Dégradation biotique ou biodégradation.....	15
5.2.1. Biodégradation aérobie.....	15
5.2.1.1. Biodégradation des HAP par les bactéries.....	17
5.2.1.2.Biodégradation des HAP par les Champignons.....	19
5.2.1.3.Biodégradation des HAP par les Algues.....	21
5.2.2. Dégradation anaérobie.....	22
6. Activités enzymatiques impliquées dans la biodégradation des HAP.....	24
7. Mode d'application de la bioremédiation.....	26
7.1.Bioremédiation ex-situ.....	26
7.2. Bioremédiation In-Situ.....	27
8. Facteurs influant sur le taux de biodégradation des HAP.....	27
8.1. Facteurs environnementaux.....	29
8.2. Biodisponibilité.....	29

MATERIEL ET METHODES

❖ Première partie : Caractérisation physicochimique et Bactériologique.....	30
1. Description de la zone d'étude.....	30
2. Prélèvement des échantillons.....	30
3. Paramètres physicochimiques.....	31
3.1. Eau.....	31
3.2. Sédiments.....	32
3.2.1. Conductivité électrique (CE) et pH.....	32
3.2.2. Dosage de la matière organique.....	32
3.2.3. Dosage du phosphore.....	33
4. Dénombrement de flore totale aérobie mésophile FTAM.....	34
5. Dosage des hydrocarbures.....	35
5.1. Hydrocarbures totaux (HCT).....	35
5.2. Hydrocarbures Aromatiques polycycliques (HAP).....	36
5.3. Spectres UV-Visible des HAP.....	37
5.4. Etablissement des courbes d'étalonnages des HAP.....	38
6. Analyse statistique.....	38

Sommaire

❖ Deuxième Partie : Identification moléculaire des souches microbiennes.....	39
1. Isolement et repiquage des souches bactériennes.....	39
2. Extraction de l'ADN bactérien.....	39
3. Extraction d'ADN génomique des micro-algues.....	40
3.1. Isolement des micro-algues.....	40
3.2. Extraction d'ADN génomique.....	41
4. Mesure de la concentration et la pureté de l'ADN Génomique.....	42
5. PCR pour les bactéries et micro-algues.....	42
6. Purification à partir de produit PCR.....	43
7. Electrophorèse.....	44
8. Séquençage.....	45
8.1. PCR pour le séquençage.....	45
8.2. Séquençage.....	45
8.3. Correction et reconstitution des séquences.....	47
8.4. Recherche de similarités.....	47
8.5. Construction d'arbres phylogénétiques.....	47
❖ Troisième partie : Suivi de la dégradation du pyrène.....	48
1. Choix de du substrat.....	48
2. Milieux de culture.....	48
3. Croissance dans milieu minimum avec du pétrole brut.....	48
4. Dégradation du Pyrène.....	49
5. Témoins et contrôle.....	49
6. Suivi de l'évolution de la biomasse.....	49
7. Suivi de la disparition du substrat.....	49
8. Extraction et dosage du pyrène	49
9. Analyses statistiques.....	50
10. Isolement et identification de souches microbiennes pouvant utiliser le Pyrène comme seule source de carbone et d'énergie	50

RESULTATS ET DISCUSSION

❖ Première partie : Paramètres physico-chimiques et microbiologiques de l'écosystème étudié.....	51
1. Paramètres physico-chimiques de l'eau.....	51
• Température.....	52
• pH.....	52

Sommaire

• Conductivité.....	52
• Oxygène dissous (OD).....	53
• Salinité.....	54
• Potentiel d'oxydo-réduction.....	54
• Total des Solides Dissous (TDS).....	55
• Matières en suspension (MES).....	55
2. Paramètres physico-chimiques des sédiments.....	55
• pH.....	55
• Matière organique.....	56
• Conductivité électrique.....	56
• Phosphore assimilable.....	56
3. Charge microbienne.....	58
4. Concentrations HCT, Anthracène, Pyrène and Benzo (a) pyrène dans l'eau.....	59
• Effet de la saison.....	61
• Effet de la station.....	61
• Analyse en Composants Principaux (ACP).....	62
• Test de corrélation.....	63
5. Concentrations HCT, Anthracène, Pyrène and Benzo (a) pyrène dans les sédiments.....	64
• Effet de la saison.....	66
• Effet de la station.....	66
• Analyse en Composants Principaux (ACP).....	67
• Test de corrélation.....	68
6. Régression linéaire.....	69
❖ Deuxième partie : Identification microbienne.....	71
1. Identification moléculaire.....	71
1.1. Espèces bactériennes.....	73
1.2. Construction d'arbres phylogénétiques.....	79
1.3. Microalgues.....	82
❖ Troisième partie : Suivi de la dégradation du Pyrène.....	85
1. Cinétique de biodégradation du Pyrène.....	85
1.1. Début de la cinétique biodégradation.....	85
1.2. Fin de la cinétique de biodégradation.....	87
2. Effet de la concentration de la molécule sur la biodégradation.....	88

Sommaire

3. Témoin et contrôle.....89

4. Evolution de la biomasse.....90

CONCLUSION GENERALE.....92

RESUME

ABSTRACT

ملخص

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Le développement technologique de la société humaine a considérablement augmenté les besoins en énergie. Le pétrole est la principale source d'énergie pour l'industrie et la vie quotidienne. Il s'agit d'un mélange de composés chimiques fabriqués principalement à partir d'hydrogène et de carbone et appelés hydrocarbures (**Ashiru et Ogundare, 2019**). De nos jours, la contamination résultant des activités liées à l'industrie pétrochimique et au processus de raffinage du charbon devient un problème environnemental sérieux en raison de leurs eaux usées, qui contiennent couramment des substances considérées comme des polluants organiques persistants (POP) tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), phénols, benzène, toluène, éthylbenzène et xylène (BTEX) (**Mozo et al., 2010**). Ces polluants atteignent l'eau de mer et les sédiments de différentes manières, notamment l'épuisement des déchets, les déversements accidentels d'hydrocarbures pendant le transport, les dépôts d'effluents municipaux et industriels (**Dhananjayan et al., 2012**). Les hydrocarbures sont des polluants environnementaux persistants en raison de leur nature récalcitrante à la biodégradation, à la bioaccumulation dans l'environnement et aux immenses effets sur la santé associée à leur exposition (**Ganesh et al., 2014**).

Les POP, en particulier les HAP, couvrent un large éventail de propriétés pertinentes pour l'environnement, y compris une faible volatilité et solubilité dans l'eau (**Arruda-Santos et al., 2018**). Ce sont généralement des composés toxiques et certains d'entre eux présentent un potentiel carcinogène, génotoxique et / ou mutagène pour plusieurs organismes et ils peuvent être transportés sur de longues distances et se bioaccumuler dans la chaîne alimentaire où peuvent atteindre des concentrations élevées dans les organismes vivants (**Ozcan et Aydin, 2009 ; Ping et al., 2011 ; Moscoso et al., 2012 ; Khairy et al., 2014 et Rota et al., 2014**).

Outre la cancérogénicité et la mutagénicité, les HAP ont également été signalés comme étant à l'origine de maladies cardiovasculaires (**Xu et al., 2010 et Clark et al., 2012**) d'asthme et d'autres maladies respiratoires (**Jung et al., 2012 et Rosa et al., 2011**), les malformations congénitales (**Langlois et al., 2013**) et d'autres maladies comme les toxicités rénales, neurologiques, immunologiques, reproductives et développementales chez les humains et les animaux (**Visciano et al., 2008**).

La majorité des HAP pourraient être introduits dans le milieu aquatique comme les rivières, les lacs, les réservoirs et les estuaires par le biais d'apports anthropiques. Ils pourraient également affecter le biote aquatique, ainsi que la santé de la faune et des humains via la chaîne alimentaire (**Ewerthon Santos et al., 2018**). Plusieurs études ont indiqué que les environnements les plus sensibles aux activités anthropiques sont les zones côtières, y compris les estuaires, et

ont souvent été signalés comme contaminés par les HAP (**Lemos et al., 2014** et **Maciel et al., 2015**).

En Algérie, il existe cinq raffineries de pétrole avec une capacité de production totale de 652 500 barils par jour (BPD). La raffinerie de Skikda, qui s'étale sur 183 hectares, produit plus de pétrole que les quatre autres raffineries. Il est également classé première en Afrique avec 352.700 BPD et troisième au monde (**Carpenter et Kostianoy, 2019**). En raison de l'emplacement de cette raffinerie sur la zone côtière de la région de Skikda (Algérie), les rejets des eaux usées constituent un risque de pollution important en mer Méditerranée et le devenir environnemental des hydrocarbures totaux et des HAP contenus dans leurs eaux usées est très préoccupant.

Les objectifs de cette étude sont : **(1)** Effectuer une évaluation et un suivi spatio-temporels des concentrations de THC et de trois HAP (anthracène, pyrène et benzo (a) pyrène) dans deux compartiments différents (eau et sédiments) de l'écosystème aquatique exposé au rejet de la raffinerie de pétrole. **(2)** Réalisation d'une caractérisation physico-chimique et microbienne de l'écosystème aquatique qui entoure la raffinerie de pétrole et de leurs effets sur le comportement et le devenir du THC et des HAP entre les compartiments de l'écosystème. **(3)** les effets saisonniers et locaux sur les paramètres microbiens physico-chimiques et la distribution du THC et des HAP. **(4)** Caractérisation microbiologique des espèces bactériennes et micro-algues existantes dans les différentes stations d'échantillonnage durant les quatre saisons. **(5)** Faire le suivi de la dégradation du Pyrène par les bactéries isolées et déterminer les souches les plus performantes. **(6)** Étudier l'effet de de la concentration du Pyrène sur le processus de biodégradation et la production de biomasse.

1. Pollution des milieux aquatiques

Les écosystèmes aquatiques sont souvent soumis à une détérioration résultant des rejets urbains ou agricoles et surtout industriels, entraînant l'apport d'un grand nombre de polluants. Les polluants ayant une faible solubilité dans l'eau, dans les conditions normales, demeurent prédominant dans les matières en suspension et dans les sédiments qui par la suite deviennent des réserves de composés toxiques (**Ramaroson, 2008**). Les contaminants à l'origine de cette pollution sont généralement classés en trois grands groupes : les éléments nutritifs, les polluants minéraux et les polluants organiques.

1.1. Les éléments nutritifs

Il s'agit essentiellement du phosphore et des composés azotés qui constituent un véritable engrais pour les plantes aquatiques. Ces éléments sont indispensables à la vie, mais la modification de leurs stocks dans les milieux aquatiques par des rejets d'origines industrielles, agricoles et urbaines engendre des dysfonctionnements d'ordre écologique dont le plus fréquent est la mise en place ou l'accélération du processus d'eutrophisation.

1.2. Les métaux lourds

Les éléments métalliques sont généralement présents dans le milieu naturel à l'état de traces mais leurs concentrations n'ont cessé de croître à la suite des activités anthropiques. Les polluants métalliques sont principalement présents dans les déchets industriels et urbains, ainsi que dans les eaux provenant de l'activité agricole. Les métaux lourds représentent un groupe important de dangereux contaminants souvent trouvés surtout dans les eaux usées industrielles (**Kratochvil et Volesky, 1998**). Les métaux lourds, composés stables et hautement persistants, sont des contaminants de l'environnement qui peuvent être accumulés et transférés aux organismes supérieurs des réseaux trophiques entraînant de sérieux problèmes écologiques et de santé publique (**De Forest et al., 2007 et Croteau et al., 2005**).

1.3. Les polluants organiques

Les polluants organiques présentant un grand danger sur les écosystèmes aquatiques sont les Persistent Polluants Organiques (POPs). Parmi eux, on trouve les hydrocarbures pétroliers.

1.3.1. Hydrocarbures pétroliers

1.3.1.1. Nature des hydrocarbures pétroliers

Le pétrole est composé essentiellement d'hydrocarbures – molécules constituées d'atomes de carbone (de 82 à 87 %) et d'hydrogène (de 11 à 15 %) et en quantité moindre, des composés organiques contenant du soufre (0 à 8 %), de l'azote (de 0 à 1 %) ou de l'oxygène (de

0 à 0,5 %) (**American Petroleum Institute, 1999**). Certains métaux peuvent également être associés au pétrole. L'aluminium, le cuivre, le nickel, le vanadium et le chrome seraient en plus fortes concentrations dans les pétroles lourds, alors que le mercure serait plus concentré dans les pétroles légers. Le pétrole brut et les produits pétroliers issus du raffinage contiennent, en proportions variables, des alcanes et des hydrocarbures aromatiques monocycliques et polycycliques. Les produits raffinés contiennent également des alcènes, alors que ceux-ci ne sont pas présents en quantité appréciable dans le pétrole brut. Quant aux alcynes, ils sont peu associés au pétrole (**Depuis et Ucan-Marin, 2015**).

1.3.1.2. Comportement des hydrocarbures pétroliers dans l'eau de surface

Lors d'un déversement dans le milieu aquatique, le devenir du pétrole dépend de plusieurs facteurs tels que le type de milieu récepteur (lac, rivière, fleuve, mer, océan), la température de l'eau, la nature et la composition du pétrole déversé, les conditions météorologiques et de même que la direction du vent et des vagues. Au fil du temps et sous l'influence de facteurs physicochimiques et biologiques, les hydrocarbures pétroliers subiront des transformations qui modifieront leur concentration, leur nature, leur répartition et même leur composition initiale (**Depuis et Ucan-Marin, 2015**). La figure 1 illustre les processus majeurs qui affectent le comportement des hydrocarbures pétroliers à la suite d'un déversement dans les eaux de surface.

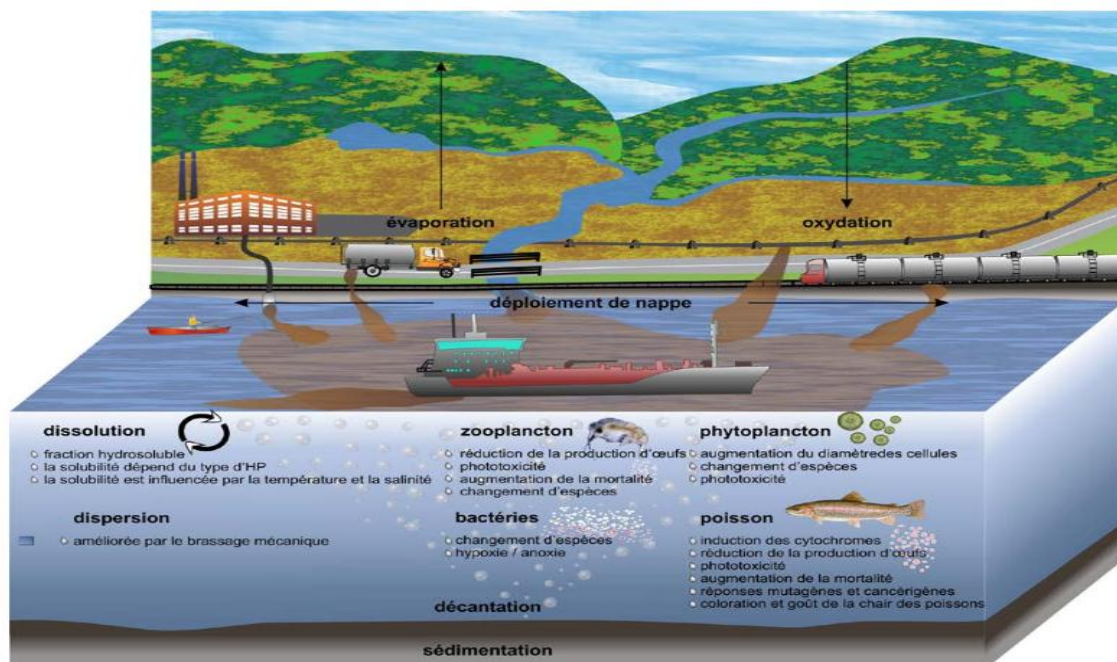


Figure 1 : Diagramme conceptuel des processus physiques et écologiques qui surviennent après un déversement d'hydrocarbures pétroliers dans les eaux de surface (**Perhar et Arhonditsis, 2014**)

➤ **L'évaporation**

Le deuxième processus intervenant dans le devenir des hydrocarbures pétroliers est l'évaporation, durant laquelle une portion importante des produits légers passe, en raison de la volatilité élevée de ces composés, de la phase liquide à la phase gazeuse. Ce processus diminue le volume des hydrocarbures dans l'eau, modifie leur composition chimique et peut parfois affecter leur toxicité aiguë, puisque les fractions légères (C1-C8), plus rapidement biodisponibles, sont considérées dans certains cas comme les plus toxiques (**American Petroleum Institute (API) 1999**). Malgré le fait que les molécules de la fraction moyenne ayant un poids moléculaire modéré C10-C12 soient aussi susceptibles de s'évaporer, leur taux d'évaporation est plus faible que celui des produits plus légers. Comme ils vont rester plus longtemps dans l'eau, leur toxicité chronique potentielle est plus élevée. Une température froide ou un couvert de glace participe aussi à la réduction de la possibilité d'évaporation rapide. De façon générale, la perte des hydrocarbures induite par le phénomène de l'évaporation peut aller jusqu'à 75 % pour les pétroles bruts légers et jusqu'à 40 % pour les bruts moyens. En revanche, les hydrocarbures lourds ne perdent pas plus de 10 % de leur volume dans les premiers jours suivant un déversement d'hydrocarbures pétroliers (**Fingas, 2013**).

➤ **La dissolution**

La dissolution est un processus en compétition avec l'évaporation parce que les produits susceptibles de se solubiliser dans la colonne d'eau ont aussi tendance à s'évaporer. Ce processus ne contribue pas de manière importante à la réduction du volume de pétrole déversé. Environ 2 à 5 % des pétroles sont enlevés de la surface de l'eau par dissolution naturelle (**Neff, 1990**). Il est à noter que le phénomène de dissolution est réduit par la baisse de la température et l'augmentation de la salinité.

➤ **La dispersion naturelle**

La dispersion naturelle consiste en la formation de gouttelettes d'huile qui s'incorporent dans la colonne d'eau et se présentent sous forme de suspension. Ce processus, sous l'influence du vent et des vagues, apparaît durant les premiers jours d'un déversement. Bien que la dispersion diminue le volume du pétrole à la surface de l'eau, elle n'en modifie pas les propriétés physicochimiques. La dispersion chimique effectuée à l'aide de dispersant peut réduire la quantité d'hydrocarbures en surface. Toutefois, l'utilisation de dispersants augmente l'exposition des organismes pélagiques (i. e. vivant dans la colonne d'eau) aux hydrocarbures. Les dispersants et les pétroles dispersés auraient une toxicité plus élevée que le pétrole en lui-même (**Deleo et al., 2015**).

➤ **L'émulsifiassions**

L'émulsifiassions, à la différence de la dispersion qui consiste en une suspension d'huile dans l'eau, est un mélange des gouttelettes d'eau dans du pétrole en surface (émulsion d'eau dans du pétrole) qui forment un nouveau composé relativement résistant à l'évaporation et à la dissolution. Ce nouveau composé peut prendre l'apparence d'une mousse brune. Ce processus tend à augmenter le volume qu'occupe le pétrole présent dans l'environnement (Neff, 1990).

➤ **La photo-oxydation**

C'est un phénomène qui se produit sous l'action de la lumière et peut transformer chimiquement certains composés en de nouvelles substances plus hydrosolubles et plus toxiques à court terme que les composés parents. La photooxydation engendre aussi des produits lourds qui ne sont ni hydrosolubles ni liposolubles (Neff, 1990).

➤ **La sédimentation**

Elle concerne souvent les fractions plus lourdes qui n'ont pas subi de dissolution ou d'évaporation. Ces fractions d'hydrocarbures pétroliers peuvent adhérer à la matière organique, aux bactéries ou aux particules d'argile de petite taille, s'alourdir et se déposer sur le fond. La sédimentation s'opère aussi par la déposition sous forme de fèces, après le passage des hydrocarbures dans le système digestif des organismes aquatiques, ou par la précipitation directe suite à l'augmentation de la densité des résidus pétroliers. La sédimentation des hydrocarbures pétroliers peut commencer immédiatement après un déversement, cependant ce processus dépend fortement de la nature des hydrocarbures, du lieu du déversement, de la présence des matières en suspension et des organismes aquatiques probablement de la température (Neff, 1990).

1.3.1.3. Effets des hydrocarbures pétroliers dans le milieu aquatique

L'introduction de quantités importantes d'hydrocarbures pétroliers dans le milieu aquatique a d'abord des effets physiques directs sur les organismes aquatiques qui se manifestent rapidement, soit l'engluement et la baisse d'oxygène dissous dans l'eau. Ces deux phénomènes peuvent entraîner rapidement la mort des organismes aquatiques. De plus, des effets toxiques divers, létaux et sublétaux, apparaissent à plus ou moins brève échéance.

La persistance et la toxicité des hydrocarbures pétroliers varient d'un composé à l'autre. Leur potentiel de toxicité pour les organismes aquatiques est inhérent à leur hydrosolubilité et proportionnel à leur liposolubilité, c'est-à-dire leur capacité de se dissoudre dans les lipides des membranes cellulaires (Di Toro et al., 2007).

En règle générale, la solubilité aqueuse des hydrocarbures décroît avec l'augmentation du nombre d'atomes de carbone de leurs molécules, alors que la toxicité augmente. Les composés de faible poids moléculaire sont plus volatils que ceux ayant un poids moléculaire élevé. Les hydrocarbures aromatiques monocycliques comme le benzène, le toluène, l'éthylbenzène et le xylène (les BTEX) sont relativement volatils et plus solubles que les HAP. Ils ne sont pas persistants dans l'eau et ne sont pas censés s'accumuler dans la chair de poissons ou dans les sédiments en concentrations importantes.

Les hydrocarbures à poids moléculaire élevé sont peu solubles dans l'eau et ont davantage d'affinités pour le carbone organique des sédiments et les lipides des cellules biologiques. Pour un même poids moléculaire (lié au nombre d'atomes de carbone), les hydrocarbures aliphatiques sont moins solubles que les hydrocarbures aromatiques et sont plus biodégradables, donc moins persistants dans l'environnement (**Battelle, 2007**). D'autre part, les études de **Verbruggen et al., (2008)** ont démontré que les HAP alkylés (ou substitués) sont nettement plus toxiques que leurs HAP parents en raison de leur bioaccumulation plus forte.

2. Raffineries de Skikda

En Algérie, il existe cinq raffineries de pétrole, à savoir : Raffinerie d'Alger, Raffinerie d'Adrar, Raffinerie d'Arzew, Raffinerie d'In Amenas et la raffinerie de Skikda, avec une capacité de production totale de 652 500 barils par jour (BPJ).

La raffinerie de Skikda (actuellement exploitée par Sonatrach) a été construite en 1979 au bord de la mer et s'étend sur 183 hectares, elle bénéficie du trafic maritime du port de Skikda et peut ainsi accueillir des pétroliers à fort tonnage. Elle produit plus de pétrole raffiné que les quatre autres raffineries. Avec une capacité de production 352700 BPJ, cette raffinerie est classée première en Afrique et troisième au monde (**Carpenter et Kostianoy, 2019**).

3. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)

3.1. Définition

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des composés organiques neutres apolaires, composés d'atomes de carbone et d'hydrogène et constitués d'au moins deux cycles aromatiques fusionnés par des arrangements linéaires, angulaires ou en coin (**Bour, 2005**). Ils font partie de la famille des composés organiques semi-volatils non halogénés et considérés comme des composés ubiquistes présents dans tous les compartiments environnementaux à cause de leur grande stabilité et leurs sources multiples (**Li et Chan, 2002**). Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont devenus un sujet important de l'environnement au cours

des dernières années en raison du risque qu'ils représentent sur l'environnement aquatique et sur la santé humaine (cancérogènes, mutagènes et tératogènes) et, par conséquence, ont été considérés comme des polluants prioritaires par l'Agence américaine de protection de l'environnement USEPA (**Delgadillo-Mirquez et al., 2011 ; Thavamani et al., 2012**).

La famille des HAP comporte plus d'une centaine de composés, le nombre de HAP identifiés à ce jour est de l'ordre de 130 (**INERIS, 2005**). Cependant, en raison de leurs effets préoccupants pour l'environnement et pour la santé humaine, seulement 16 d'entre eux sont considérés comme prioritaires par l'Agence de Protection de l'Environnement des Etats Unies d'Amérique (US-EPA), ils font l'objet des HAP les plus étudiés, suivis et posant des problèmes environnementaux majeurs du fait de leur toxicité (**US-EPA**).

3.2. Propriétés physico-chimiques

Tableau 1. Propriétés physico-chimiques des 16 HAP prioritaires (**ATSDR, 1995**).

Nom du HAP	N°CAS	Masse molaire [g/mol]	Densité [g/cm ³]	Solubilité dans l'eau à 25°C [mg/l]	Coefficient de partage octanol-eau log K _{ow}	Coefficient de partage octanol carbone organique log K _{oc}
Naphtalène	91-20-3	128,2	1,162	32	3,3	3,15
Acénaphthylène	208-96-8	152,2	1,194	3,93	4,07	1,4
Acénaphène	83-32-9	154,2	1,024	3,42	3,98	3,66
Fluorène	86-73-7	166,2	1,203	1,9	6,58	6,2
Phénanthrène	85-01-8	178,2	1,172	1	4,45	4,15
Anthracène	120-12-7	178,2	1,240	0,07	4,45	4,15
Fluoranthène	206-44-0	202,3	1,236	0,27	4,9	4,58
Pyrène	129-00-0	202,3	1,271	0,16	4,88	4,58
Benzo(a) anthracène	56-55-3	228,3	1,174	0,0057	5,61	5,3
Chrysène	218-01-9	228,3	1,274	0,06	5,16	5,3
Benzo(b) fluoranthène	205-99-2	252	1,29	0,001	6,04	5,74
Benzo(k) fluoranthène	207-08-9	252	1,29	0,0008	6,06	5,74
Benzo(a) pyrène	50-32-8	252,3	1,282	0,0038	6,06	6,74
Dibenzo(a,h) anthracène	53-70-3	278,3	1,252	0,0005	6,84	6,52
Benzo (g, hi, i) pérylène	191-24-2	276,3	1,38	insoluble	6,5	6,2
Indéno (1, 2,3-cd) pyrène	193-39-5	276,3	N.D	0,0008	6,58	6,2

3.3. Propriétés chimiques

Les HAP peuvent être classés en trois groupes (Figure 2) basés sur le nombre de cycles aromatiques qu'ils contiennent et leurs masses molaires moléculaires :

- HAP de faibles masses molaires moléculaires (de l'ordre de 152-178 g/mol, soit 2 à 3 cycles) : naphthalène, acénaphthylène, acénaphthène, fluorène, anthracène et phénanthrène – solubilité et volatilité la plus élevée.
- HAP de masses molaires moléculaires intermédiaires (de l'ordre de 202 g/mol, 4 cycles) : fluoranthène, pyrène,
- HAP à masses molaires moléculaires élevées (de l'ordre de 228-278 g/mol, soit 4 à 6 cycles) : benzo(a)anthracène, chrysène, benzo(a)pyrène, benzo(b)fluoranthène, dibenzo(ah)anthracène, benzo(k)fluoranthène, benzo(ghi)pérylène, indéno(1,2,3, cd)pyrène – sorption la plus forte.

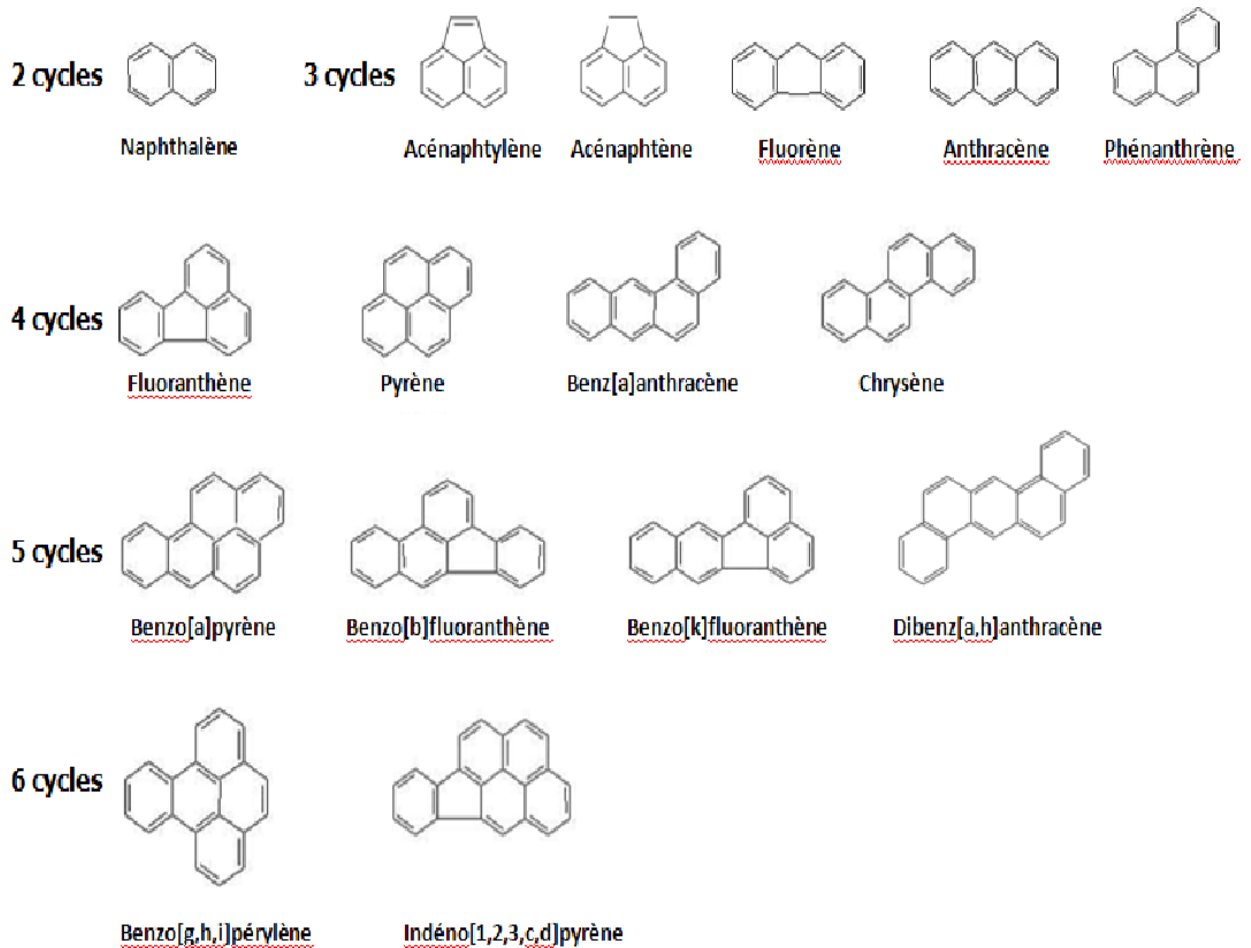


Figure 2 : Structure moléculaire des HAP considérés comme prioritaires par US-EPA (Li et Chan, 2002)

3.4. Sources des HAP

Les HAP sont formés lors de la combustion incomplète ou de la pyrolyse de matières organiques. Ils peuvent être introduits dans l'environnement par des phénomènes naturels tels que les incendies de forêt, les feux de brousse, les éruptions volcaniques ou les fuites de réserves naturelles de pétrole. D'autres peuvent même être, dans certains cas, biosynthétisé par des organismes vivants (Coelho *et al.*, 2004 ; Baek *et al.*, 1991). Cependant, la source prédominante de ce type d'hydrocarbures dans l'environnement est essentiellement anthropique, ils sont principalement formés via les activités anthropiques comme sous-produits de la combustion incomplète de combustibles contenant du carbone comme le charbon, le pétrole et les produits connexes ainsi que le déversement de pétrole lors de son exploitation. La forte contamination des écosystèmes par les HAP est souvent associée à des industries telles que la fabrication de gaz, la production de coke, la préservation du bois et surtout le raffinage du pétrole. (Kaushik et Haritash, 2006 ; Yap *et al.*, 2010).

Les émissions de HAP dans l'atmosphère proviennent notamment de la production d'aluminium, de l'industrie métallurgique (fonte et acier) et des activités associées à la production et à l'utilisation de bitumes naturels ou artificiels (schistes bitumeux, asphaltes) et de noir de carbone (industrie du caoutchouc et pneumatique) (Baek *et al.*, 1991 ; Wilson et Jones, 1993). D'après Wilson et Jones (1993), les principales activités industrielles associées à la production et à l'utilisation de matériaux contenant des HAP sont les suivantes :

- Génération électrique ou thermique par utilisation de combustibles fossiles
- Production de coke
- Cracking catalytique
- Production et utilisation de noir de carbone, asphalte, brai, goudron de houille
- Raffinage/distillation de pétrole brut et de ses dérivés
- Procédés de traitement du bois
- Fabrication de produits de préservation du bois (créosote, huile d'anthracène)
- Traitement, transport, stockage, utilisation de combustible/pétrole
- Production d'aluminium, de fonte et d'acier
- Incinération (pneus, déchets, charbon etc.)

3.5. Effets des HAP

3.5.1. Effet sur la santé humaine

Les HAP constituent un sujet de préoccupation majeure, car ils présentent un risque pour la santé humaine associé à une exposition aux HAP potentiellement cancérigènes. Compte tenu du caractère lipophile des HAP, ces derniers s'accumulent dans la chaîne alimentaire. Ils se retrouvent dans le corps humain par ingestion et ils sont absorbés au niveau intestinal. Les HAP pénètrent également le corps humain par inhalation ou par un contact cutané et ils se répandent à l'ensemble de l'organisme en quelques minutes. Les HAP inhalés s'introduisent dans l'organisme via les cellules de l'épithélium bronchique ou les cellules alvéolaires (**Naurini, 2007**). Ceci dit, les HAP sont relativement stables chimiquement ce qui rend leur élimination directe par l'organisme vivant limitée. Ainsi, pour augmenter leur hydrosolubilité et faciliter leur excrétion par l'organisme, les HAP nécessitent une activation métabolique. Cette transformation est effectuée lorsque les HAP se retrouvent dans le foie par l'action des monooxygénases à cytochrome P-450 qui forment des époxydes par l'addition d'un atome d'oxygène. Ces époxydes s'hydrolysent à leur tour et forment les dihydrodiols puis le diol époxyde.

Cependant, ces métabolites produits de certains HAP sont souvent plus toxiques, car leurs structures chimiques peuvent se lier de manière covalente aux protéines et à l'acide désoxyribonucléique (ADN) sous forme d'adduits provoquant ainsi des mutations. Ces mutations peuvent affecter différentes fonctions d'une cellule, mais surtout peuvent être initiateurs de la cancérogenèse (**Leglize, 2004**). Des effets mutagènes ont été prouvés pour certains HAP à haut poids moléculaire dont le chrysène, le benzo (b) fluoranthène et le benzo (a) pyrène (**Bourcereau, 2010**). Ce dernier est capable de passer la barrière placentaire et peut avoir des effets embryotoxiques et tératogènes. De plus, l'Agence internationale pour la recherche sur le cancer (IARC) indique qu'en plus de ces HAP, d'autres HAP à haut poids moléculaire sont potentiellement cancérigènes et sont le benzo [a] anthracène, le dibenzo [a, h] anthracène et l'indéno[1,2,3 -cd] pyrène.

En ce qui concerne les HAP de faible poids moléculaire, ils ne sont pas classés parmi les composés cancérigènes, mais présentent toutefois un danger à toxicité aiguë. À concentration élevée, une exposition à ces HAP peut provoquer des vomissements, des diarrhées et le développement d'anémies hémolytiques (**Leglize, 2004**).

Ceci étant dit, la toxicité chronique des HAP est la plus appréhendée qu'une toxicité aiguë, car les niveaux de concentration ne sont pas semblables. L'atteinte des effets néfastes dus à une toxicité aiguë nécessite une exposition aux HAP à des concentrations très élevées et limitées

dans le temps. Or ce phénomène est rarement rencontré dans l'environnement. En revanche, une exposition aux HAP à des faibles concentrations pendant une longue durée est la plus répandue et la plus dangereuse.

3.5.2. Effet sur le milieu aquatique

La bioaccumulation désigne la capacité des organismes à concentrer et à accumuler les HAP à des concentrations supérieures à celles de l'eau dans laquelle ils se trouvent. Cela dit, lorsque les HAP se trouvent dans les cours d'eau, ils s'adsorbent sur les matières en suspension à cause de leur caractère essentiellement apolaire formant ainsi des réservoirs d'accueil dans les sédiments (**Olivier, 2009**). Un phénomène d'accumulation prononcée se produit chez les organismes aquatiques dépourvus d'un système enzymatique capable de métaboliser les HAP, en particulier, les phytoplanctons, les zooplanctons, les bivalves et les gastéropodes. Dans le meilleur cas, l'apport quotidien en HAP ne peut être que très peu évacué par les organismes aquatiques et la bioaccumulation se met en place jour après jour. L'hydrophobicité marquée des HAP favorise leur accumulation dans la chaîne alimentaire, en particulier, les tissus adipeux qui sont enclins à concentrer ces composés.

Cependant, plus les organismes aquatiques présentent un niveau d'évolution élevé, plus ils sont capables de dégrader les HAP par l'action des enzymes (**Bourcereau, 2010**). Par conséquent, la bioaccumulation des HAP dans les organismes aquatiques, en particulier les poissons, peut avoir un triple effet. Premièrement, la bioaccumulation des HAP dans les organismes aquatiques peut créer une certaine toxicité et perturber ainsi l'équilibre de l'écosystème aquatique (**Barnier, 2009**).

Deuxièmement, tout comme chez les humains, les HAP peuvent induire le développement d'adduits à l'ADN à la suite de leurs métabolites. Ils peuvent, ainsi, provoquer des lésions aux poissons pouvant aller à la génotoxicité, la cancérogénicité, l'effet négatif sur la reproduction et le développement des poissons (**Lacoste, 2008**).

3.6. Données toxicologiques des HAP

Généralement les molécules de faible poids moléculaire présentent des caractéristiques de toxicité aiguë tandis que les molécules de poids moléculaires élevés montrent des effets cancérogènes et de bioaccumulation (**Goyer et al., 1995**).

Les HAP sont des composés toxiques et certains d'entre eux présentent un potentiel carcinogène, génotoxique et / ou mutagène pour plusieurs organismes et ils peuvent être transportés sur de longues distances et se bioaccumuler dans la chaîne alimentaire où peuvent atteindre des concentrations élevées dans les organismes vivants (**Ozcan et Aydin, 2009 ; Ping et al., 2011 ; Moscoso et al., 2012 ; Khairy et al., 2014 et Rota et al., 2014**). Outre la cancérogénicité et la mutagénicité, les HAP ont également été signalés comme étant à l'origine de maladies cardiovasculaires (**Xu et al., 2010 ; Clark et al., 2012**) d'asthme et d'autres maladies respiratoires (**Jung et al., 2012 ; Rosa et al., 2011**), les malformations congénitales (**Langlois et al., 2013**) et d'autres maladies comme les toxicités rénales, neuro, immunologiques, reproductives et développementales chez les humains et les animaux de laboratoire (**Visciano et al., 2008**). Le tableau 2 rassemble les données toxicologiques de quelques-uns de ces produits.

4. Devenir des HAP dans l'environnement

Il existe une variété de mécanismes par lesquels les HAP sont dégradés dans l'environnement, y compris chimio-oxydation et photo-oxydation, mais la dégradation microbienne est considérée comme la principale voie de dégradation des HAP dans les sols (**Juhasz et Naidu, 2000**). Les HAP ont des demi-vies différentes dans les compartiments environnementaux (par ex. sol, air, eau) en fonction de leur sensibilité structurelle à décomposition chimique, physique ou biologique. Les HAP rejetés dans l'atmosphère sont sujets à transport à courte et longue distance et sont éliminés par dépôt humide et sec sur le sol, l'eau et végétation. Les HAP peuvent volatiliser par la photolyse, s'oxyder par la biodégradation, se lier aux particules en suspension ou sédiments ou s'accumulent dans les organismes aquatiques (**ATSDR, 1995**).

5. La dégradation des HAP

5.1. Dégradation abiotique

L'action simultanée des différents facteurs abiotiques (physique et chimique) peut aboutir à une élimination des hydrocarbures partielle (**Bertrand et Mille, 1989**). Ces facteurs sont responsables de la disparition de 20% des hydrocarbures aromatiques, à 2 et 3 cycles, dans l'environnement (**Park et al., 2001**). Les facteurs de transformation abiotique des hydrocarbures sont :

5.1.1. Solubilisation

La solubilité des HAP dans l'eau est très faible. Un HAP est d'autant plus soluble que sa masse moléculaire est faible et que sa polarité est élevée tels que le benzène (**Fingas, 2013**). Il est à noter que les HAP solubles sont parfois classés parmi les plus dangereux pour l'environnement, car ils sont difficiles à éliminer et sont assimilables par la faune et la flore (**Bouchez et al., 1995**).

5.1.2. Evaporation

L'évaporation est un processus qui débute immédiatement après un déversement d'hydrocarbures et peut se poursuivre pendant quelques jours. Elle correspond au transfert des composés volatils plus légers, comme les aliphatiques, les BTEX et les HAP de faible masse moléculaire, vers l'atmosphère (**Neff et al., 2000**). Cette perte des composés volatils entraîne la modification de certaines propriétés physiques des HAP, telles que la densité et la viscosité. Les principaux facteurs qui influent sur le processus d'évaporation sont la volatilité des composés présents et les conditions atmosphériques, telles que la température du milieu, l'intensité du vent et/ou du soleil.

5.1.3. Emulsification

L'émulsification est un processus d'incorporation de gouttelettes d'eau dans les hydrocarbures pétroliers. Ceci augmente le volume du produit déversé et modifie certaines propriétés physiques des hydrocarbures, telles que la densité et la viscosité. Pour que le produit obtenu soit appelé « émulsion », il doit avoir une certaine stabilité (**Fingas, 2013**). Cette émulsion stable, eau-pétrole, est nommée « mousse au chocolat ».

5.1.4. Photo-oxydation

La photo-oxydation, ou oxydation photochimique, est un processus d'altération des hydrocarbures qui est modulé par différents facteurs, notamment le spectre et l'intensité lumineuse du rayonnement solaire et la composition chimique des hydrocarbures déversés (**Prince et al., 2003**). Dans le cas des sols, ce phénomène n'a lieu que dans les premiers centimètres de la surface (**Park et al., 2001**). Sous l'action du rayonnement solaire, essentiellement les rayons UV, certains composés peuvent être oxydés. Les composés produits sont alors plus solubles (acides, alcools, cétones, peroxides et sulfoxides) que les composés

initiaux et peuvent être plus toxiques pour les communautés microbiennes (**Payne et Philipps, 1985 ; Maki et al., 2001**).

5.1.5. Sédimentation

La sédimentation est le passage des hydrocarbures de la surface vers le fond. Les gouttelettes d'hydrocarbures dispersées peuvent interagir naturellement avec les matières en suspension (MES) présentes dans la colonne d'eau, tels que les minéraux argileux ou la matière organique, pour former des agrégats hydrocarbures-MES (**Gong et al., 2014 ; Fitzpatrick et al., 2015**).

La formation de ces derniers est due aux interactions de charges électriques (ponts cationiques) entre les composés polaires des hydrocarbures et les surfaces des particules (**Bandara et al., 2011**). Le phénomène de sédimentation est d'ailleurs capital, notamment dans l'eau océanique profonde, en termes d'exportation de la surface vers le fond (**Dachs et al., 2002**). La sédimentation conduit à la constitution d'agrégats de haute densité difficilement dégradables par voie naturelle.

5.2. Dégradation biotique ou biodégradation

5.2.1. Biodégradation aérobie

La biodégradation est un processus lent qui nécessite la croissance et la multiplication de microorganismes (bactéries et champignons) qui peuvent utiliser les hydrocarbures pétroliers comme source d'énergie en les transformant en sous-produits oxydés qui seront par la suite dégradés, par oxydation, en dioxyde de carbone et en eau. Après l'arrêt des processus physiques et chimiques de transformation des hydrocarbures légers et moyens, la biodégradation devient le processus majeur de transformation de ces composés. Cependant, à cause de la structure complexe des hydrocarbures lourds, ces derniers ne sont pas sujets à la biodégradation, au moins pour plusieurs mois, voire plusieurs années (**API, 1999**). À poids moléculaire équivalent, les hydrocarbures ramifiés ou cycliques auront un taux de biodégradation plus faible que les hydrocarbures linéaires.

Les HAP sont traités par les bactéries et les champignons sur le même principe que le naphtalène. Ces hydrocarbures sont peu mobilisables à cause de leur caractère hydrophobe. Ils ont un coefficient *K_{oc}* élevé. Leur attaque est d'autant plus lente qu'il y a davantage de cycles dans la formule. L'oxygénation peut s'exercer à plusieurs endroits de la molécule et conduire à un mélange de produits dont certains sont excrétés dans le milieu extracellulaire. La vie moyenne de ces composés dans les sols contaminés peut atteindre des mois, voire des années. Comme la

dégradation est souvent incomplète et se fait le plus souvent par cométabolisme, elle peut conduire à l'accumulation de composés oxygénés récalcitrants. Pourtant une croissance bactérienne utilisant un poly-aromatique comme seule source de carbone et d'énergie reste possible. Des travaux remontant à plus d'une dizaine d'années en ont fait la démonstration en cultivant un *Pseudomonas paucimobilis* sur le fluoranthène (Mueller et al., 1990).

Une série d'autres composés tels que naphthalène, fluorène, anthracène et divers dérivés étaient également métabolisés. Des observations récentes ont révélé que diverses espèces appartenant au genre *Sphingomonas* ont une aptitude particulière à dégrader les polycycliques (Story et al., 2001).

La dégradation du pyrène, de l'anthracène et du benzo(a) pyrène (BaP) a retenu beaucoup d'attention. Les intermédiaires de l'attaque du (BaP) par un *Mycobacterium* ont été identifiés par Schneider et al. La dégradation du substrat s'effectue par cométabolisme dans un milieu organique complexe. Un premier cycle est ouvert par dioxygénation qui est, selon les cas, de type méta ou ortho. (Pelmont, 2005).

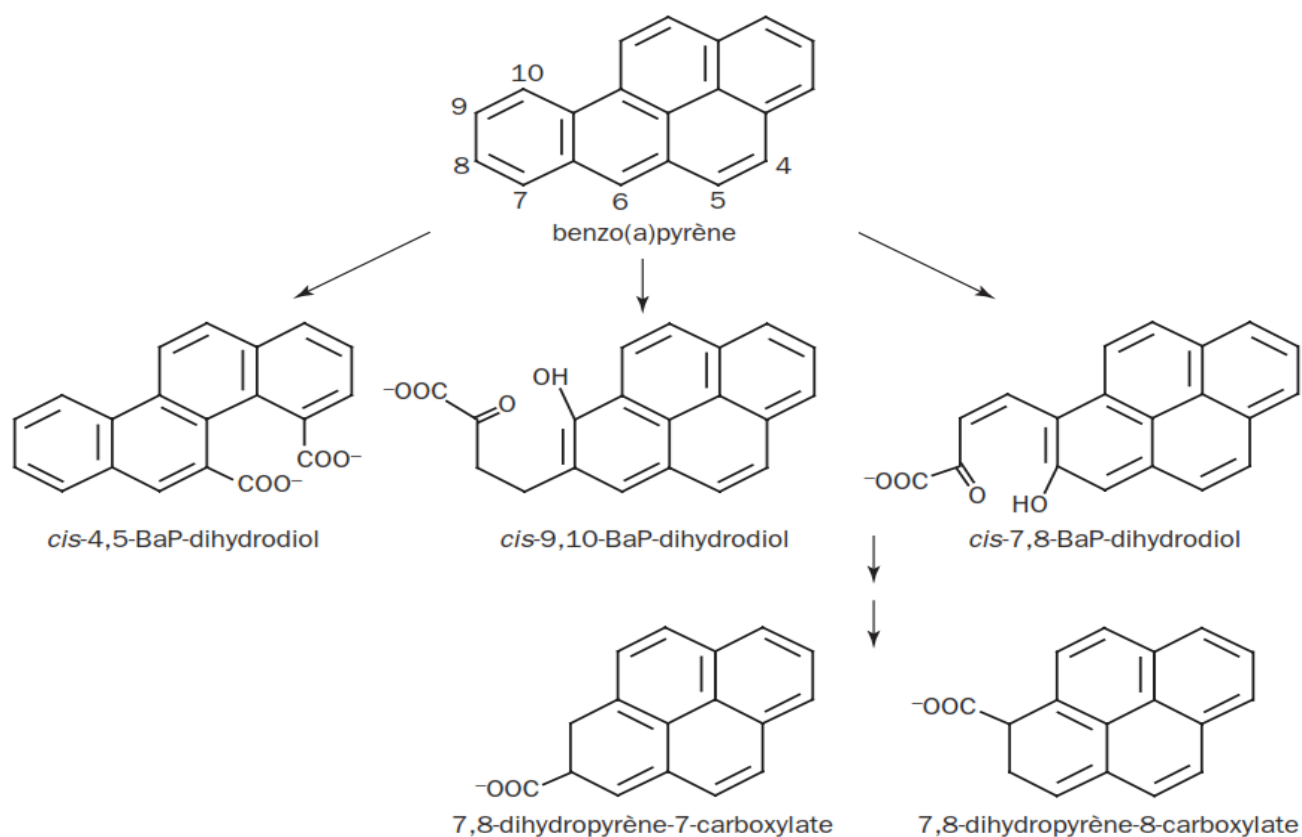


Figure 3 : Schéma indicatif de l'attaque du Benzo (a) Pyrène par *Mycobacterium* (Van Herwijnen et al., 2003)

5.2.1.1. Biodégradation des HAP par les bactéries

Les bactéries sont la classe des micro-organismes activement impliqués dans la dégradation des polluants organiques des sites contaminés. De nombreuses espèces bactériennes sont connues pour leur capacité de dégradation des HAP. La plupart d'entre elles, représentant une grande efficacité de biodégradation des HAP, sont isolés à partir des écosystèmes contaminés par le rejet de déchets pétrochimiques surtout à long terme.

Parmi les HAP présents dans les déchets pétrochimiques, le benzo (a) pyrène (BaP) est considéré comme le plus cancérigène et le plus toxique. Les études ont montré que les bactéries peuvent dégrader le BaP lorsqu'elles sont cultivées sur une alternative source de carbone dans les expériences de culture liquide. **Ye et al. en 1996** ont observé une diminution de 5% de la concentration de BaP après 168 h pendant incubations avec la souche EPA 505 de *Sphingomonas paucimobilis*.

D'autre part, **Aitken et al., (1998)** ont isolé 11 souches provenant de divers sites contaminés (huile, huile moteur, bois traitement et raffinage) avec la capacité de dégrader le BaP. Les organismes ont été identifiés comme au moins trois espèces de *Pseudomonas*, ainsi comme espèces *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia* et *Sphingomonas*. Par ailleurs d'autres études ont signalé la dégradation BaP par d'autres bactéries, notamment *Rhodococcus sp*, *Mycobacterium* et culture mixte de *Pseudomonas* et *Flavobacterium* (**Walter et al., 1991 ; Schneider et al., 1996 ; Trzesicka-Mlynarz et Ward, 1995**). **Heitkamp et al., (1988)** ont décrit un isolat bactérien capable de minéraliser le pyrène. **Romero et al., (1998)** ont isolé *Pseudomonas aeruginosa* d'un ruisseau fortement pollué par une raffinerie de pétrole. L'espèce s'est avérée être en croissance active sur des doses élevées de phénanthrène avec élimination du polluant dans un délai de 30 jours. **Rehmann et al., (1998)** ont isolé un *Mycobacterium spp*, Souche KR2 d'un sol d'une usine à gaz contaminé par les HAP, qui a pu utiliser du pyrène comme seule source de carbone et d'énergie. L'isolat ajouté du pyrène (0,5 mg/ml) est métabolisé à 60% dans 8 jours à 20 ° C en Cis-4,5-pyrène dihydrodiol, acide 4-5-phénanthrène dicarboxylique, 1hydroxy-2-naphtoïque acide, 2-carboxybenzaldéhyde, acide phtalique et l'acide protocatéchuique ont été identifiés comme des produits de dégradation et une voie de dégradation du pyrène a également été suggérée (Figure.4).

Yuan et al., (2002) ont isolé six souches gram-négatives de bactéries d'un site d'élimination des déchets pétrochimiques ayant la capacité de dégradation de l'acénaphthène, du fluorène, du phénanthrène, de l'anthracène, et le pyrène de 70 à 100% sur une période de 40 jours

de traitement initial. Deux des six souches isolées étaient des *Pseudomons fluorescens* et *Haemophilus spp*, la bactérie en forme de bâtonnet. Des bactéries isolées des sédiments de mangrove sont connus pour dégrader le phénanthrène à partir de 42% à 78% avec un potentiel de dégradation différent selon les différents sédiments (Tam et al., 2002). Daane et al., (2001) ont isolés des bactéries dégradant les HAP associées aux rhizosphères des plantes de marais salés. Ils ont catégorisé les bactéries isolées en trois groupes bactériens principaux : les pseudomonas à Gram négatif ; les nocardioformes à Gram positif non sporulées ; et le groupe sporulé à Gram positif Paenibacillus.

Daane et al., (2001) ont aussi observé que les isolats enrichis en phénanthrène peuvent utiliser un plus grand nombre des HAP que les isolats enrichis en naphthalène. Plus tard, ils établissent que les bactéries appartenant au genre *Paenibacillus*, isolées à partir des sédiments contaminés par le pétrole et de la rhizosphère des marais salés peut utiliser du naphthalène ou du phénanthrène comme seule source de carbone et peuvent dégrader les HAP (Daane et al., 2002). Verrhiest et al., (2002) ont étudié l'interaction entre un mélange de HAP et des communautés microbiennes en sédiments d'eau douce. Ils ont observé que pour le benzo (k) fluoranthène la concentration dans les sédiments était stable pendant plus de 28 jours, alors que le phénanthrène et le fluoranthène sont restés de 3% à 6%. L'étude a montré que (a) les HAP induisent des perturbations dans les communautés microbiennes en termes de densité et de métabolisme, (b) les bactéries indigènes pourrait être utilisé pour l'évaluation de la toxicité, et (c) les micro-organismes indigènes des sédiments semblent avoir une forte capacité de dégradation des HAP, en fonction des propriétés physico-chimiques et de la disponibilité des substances présentes.

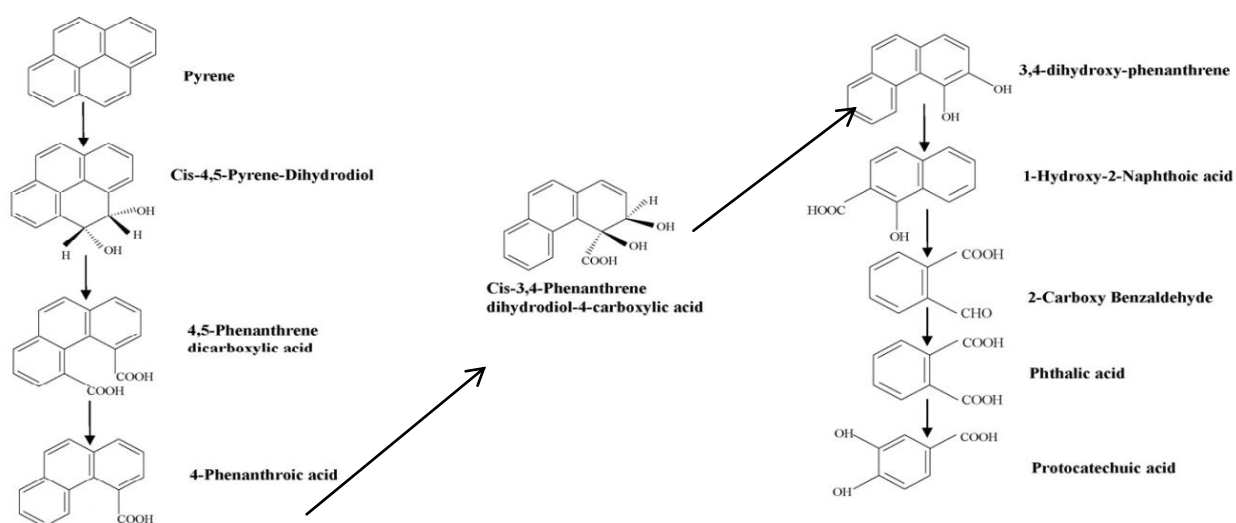


Figure : 4 : Proposition de dégradation du pyrène par *Mycobacterium sp.* Souche KR2 (Rehmann et al., 1998).

5.2.1.2. Biodégradation des HAP par les Champignons

Plusieurs champignons sont connus pour avoir la propriété de dégrader des polluants persistants. **Cutright** a étudié la cinétique impliquée dans la dégradation des HAP par le champignon *Cunninghamella echinulata* var. *élégans* et a suggéré que pour un système de réaction de premier ordre, la vitesse du changement de la concentration de contaminant est proportionnelle à la concentration de ce contaminant dans le sol et l'outil de prédiction du temps de la dégradation dépend des micro-organismes, du type de contaminant et de sa concentration (**Cutright, 1995**). La dégradation microbienne par les champignons lignolytiques a été intensivement étudiée (**Cajthaml et al., 2001**) et en raison de la structure irrégulière de la lignine, les champignons lignolytiques produisent des enzymes extracellulaires avec les substrats à très basse spécificité, les rendant aptes à la dégradation de différents composés. Le système ligninolytiques se compose de trois groupes d'enzymes principaux avec la lignine peroxydase (LiPs), la peroxydase dépendante du manganèse (MnPs), les phénoloxydases (laccases, tyrosinases). Des expériences avec des enzymes purifiées ont prouvé que les enzymes ligninolytiques sont capables de dégrader les HAP (**Hofrichter et al., 1998**). Il a été observé que les enzymes lignolytiques effectuent une oxydation radicalaire à un électron, produisant un cation radical de contaminants suivis de l'apparition de quinines (**Vyas et al., 1994**). Une étude de **Clemente et al. (2001)** a démontré la dégradation des HAP par 13 souches de champignons ligninolytiques de deutéromycètes et ont constaté que le degré de dégradation varie avec la variation de enzymes lignolytiques. Une dégradation maximale du naphthalène (69%) a été observée par la souche 984 ayant une activité Mn-peroxydase, suivi de la souche 870 (17%) montrant une activité de la lignine peroxydase et la laccase. Une dégradation du phénanthrène de 12% a été observée avec la souche 870 avec des activités Mn-peroxydase et laccase. Un bon niveau de dégradation de l'anthracène (65%) a été observé par la souche 710. Les HAP à bas poids moléculaire (2-3 cycles) se sont avérés être les plus dégradés par *Aspergillus sp*, *Trichocladium canadense* et *Fusarium oxysporum*. Pour un poids moléculaire élevé d'HAP (4 à 7 cycles), la dégradation maximale a été observée par *T. canadense*, *Aspergillus sp*, *Verticillium sp*, et *Achremonium sp*. De telles études ont montré que les champignons ont une grande capacité à dégrader une large gamme de HAP dans des conditions de faible teneur en oxygène. Le système monooxygénase du cytochrome P-450 génère des époxydes qui peuvent également être impliqués dans la dégradation. Les époxydes peuvent être réarrangés en dérivés hydroxyle ou ils peuvent être hydrolysés en dihydrodiols vicinaux. **Cajthaml et al. (2002)** ont étudié la dégradation fongique de produits d'HAP par le champignon lignolytique *Irpex lacteus* et a constaté que les principaux produits de dégradation de l'anthracène et du phénanthrène étaient

respectivement l'antraquinone et le phénanthrène-9,10-dihydrodiol (Figure.5). L'étude a également proposé la voie de la dégradation d'anthracène et de phénanthrène.

Les champignons de la pourriture blanche peuvent, de leur côté, dégrader un large éventail d'organo-polluants et l'activité dégradante est due aux systèmes de dégradation de la lignine de ces champignons. **Boyle et al. (1998)** ont constaté que, pour les champignons de la pourriture blanche, la culture dans le sol ne permet pas de dégrader des quantités significatives d'HAP. Cependant, en culture liquide, ils ont dégradé de nombreux HAP. La dégradation du benzo (a) pyrène par les champignons de la pourriture blanche en milieu liquide était plus rapide par les champignons qui avaient été exposés aux HAP, ce qui suggère que le système de dégradation était inductible. La dégradation du sol a été augmentée par certains surfactants, ceux-ci augmentent la concentration de B(a)P dans l'humidité du sol. Parmi des centaines de champignons de la pourriture blanche affichant des lignolytiques activité, *Phanerochaete chrysosporium*, *Bjerkandera adusta* et *Pleurotus ostreatus* ont été largement étudiés. Les champignons les plus abondants dans les environnements pollués sont les levures (**Berdicevsky et al., 1993 ; Cerniglia et al., 1979**) et ils peuvent oxyder les HAP avec d'autres sources de carbone. Le taux de dégradation du phénanthrène par *Rhodotorula glutinis*, levure isolée du ruisseau contaminé était presque égal à la dégradation par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (**Romero et al., 1998**).

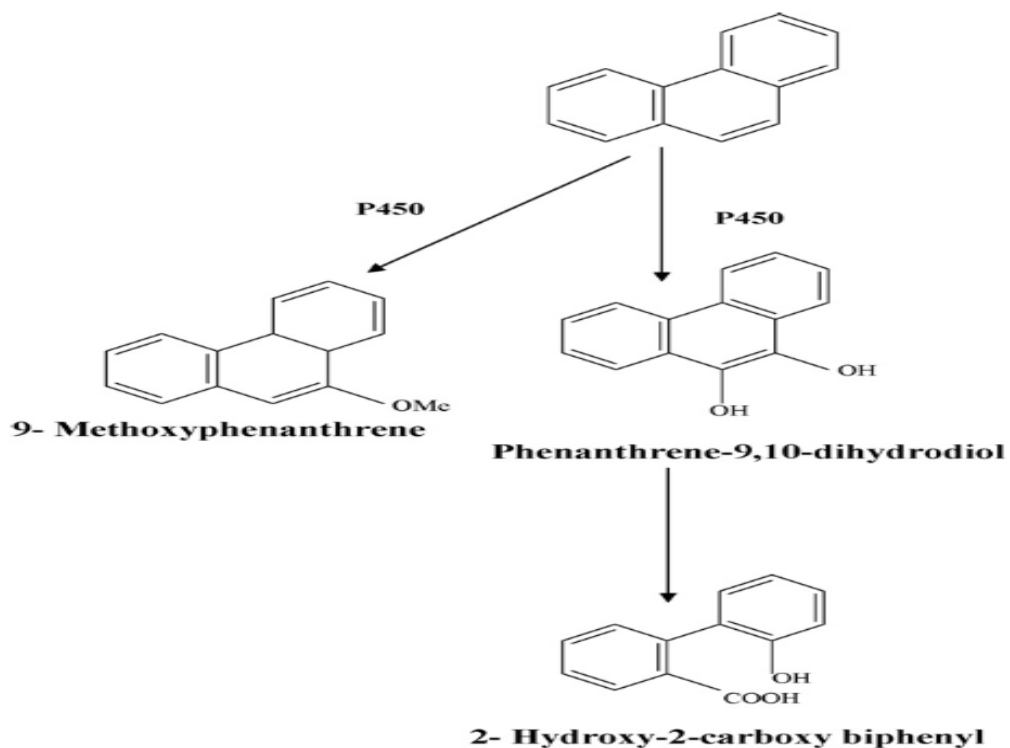


Figure 5 : Voie de dégradation fongique du phénanthrène en utilisant *Irpex lacteus* (**Cajthaml et al., 2002**)

5.2.1.3. Biodégradation des HAP par les Algues

La dégradation des HAP nécessite un consortium de micro-organismes et les algues ne font pas exception. Procaryote et eucaryote algues marines photo-autotrophes (c.-à-d. cyanobactéries, algues vertes, et les diatomées) sont connus pour métaboliser le naphtalène en une série des métabolites (**Cerniglia et al., 1979 ; Cerniglia et al., 1980 ; Cerniglia et al., 1980**). Bien qu'il y a des indications que la cishydroxylation de naphtalène par les cyanobactéries, les oscillateurs et *Agmenellum* spp. Impliquent des voies similaires aux champignons (**Cerniglia et al., 1979 ; Cerniglia et al., 1980 ; Cerniglia et al., 1980 ; Narro et al., 1992 a et b**).

Le BaP est connu pour être transformé en diols et en quinones par les algues marines sur une période de 5 à 6 jours. Il a été constaté que *Selenastrum capricornutum*, une algue verte d'eau douce métabolise le BaP en cis-dihydrodiols en utilisant un système enzymatique dioxygénase tel que trouvé chez les procaryotes hétérotrophes. Il a été observé que *S. capricornutum* produit du 11,12-dihydrodiol sous lumière dorée et du 9,10-dihydrodiol sous la lumière blanche. Avec l'augmentation de l'énergie lumineuse de l'or à blanc et à UV-A dans la région absorbante des HAP, la production de BaP quinone augmente. L'étude a également conclu que seules les algues vertes métabolisent presque complètement le BaP en dihydrodiols, alors que les algues jaunes et les algues bleu-vert n'ont pas réussi à métaboliser les HAP et les doses plus élevées de HAP s'avèrent phytotoxiques pour les algues (**Warshawsky et al., 1995 ; Warshawsky et al., 1988**).

Certaines études rapportent que les algues améliorent l'élimination du fluoranthène et pyrène lorsqu'ils sont présents avec des bactéries. **Borde et al., (2003)** ont signalé le premier cas de biodégradation de substances toxiques par la photosynthèse polluants aromatiques par microcosmes algues-bactériens en une seule étape traitement. Le potentiel des microcosmes algues-bactériens pour la la biodégradation du salicylate, du phénol et du phénanthrène a été étudiée.

Pseudomonas migulae et *Sphingomonas yanoikuyae* ont été étudiés pour la dégradation du phénanthrène. L'algue verte *Chlorella sorokiniana* a été cultivée en présence des polluants à différents concentrations, montrant des effets inhibiteurs croissants dans l'ordre de : salicylate < phénol < phénanthrène. Aucune élimination substantielle (> 85%) n'a été enregistrée que dans les systèmes inoculés avec des algues et bactéries et incubées sous un éclairage continu. Ces études ont démontré des relations synergiques entre les algues et les bactéries microcosmes. Différentes espèces de microalgues ont été signalées pour dégrader le fluoranthène et le pyrène.

L'étude de fluoranthène, pyrène et un mélange de fluoranthène et de pyrène par *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus platydiscus*, *Scenedesmus quadricauda* et *Selenastrum capricornutum* a montré que l'élimination est spécifique des espèces d'algues et dépendant des substances toxiques. Élimination des HAP en 7 jours de traitement étaient respectivement de 78% et 48% par *S. capricornutum* et *C. vulgaris* (Lei et al., 2007).

L'efficacité de l'élimination du fluoranthène et du pyrène dans un mélange supérieur au composé unique respectif, suggérant que la présence d'un HAP stimule l'élimination de l'autre HAP. Une souche de microalgue verte hétérotrophe *Prototheca zopfii* immobilisée dans de la mousse de polyuréthane a également été signalée pour aider à l'accumulation de mélange de HAP dans la matrice (Ueno et al., 2008). Alors que les cellules vivantes libres de l'algue peuvent réduire les HAP et les n-alcanes (Ueno et al., 2006).

5.2.2. Dégradation anaérobie

La biodégradation des HAP a été observée sous les deux conditions aérobies et en anaérobies. Les communautés microbiennes des sédiments et des sols contaminés existent dans des conditions anaérobies et la biotransformation des polluants est observée dans ces conditions. Des études ont montré que les HAP à deux et trois cycles peuvent être dégradés anaérobie (Coates et al., 1996 ; Bregnard et al., 1996 ; Lagenhoff et al., 1996). Ambrosoli et al., (2005) ont signalé une dégradation anaérobie des HAP dans le sol par un consortium de bactéries mixtes dans des conditions dénitrifiantes et ont conclu que biodégradation en anaérobie du fluorène, du phénanthrène et du pyrène, semble possible à la fois par voie fermentative et respiratoire, à condition que les co-métabolites de faible poids moléculaire et des accepteurs d'électrons appropriés (nitrate) sont présents.

Par ailleurs, de nouvelles voies de biotransformation anaérobie du fluorène et le phénanthrène par les bactéries sulfato-réductrices (BSR) sont proposé (Figure.6) (Tsai et al., 2009). La culture des BSR a été enrichi en anaérobie dans les boues d'eaux usées porcines et pourraient biotransformer 88% des fluorène et 65% de phénanthrène en 21 jours d'incubation. Il a été observé que la réduction du sulfate était associée à la biotransformation du fluorène et du phénanthrène. Le Fluorène et le phénanthrène ont été biotransformé par une séquence d'hydratation et réactions d'hydrolyse suivies d'une décarboxylation avec la formation de p-crésol (uniquement dans le système phénanthrène) et de phénol. Une dégradation des HAP a également

été observée dans les sédiments dérivés d'aquifères d'eau douce couplée à la réduction de Fe (III) (Anderson et Lovely, 1999).

Plus tard, il a été ajouté que les bactéries réductrices de sulfate constituent un composant microbien majeur dans la dégradation des HAP sur deux à quatre cycles, mais les méthanogènes et les populations microbiennes de vancomycine sont également impliquées (Chang et al., 2002).

Le processus de biodégradation des hydrocarbures, sous conditions anaérobies et réductrices, peuvent être supposées en trois grandes étapes. Initialement haute concentration d'hydrocarbures aromatiques est partiellement dégradé dans des conditions de réduction des nitrates et des sulfates pour former des acides organiques de bas poids moléculaire comme intermédiaires métaboliques. Le taux et l'étendue de la dégradation des HAP est corrélée au nombre de cycles benzéniques et la présence / absence de chaînes latérales (Coates et al., 1997).

Bien que la biodégradation en anaérobie est comparativement un processus plus lent et limité par plusieurs autres facteurs, il a l'avantage d'être adopté dans les milieux naturels et ne peut être négligée.

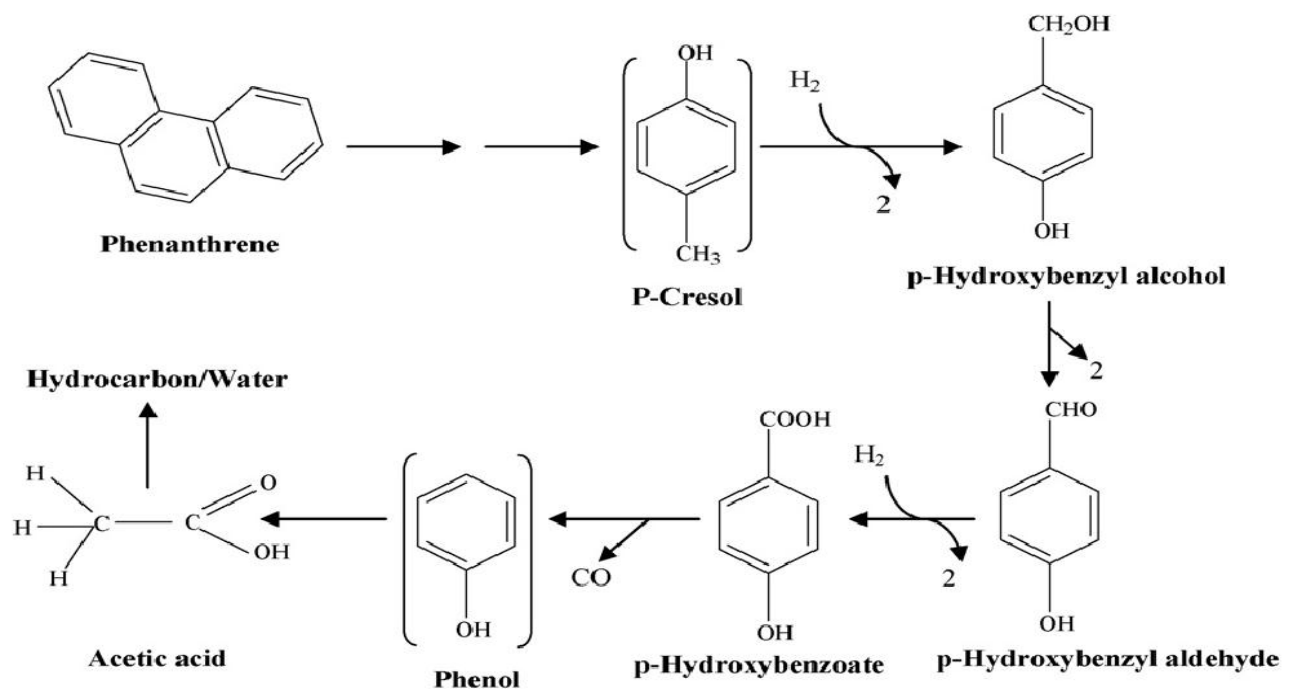


Figure 6 : Voie de biotransformation anaérobie proposée du phénanthrène par les bactéries sulfato-réductrices (Coates et al., 1997)

6. Activités enzymatiques impliquées dans la biodégradation des HAP

La biodégradation des HAP, par les microorganismes, décrite chez les bactéries, les champignons et les algues en conditions aérobies, implique différentes voies métaboliques selon le type d'organisme (figure.7).

Le principal point de variation entre les différentes voies métaboliques est la stratégie de déstabilisation des cycles aromatiques. Les bactéries sont décrites pour initier l'oxydation des cycles aromatiques par des dioxygénases qui attaquent les doubles liaisons par l'addition de deux molécules d'oxygène. Certaines bactéries sont également décrites pour dégrader les HAP en conditions anaérobies en activant la molécule par une carboxylation ou le greffage d'un groupement fumarate (**Meckenstock et al., 2004**). Chez les eucaryotes comme les algues ou les champignons, la voie impliquée est le processus de détoxification du cytochrome P450 impliquant une activité monooxygénase. L'intermédiaire époxyde obtenu par l'addition d'un atome d'oxygène est ensuite réarrangé de manière enzymatique ou non. La troisième voie implique la production d'enzymes extracellulaires capables d'oxyder les HAP par des activités de type peroxydase ou laccase. Cette voie de dégradation est principalement décrite chez des champignons lignolytiques.

Les mécanismes impliqués dans la dégradation des HAP par les champignons sont majoritairement des co-métabolismes, c'est-à-dire une dégradation sans bénéfice direct de matière ou d'énergie pour l'organisme qui en est responsable. Ces processus nécessitent ainsi l'utilisation d'autres substrats en tant que source de carbone ou donneur d'électrons.

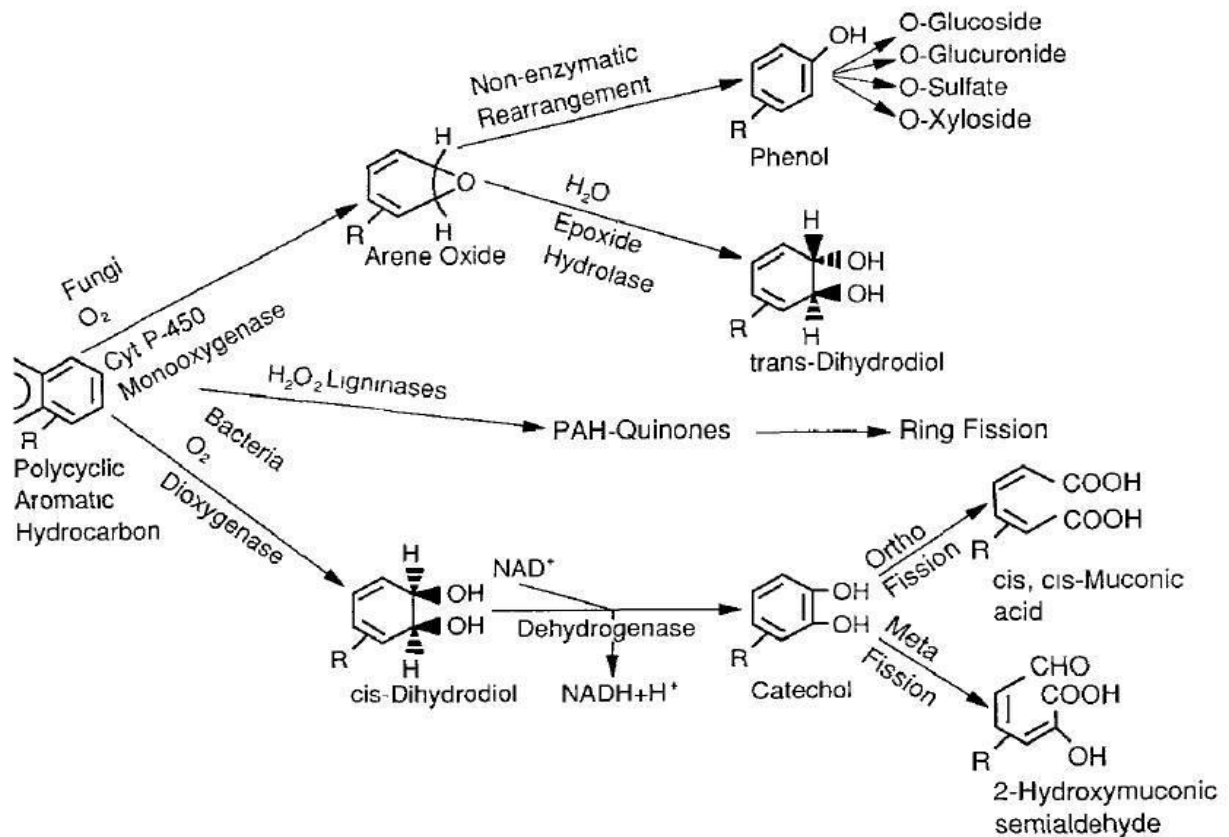


Figure 7 : Voies métaboliques de biodégradation des HAP (Cerniglia, 1992)

Il est généralement admis que la dégradation des HAP par les champignons nonlignolytiques est liée au mécanisme de détoxification des xénobiotiques du cytochrome P450 (Juhász et Naidu, 2000 a). Mais Veignie et al., (2004) et Rafin et al., (2006) ont souligné l'implication possible de mécanismes chimiques de type réaction de Fenton avec les ERO produits par les cellules fongiques chez *Fusarium solani* (S19).

L'activité enzymatique la plus décrite chez les bactéries pour le clivage des cycles aromatiques est l'activité dioxygénase qui incorpore les deux atomes du dioxygène afin d'éliminer des liaisons chimiques (Juhász et Naidu, 2000 a). Longtemps réputée propre aux procaryotes, cette activité commence à être décrite chez les champignons (Rieble et al., 1994 ; Cultrone et al., 2005 ; Wadman et al., 2009) et l'étude de son implication dans la dégradation des HAP pourrait se révéler intéressante.

Des activités enzymatiques présentant aussi un grand intérêt pour la compréhension des mécanismes de dégradation des HAP catalysent la génération d'agents oxydants ou la détoxification des ERO, ces molécules étant impliquées dans l'oxydation des composés aromatiques. Parmi les enzymes générant des agents oxydants se trouvent des peroxydases et plus particulièrement les lignine- (LnPOX) et manganèse-peroxydases (MnPOX) déjà décrites

dans les processus de dégradation des HAP. Les lignine-peroxydases utilisent le peroxyde d'hydrogène généré notamment par des oxydases pour réaliser une oxydation à un électron de différentes structures aromatiques apparentées à la lignine aboutissant à la formation de radicaux de cations aryle. Ces radicaux cationiques réactifs sont capables à leur tour d'attaquer chimiquement le polymère de lignine (**Pelmont, 1995**). Les manganèse-peroxydases catalysent l'oxydation par le peroxyde d'hydrogène du Mn^{2+} en Mn^{3+} qui va lui-même oxyder une variété de substrats phénoliques. Egalement impliquées dans la génération d'agents oxydants, les laccases utilisent l'oxygène moléculaire pour l'oxydation de substrats phénoliques en radicaux phénoxy (**Gianfreda et Rao, 2004**).

Les enzymes de détoxification des ERO sont nécessaires pour la survie des tous les organismes aérobies. En effet, certaines voies métaboliques utilisant l'oxygène dont la respiration génèrent inévitablement des ERO qui peuvent réagir avec des composants cellulaires et les endommager. Ces enzymes éliminent donc les ERO de manière constitutive chez les organismes aérobies, mais peuvent également augmenter leur activité en cas de stress oxydant. Le stress oxydant est une situation où la cellule va générer une plus grande quantité d'ERO que lors de son fonctionnement normal. Ce type de situation peut résulter de différents facteurs dont l'exposition à des xénobiotiques. Beaucoup de réactions enzymatiques de détoxification des ERO sont communes aux différents groupes phylogénétiques dont celui des champignons (**Lushchak, 2011**). Trois activités majeures se distinguent parmi elles: la superoxyde dismutase qui convertit les anions super-oxydes en dioxygène et peroxyde d'hydrogène, la catalase qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène formant de l'eau et du dioxygène, et la glutathion-peroxydase qui entraîne la destruction réductive de l'hydrogène et des hydroperoxydes de lipide en utilisant le glutathion comme donneur d'électrons.

7. Mode d'application de la bioremédiation

7.1. Bioremédiation *Ex-Situ*

Cette méthode de traitement a l'avantage de mieux contrôler des paramètres tels que l'humidité, la température et la teneur en éléments nutritifs. Le traitement peut être effectué plus rapidement une fois la décontamination réelle a commencé, mais les quantités de sol contaminé habituellement présentes sur les sites rendent le coût du traitement *ex-situ* prohibitif, en raison des coûts associés non seulement à la remise en état processus, mais aussi avec l'excavation et le transport du sol (**Koning et al., 2000**). *Ex-situ* la technologie de traitement est divisée en biorestoration en phase boue et en phase solide bioremédiation (**Pavel et Gavrilescu, 2008**).

Bien que certains sites contaminés puissent être contrôlés plus facilement et entretenus avec des paramètres, d'autres sont plus efficaces avec les techniques *in-situ* (Talley et Sleeper, 1997). C'est la raison pour laquelle une décision sur l'alternative choisie doit être prise sur la base d'une variété de facteurs économiques impliqués dans chaque projet.

7.2. Bioremédiation In-Situ

Les processus *in situ* traitent les sols et les eaux souterraines sur place, sans élimination. Les avantages potentiels de la bioremédiation *in-situ* est son caractère non invasif et sa supposée rentabilité. Bien que certains sites peuvent être plus facilement contrôlés et entretenus avec des configurations *ex-situ*, d'autres sont plus efficace avec un traitement *in-situ* (Talley et Sleeper, 1997). Cependant, les processus *in-situ* peuvent être limités par la capacité de contrôler ou de manipuler l'environnement physique et chimique en place.

Comme les traitements hors site ont tendance à être coûteux, les processus de bioremédiation *in-situ*, tels que la surveillance, l'atténuation naturelle, la biostimulation, la bioaugmentation et la rhizoremédiation sont devenues de plus en plus un moyen attractif pour réhabiliter les sites contaminés, notamment ceux pollués par les contaminants (Ayoub et al., 2010).

La communauté microbienne compétente et l'ensemble le processus de bioremédiation des xénobiotiques est influencé par une multitude de paramètres environnementaux comme la température, la disponibilité de l'oxygène (ou un autre accepteur d'électrons), le type et concentration de nutriments, salinité, pression, activité de l'eau, pH et cocontaminants inhibiteurs de processus sur le site ainsi que la composition chimique, l'état physique, la concentration, disponibilité et toxicité du contaminant cible. Si l'un de ces facteurs est sous-optimal ou absent sur le terrain, le taux de réussite de la bioremédiation appliquée peut diminuer (Nölvak, 2012). La fourniture de la quantité d'O₂ nécessaire pour dégrader biologiquement les hydrocarbures est l'un des principaux problèmes de nettoyage *in-situ* en utilisant des méthodes biologiques. L'oxygène peut être introduit sous forme d'air, de liquide oxygène, ou en peroxydes organiques. Une méthode pour résoudre ce problème est bioventilation, aération forcée de la matrice du sol pour fournir de l'O₂ pour la biodégradation.

8. Facteurs influant sur le taux de biodégradation des HAP

Plusieurs facteurs influencent le taux de biodégradation des HAP et leur degré de persistance (Cerniglia, 1984). Parmi lesquels on retrouve : l'existence d'un consortium microbien capable de

dégrader les HAP, la biodisponibilité du contaminant aux attaques microbiennes et de certains facteurs environnementaux (type de sol, température, pH du sol, niveau d'oxygène du sol, humidité, électrons accepteurs, teneur en éléments nutritifs du sol et autres substances pouvant servir de substrat cométabolites, concentrations d'HAP, toxicité, mobilité et histoire de contamination du sol) contribuant à la croissance microbienne (**Cerniglia, 1984 ; Ukiwe et al., 2013**). La biodisponibilité des contaminants suivis du transfert de masse des contaminants et du métabolisme ultérieur sont les facteurs censés contrôler l'efficacité globale de la bioremédiation dans la matrice du sol, en particulier en ce qui concerne les contaminants hydrophobes tels que les HAP (**Mohan et al., 2006**). La biodisponibilité des contaminants est influencée par de nombreux facteurs comme les propriétés physico-chimiques des HAP (structure chimique, poids moléculaire, hydrophobicité), la durée pendant laquelle les HAP ont été introduit dans le sol et les propriétés du sol, y compris la texture du sol, sa composition, sa capacité d'échange cationique, sa teneur en l'eau, son pH et sa structure physique.

Ces facteurs affectant le taux de biodégradation des HAP peuvent être classés en trois domaines (**Vidali, 2001**) :

1. Liés aux HAP : propriétés physico-chimiques des HAP, concentration, durée de présence des HAP dans le sol et la biodisponibilité associée des contaminants pour la population microbienne; effets toxiques ou inhibiteurs des contaminants et de leurs produits de dégradation.
2. Liés à l'environnement: type de sédiment, type de sol, teneur en matières organiques, état nutritionnel, salinité, sol-eau rapport, Température, pH, redox potentiel; présence d'oxygène ou autre accepteur final d'électrons.
3. Liés aux bactéries : l'existence d'une population microbienne capable de dégrader les polluants (Types, population, distribution et exposition antérieure).

Les communautés microbiennes présentes dans un sol contaminé auparavant peuvent métaboliser les HAP à des taux plus élevés que les sols microbiens communautés trouvées dans des sols non contaminés. Une période d'acclimatation est nécessaire pour les microbes après un événement de contamination avant le début des processus de dégradation. Pendant cette acclimatation période, les communautés microbiennes du sol appropriées sont développées par la croissance et l'enzyme l'induction (**Rathbone et al., 1998**).

8.1. Facteurs environnementaux

De nombreuses études ont étudié l'efficacité de la bioremédiation sur une échelle de laboratoire et sous des conditions de laboratoire, telles que pH neutre et températures mésophiles. Cependant, il est évident que les facteurs environnementaux qui varient d'un site à l'autre (comme le pH du sol, la disponibilité des éléments nutritifs) et la biodisponibilité du contaminant peut influencer le processus de biorestauration en inhibant la croissance des micro-organismes dégradant les polluants. De manière générale, température, acidité / alcalinité (pH), l'oxygène, les nutriments, l'irradiation lumineuse et la biodisponibilité sont considérés comme les plus courants facteurs pertinents affectant la bioremédiation des HAP (**Bamforth et Singleton, 2005**).

8.2. Biodisponibilité

La bioremédiation comprend une augmentation de la biodisponibilité envers divers organismes dégradant les polluants (bio-augmentation) ou la fourniture d'amendements pour exploiter la capacité de dégradation de la microflore indigène naturelle existant dans un écosystème (bio-stimulation) (**Megharaj et al., 2011**). Permettre à un polluant de se dégrader via la bioremédiation intrinsèque (où le polluant cible est biodégradé sans intervention) est généralement un processus lent. Par conséquent, une bioremédiation améliorée, impliquant soit la biostimulation ou la bioaugmentation est de plus en plus étudiée (**Juhasz et Naidu, 2000**).

Les manipulations des facteurs environnementaux, tels que la diversité bactérienne et les HAP, ci-dessous sont à la base de bioremédiation (**Jazestani, 2011**), avec les objectifs suivants :

- Amélioration de l'habitat microbien du sol par l'ajout d'engrais, le travail du sol, le chaulage...
- Promouvoir les groupes fonctionnels microbiens capables de dégrader les HAP.
- Augmentation de la biodisponibilité des HAP.

❖ Première partie : Caractérisation physicochimique et Bactériologique

1. Description de la zone d'étude

La baie de Skikda est située dans la partie nord-est de l'Algérie, à environ 470 km à l'est de la capitale Alger. La zone d'étude est en contact avec un énorme complexe industriel pétrochimique, où le pétrole brut et les produits d'hydrocarbures raffinés contaminent l'écosystème via la pollution atmosphérique ainsi que des effluents liquides qui sont déversés dans les écosystèmes aquatiques.

Pour toute analyse, les sédiments, l'eau de rivière, l'eau de la zone estuaire et l'eau de mer ont été collectés sur 6 sites situés à proximité de la raffinerie de pétrole de Skikda. La localisation de ces sites est donnée dans le tableau 2.

Le premier site St1 (choisi comme site de référence) est situé avant le point de rejet de la raffinerie au point de confluence des oueds « Safsaf » et « Zramna », le second est situé après le point de rejet de la raffinerie dans la zone estuaire, le reste des sites est situé de part et d'autre de la zone estuaire, le troisième et le quatrième se situent respectivement sur les plages « Ben Mhidi » et « Flifla ». Enfin, le cinquième et le sixième point se situent respectivement sur les plages « paradis » et « carrière » (Figure 8).

Tableau 2 : Localisation des sites d'échantillonnage

Sites	Latitude	Longitude
St1	36.872953N	6.940996W
St2	36.881041N	6.930255W
St3	36.891311N	6.997657W
St4	36.903441N	7.039901W
St5	36.894309N	6.883903W
St6	36.914603N	6.883254W

2. Prélèvement des échantillons

Les prélèvements simultanés d'eau de surface et de sédiments ont été réalisés en octobre 2016, janvier 2017, avril 2017 et juillet 2017. Trois échantillons de sédiments et d'eau ont été prélevés sur chaque site. Ces derniers sont par la suite homogénéisés pour avoir un échantillon moyen pour chaque site.

Des échantillons d'eau ont été prélevés à 0,3 m sous l'interface air-eau dans des bouteilles en verre ambré de 1 litre. Des échantillons de sédiments ont été prélevés à l'aide de bouteilles cylindriques en verre ambré de 0,5 L.

Les échantillons destinés à l'analyse microbiologique sont prélevés dans des flacons en verre stérilisés de 0,25 L. Tous les outils utilisés pour l'échantillonnage sont préalablement nettoyés et rincés à l'acétone. Les échantillons ainsi prélevés ont été transportés au laboratoire pour analyse, dans une glacière à 4-6°C.

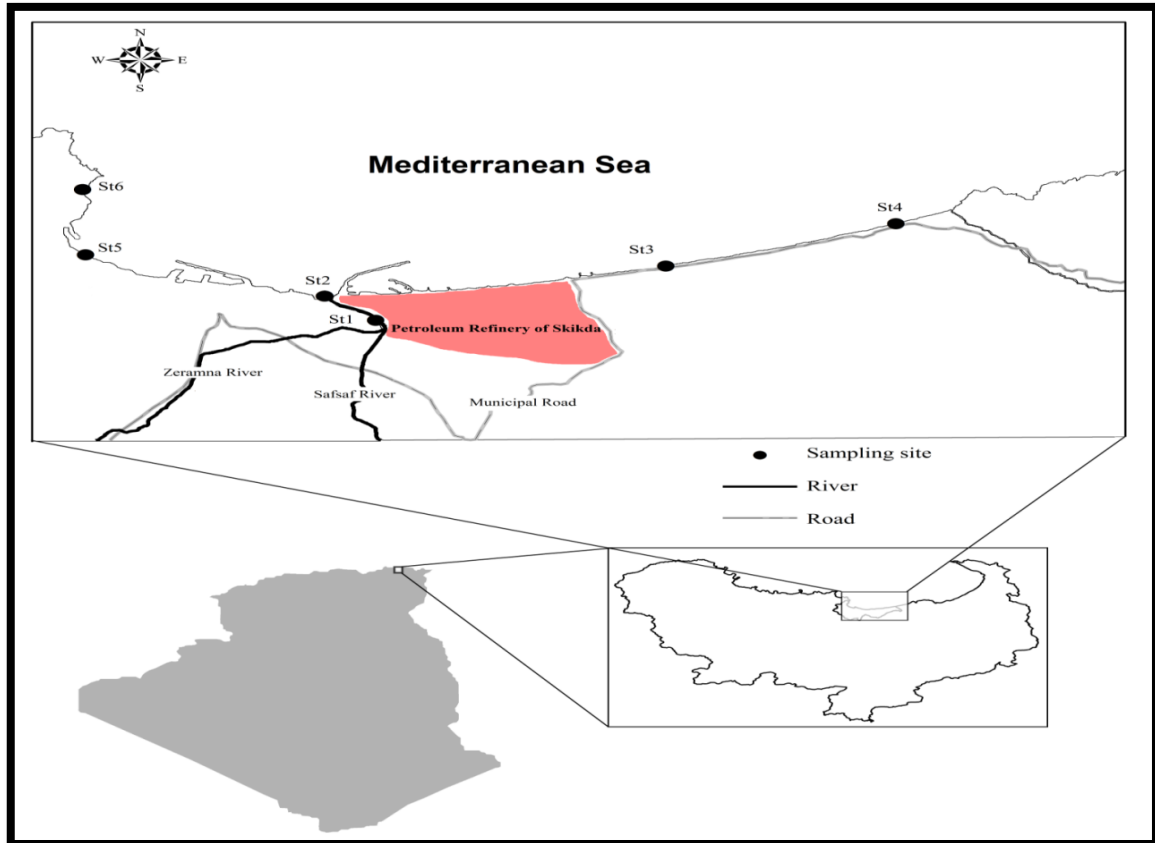


Figure 8 : Localisation de l'industrie des raffineries de pétrole de Skikda et des sites d'échantillonnage (**Google Map modifiée**)

3. Paramètres physicochimiques

3.1. Eau

Les paramètres physico-chimiques, tels que le pH, la conductivité, la salinité, l'oxygène dissous, la température et le potentiel d'oxydoréduction ont été mesurés *in situ* à l'aide d'un appareil portable multi-paramètres (modèle HANNA HI9829).

La matière en suspension (MES) a été déterminée par filtration de l'eau avec une pompe sous vide sur des filtres en nitrate de cellulose de porosité 0,45 µm comme décrit par **Rodier (2009)**.

3.2. Sédiments

Pour les sédiments, les caractéristiques suivantes ont été déterminées :

3.2.1. Conductivité électrique (CE) et pH

Ces deux paramètres ont été mesurés en utilisant un appareil multi-paramètres (modèle HANNA HI9829).

3.2.2. Dosage de la matière organique (Walkley et Black, 1934)

Le dosage de la matière organique est réalisé à partir de l'un de ces constituants de carbone et l'azote. Le carbone représente 58% de la matière organique.

$$\text{MO \%} = \text{CO \%} \times 1,724$$

La détermination de CO (Carbone Organique) est basée sur l'oxydation de ce dernier par le bichromate de potassium en milieu d'acide sulfurique source de chaleur.

- **Mode opératoire :**

Peser un poids p de sol séchée et tamisée dans une fiole conique puis ajouter 10 mL de la solution de bichromates de potassium. Agiter d'un mouvement de va et vient, verser 20 mL d'acide sulfurique (2N), agiter pendant une minute. Enfin, laisser reposer 30 minutes puis ajouter 150 ml d'eau distillée (**réactifs voir annexe 3**).

- **Dosage**

On détermine la quantité de bichromates de potassium n'ayant pas réagi à l'oxydation. Ajouter 6 gouttes de ferroïne.

Doser avec le sel de Mohr en laissant couler celui-ci, goutte à goutte, au centre de la suspension à doser en agitant continuellement.

Un échantillon normal prend la couleur sombre au contact de la ferroïne et vire finalement vers le rouge.

- **Le témoin**

Traiter un échantillon témoin sans terre dont :

T = nombre de mL de solution de sel de Mohr verser pour le témoin.

T' = volume de bichromates de potassium.

t = concentration de la solution de sel de Mohr.

t' = concentration de bichromates de potassium.

$T \times t = T' \times t'$, on déduit $T = 10/T$.

- **Calculs**

La réaction



Carbone (C) en gramme pour 100 grammes de terre : $C = 0,39 \times (10 - Vt) / P$

Dont :

- **P** : poids prise de terre.
- **V** : mL versés de solution de sel de Mohr.

- **Calcul de la matière organique**

Comme la matière organique ne renferme que 58 % de carbone, il faut multiplier le pourcentage de carbone par le facteur 1,72 pour avoir le pourcentage de la matière organique.

3.2.3. Dosage du phosphore (Olsen et *al.*, 1954)

L'échantillon est porté à très haute température dans un creuset de platine en présence de carbonate de sodium. Le résidu transvasé dans l'acide sulfurique réagira avec le molybdate d'ammonium pour former le complexe phospho-molybdique qui s'accompagnera d'une coloration bleue après réduction par l'acide ascorbique. Le dosage est effectué au spectrophotomètre. Tout le phosphore minéral et organique (assimilable) et dissous est dosé par cette méthode.

Mode opératoire

Peser 1g de sédiment sec tamisé à 0,5 mm et 5 g de carbonate de sodium. Mélanger et placer dans un creuset en platine.

- Ajouter 1 g de carbonate de sodium au-dessus du mélange sol/carbonate de sodium.
- Chauffer doucement le creuset à l'aide d'un bec Bunsen afin d'évaporer toute éventuelle humidité.
- Placer le couvercle sur le creuset de façon à laisser 1/5 du creuset non couvert. Chauffer à l'aide du bec Bunsen avec une petite flamme, pendant 10 min afin que la masse fonde doucement.
- Accélérer la fusion en chauffant à flamme maximum pendant 15 à 20 min.
- Soulever le couvercle avec une pince à intervalles réguliers de façon à être en conditions oxydantes.

- Lorsque la fusion est terminée, laisser refroidir un peu le creuset avant de le manipuler pour éviter qu'il se déforme. Puis le laisser refroidir tout en lui imprimant un mouvement rotatif.
- Lorsque le creuset est suffisamment froid, le faire rouler doucement entre les mains pour faciliter le décollage de la masse fondue.
- Transvaser le contenu du creuset dans une fiole jaugée avec 30 mL de solution d'acide sulfurique (4,5 mol/L). Faire très attention d'éviter des pertes dues à l'effervescence produite.
- Placer le creuset et son couvercle dans un bécher de 100 ml.
- Ajouter 25 mL de solution d'acide sulfurique (1 mol/L) et chauffer jusqu'à l'ébullition.
- Transvaser la solution et les sédiments dans la fiole de 250 mL, ajuster au volume avec de l'eau déminéralisée.
- Laisser reposer jusqu'à ce que les sédiments soient déposés.
- Prélever une aliquote de 5 mL de surnageant et verser dans des fioles jaugées de 50 ml de 4 échantillons.
- Ajuster à pH 5 avec la solution de carbonate de sodium, ajouter 5 ml de la solution d'acide sulfurique (2 mol/L) et 5 ml de la solution de molybdates d'ammonium et agiter.
- Ajouter 4 ml de la solution d'acide ascorbique et d'antimoine, ajuster le volume avec l'eau déminéralisée. Homogénéiser et laisser la coloration se développer pendant 10 mn.
- Lire l'absorbance au spectrophotomètre à 860 nm.

Calcul

Après la lecture au spectrophotomètre, tracer la courbe d'étalonnage et déterminer la concentration de phosphore contenue dans les échantillons. Pour calculer la teneur du phosphore dans 100g des sédiments on applique la formule suivante :

$$P (\mu\text{g/g}) = C \times V / S = 250 C$$

Où :

C: microgrammes de phosphore déterminés sur la courbe d'étalonnage ($\mu\text{g/mL}$) ;

V : volume d'extraction en mL (250 mL) ;

S : poids de la prise d'essai de terre en g (1g).

4. Dénombrement de flore totale aérobie mésophile FTAM (Joffin and Leyral, 2009)

Ce dénombrement se fait sur gélose nutritive (GN) ordinaire, permettant ainsi à tous les microorganismes revifiables non exigeants de se développer.

Des dilutions décimales sont réalisées pour chaque échantillon d'eau afin de réduire la charge microbienne et avoir des colonies dénombrables lors de lecture.

Deux boîtes de gélose nutritive sontensemencées en surface par 0,1ml de chaque dilution. Les boîtes sont ensuite incubées à 25°C pendant 72h.

Pour calculer la charge microbienne, on applique la formule suivante :

$$N = \frac{\sum C}{V. (n1 + 0,1.n2)} \cdot \frac{1}{d}$$

Dans laquelle :

C : Somme des colonies des boîtes comptées ;

V : Volume de l'inoculum ;

n1 : Nombre de boîtes comptées à la plus faible dilution ;

n2 : Nombre de boîtes comptées à la plus forte dilution ;

d : Dilution correspondant à la dilution la plus faible.

5. Dosage des hydrocarbures

5.1. Hydrocarbures totaux (HCT)

Les hydrocarbures totaux ont été déterminés comme dans la méthode gravimétrique (pour l'eau et les sédiments) décrite par **Fusey et al., (Fusey et Oudot, 1973 ; 1976 ; Fusey et al., 1981)**.

Cette méthode peut être réalisée simplement en évaporant le solvant d'extraction et en pesant le résidu. La perte abiotique (processus d'évaporation) a été précédemment estimée dans les fioles stériles marquées.

Pour l'extraction du sol, la technique a été légèrement modifiée, selon cette technique nous avons pu déterminer la quantité d'hydrocarbures (ppm) présente dans l'échantillon à analyser. Le principe de la méthode comprend les étapes suivantes :

- Un volume de (100 mL) de l'échantillon à analyser a été versé dans une ampoule à décanter.
- Quelques gouttes d'orange de méthyle et 0,2 mL de HCl à 50% ont été ajoutées pour acidifier l'échantillon.
- Du chloroforme (meilleur solvant pour l'extraction des phases organiques) a été ajouté pour un volume égal à la moitié du volume de l'échantillon.
- Le mélange a été bien agité avec une ouverture de temps en temps pour laisser le gaz s'échapper, puis il a été décanté pendant quelques minutes.
- Enfin, la phase supérieure a été filtrée sur Na₂SO₄ afin d'éliminer toute trace d'humidité.

- Le solvant contenant la phase organique a été récupéré dans un bêcher préalablement pesé et placé dans une étuve jusqu'à évaporation totale. L'échantillon final a été pesé et la quantité obtenue de résidu a été calculée en utilisant la formule ci-dessous :

$$Q_{\text{Total}} (\text{ppm}) = W_f - W_i / V_s$$

Où :

Q_{Total} : La quantité d'hydrocarbure total ;

W_f : Poids final de l'échantillon ;

W_i : Poids initial de l'échantillon ;

V_s : Volume de l'échantillon.

5.2. Hydrocarbures Aromatiques polycycliques (HAP)

Les HAP ont été déterminés comme décrit dans (**Tadashi et al., 2011 ; Comité technique CEN / TC BT) 2007**). Les molécules sélectionnées pour cette étude (l'anthracène, le pyrène et le benzo (a) pyrène) font partie des 16 HAP les plus dangereux pour l'environnement et sont répertoriés comme polluants de contrôle prioritaires selon l'Agence américaine de protection de l'environnement (USEPA) (**USEPA, 2014 et Keith, 2014**). Ils représentent également les trois catégories de HAP; légers 2-3 anneaux 152-178 g/mol, intermédiaires 4 anneaux 202 g/mol, et lourds > 5 anneaux 228-278 g/mol.

Les concentrations d'anthracène, de pyrène et de benzo (a) pyrène dans les sédiments et l'eau ont été déterminées par HPLC. 20 ml d'échantillons d'eau et 20 g de poids sec de sédiment ont été acidifiés avec HCl 1 N, agités pendant 3 min avec un volume égal de 1: 1 (v: v) n-hexane: acétate d'éthyle, et centrifugés (9600 tr/min; 4°C; 10 min). La couche organique a ensuite été collectée.

L'extrait a été séché sous un courant d'azote et l'extrait sec a été dissous dans de l'acétonitrile et analysé. L'analyse HPLC a été réalisée en utilisant un système HPLC Agilent Technology (Agilent 1260 Infinity Quaternary) par injection d'échantillon de 20 µL, un détecteur UV/Vis et une colonne analytique (StableBond C18 (Zorbax) (4,6 × 150 mm × 15 µm).

La phase mobile est un gradient d'écoulement (1 ml/min) avec de l'acétonitrile et de l'eau avec détection à des longueurs d'onde de 253 nm, 239 nm et 295 nm respectivement pour l'anthracène, le pyrène et le benzo (a) pyrène. La température dans le four à colonne a été réglée à 25°C. Une phase mobile avec des conditions d'éluion en gradient à étapes multiples a été utilisée avec un temps de fonctionnement total de 60 min par injection d'extrait d'échantillon (tableau 3).

Pour les sédiments, les concentrations résiduelles ont été calculées en utilisant la formule suivante:

$$[Ci] = (Ai \times fi \times V) / m$$

[Ci]: Masse de substance (i) d'un échantillon en mg / g (sédiment sec) ;

Ai: Surface ou hauteur du pic de la substance (i) dans le chromatogramme ;

fi: Facteur de réponse de la substance (i) en nombre par mg / ml; pente de la courbe d'étalonnage ;

V: volume d'extrait en ml ;

m: masse de sédiments secs en g.

Tableau 3 : Flux de gradient de phase mobile avec composition et temps

Temps (min)	AC (%)	H ₂ O (%)
0	40	60
27,5	95	5
35,5	100	00
45	40	60
60	40	60

5.3. Spectres UV-Visible des HAP

Avant de procéder au dosage des HAP, il a été préférable de connaître leur maximum d'absorbance en établissant leur spectre UV-Visible (Figure ci-dessous)

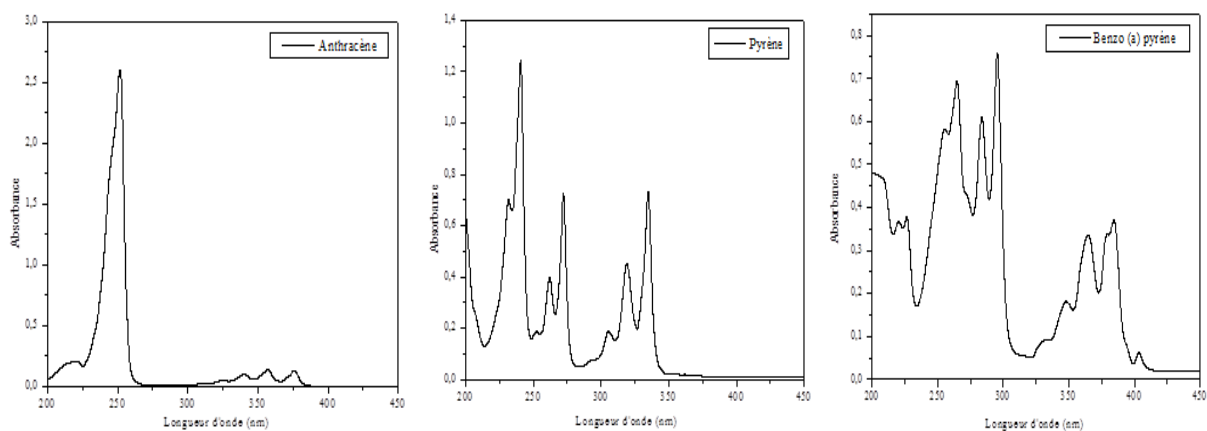


Figure 9 : Spectre UV-Visible des trois HAP

5.4. Etablissement des courbes d'étalonnages des HAP

Les courbes d'étalonnage de chaque composé ont été tracées afin d'analyser quantitativement des solutions étalon de HAP's préparées dans l'acétonitrile à des concentrations allant de 0,001 mg/L à 0,2 mg/L. Les courbes d'étalonnage des trois HAP (**voir annexe 6**)

6. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel XLSTAT (**Inc. corporation. 2014**). La normalité des données a été vérifiée à l'aide du test Shapiro-wilk. Comme les ensembles de données n'étaient pas normalement distribués, un test de de Kruskal-wallis a été appliqué pour étudier les variations saisonnières des sites et des caractéristiques physico-chimiques, de la charge microbienne et des concentrations d'hydrocarbures. Si des résultats significatifs sont trouvés, le test de Dunn sera utilisé pour détecter des différences significatives entre les différents sites et le site de référence St1 ($p < 0,05$).

L'Analyse en Composantes Principales (ACP) a été réalisée afin de mettre en évidence les principaux facteurs qui influencent la distribution des hydrocarbures et étudier la relation de dépendance entre eux et les paramètres physico-chimiques et la charge microbienne. Enfin, la régression linéaire entre les paramètres de l'eau et les paramètres de des sédiments a été appliquée afin de mettre en évidence le comportement et le devenir des hydrocarbures dans les compartiments étudiés. Le niveau critique de signification a été fixé à ($p < 0,05$) pour tous les tests.

❖ Deuxième Partie : Identification moléculaire des souches microbiennes

1. Isolement et repiquage des souches bactériennes

L'isolement se fait à partir des cultures de dénombrement dans la boîte de Petri contenant la gélose nutritive (GN). Les colonies sont prélevées selon leur morphotype (taille, aspect, contour, couleur...) et un représentant de chacune des colonies est isolé. La culture se fait dans l'obscurité à 30°C. La durée d'incubation varie d'une souche à l'autre (de 24h à 72h). Chaque colonie est repiquée puis purifiée 3 fois avant d'être caractérisée au niveau moléculaire.

2. Extraction de l'ADN bactérien

L'ADN total est extrait par la méthode telle que décrite par **Leblond et al., (1966)**.

- **Préparation des solutions :**

- **Tris-HCL 2M (pour 1000ml) :**

Tris base: 242g

H₂O UP: 1000ml

Le pH est ajusté à 8 avec du NaOH 2N

- **EDTA 0,5M (pour 1000ml) :**

EDTA : 146,1g

H₂O UP : 1000ml

Le pH est ajusté à 8 avec du NaOH 2N ensuite la solution est autoclave à 120°C pendant 15min.

- **SDS soduim dodecyl sulfate 10% (pour 100ml) :**

SDS : 10g

H₂O UP : 100ml

Le pH est ajusté à 7.2 avec du NaOH 2N ensuite la solution est autoclave à 120°C pendant 15min.

- **Lysozyme (pour 1ml):**

Lysozyme : 50mg

H₂O UP : 1ml

- **Protéinase K (pour 1ml):**

Protéinase K : 20mg

H₂O UP : 1ml

- **Acétate de potassium 3M (pour 10ml) :**

Acetate de potassium à 5M : 2,94g/6ml

Acide acétique : 1,15ml

H₂O UP : 2,85ml

• **Mode opératoire :**

- A partir de culture de 24h sur bouillon nutritif centrifugée, 1ml de Tris-Hcl à 10 mM est ajouté au culot ensuite centrifugé à 11000 rpm pendant 10 min à 4°C. Le surnagent est par la suite pipeté et 500µl de Tris-Hcl a 10 mM est ajouté au culot et vortexé ;
- Ajouter 20 µl de lysozyme 50mg/ml au tube. Vortexer et incuber au bain sec à 37°C pendant 40 min ;
- Ajouter 60 µl d'EDTA à 0,5M et 10 µl protéinase K 20mg/ml et incuber à 37°C pendant 10min ;
- Ajouter 60 µl SDS 10% et incuber à 50°C pendant 40min ;
- Ajouter 350 µl d'acétate de potassium 3M et placer au bain de glace pendant 10 min ;
- Centrifuger à 12000rpm pendant 10min et récupérer le surnagent ;
- Ajouter 1ml isopropanol au surnagent, récupéré et agiter, l'ADN précipité est observé ;
- Centrifuger à 10000 rpm pendant 1min, récupérer le culot ;
- Ajouter 1ml éthanol 70% au culot récupéré ;
- Centrifuger à 10000 rpm pendant 1min, et récupérer le culot ;
- Laisser ouvert les tubes à l'air libre pendant 30 min ensuite ajouter 50 µl d'eau ultra pur ;
- Mesurer la concentration et la pureté de l'ADN génomique à l'aide d'un spectrophotomètre (nanodrop) ;
- Les échantillons ainsi récupérés sont congelés à -20°C.

3. Extraction d'ADN génomique des micro-algues

3.1. Isolement des microalgues

L'isolement a été effectué sur milieu solide **BG11 (Hoff et Snell 2001 ; Rippka, 1988)**, La composition chimique du milieu est représentée dans le tableau 4.

Tableau 4 : Composition chimique de milieu d'isolement des micro-algues

Elément	Concentration (g/l)
NaNO ₃	1.5
KH ₂ PO ₄ 3 H ₂ O	0,04
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0,075
CaCl ₂ 2 H ₂ O	0,036
Acide citrique	0,006
Citrate ferrico-ammoniaque	0,006
EDTA	0,001
Na ₂ CO ₃	0,02
Agar	15

La purification des souches des micro-algues est basée sur le principe des repiquages répétés sur boîtes. Deux colonies d'aspect différent ont été prélevées et étalées sur de nouvelles boîtes de Petri. Cette opération sera répétée plusieurs fois pour assurer une meilleure purification. L'incubation se fait dans enceinte de phyto-culture à 30°C et sous un cycle lumineux de 14h/1j0h.

3.2.Extraction d'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique des micro-algues se fait en utilisant le Cetyltriméthylammonium bromide (CTAB) selon le protocole décrit par **Kumar et al., en 2014**.

• Préparation des Solutions utilisées:

➤ CTAB Buffer (pour 100ml) :

Tris-HCL : 10 Mm

EDTA : 25Mm

NaCl : 1,5 M

H₂O UP : Compléter le volume de 100 ml

➤ Chloroform Isoamyl Alcohol (CIA) (24 :1)

➤ Bêta-mercaptoéthanol

➤ Ethanol 70%

➤ Tampon TE

• Mode opératoire :

- Récupérer à partir du milieu de culture une quantité de 0,1g de micro-algues et mettre l'échantillon dans un tube eppendorf de 2 ml ;
- Ajouter 1,5 ml de CTAB ; 10 µl de β-mercaptoéthanol, bien agiter et incubé dans un bain marie à 65°C pendant 1 heure ;
- Centrifuger à 13000 tr / min pendant 15 minutes, recueillir le surnageant dans un nouveau tube eppendorf ;
- Ajoutez une quantité égale de CIA au surnageant ;
- Trois couches apparaissent, collectez la couche supérieure dans un nouveau tube eppendorf puis ajoutez un volume égal d'isopropanol ;
- Incuber 20 min à 20°C pour précipiter l'ADN ;
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 15 minutes;
- Éliminer le surnageant et ajouter 500 µl d'éthanol à 70% au culot obtenu pour le lavage ;
- Bien mélanger et centrifuger à 8000 tr / min pendant 5 minutes ;
- Jeter le surnageant et ajouter 70 µl de tampon TE ;
- Les échantillons ainsi récupérés sont congelés à -20°C.

4. Mesure de la concentration et la pureté de l'ADN Génomique

Le dosage de l'ADN se fait par mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm, selon la formule suivante : $C (\mu\text{g/ml}) = (A_{260}) \times 50$. La pureté de l'ADN est donnée par le rapport (A_{260}/A_{280}). Ce rapport doit être voisin de 1,8. Un rapport plus élevé indique une contamination par les ARN, alors que les protéines ou le phénol diminuent cette valeur. Les mesures d'absorbances sont effectuées grâce au spectrophotomètre (NanoDrop 8000 ThermoScientific) La concentration de l'ADN dans l'échantillon doit être au minimum 20 $\mu\text{g/ml}$, alors que le rapport d'absorbance entre λ 260 et λ 280nm enregistrées est compris entre 1,6 et 1,8.

5. PCR pour les bactéries et micro-algues

La PCR est une méthode permettant d'obtenir rapidement une quantité importante d'un segment précis d'ADN génomique grâce à l'utilisation de deux amorces de polarités opposées encadrant le fragment à amplifier, l'amplification de l'ADN étant exponentielle (**Mullis et al., 1986 ; Saiki et al., 1985**). On utilise un kit d'amplification (Taq polymérase Invitrogen By life technologies).

Dans un tube eppendorf on met :

- Taq polymérase : 0,4 μl
- MgCl_2 : 3,2 μl
- DNTP : 0,8 μl
- Tampon : 4 μl
- Amorces F : 1,6 μl
- Amorces R : 1,6 μl
- Extrait D'ADN : 1 μl
- H_2O UP : 27,4 μl .

NB : les amorces utilisées sont des amorces universelles visant d'amplifier la partie d'ADN codante pour l'ARN16s et ayant une taille de 1500 pb, à savoir : 27F (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3') et 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3').

Témoin : Tous les ingrédients de la PCR sont mis dans un tube eppendorf à part l'extrait D'ADN.

Puis on procède à l'amplification dans un thermo-cycler (C 1000 Thermal cycler. BIO-RAD) (Figure 10) dans les conditions rapportées dans le tableau ci-dessous : (**Tian et al., 2008**)

Tableau 5 : Conditions de la PCR pour l'amplification

Dénaturation Initiale	94°C	4 min
30 cycles	94°C	1 min
	55°C	1min
	72°C	2min
Extension final	72°C	10 min
Maintenir	4°C	∞



Figure 10 : Déroulement de la PCR dans le Thermocycleur (**Photo personnelle**)

6. Purification à partir de produit PCR

- Les produits PCR sont purifiés par le kit de purification (**Invitrogen** By life technologies)
- Ajouter 4 volumes du binding buffer (B2) (avec l'isopropanol) à 1 volume du produit PCR, (Environ 60 µl à 15 µl) bien agité ;
- Placer le tout dans la spine colonne et centrifuger à 10 000 g pendant 1 min puis jeter le culot ;
- Remettre la spine colonne dans le même tube et ajouter 650 µl de wash buffer (W1) (avec l'éthanol) puis centrifuger à 10 000 g pendant 1 min ;
- Jeter le culot et centrifuger encore une fois au max speed pendant 3 min ;
- Place la spine colonne dans un nouveau tube et ajouter 30 µl d'éluant buffer (E1) et incubé à température ambiante pendant 3 min puis centrifuger au max speed pendant 3 min ;
- Les échantillons sont ensuite congelés à -20°C.

7. Electrophorèse

Afin de confirmer le bon déroulement de la PCR et l'amplification de la bonne partie de l'ADN, Les fragments amplifiés obtenus sont séparés selon leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % dans les conditions suivantes :

- Tris, Borate, EDTA TBE *1 ;
- Gel stain pour la fluorescence ;
- Tampon de charge ;
- Le marqueur de taille utilisé est 50 pdb (Invitrogen By life technologies) ;
- Cuve d'électrophorèse à voltage 50 volts pendant 45min (Figure 11).

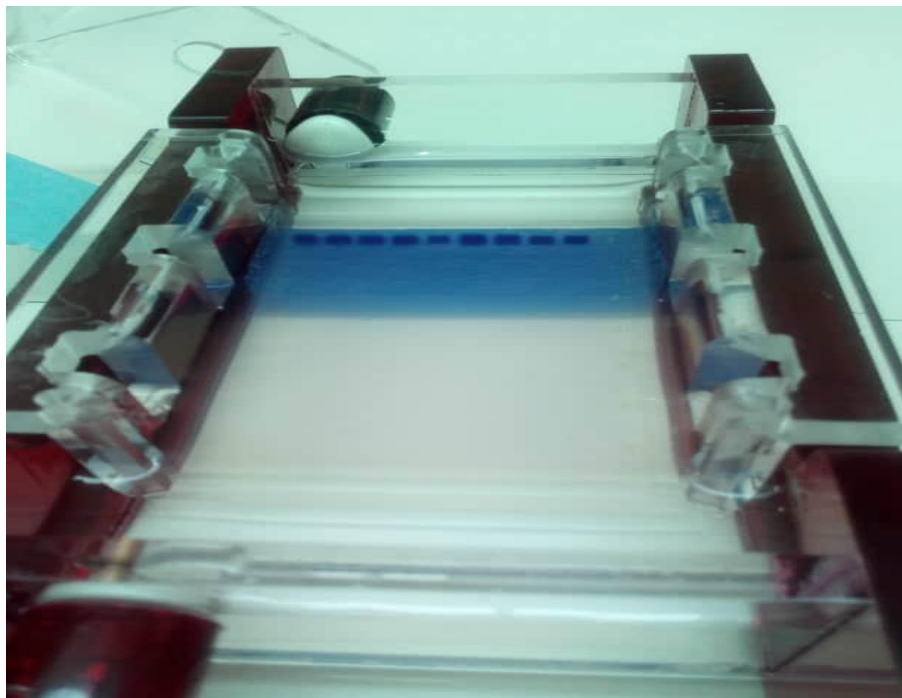


Figure 11 : plaque d'électrophorèse (Photo personnelle)

Le gel est ensuite visualisé dans un system d'imagerie sur gel (**Molecular Imager. Gel DOC XR+. BIORAD**). Les résultats de la comparaison des fragments d'ADN amplifiés avec le marqueur de taille ont montré que la taille de ces fragments avoisine les 1500 paires de base (figure 12)

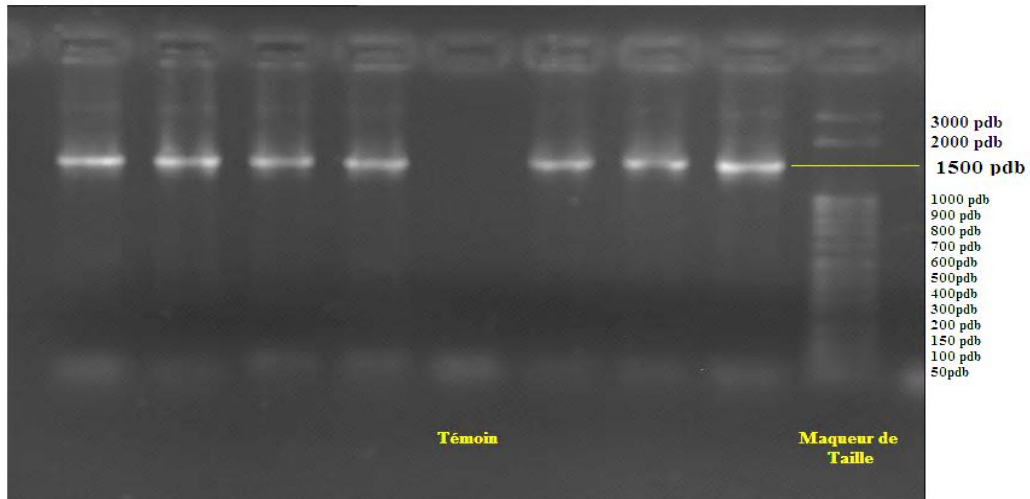


Figure 12 : Migration de l'ADNr 16s sur gel d'agarose (Photo personnelle)

8. Séquençage

Une fois l'ADN purifié, on procède aux étapes suivantes :

8.1 PCR pour le séquençage (selon le manuel du séquenceur 3500XL Genetic Analyzer. Applied Biosystems / HITACHI)

- Dilution des échantillons à séquencer de façon à avoir une quantité d'ADN avoisinant les 35 ng dans 10 µl dans chaque puits de la microplaque du séquenceur ;
- Ajout de 1µl de solution d'amorces 27Fet 1492R dans chaque puits ;
- Ajout de 9 µl du mix pour la PCR (fourni avec le séquenceur et contenant cette fois des DNTP marquées) ;
- Puis, on procède à un PCR dans les conditions rapportées dans le tableau 6.

Tableau 6 : Conditions de la PCR pour le séquençage

Dénaturation Initiale	96°C	1min
25 cycles	96°C	30 s
	50°C	10 s
	50°C	5 s
Extension Finale	60°C	4 min
Maintenir	4°C	∞

8.2 Séquençage (DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis, Applied Biosystems Chemistry Guide, Third Edition)

Les séquençages directs des produits PCR ont été effectués par un séquenceur (**3500XL Genetic Analyzer. Applied Biosystems / HITACHI**) (Figure 13), selon la méthode de terminaison de

chaîne par didéoxynucléotides. Les résultats sont visualisés sur des chromatogrammes (Figure 14), les 4 types de ddNTP étant marqués par des fluorochromes différents.



Figure 13 : Séquenceur d'ADN (Photo personnelle)

- **Mode opératoire**

- Préparation de la solution BigDye Xterminator :
 - 20 μ l de billes Xterminator
 - 90 μ l de solution SAM
 - Bien agiter.
- Ajouter, dans chaque puits de microplaque, les 110 μ l de la solution BigDye Xterminator à 20 μ l du produit PCR ;
- Agiter pendant 30 min ;
- Centrifuger 2000 g pendant 2 min ;
- Calibrer le séquenceur ;
- Procéder au séquençage par le module sequencing longned protocole. (BDxStdSeq50-PoP7xL-Z).

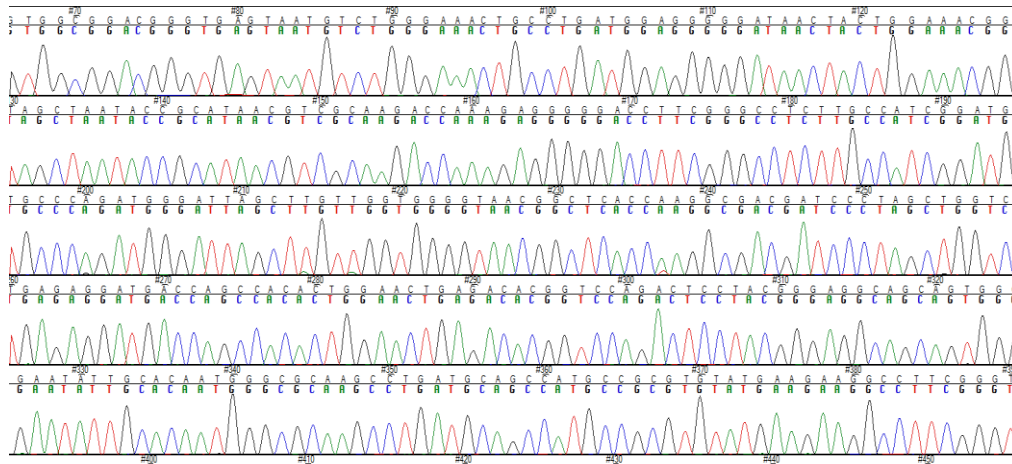


Figure 14 : Chromatogramme des séquences d'ADNr 16S

8.3 Correction et reconstitution des séquences

La correction et reconstitution des séquences a été faite sur PC grâce au logiciel (**Sequencher 4.1.4**) qui permet de visualiser le résultat de séquençage sous forme d'électrophorégramme. Il permet la correction manuelle directe de la séquence et de supprimer le début ou la fin de séquences souvent illisible ou ayant des pics arrondis.

8.4 Recherche de similarités

Le recherche de similarités entre la séquence d'ADNr 16S et la banque d'ADN (Gen Bank) data base du National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) grâce à l'outil d'alignement Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Cette étape permet l'identification des séquences par homologie avec d'autres séquences et affilier l'isolat étudié à un groupe taxinomique.

8.5 Construction d'arbres phylogénétiques

Une analyse génétique évolutive moléculaire le logiciel (Mega software) en utilisant le voisinage méthode (neighbor-joining method) a permis de générer une matrice de distance élaborée par comparaison des séquences d'ADN. Cette matrice est ensuite représentée sous forme d'un arbre phylogénétique.

❖ Troisième partie : Suivi de la dégradation du pyrène

1. Choix de du substrat

La molécule retenue pour cette étude est le pyrène qui est le plus abondant dans les sites de prélèvement de notre étude, elle est reconnue par sa toxicité et sa persistance dans les milieux. La molécule est utilisée comme substrat d'étude à un degré de pureté de **99,99 %**.

2. Milieux de culture

Le milieu de culture est un milieu minimum Bushnell Hass Mineral Salts medium (BHMS) où le pyrène est la seule source de carbone et d'énergie. Il est recommandé pour l'examen des carburants pour la contamination microbienne et pour l'étude de la détérioration microbienne des hydrocarbures (**Mahjoubi et al., 2013**).

La composition de ce milieu de culture est reportée dans le tableau 7.

Tableau 7: Composition du milieu **BHMS**

Ingredients	Gr / Litre
Magnesium sulphate	0.200
Calcium chloride	0.020
Monopotassium phosphate	1.000
Dipotassium phosphate	1.000
Ammonium nitrate	1.000
Ferric chloride	0.050
pH final (à 25°C) 7.0±0.2	

3. Croissance dans milieu minimum avec du pétrole brut

Il s'agit d'une adaptation et réactivation des souches bactériennes. Un consortium de souches bactériennes isolées à partir de la St2 est ont été cultivées en aérobie (DO 600nm = 1,0) dans des flacons en verre de 250 ml de capacité avec 50 ml de milieu de sel minéral contenant (g/l): NaCl (0.5), (NH₄)₂SO₄ (0.1), NaNO₃ (0.2), MgSO₄.7H₂O (0.025), K₂HPO₄.3H₂O (1.0) et KH₂PO₄ (0.4), agar (15g / L), à pH 7 avec du pétrole brut comme seule source de carbone à 1%. Les flacons de culture ont été maintenus dans un agitateur pendant 7 jours à 200 tr/min à 30°C (**Liu et al., 2016**).

Après 7 jours d'incubation, le bouillon de culture de chaque flacon a été centrifugé à 8000 rpm à 4 °C pendant 10 minutes. La masse microbienne est récupérée et va être ensuite utilisée comme inoculum pour le suivi de la dégradation du Pyrène.

4. Dégradation du Pyrène

Les cultures sont réalisées dans des fermenteurs miniaturisés formant un système clos. Il s'agit de flacons en verre de 100 ml de capacité contenant des concentrations de pyrène de : 10, 20, 30 40, 50 60, 80, 100 mg /L comme seule source de carbone et d'énergie dans un volume de 40ml. Une série de flacon et inoculée par les bactéries pré-cultivées au préalable sur du pétrole brut, et une autre série est inoculée par des bactéries plus des micro-algues isolées à partir du même site de prélèvement. Les cultures sont incubées dans une étuve microbiologique à 30°C sous agitation de 150 tr/min. Puis on procède à une série de prélèvement périodique durant 30 jours afin de suivre la dégradation du pyrène, par un consortium de souches bactériennes isolée à partir de la station 2 (zone estuaire la plus contaminée par les rejets de la raffinerie).

5. Témoins et contrôle

Deux témoins sont réalisés dans les mêmes conditions d'expérience :

- Un témoin stérile contenant les différentes concentrations de pyrène sans le microbiote des eaux, pour la vérification de la présence d'une éventuelle dégradation abiotique ;
- Un témoin (blanc) est inoculé par le microbiote des eaux en absence du Pyrène.

6. Suivi de l'évolution de la biomasse

Ce suivi se fait mesure de la densité optique (DO) par un spectrophotomètre UV-VIS à 600 nm à chaque prélèvement. La production de la biomasse permet de nous donner une idée sur la dégradation du substrat qui est utilisé comme seule source de carbone et d'énergie.

7. Suivi de la disparition du substrat

La cinétique de dégradation du Pyrène a été établie en procédant à des prélèvements périodiques de 5, 10, 15, 20 et 30 jours.

8. Extraction et dosage du pyrène

Les mêmes méthodes d'extraction et de dosages appliquées sur les échantillons prélevés des sites pour l'étude de la pollution de l'écosystème, sont utilisées pour le suivi de la cinétique de dégradation du Pyrène.

11. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel XLSTAT (**Inc. Corporation 2014**). La normalité des données a été vérifiée à l'aide du test Shpiro-wilk. Comme l'ensemble des données étaient normalement distribués, une analyse de la variance a été appliquée pour vérifier l'effet de la concentration du Pyrène sur la biodégradation.

Le test de Student a été également appliqué pour la comparaison de la dégradation des différentes concentrations du Pyrène par les deux processus : biologique et non biologique.

12. Isolement et identification de souches microbiennes pouvant utiliser le Pyrène comme seule source de carbone et d'énergie

À la fin d'incubation, un prélèvement de 100µl à partir du milieu de culture a fait l'objet d'isolement et d'identification des souches bactériennes ayant dégradé les différentes concentrations du Pyrène en l'utilisant comme seule source de carbone et d'énergie. L'isolement se fait sur gélose nutritive et l'identification moléculaire se fait en suivant les mêmes modes opératoires.

❖ Première partie : Paramètres physico-chimiques et microbiologiques de l'écosystème étudié

La connaissance des paramètres physico-chimiques donne une appréciation préliminaire de la qualité et le degré de la pollution d'un écosystème donné.

1. Paramètres physico-chimiques de l'eau :

Les paramètres physico-chimiques de l'eau sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 8: Paramètres physico-chimiques de l'eau

Saison	Site	Temp. (°C)	pH	Cond. (µs/cm)	D.O. (mg/l)	Salinité (g/l)	P.O.R. (mv)	T.D.S. (ppm)	MES (mg/l)
Automne	S1	24.30	7.5	11060	3.42	2.09	-162	632	33±2
	S2	25	8.1	51300	4	28.76	131.6	25.67	237±2
	S3	22.4	8.06	54170	8	35.8	163	27.1	210±1
	S4	22.6	8.07	53630	8.2	34.58	149.6	27.6	166.5±3.5
	S5	23	8.05	53490	8	35.3	146	26.75	217±3
	S6	22.2	8.1	54000	8	35.76	182.8	27.7	200±2
Hiver	S1	14.15	7.81	15800	3.82	0.78	-195.1	770	15.5±0.5
	S2	18.40	7.73	50840	5.6	32.08	172.7	25.23	73±2.5
	S3	14.0	8.18	56860	9	36.50	173.40	28.17	66.5±2.5
	S4	14	8.19	55480	9	36.38	122.5	27.40	69.5±2
	S5	15.0	8.22	55540	9	36.98	175.2	27.81	66.5±0.5
	S6	14.00	8.18	57770	9	38.58	194.4	28.87	64±1
Printemps	S1	21.60	7.86	13680	3.27	0.69	-157	684	27±3
	S2	23.10	7.81	47620	4.5	30.02	124.0	23.84	246±6
	S3	19.40	8.08	51910	8	34.82	229	26.5	156±4
	S4	19.15	8.07	52000	8.2	32.2	143.6	23.3	127±5.5
	S5	19.7	8.08	46300	8	33.39	141	25.26	152±2
	S6	19.85	8.09	50250	8	33.00	177.6	25.12	139±4
Eté	S1	27.8	7.59	13990	3.11	1.70	-150.8	700	84±7
	S2	30.62	8.13	53500	3.5	31.12	220.5	26.79	144±4
	S3	27.98	8.11	53040	7.5	34.91	112.00	26.54	143±1
	S4	28.16	8.18	53360	7.3	35.11	219	26.65	147±5
	S5	27.19	8.21	53750	7.1	35.46	118.00	26.88	146±2
	S6	27.00	8.15	53110	7.2	35.03	96.00	26.58	142±2
Effet saison (p)		< 0.0001	0.001	0.000	< 0.0001	0.005	0.769	0.000	< 0.0001
Effet station (p)		0.470	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

- **Température**

La température de l'eau joue un rôle important dans la solubilité des sels et des gaz dont, entre autres, l'oxygène nécessaire à l'équilibre de la vie aquatique. Par ailleurs, la température accroît les vitesses des réactions chimiques et biochimiques d'un facteur de 2 à 3 pour une augmentation de température de 10°C. L'activité métabolique des organismes aquatiques est donc également accélérée lorsque la température de l'eau s'accroît (**Institut Bruxellois pour la Gestion de l'Environnement 2005**). Qualité physico-chimique et chimique des eaux de surface: cadre général). Les températures de l'eau enregistrées sur les quatre saisons sont comprises entre 14°C et 30.62°C (tableau 8), où les températures les plus basses sont enregistrées durant la saison d'hiver et les plus hautes durant la saison d'été.

D'après les résultats enregistrés et les analyses statistiques, la saison a un effet très hautement significatif ($p < 0,001$) sur la température. Par contre la station n'a aucun effet sur la température de l'eau ($p = 0,470$) malgré que les températures les plus élevées sont toujours enregistrées au niveau de la station 2 (zone estuaire après le déversement des eaux usées de la raffinerie) et cela est due à la température élevée des eaux de l'effluent de sortie qui sont, probablement, utilisées dans le processus de refroidissement.

- **pH**

Les résultats obtenus ne montrent pas de grandes variations entre les stations de prélèvement et les saisons pour ce paramètre; les valeurs enregistrées sont globalement très proches et sont comprises entre 7.5 enregistrée à la St1 en automne et 8.22 enregistrée à la St5 en hiver (tableau 8). Selon l'OMS, qui exige que le pH des eaux de surface doit être compris dans l'intervalle de 6,5 et 8,5 (**Guergazi et Achour, 2005**), on peut dire que la qualité des eaux de la zone d'étude en termes d'acidité et d'alcalinité est bonne.

Par ailleurs, les analyse statistiques montrent que la saison et la station ont un effet très hautement significatif ($p < 0,001$) sur le pH des eaux de la zone d'étude.

- **Conductivité**

La conductivité électrique (EC) est une expression numérique de la capacité d'une solution à conduire le courant électrique. La plupart des sels minéraux en solution sont de bons conducteurs. Par contre, les composés organiques sont de mauvais conducteurs.

Les valeurs de conductivité électrique de l'eau enregistrées sur les quatre saisons sont comprises entre 11060 $\mu\text{S}/\text{cm}$ enregistrée en automne au niveau de la St1 et 57770 $\mu\text{S}/\text{cm}$ enregistrée en hiver au niveau de la St6 (tableau 8). Ces valeurs dépassent largement la conductivité d'une eau

naturelle comprises entre 50 et 1500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (**Institut Bruxellois pour la Gestion de l'Environnement 2005**).

D'après les résultats enregistrés et les analyse statistiques, l'effet de la station est très hautement significatif ($p < 0,0001$). En générale les valeurs les plus élevées sont enregistrées à la station S3, St4, St5 et St6, c'est-à-dire au niveau des eaux de mer. Alors que des valeurs moins élevées sont enregistrées au niveau de la St2 (la zone estuaire). Cependant, les valeurs les plus faibles sont enregistrées au niveau de la St1 (eau douce). Et cela peut être expliqué par le fait que la conductivité électrique est proportionnelle à la salinité de l'eau.

Quant à l'effet de la saison sur la conductivité de l'eau, il est aussi très hautement significatif ($p < 0,0001$).

- **Oxygène dissous (OD)**

Les concentrations en oxygène dissous constituent l'un des plus importants paramètres de la qualité des eaux pour la vie aquatique. Il est également un bon indicateur de pollution d'un écosystème aquatique et du suivi de son autoépuration. Il est aussi considéré comme facteur essentiel à la vie aquatique, en particulier aux organismes assurant l'autoépuration des hydro-systèmes (**Derwich et al., 2008**). L'oxygène dissous dans les eaux de surface provient essentiellement de l'atmosphère et de l'activité photosynthétique des algues et des plantes aquatiques. La concentration en oxygène dissous varie de manière journalière et saisonnière car elle dépend de nombreux facteurs tels que la pression partielle en oxygène de l'atmosphère, la température de l'eau, la salinité, la pénétration de la lumière, l'agitation de l'eau et la disponibilité en nutriments (**Rodier et al., 2009**).

Les valeurs enregistrées de l'oxygène dissous dans l'eau sur les quatre saisons sont comprises entre 3.11 mg/l enregistrée à la saison estivale au niveau de la St1 et 9 mg/l enregistrée en période hivernale au niveau de l'eau de mer (St3, St4, St5 et St6) (tableau 8).

En générale, l'eau contient toujours des gaz dissous dont les concentrations dépendent notamment de la température ainsi que de la composition et de la pression de l'atmosphère gazeux avec laquelle elle est en contact (**Rodier et al., 2009**). Dans le cas d'oxygène dissous il est inversement proportionnel à la température de l'eau. D'ailleurs c'est ce qui a été confirmé par les analyses statistiques qui ont montré un effet très hautement significatif ($p < 0,0001$) de la saison qui se manifeste principalement par le changement de la température.

D'autre part et d'un point de vue spatial, les analyses statistiques montrent aussi un effet très hautement significatif ($p < 0,0001$) de la station sur le taux d'oxygénation de l'eau, où les valeurs les moins élevées sont toujours enregistrées au niveau de la St1 (eau douce du point de

confluence de oued «Safsaf» et «Zramna»), puis on enregistre des valeurs un peu plus élevées au niveau de St2 (zone estuaire), alors que les valeurs les plus élevées sont enregistrées au niveau de l'eau de mer (St3, St4, St5 et St6). Ce qui laisse à conclure que le taux d'oxygène dissous est proportionnel à la salinité de l'eau.

- **Salinité**

Les résultats obtenus pour ce paramètre connaissent une grande variation surtout spatiale, ils varient entre 0,69 g/L enregistrée en printemps au niveau de la St1 et 38,58 g/L en période hivernale au niveau de la St6 (tableau 8). Les valeurs minimales sont toujours enregistrées au niveau de la St1 qui est une eau douce. Ces valeurs augmentent au niveau de la St2 (zone estuaire) mais restent toujours inférieures aux valeurs enregistrées dans l'eau de mer (St3, St4, St5 et St6). Ces dernières avoisinent toujours la valeur naturelle pour une eau de mer qui est de 36g/L.

Les analyse statistiques confirment un effet très hautement significatif ($p < 0,001$) pour la saison et la station sur la salinité de l'écosystème aquatique étudié.

- **Potentiel d'oxydo-réduction**

Dans les écosystèmes aquatique, le potentiel redox (ou disponibilité en électrons) affecte les états d'oxydation des éléments (H, C, N, O, S, Fe...). Dans les eaux naturelles, des comparaisons relatives de l'évolution du potentiel redox peuvent être utiles pour suivre les degrés de changement du système aquatique (**Institut Bruxellois pour la Gestion de l'Environnement 2005**).

La valeur minimale est de -195,1 mV enregistrée en période hivernale au niveau de la St1, alors que la valeur maximale est de 229 mV enregistrée en printemps au niveau de la St3 (tableau 8). On remarque que le potentiel redox est trop réduit, par rapport autres station de prélèvement, avec même des valeurs négatives au niveau de la St1 (eau douce et peu courante), cela peut être expliqué par le fait que l'eau de la zone estuaire et l'eau de mer sont plus agitées et par conséquence plus oxygénées car dans une eau bien oxygénée, les conditions d'oxydation dominant et quand les concentrations d'oxygène diminuent, le milieu devient plus réducteur ce qui se traduit par une réduction du potentiel redox (**Institut Bruxellois pour la Gestion de l'Environnement 2005**).

Les analyses statistiques montrent un effet très hautement significatif ($p < 0,0001$) pour la station. Alors que, l'effet de la saison n'a aucun effet significatif ($p = 0,769$) sur le potentiel redox.

- **Total des Solides Dissous (TDS)**

Le TDS pourrait provenir de la dissolution des roches carbonatées (origine naturelle), ou des eaux usées et industrielles (origine anthropique). Pour ce paramètre les valeurs enregistrées, durant les quatre saisons, oscillent entre 23,3 mg/L et 770 mg/L (tableau 8). Les valeurs maximales sont enregistrées au niveau de la St1 (eau douce du point de confluence de oued « Safsaf » et oued « Zramna »), alors que les valeurs minimales sont enregistrées dans l'eau de mer. Les valeurs du TDS sont conformes à la norme fixée par l'OMS (<1200 mg/L).

En ce qui concerne l'effet de la saison et de la station sur les TDS, les analyses statistique montrent un effet très hautement significatif ($p < 0,001$).

- **Matières en suspension (MES)**

Les matières en suspension comprennent toutes les matières minérales ou organiques qui ne se solubilisent pas dans l'eau. Elles incluent les argiles, les sables, les limons, les matières organiques et minérales de faible dimension, le plancton et autres microorganismes de l'eau. Ce sont des paramètres très importants à suivre car ils affectent la transparence de l'eau et diminuent la pénétration de la lumière et, par suite, la photosynthèse comme ils peuvent également gêner la respiration des poissons. Par ailleurs, les matières en suspension peuvent accumuler des quantités élevées de matières toxiques (métaux, pesticides, huiles minérales, hydrocarbures aromatiques polycycliques (**Institut Bruxellois pour la Gestion de l'Environnement 2005**)).

Dans notre étude, les valeurs des matières en suspension varient entre 15,5 mg/L et 237 mg/L (tableau 8), où les valeurs minimales sont enregistrées au niveau de la St1 et en période hivernale. C'est ce qui a été confirmé par l'analyse statistique où l'effet de la saison et de la station s'avère très hautement significatif ($p < 0,001$), et ce qui concorde avec le fait que la quantité de matières en suspension varie notamment selon les saisons et le régime d'écoulement des eaux (**Institut Bruxellois pour la Gestion de l'Environnement 2005**).

2. Paramètres physico-chimiques des sédiments

- **pH**

Pour ce paramètre, les valeurs enregistrées sont plus ou moins proches oscillant entre 7,07 enregistrée à la St1 en automne et 9,04 enregistrée à la St4 durant la même saison (tableau 9). D'après les analyses statistiques, la variation saisonnière du pH est significative ($p < 0,05$), alors que le changement de site n'influence pas les valeurs du pH.

- **Matière organique**

Les teneurs des sédiments en matière organique sont comprises entre 1111 $\mu\text{g/g}$ et 208616 $\mu\text{g/g}$ (tableau 9) avec toujours des valeurs plus importantes au niveau de la St1. La St2 vient en deuxième position en termes de charge en matière organique, alors que les sites de prélèvement situés au niveau de la mer (St3, St4, St5 et St6) viennent en troisième position avec des proportions variables. D'ailleurs c'est ce qui a été confirmé par l'analyse statistique, où l'effet de la station s'avère très hautement significatif ($p < 0,0001$). Cela est expliqué par la nature des sédiments qui est sableuse pour les sites situés au niveau de la mer (St3, St4, St5 et St6) et moins pollués, en revanche elle est boueuse vaseuse au niveau de St1 (point de confluence des oueds « Safsaf » et « Zramna ») et St2 (la station la plus polluée par les effluents de sortie de la raffinerie).

Quant à l'effet de la saison sur la distribution de la matière organique, les analyses statistiques montrent un effet hautement significatif ($p=0,004$), avec des valeurs élevées durant la période hivernale par rapport aux autres saisons, est cela est probablement due au ralentissement de l'activité microbienne, qui est le facteur principal dans la dégradation et minéralisation de la matière organique par la baisse de la température (**Pelmont, 2005**).

- **Conductivité électrique**

La plupart des sels minéraux en solution sont de bons conducteurs. Par contre, les composés organiques sont de mauvais conducteurs.

Les valeurs de la conductivité électrique des sédiments enregistrées sur les quatre saisons sont comprises entre 186 $\mu\text{S/cm}$ et 2655 $\mu\text{S/cm}$ (tableau 9). On remarque que ces valeurs sont largement inférieures à celles enregistrées dans l'eau et cela peut être expliqué par le fait que l'eau est chargée en sels minéraux, qui en solution, sont de bons conducteurs. Par contre, les composés organiques, qui ont tendance à se sédimenter, sont de mauvais conducteurs (**Institut Bruxellois pour la Gestion de l'Environnement 2005**).

D'après les analyses statistiques, la saison n'a aucun effet sur la conductivité électrique des sédiments ($p=0,434$), alors que l'effet de la station s'avère très hautement significatif ($p < 0,0001$).

- **Phosphore assimilable**

Les résultats obtenus pour ce paramètre connaissent une variation surtout spatiale, elles avoisinent le zéro dans certaines stations en automne et peuvent aller jusqu'à 4,46 $\mu\text{g/g}$ au niveau de St2 en période estivale. Les résultats statistiques montrent un effet spatio-temporel très hautement significatif ($p < 0,0001$).

Résultats et Discussion

En générale, les variations spatio-temporelles enregistrées dans les valeurs des paramètres physico-chimiques des échantillons d'eau et de sédiments (tableaux 8 et 9) peuvent être attribuées à l'hétérogénéité des sites d'échantillonnage et des rejets d'eaux usées de la raffinerie de pétrole.

Tableau 9 : Paramètres physico-chimiques des sédiments

Saison	Site	pH	M.O. (µg/g)	Conductivité (µs/cm)	Phosphore (µg/g)
Automne	S1	7.07±0.74	13111±142	186.66±28.53	1.73±0.29
	S2	8.61±0.06	41999±533	2655±35	1.16±0.057
	S3	8.91±0.02	2095±750	777.66±12.22	0
	S4	9.04±0.11	1111±167	728±11.35	0
	S5	8.67±0.07	4703±223	1354±13.11	0.133±0.11
	S6	8.33±0.64	1933±88	551.66±25.96	0.133±0.057
Hiver	S1	8.02±0.03	20416±1616	290.66±50.06	4.93±0.25
	S2	8.07±0.44	208616±4018	1815.66±11.06	3.5±0.4
	S3	7.71±0.27	10791±1111	644±8.88	1.53±0.49
	S4	7.42±0.14	9275±875	636.33±17	1.5=0.1
	S5	8.45±0.04	12133±1616	559.33±3.78	1.46±0.20
	S6	8.31±0.07	9566±505	1355.33±40.06	2.43±1.01
Printemps	S1	8.04±0.06	12266±1411	318.33±73.05	2.26±0.25
	S2	7.56±0.06	82733±3476	5014±759.52	6.6±0.17
	S3	7.5±0	8311±758	1093±20.66	0.96±0.30
	S4	7.97±0.44	6222±615	799.33±11.37	0.7=0.1
	S5	7.77±0.02	7422±538	689.66±12.58	0.86±0.057
	S6	8.20±0.43	4399±533	873.33±3.05	0.7±0.001
Eté	S1	7.55±0.05	12977±1110	288.66±61.53	5.8±0.17
	S2	8.29±0.07	39466±2013	4438±163.64	4.46666±1.45
	S3	8.64±0.06	5344±283	736±8.18	0.66±0.057
	S4	8.25±0.08	4688±615	532.66±2.51	0.7=0.1
	S5	8.12±0.03	7644±1231	320.33±14.15	0.7=0.001
	S6	7.92±0.38	1199±371	1004.66±2.51	0.83±0.057
Effet saison (p)		0.005	0.004	0.434	< 0.0001
Effet station (p)		0.078	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

3. Charge microbienne

Concernant la charge microbienne, les résultats obtenus (tableau 10) ont montré des valeurs comprises entre $(95 \text{ et } 58,10^9 \text{ UFC/mL})$ dans l'eau et entre $(70 \text{ et } 837,10^5 \text{ UFC/mL})$ dans les échantillons de sédiments. Les résultats des tests de Kruskal-Wallis ont montré une variation spatio-temporelle importante de la charge microbienne ($p < 0,05$). Dans les compartiments d'eau et de sédiments, la charge la plus élevée est enregistrée au niveau de la St1 en automne, au printemps et en été. Cependant, en hiver, dans St2 une charge microbienne élevée a été distinguée par rapport aux autres sites. Ce résultat peut être attribué à la baisse de température qui ralentit la croissance microbienne. Cependant, la température dans St2 reste relativement élevée par rapport aux autres stations en raison du rejet à chaud de la raffinerie. En général, les stations sont classées dans l'ordre suivant: $\text{St1} > \text{St2} > \text{St3} \approx \text{St4} \approx \text{St5} \approx \text{St6}$. La charge microbienne est inversement proportionnelle à la salinité de l'eau.

Tableau 10 : Charge bactérienne dans l'eau et les sédiments

Saison	Site	Charge Bactérienne dans l'eau (UFC/ml)	Charge Bactérienne Sédiments (UFC/g)
Automne	St1	14×10^7	145×10^5
	St2	47×10^5	92×10^4
	St3	24×10^2	1100
	St4	1120	620
	St5	26×10^2	1470
	St6	820	550
Hiver	St1	28×10^3	41×10^2
	St2	41×10^3	85×10^2
	St3	180	125
	St4	95	86
	St5	150	95
	St6	110	70
Printemps	St1	87×10^6	46×10^5
	St2	38×10^5	65×10^5
	St3	860	320
	St4	520	240
	St5	730	410
	St6	570	190
Eté	St1	58×10^9	837×10^5
	St2	84×10^7	76×10^5
	St3	5×10^3	15×10^2
	St4	16×10^2	850
	St5	74×10^2	1830
	St6	1340	695
Effet saison		0.000	0.000
Effet station		<0.0001	<0.0001

4. Concentrations HCT, Anthracène, Pyrène and Benzo (a) pyrène dans l'eau

Les concentrations d'HCT, Anthracène, Pyrène et Benzo (a) pyrène enregistrées durant les quatre saisons étaient dans la gamme de : 78-9457 $\mu\text{g/L}$, ≈ 0 -157 $\mu\text{g/L}$, ≈ 0 -188,6 $\mu\text{g/L}$, ≈ 0 -2224,45 $\mu\text{g/L}$, respectivement (figure 15). Les concentrations des trois HAP dépassent largement les normes fixées pour les eaux de surface et les eaux marines. Par contre, pour les HCT la concentration la plus élevée répond au plan du respect des normes nationales et internationales sur les valeurs limites pour les rejets des effluents industrielles fixé à 1000 $\mu\text{g/L}$ (**Arrêté n°01164/MINEEF/CIAPOL/SDIIC du 04 novembre 2008**), et ne dépassent pas la valeur limite maximale de la teneur des HCT dans les eaux usées autres que domestiques au moment de leur déversement dans un réseau public d'assainissement ou dans une station d'épuration (**Journal officiel de la République algérienne. Numéro 36, juin 2009**). Cela peut être expliqué par le fait que les HCT sont un mélange d'hydrocarbures ayant un niveau de biodégradabilité inversement proportionnel à leur poids moléculaire, par conséquent les molécules d'hydrocarbures ayant un faible poids moléculaire sont plus accessible et vulnérable à la dégradation, en revanche les hydrocarbures ayant un poids moléculaire relativement élevé comme c'est le cas pour les trois molécules choisie dans cette étude (Anthracène, Pyrène et Benzo(a)pyrène) sont plus persistants.

On remarque même qu'en moyenne les concentrations enregistrées des HAP suivis dans cette étude suivent la même loi et leur abondance dans l'eau est comme suit : **Benzo(a)pyrène > pyrène > Anthracène**. Ce qui est logique du moment où l'augmentation du nombre de cycles aromatiques et l'angularité des HAP attribuent une plus grande stabilité et une hydrophobicité plus élevée, de sorte que les HAP de haut poids moléculaire (HMW), ayant plus de trois cycles aromatiques sont plus persistants dans l'environnement (**boudreau et al., 2019**).

Par rapport à d'autres études, les concentrations de HAP étudiées enregistrées dans cette étude et en particulier au niveau de St2, St3 et St5 dépassent largement les concentrations de HAP enregistrées dans d'autres études similaires dans différents pays à travers le monde: variaient d'environ: 0,002 à 0,0114 $\mu\text{g/L}$ dans la marina de Brighton au Royaume-Uni (**King et al., 2004**), 0,946 à 13,448 $\mu\text{g/L}$ dans le bassin versant de la rivière Daliao en Chine (**Wei et al., 2007**), 0,144 à 2,361 $\mu\text{g/L}$ dans le fleuve Jaune de Chine centrale (**Jian-Hui et al., 2009**), 0,0086 $\mu\text{g/L}$ à 0,0467 $\mu\text{g/L}$ dans la ligne portuaire de Mumbai, Inde (**Dhananjayan et al., 2012**), 0,150 à 0,325 $\mu\text{g/L}$ dans le bassin de la rivière Yinma en Chine (**Caiyun et al., 2016**), 0,147 à 0,386 $\mu\text{g/L}$ dans le bassin du fleuve Yinma en Chine (**Yanan et al., 2018**) et 0,004 à 0,119 $\mu\text{g/L}$ dans le fleuve Japaratuba au Brésil (**Ewerterton et al., 2018**).

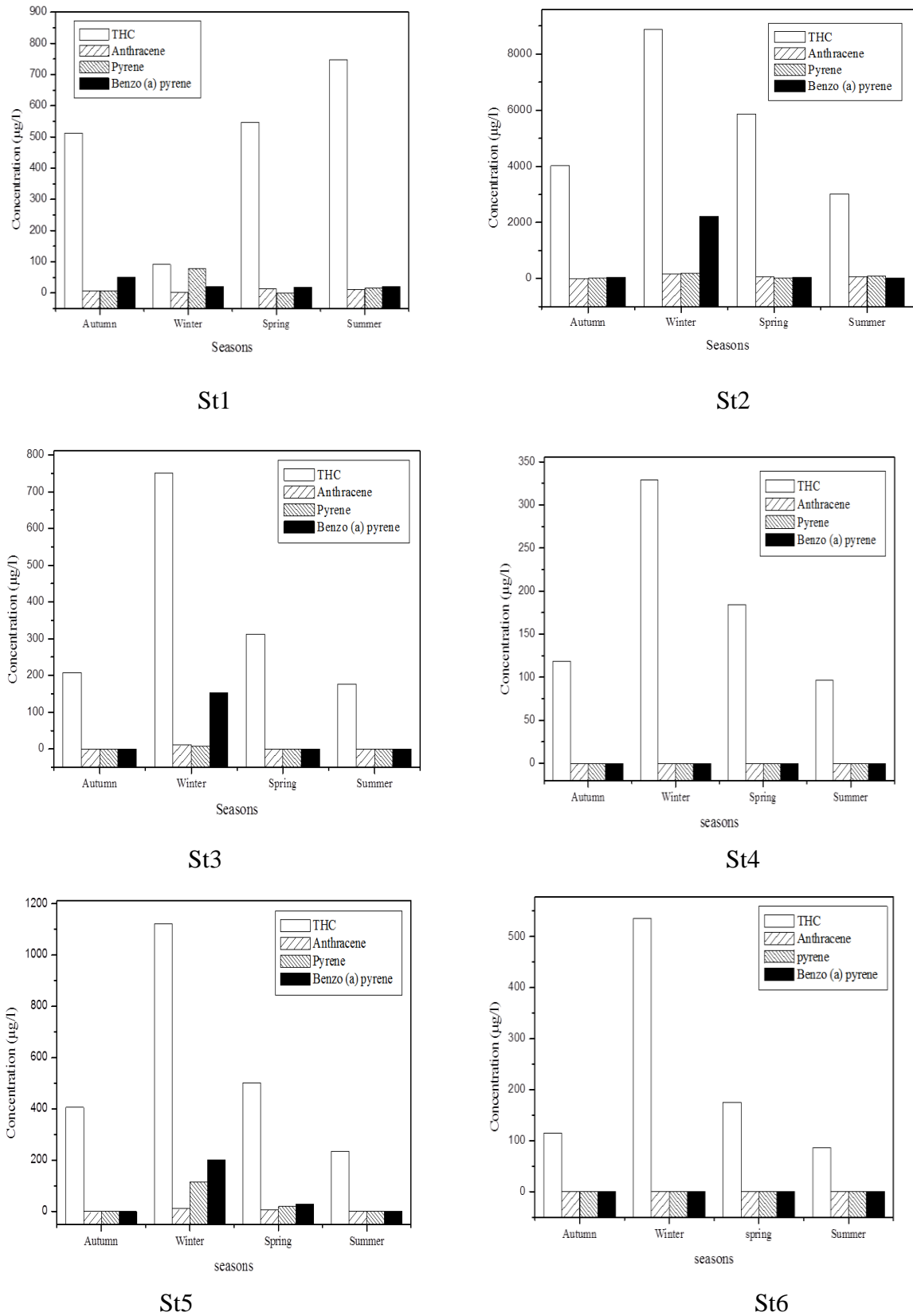


Figure 15 : Variations spatio-temporelle des teneurs des HCT, Anthracène, Pyréne and Benzo (a) pyrène dans l'eau

- **Effet de la saison**

D'un point de vue saisonnier, un effet important a été observé dans le cas du pyrène ($p < 0,05$) et du benzo (a) pyrène ($p < 0,05$) (figure 15). Les concentrations les plus élevées ont été enregistrées en hiver par rapport aux autres saisons puis au printemps puis en automne et enfin l'été. Cela est probablement dû à la baisse de température qui provoque une augmentation de la viscosité des hydrocarbures, ce qui ralentit leur dilution dans l'eau. La biodégradation par les micro-organismes environnants est également moins efficace à des températures plus basses. Les taux de volatilisation suivent des tendances similaires. Ainsi, dans des environnements froids, la persistance des hydrocarbures pétroliers est plus importante (Zheng et al., 2016). Par contre, ce qui n'est pas le cas pour l'Anthracène où aucun effet de la saison n'a été constaté sur sa distribution dans l'eau ($p=0,145$).

En règle générale, la solubilité aqueuse des hydrocarbures diminue avec l'augmentation du nombre d'atomes de carbone, tandis que la toxicité aquatique augmente. Les composés à faible poids moléculaire sont plus volatils que ceux à poids moléculaire élevé. Les hydrocarbures de haut poids moléculaire sont peu solubles dans l'eau et ont plus d'affinité pour le carbone organique dans les cellules biologiques des sédiments et des lipides.

- **Effet de la station**

En ce qui concerne l'évolution spatiale du HCT et des HAP étudiés, des concentrations très élevées ont été rapportées dans St2 directement exposée au rejet d'eaux usées industrielles rejetées par la raffinerie de pétrole, par rapport à d'autres sites d'échantillonnage ($p < 0,0001$) (figure 15). La présence de HAP dans le site de référence (St1 situé avant le rejet de la raffinerie) peut être attribuée à d'autres sources anthropiques telles que les déchets ménagers, la circulation automobile, l'agriculture et différentes activités industrielles (Sakulthaew et al., 2014 ; Ma et al., 2013), et ils peuvent même provenir de sources naturelles (Wolska et al., 2012). Cependant, ces concentrations sont presque négligeables par rapport à St2. On a également remarqué que la contamination par les hydrocarbures s'étend des deux côtés de la zone de l'estuaire dans St3 (176,33-751 $\mu\text{g/L}$, ≈ 0 -10,29 $\mu\text{g/L}$, ≈ 0 -7,87 $\mu\text{g/L}$ et ≈ 0 -152,28 $\mu\text{g/L}$) pour HCT, anthracène, pyrène et benzo (a) pyrène respectivement et pour St5 (235-1121,33 $\mu\text{g/L}$, ≈ 0 -10,69 $\mu\text{g/L}$, ≈ 0 -113,88 $\mu\text{g/L}$, ≈ 0 -201,39 $\mu\text{g/L}$) également pour HCT, anthracène, pyrène et benzo (a) pyrène respectivement, surtout en hiver et au printemps. En St 5, des niveaux élevés enregistrés par rapport à St3 à ($p < 0,05$) ont été attribués, en plus de l'impact de la raffinerie, à l'impact du port abritant les activités maritimes dont les bateaux et les navires de transport rejetant des fumées

noires tout au long de leur mouvement, constituant ainsi une source de contamination par les hydrocarbures dans cette région.

En ce qui concerne St4 et St6 (les sites les plus éloignés), les concentrations de HAP enregistrées à leurs niveaux sont $<1 \mu\text{g/L}$. ce qui signifie que le taux de pollution a été dilué par l'eau de mer.

Par ailleurs, le test de Dunn permet de distinguer St2 dans un groupe à part, les St4 et St6 dans un autre groupe, et enfin St1, St3 et St5 sont souvent regroupés dans un troisième groupe.

- **Analyse en Composants Principaux (ACP)**

L'analyse en composants principaux a été réalisée pour déterminer les principaux facteurs influençant la distribution des paramètres physico-chimiques (T° , pH, conductivité, DO, salinité, ORP, TDS et SM), la charge microbienne et les concentrations d'hydrocarbures, elle révèle également les dépendances et relations les similitudes entre ces paramètres (Figure 16). La PC1 et la PC2 représentent un ensemble 71,52% (44,29% pour PC1 et 27,23% pour PC2) de la variance totale. Les résultats obtenus ont montré trois grands groupes de paramètres étudiés suivant les principaux facteurs F1 et F2.

F1 représente salinité de l'eau qui est en corrélation positive avec la conductivité, l'oxygène dissous, le pH et le potentiel redox et en corrélation négative avec le total des solides dissous et la charge microbienne qui est principalement concentrée dans St1 (eau douce du point de confluence des rivières « Safsaf » et « Zramna ») relativement chargé en matière organique et moins oxygéné par rapport aux autres stations d'échantillonnage ce qui favorise la prolifération des microorganismes. Alors que F2 représente les concentrations d'hydrocarbures, principalement concentrées en St2 directement exposées aux eaux usées industrielles rejetées par la raffinerie de pétrole. Par ailleurs, on trouve que la température et les matières en suspension ne sont influencées par aucune station de prélèvement.

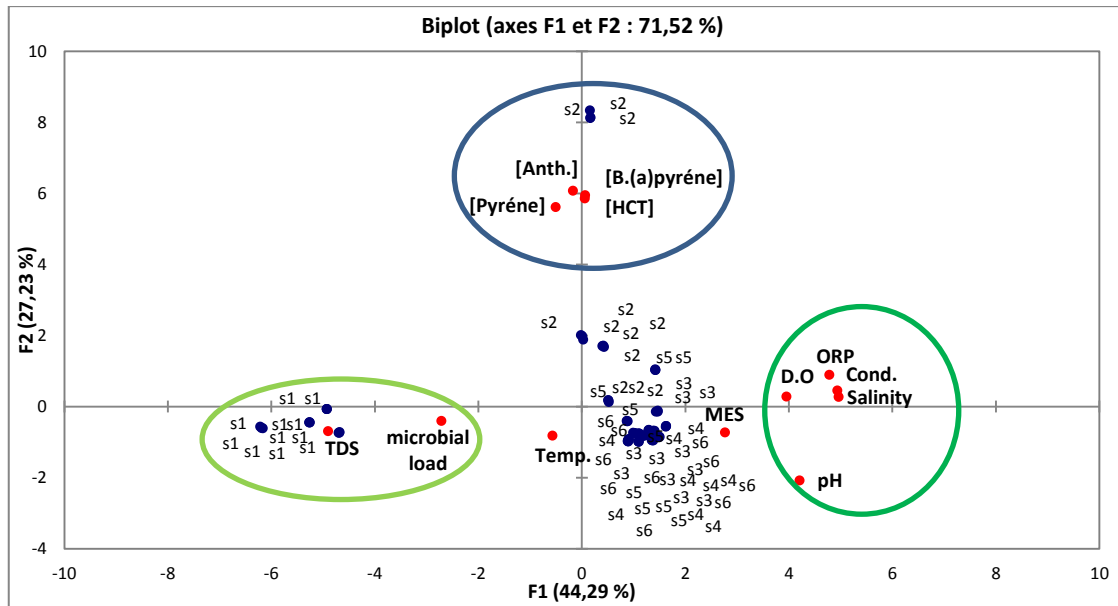


Figure 16 : Analyse en Composants Principaux (ACP) paramètres physico-chimiques, la charge microbienne et les concentrations d'hydrocarbures dans l'eau

- **Test de corrélation**

L'analyse de corrélation de Spearman a été appliquée pour étudier la corrélation entre la distribution des HAP et les paramètres physico-chimiques des sites de l'eau et aussi entre les paramètres physico-chimiques eux-mêmes (tableau 11). Les résultats montrent que les hydrocarbures sont en corrélation positive entre eux même et inversement proportionnel au pH tandis que les autres paramètres physico-chimiques n'ont pas d'influence sur les hydrocarbures. Quant au pH, il est en corrélation positive avec tous les paramètres physico-chimiques à l'exception de TDS et la charge microbienne, ce qui est logique vue que l'activité microbienne dégrade la matière organique dissoute (faisant partie de TDS) et le résultat de la fermentation qui engendre une diminution du pH (**Pelmont, 2005**).

En ce qui concerne la température, elle est en corrélation positive avec la charge microbienne et les matières en suspension car la croissance de la flore totale mésophile est ralentie dans les milieux à basse température (<15°C), alors qu'elle est favorisée dans les températures relativement élevées (20-37°C). Cette croissance microbienne aboutie à la formation de masse microbienne dans l'eau qui va à son tour augmenter le taux de matière en suspension (**Pelmont, 2005**).

En revanche, la température est inversement proportionnelle au taux d'oxygène dissous dans l'eau. Car en effet, à une température de 20°C, une quantité maximale de 9,2 mg/L d'oxygène peut être dissoute dans de l'eau pure. Même si c'est quelque peu déconcertant, la solubilité de l'oxygène dans l'eau pure est de seulement 8,3 mg/L à 25°C et ne dépasse pas 5,6 mg/L à 50°C.

Lorsque la température est plus basse, la solubilité passe à 12,8 mg/L à 5°C. Et on peut aussi remarquer par ailleurs, que le taux d'oxygène dissous est inversement proportionnel au taux de matière en suspension ce qui est logique vue que la pureté de l'eau joue un rôle important dans la solubilité de l'oxygène (**Rodier et al., 2009**). Finalement, la charge microbienne est influencée négativement par le pH, la Conductivité, l'oxygène dissous, la salinité et le potentiel d'oxydo-réduction. Et positivement par le total des solides dissous et la température. Alors que la MES n'a pas d'influence significative.

Tableau 11: Matrice de corrélation de Spearman (n-1) entre les paramètres de l'eau (p<0,05)

Variables	[THC]	[Anth.]	[Pyréne]	[B. (a) pyrène]	Temp.	pH	Cond.	D.O	Salinity	ORP	TDS	SM	Microbial load
[HCT]	1	0,9218	0,6848	0,7706	0,0251	-0,3297	0,0890	-0,1317	0,0456	0,1523	-0,1590	0,1393	-0,0431
[Anth.]		1	0,7695	0,8108	0,0577	-0,3545	0,0446	-0,1076	0,0115	0,1341	-0,1018	-0,0134	-0,0208
[Pyréne]			1	0,7904	-0,2038	-0,2449	-0,0322	-0,0014	-0,0679	0,0184	0,0458	0,1145	-0,0254
[B. (a) pyrène]				1	-0,1760	-0,3077	0,0652	0,2152	0,0556	0,1132	-0,0936	-0,2018	-0,0466
Temp.					1	-0,1131	-0,0740	-0,4694	-0,0845	-0,0316	0,0000	0,4427	0,2630
pH						1	0,8207	0,6178	0,8038	0,7417	-0,7469	0,3165	-0,4653
Cond.							1	0,7562	0,9900	0,9560	-0,9779	0,5419	-0,4552
D.O								1	0,8022	0,7040	-0,7175	-0,3164	-0,3727
Salinity									1	0,9541	-0,9816	0,5352	-0,4541
ORP										1	-0,9621	0,5569	-0,4224
TDS											1	-0,6183	0,4683
SM												1	-0,1721
Microbial load													1

5. Concentrations HCT, Anthracène, Pyrène and Benzo (a) pyrène dans les sédiments

Les résultats ont montré que les concentrations de HCT, d'anthracène, de pyrène et de benzo (a) pyrène enregistrées au cours des quatre saisons dans les sédiments étaient de l'ordre de: 323-185450 µg/g, <1-87624,7 µg/g, <1-17485,5 µg/g, <1 - 39555,5 µg/g, respectivement. Avec des moyennes de 13201,264 µg/g 4199,966 µg/g, 1524,478 µg/g, 2464,815 µg/g, respectivement (Figure 17). Selon Baumard et al. (1998) (Baumard P. et al. 1998), la contamination par les HAP dans les sédiments et sols peut être classée en quatre niveaux différents : faible (<0,1 µg/g ps), modéré (0,1–1 µg/g ps), élevé (1–5 µg/g ps) et très élevé (> 5µg/g ps), On peut considérer que la contamination, par l'anthracène, le pyrène et le benzo (a) pyrène, est très élevée.

En générale, La disparition d'un polluant est conditionnée par leur solubilité, leur caractère volatil (émission dans l'atmosphère et destruction photochimique), ou leur adsorption sur les particules du sol et de sédiment (humus et argiles). Un produit fortement adsorbé reste plus longtemps dans les sédiments et le sol, alors qu'un produit très soluble est entraîné rapidement

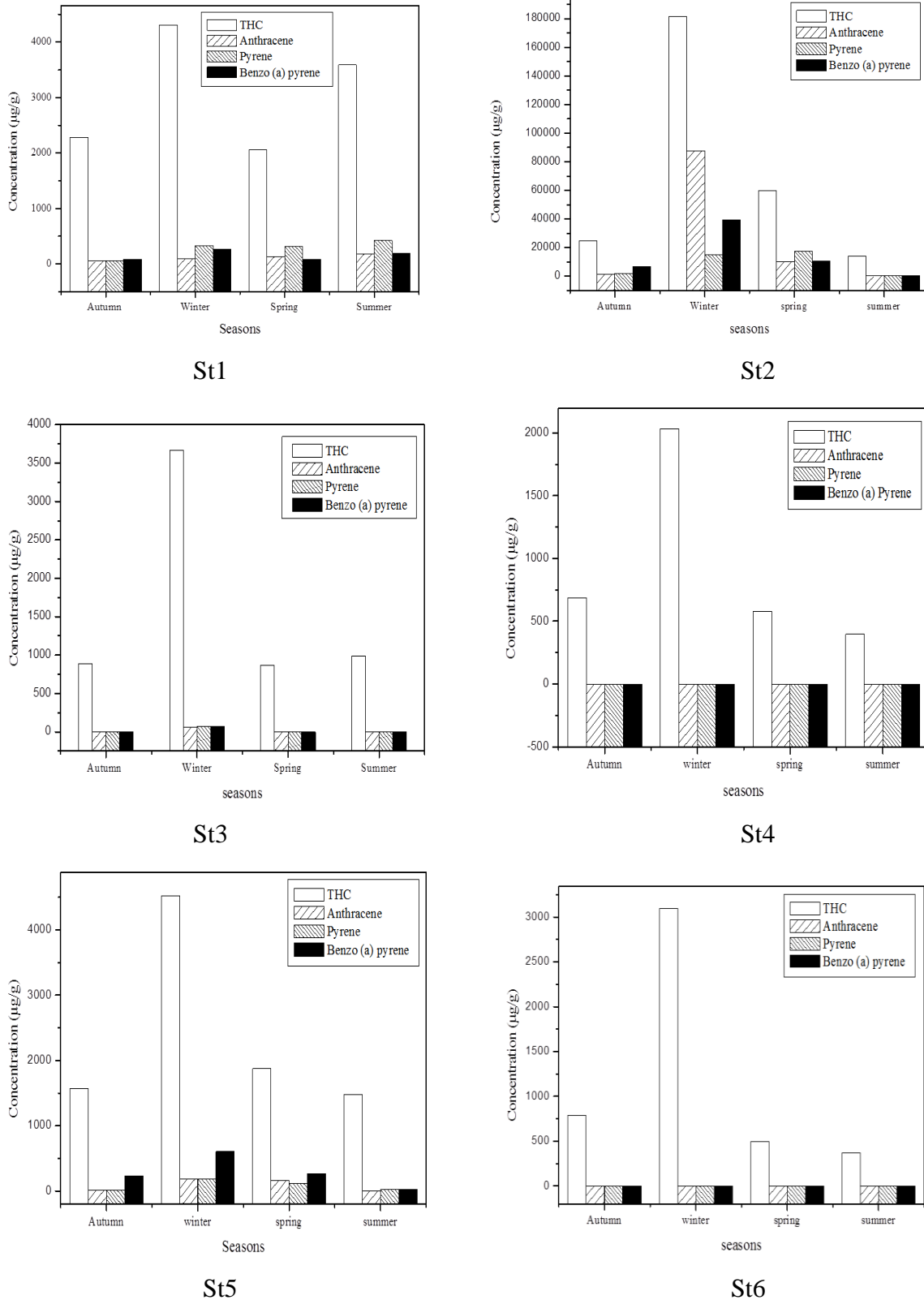


Figure 17 : Variations spatio-temporelle des teneurs des HCT, Anthracène, Pyréne and Benzo (a) pyrène dans les sédiments

vers la nappe phréatique HAP suivis dans cette étude est comme suit : **Anthracène > Benzo (a) pyrène > pyrène.**

C'est-à-dire que les moyennes des concentrations enregistrées ne suivent pas la même loi que dans l'eau où l'abondance des HAP est proportionnelle au nombre de cycles et le poids moléculaire. On remarque que la concentration de l'Anthracène est plus élevée que celle du pyrène, et cela est due à la solubilité de l'anthracène et le pyrène dans l'eau qui est de l'ordre de : 0,076mg/L et 0,135mg/L, respectivement (**NF EN ISO 17993 Juillet 2004**).

- **Effet de la saison**

Les résultats de l'analyse statistique montre que sur l'ensemble des hydrocarbures suivis dans cette étude, seuls les HCT aient un effet de saison significatif ($p < 0,001$) sur leur abondance dans les sédiments. Pour les autres HAP (l'anthracène, le pyrène et le benzo (a) pyrène), la saison n'a aucun effet sur leur abondance dans les sédiments. C'est d'ailleurs ce qui a été confirmé par le test de Dunn (voir annexe 5) où on trouve les saisons regroupées dans un seul groupe pour l'anthracène, le pyrène et le benzo (a) pyrène. Par contre, en ce qui concerne les HCT toutes les saisons sont regroupées dans un groupe, à l'exception de la saison d'hiver qui est classée dans un autre groupe et ayant des concentrations plus élevées que dans les autres saisons. Ce qui est causé probablement par la baisse de température dans la saison d'hiver. Pour les autres HAP, la saison n'a aucun effet sur leur distribution et abondance au niveau des sédiments, cela peut être expliqué par l'absence de deux phénomènes jouant un rôle important dans l'élimination et la distribution des HAP dans l'environnement ; d'une part l'évaporation qui correspond au transfert, des composés volatils ayant un poids moléculaire relativement léger, comme les HAP de faible masse moléculaire, vers l'atmosphère (**Neff et al., 2000**). D'autre part la photodégradation ou oxydation photochimique qui est un processus d'altération des hydrocarbures et modulé par différents facteurs, notamment le spectre et l'intensité lumineuse du rayonnement solaire (**Prince et al., 2003**). Dans le cas des sédiments ou des sols, ce phénomène n'a lieu que dans les premiers centimètres de la surface (**Park et al., 2001**).

- **Effet de la station**

Les taux de pollution les plus élevés, pour tous les polluants surveillés dans cette étude, sont également enregistrés au niveau St2. Selon les analyses statistiques, l'effet de site est très hautement significatif ($p < 0,0001$). Pour les HCT on constate leur présence au niveau de toutes les autres stations mais avec des concentrations différentes, dont les moyennes sont de l'ordre décroissant suivant: St1 : 3061,333 $\mu\text{g/g ps}$ > St5 : 2362,167 $\mu\text{g/g ps}$ > St33 : 1603,417 $\mu\text{g/g ps}$ >

St6 : 1188,583 $\mu\text{g/g ps}$ St4 : 924,000 $\mu\text{g/g ps}$ et qui restent minime par rapport aux concentrations de St 2 qui est en moyenne de 70068,083 $\mu\text{g/g ps}$. Pour les autres HAP les moyenne des concentrations dans les stations sont classées comme suit : St1 : 115,318 $\mu\text{g/g ps}$ > St5 : 94,160 $\mu\text{g/g ps}$ > St3 : 15,029 $\mu\text{g/g ps}$ > St4 et s6 : >1 pour l'Anthracène. En suite : St1 : 278,918 $\mu\text{g/g ps}$ > ST5 : 84,670 $\mu\text{g/g ps}$ > St3 : 16,865 $\mu\text{g/g ps}$ > St 4 et St6 : >1 pour le pyrène. Tandis qu'elles sont classées comme suit : St5 : 282,768 $\mu\text{g/g ps}$ > St1 : 153,613 $\mu\text{g/g ps}$ > St3 : 17,976 $\mu\text{g/g ps}$ > St4 et St6 : < 1 $\mu\text{g/g ps}$ pour le Benzo (a) pyrène. Les concentrations des HAP enregistrées au niveau des stations précédentes restent minimales par rapport aux celles enregistrées au niveau de la St2 qui ont des moyennes de l'ordre de : 24975.288 $\mu\text{g/g ps}$, 8766,418 $\mu\text{g/g ps}$ et 14334,533 $\mu\text{g/g ps}$ pour l'anthracène, le pyrène et le benzo (a) pyrène, respectivement. Le teste de Dunn (voir annexe 5) regroupe les stations en trois groupe différents les premier renferme les stations 3, 4 et 6 le deuxième les stations 1 et 5 et dans le troisième groupe est classée la station 1.

- **Analyse en composants principaux (ACP)**

L'analyse en composantes principales a été réalisée pour mettre en évidence les principaux facteurs influençant la distribution des paramètres physico-chimiques (Matière organique, Phosphore, pH, Conductivité), la charge microbienne et les concentrations d'hydrocarbures dans les différents sites et saisons d'échantillonnage des sédiments (figure 18). Les PC1 et PC2 représentaient ensemble 75,39% (56,46% pour PC1 et 18,93% pour PC2) de la variance totale. Les résultats obtenus ont montré trois grands groupes de paramètres étudiés suivant les principaux facteurs F1 et F2. F1 représente MO positivement corrélée avec les hydrocarbures rejetés par la raffinerie de pétrole, en particulier dans St2. F2 représente la charge microbienne corrélée négativement avec le pH.

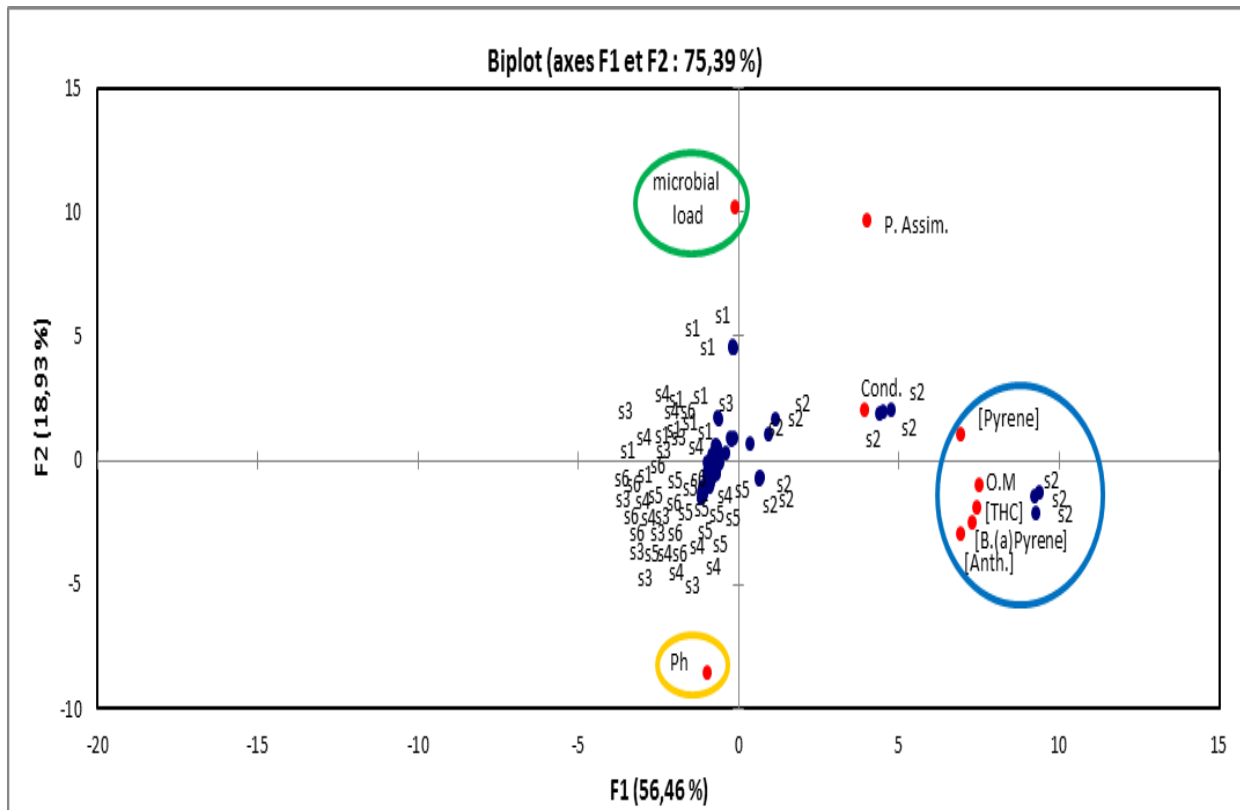


Figure 18 : Analyse en composants principaux (ACP) du THC, des concentrations de HAP, des propriétés physico-chimiques et de la charge microbienne dans les sédiments

- **Tests de corrélation**

Les résultats de l'analyse de corrélation de Spearman (n-1) (tableau 12) ont montré une corrélation positive significative entre les concentrations hydrocarbures totaux et la concentration de chaque HAP ($p < 0,05$): $R_{\text{THC-Anthracène}} = 0,862$; $R_{\text{THC-pyrène}} = 0,865$; $R_{\text{THC-B (a) pyrène}} = 0,844$; $R_{\text{Anthracène-pyrène}} = 0,987$; $R_{\text{Anthracène-B (a) pyrène}} = 0,978$; $R_{\text{Pyrène-B (a) Pyrène}} = 0,956$. En outre, une corrélation positive significative a été aussi constatée entre les teneurs en matière organique et hydrocarbures totaux ainsi que les HAP: $R_{\text{OM-THC}} = 0,913$; $R_{\text{OM-Athracène}} = 0,833$; $R_{\text{OM-pyrène}} = 0,857$; $R_{\text{OM-B (a) Pyrène}} = 0,791$. Ces résultats coordonnent avec l'analyse des composants principaux (Figure 18). En ce qui concerne les autres paramètres comme le phosphore, pH, la conductivité électrique et la charge microbienne, ils ne sont pas en corrélation avec les teneurs des hydrocarbures totaux et les HAP et même entre eux même.

Tableau 12: Matrice de corrélation de Spearman (n-1) entre les paramètres étudiés des sédiments ($p < 0,05$)

Variabes	[THC]	[Anth.]	[Pyrene]	[B.(a)Pyrene]	O.M	Phosphore	pH	Cond.	Charge microbienne
[THC]	1	0.862	0.865	0.844	0.913	0.769	-0.176	0.171	0.388
[Anth.]		1	0.987	0.978	0.833	0.676	-0.158	0.127	0.563
[Pyrene]			1	0.956	0.857	0.719	-0.191	0.089	0.630
[B. (a) Pyrene]				1	0.791	0.607	-0.104	0.163	0.527
O.M					1	0.867	-0.366	0.105	0.451
Phosphore						1	-0.526	0.022	0.359
PH							1	0.214	-0.022
Cond.								1	-0.073
Charge microbienne									1

6. Régression linéaire

La régression linéaire entre les concentrations d'hydrocarbures dans les deux compartiments de l'écosystème (eau et sédiments) montre une corrélation positive, avec un coefficient de corrélation linéaire R^2 d'environ : 0,84, 0,71 et 0,90 pour le THC, l'anthracène et le benzo (a) pyrène, respectivement (Figure 19). Cela signifie que les concentrations dans les sédiments sont proportionnelles aux concentrations dans l'eau. Selon (Caiyun et al., 2016 ; Arruda-Santos et al., 2018), les HAP dans le système sédiment-eau étaient dans un état instable et de préférence pour s'adsorber sur les particules en suspension (PES) puis se précipiter et s'accumuler dans les sédiments, où des transformations chimiques et biochimiques peuvent se produire, ce qui concorde avec nos résultats.

Il est à noter que la corrélation la plus forte entre l'eau et les sédiments a été enregistrée dans le cas du benzo (a) pyrène, qui a la demi-vie la plus longue (708 jours) dans le sol et les sédiments par rapport aux autres HAP (Lutz, 2006) et il est également concerné comme le HAP le plus cancérigène et le plus toxique (Caiyun et al., 2015). En revanche, ce n'est pas le cas pour les teneurs en pyrène où l'on constate que la corrélation entre sa concentration dans l'eau et les sédiments était positive mais faible avec un $R^2 = 0,25$ (Fig.19).

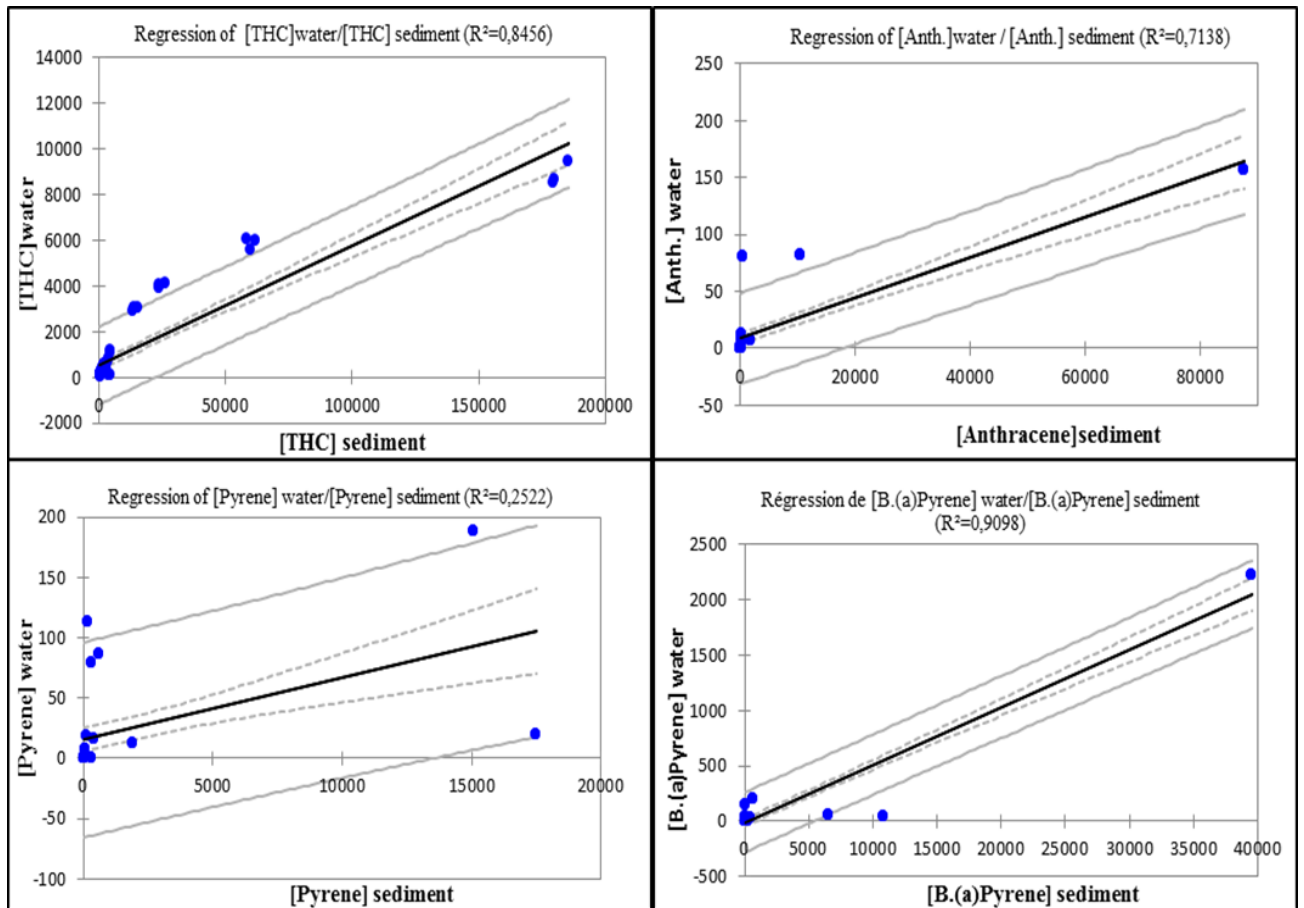


Figure 19 : Régression linéaire entre l'eau et les sédiments pour les concentrations des HCT et des HAP

❖ Deuxième partie : Identification microbienne

1. Identification moléculaire

Décrite pour la première fois à la fin des années 80, la Polymerase Chain Reaction (PCR) est l'une des méthodes les plus largement utilisées en biologie moléculaire pour l'identification des espèces (**Saik et al., 1988**). Plusieurs décennies plus tard, cette méthode a été optimisée pour continuer à atteindre ses objectifs spécifiques.

Les ARNr sont des molécules ayant évolué plus lentement que le reste du génome et constituent de ce fait une horloge moléculaire lente. De par la qualité de l'information phylogénétique qu'ils fournissent, ce sont principalement les gènes codant l'ARN de la petite sous-unité du ribosome, c'est-à-dire le gène de l'ARNr 16S chez les procaryotes ou de l'ARNr 18S chez les eucaryotes, qui sont utilisés comme marqueurs phylogénétiques. Le gène de l'ARNr 16S a comme avantages d'être constitué de domaines hautement conservés entourant des domaines variables, de présenter une taille d'environ 1500 nucléotides (figure 20) aisément séquençables et d'avoir une séquence suffisamment informative (**Ludwig, 2007; Stackebrandt et Goebel, 1994 ; Clarridge, 2004**).

D'autre part l'ARNr 16S est par excellence marqueur génétique le plus couramment utilisé pour l'étude de la phylogénie microbienne et de la taxonomie (**Janda et Abbott, 2007**) en raison de : (1) sa présence dans l'ensemble des espèces bactériennes sous forme d'opérons en un nombre variable de copies (**Petti, 2007; Woese, 1987**), (2) aucune modification de la fonction du gène ADNr 16S a été observée au fil du temps, (3) le gène ADNr 16S a une longueur d'environ 1500 paires de base qui convient à des fins informatiques (**Janda et Abbott, 2007**), (4) il est constitué de sept régions conservées et de neuf régions hypervariables, ces régions hautement conservées servent de cibles pour des amorces dites "universelles" servant à l'amplification in vitro par PCR (**Chakravorty et al., 2007 ; Weisburg et al., 1991**). L'ensemble permet donc théoriquement d'utiliser ce gène pour identifier et détecter toute espèce microbienne.

Au cours de cette étude, un travail important d'isolement et d'identification de souches a été effectué. L'identification bactérienne est fondée sur le rapprochement de la séquence étudiée à la séquence de la souche type la plus proche représentant l'espèce. Il est admis qu'en dessous de 97% de similarité (pour le gène 16S entier), deux bactéries ne peuvent appartenir à la même

espèce. Dans cette étude seule les similarités à un pourcentage > 99% sont prises en considération.

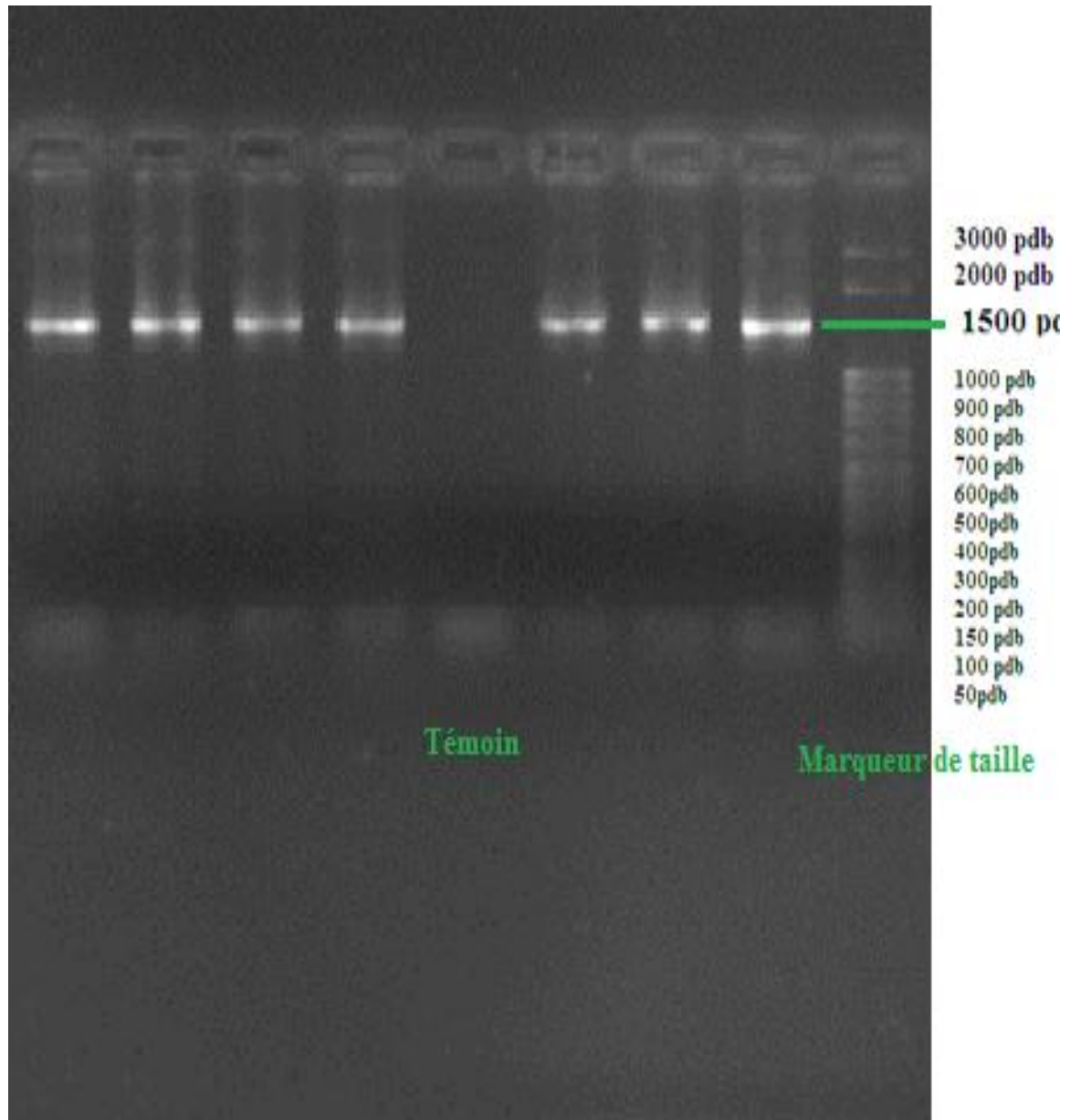


Figure 20 : Migration de L'ADNr 16S sur gel d'agarose

1.1. Espèces bactériennes

Les espèces bactériennes isolées et identifiées à partir des différentes stations de prélèvement durant les quatre saisons sont rapportées dans le tableau 13:

Tableau 13 : Espèces bactériennes isolées et identifiées à partir des différentes stations de prélèvement durant les quatre saisons

	St1	St2	St3 et St4	St5 et St6
Automne	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Escherichia coli</i> 2. <i>Proteus vulgaris</i> 3. <i>Proteus penniri</i> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Escherichia coli</i> 2. <i>Enterobacter cloacae</i> 3. <i>Pseudomonas stutzeri</i> 4. <i>Alcaligenes faecalis</i> 5. <i>Alcaligenes aquatilis</i> 6. <i>Pusillimonas sp</i> 7. <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> 8. <i>Acinetobacter lactucaae</i> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Exiguobacterium aurantiacum</i> 2. <i>Exiguobacterium aquaticum</i> 3. <i>Marinobacter litoralis</i> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Kocuria rosea</i> 2. <i>Exiguobacterium aurantiacum</i> 3. <i>Staphylococcus haemolyticus</i> 4. <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>
Hiver	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Shewanella baltica</i> 2. <i>Aeromonas salmonicida</i> 3. <i>Aeromonas caviae</i> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Pseudomonas extremorientalis</i> 2. <i>Pseudomonas pachastrellae</i> 3. <i>Staphylococcus warneri</i> 4. <i>Pseudomonas fluorescens</i> 5. <i>Pseudomonas poae</i> 6. <i>Pseudomonas aestusnigri</i> 7. <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Pseudoalteromonas issachenkonii</i> 2. <i>Pseudoalteromonas undina</i> 3. <i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Pseudoalteromonas sp</i> 2. <i>Vibrio cyclitrophicus</i> 3. <i>Vibrio gigantis</i>
Printemps	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Pseudomonas fluorescens</i> 2. <i>Staphylococcus pasteurii</i> 3. <i>Escherichia coli</i> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Pseudomonas xanthomarina</i> 2. <i>Brevundimonas olei</i> 3. <i>Alcaligenes aquatilis</i> 4. <i>Pseudomonas pachastrellae</i> 5. <i>Pseudomonas aestusnigri</i> 6. <i>Pseudomonas indoloxydans</i> 7. <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> 8. <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> 9. <i>Acinetobacter lactucaae</i> 10. <i>Acinetobacter pittii</i> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Pseudoalteromonas issachenkonii</i> 2. <i>Pseudoalteromonas undina</i> 3. <i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Pseudoalteromonas sp</i> 2. <i>Vibrio cyclitrophicus</i> 3. <i>Vibrio gigantis</i> 4. <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>
Été	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Acinetobacter johnsonii</i> 2. <i>Acinetobacter towneri</i> 3. <i>Pseudomonas anguilliseptica</i> 4. <i>Stenotrophomonas sp.</i> 5. <i>Escherichia coli</i> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>E. coli</i> 2. <i>Enterobacter cloacae</i> 3. <i>Pseudomonas stutzeri</i> 4. <i>Alcaligenes faecalis</i> 5. <i>Alcaligenes aquatilis</i> 6. <i>Pusillimonas sp</i> 7. <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> 8. <i>Acinetobacter lactucaae</i> 9. <i>Acinetobacter pittii</i> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Pseudomonas aestusnigri</i> 2. <i>Citrobacter freundii</i> 3. <i>Marinobacter litoralis</i> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Pseudomonas aestusnigri</i> 2. <i>Citrobacter freundii</i> 3. <i>Marinobacter litoralis</i> 4. <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>

D'après les résultats obtenus, on remarque une différence dans diversité microbienne des bactéries isolées entre les stations de prélèvement ainsi qu'entre les saisons.

➤ La St1 (conjoncture de oued « Zramna » et oued « Safsaf »)

Hormis la saison d'hiver, la St1 est marquée par la présence d'*E. coli* dans toutes les saisons, et cela est probablement due à la contamination fécale des eau de oued « Zramna » et oued « Safsaf ». En saison d'automne on remarque au la présence de *Proteus vulgaris* qui est un germe commensale du tube digestif de l'homme et des animaux. On peut le trouver dans le sol, l'eau et les matières fécales et *Proteus penniri* qui est un pathogène invasif et une cause d'infections nosocomiales des voies urinaires.

Pour la saison de l'hiver on remarque l'absence d'*E. coli* dans la St1 probablement à cause de la baisse de la température qui ne favorise pas la croissance de cette espèce bactérienne ayant une température idéale de 37°C et thermo-tolérante qui peut pousser même à 44°C. On trouve aussi *Shewanella baltica* qui est une espèce connue pour sa détérioration des poisons et sa caractéristique psychrotrophique qui lui attribue la capacité de vivre dans des basses températures comme celle enregistrée au niveau de la St1 en saison d'hiver (**Fonnesbech et al., 2005 ; Ziemke et al., 1998**). Les deux autres espèces appartiennent au genre *Aeromonas*, il s'agit de *Aeromonas salmonicida* qu'elle est généralement rencontrée en eau douce ou peu saline, et elle est notamment responsable d'une infection en aquaculture. Et *Aeromonas caviae* qui est d'habitude isolée à partir des milieux aquatiques, des eaux usées et des poissons (**Laviad et Halpern, 2016**). Quant à la saison de printemps et en plus d'*E. coli*, on remarque la présence et la dominance de deux espèces *Pseudomonas fluorescens* et *Staphylococcus pasteurii*.

Enfin pour la saison d'été on trouve la dominance de de deux espèce appartenant au genre *Acinetobacter* Les bactéries du genre *Acinetobacter* sont des organismes saprophytes omniprésents et vivants qui peuvent être isolés du sol, de l'eau, des eaux usées et d'une grande variété d'aliment (**Kämpfer, 2014**), il s'agit de *Acinetobacter johnsonii* qui a pour habitat et source ; la Peau humaine, l'eau, le sol et les excréments humains (**Yang, 2014**) et *Acinetobacter towneri* qui est une bactérie aérobie et peut être isolée à partir de boues activées (**Carr et al., 2003**) ce qui reflète la contamination des eaux des deux oueds par les rejets ménagers ou par les rejets de station d'épuration des eaux. La troisième est *Pseudomonas anguilliseptica* qui est une espèce pathogène pour les poissons et qui a été isolée pour la première fois à partir des anguilles qui sont à des poisons des eaux douces (**Anzai et al., 2000**). La dernière espèce appartiens au

genre *Stenotrophomonas* qui est un genre englobant des bactéries ubiquistes, largement répandues dans l'environnement (eaux, sols, plantes, aliments).

➤ La St2 (Zone estuaire)

C'est la station où en retrouve plus de diversité des espèces bactériennes par rapport aux autres stations de d'échantillonnage. On remarque la présence de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* au niveau de la St2 durant toutes les saisons. Ces bactéries ont été nommées comme telles car elles peuvent dégrader les principaux composants de l'huile (**Gauthie et al., 1992**). D'autant plus que le genre *Marinobacter* est associé à la dégradation des hydrocarbures pétroliers. (**Deppe et al., 2005**).

Dans la saison d'automne en retrouve également *E. coli* et une souche *Enterobacter cloacae* qui est présente dans l'environnement et peut être retrouvée e au niveau du sol, de l'eau, des plantes et même des animaux (Guérin, F.2015). En retrouve aussi une souche de *Pseudomonas stutzeri* qui se trouve largement dans l'environnement et occupe une gamme diversifiée de niches écologiques, notamment en étant un agent pathogène opportuniste chez l'homme. D'autre part cette bactérie a été isolée à partir d'échantillons de sols contaminés par les hydrocarbures et d'eau de mer/sédiments. Cette souche répond aux exigences de pouvoir tolérer le NaCl et se trouve dans les colonnes d'eau de l'océan Pacifique et les sédiments de la Méditerranée. Ces souches marines ont de nombreux rôles écologiques, y compris la dégradation du naphtalène, l'oxydation du soufre et, surtout, la dénitrification et la diazotrophie (fixation de l'azote). Il existe également des preuves de la présence de *P. stutzeri* dans les stations d'épuration des eaux usées. (**Lalucat et al., 2006**). *Alcaligenes faecalis* que l'on trouve couramment dans l'environnement. Elle a été nommé à l'origine pour sa première découverte dans les matières fécales, mais a été découvert plus tard comme commun dans le sol, l'eau et les environnements en association avec les humains et certaines sous-espèce se distingue par leur capacité à utiliser le phénol comme source de carbone (**Rehfuss et Urban, 2005**).

La deuxième espèce appartenant au genre *Alcaligenes* est *Alcaligenes aquatilis* qui a été isolée pour la première fois des sédiments de d'une zone estuaire du fleuve « Weser » en Allemagne et à partir d'un marais salé du ruisseau « Shem » dans le port de Charleston aux États-Unis. Les souches d'*Alcaligenes aquatilis* sont reconnues pour leur capacité à dégrader les hydrocarbures (**Durán et al., 2019**). On retrouve aussi un genre de bactérie appartenant à la famille de « *Alcaligenaceae* » qui est le genre *Pusillimonas* qui regroupe des espèces pouvant être isolées à partir du sol ou des eaux de surfaces marines telle que *Pusillimonas maritima* (**Jianyang et al., 2020**).

La dernière espèce retrouvée dans la St2 durant la saison d'Automne est *Acinetobacter lactucae*, c'est une espèce bactérienne qui peut se trouver dans les cours d'eau et en association avec d'autres plantes comme il a été démontré par **Rooney et al., en 2016**, où ils ont isolé une souche de cette espèce à partir de la plante *Lactuca sativa* (Laitue cultivée). En hiver, à l'exception de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* et *Staphylococcus warneri* qui est un germe commensal commun trouvé dans la flore cutanée des humains et des animaux, la St2 est marquée par la présence de nombreuses espèces appartenant toutes au genre *Pseudomonas* qui regroupe des bactéries largement répandues dans l'environnement et peuvent coloniser le sol et les eaux douces, salées et saumâtres, superficielles et souterraines et qui sont aussi reconnues pour leur capacité de biodégradation des huiles et des produits pétroliers comme les hydrocarbures et démontrent des rendements de dégradation élevés (**Baryshnikova et al., 2001; Indrani et al., 2014**) ce qui justifie leur présence abondante au niveau de la St2 directement exposée aux rejets de la raffinerie pétrolière hautement chargés en hydrocarbures. Parmi les espèces retrouvées on peut citer : *Pseudomonas extremorientalis*, *Pseudomonas pachastrellae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas poae*, *Pseudomonas aestusnigri*.

La saison du printemps est la saison où on trouve le plus de diversité microbienne, avec ces 10 espèces bactériennes on retrouve en plus des *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, *Alcaligenes aquatili*, *Acinetobacter lactucae* et *Acinetobacter pittii* (déjà retrouvées dans les autres saisons), il y a une nouvelle espèce qui apparaît, il s'agit de *Brevundimonas olei* qui est un genre bactérien ayant aussi la capacité de dégrader des hydrocarbures et peut être isolé à partir des écosystèmes pollués par les rejets pétroliers (**Mansur et al., 2014**).

Il est à noter que la saison du printemps comme celle de l'hiver sont marquées par l'abondance et la dominance de espèces du genre *Pseudomonas* telles que : *Pseudomonas xanthomarina*, *Pseudomonas pachastrellae*, *Pseudomonas aestusnigri*, *Pseudomonas indoloxydans*, *Pseudomonas pseudoalcaligene*.

Les espèces de *Pseudomonas* sont généralement ubiquitaires et peu exigeantes en terme de substrat et de température, elles peuvent pousser à des températures allant de 15°C jusqu'à 35°C et peuvent même tolérer des températures plus basses et plus hautes.

En saison d'été, on retrouve pratiquement les mêmes espèces bactériennes isolées dans la saison d'automne à l'exception d'une espèce qui se rajoute, il s'agit d'*Acinetobacter pittii* qui est omniprésente dans la nature.

En général la majorité des espèces isolées au niveau de la St2 appartiennent aux genres *Pseudomonas*, *Alcaligenes* et *Acinetobacter* qui sont reconnues pour leur capacité à dégrader les composés phénolique ou hydrocarbures (**Haritash et Kaushik, 2009**). Ce qui justifier leur abondance dans cette zone polluée par les rejets de la raffinerie contenant des concentrations élevées des hydrocarbures.

➤ La St3 et St4 (eau de mer)

La saison d'automne, on retrouve des souches bactériennes appartenant au genre *Exiguobacterium* qui est un genre bactérien pouvant causer des infections humaines et peut être isolé à partir des eaux de surface notamment les lacs et l'eau de mer grâce à leur pouvoir halotolérant. (**Pitt et al., 2007 ; Raichand et al., 2011**) ce qui justifier la présence des deux espèces *Exiguobacterium aurantiacum* et *Exiguobacterium aquaticum* au niveau de la St3 et St4. En plus du genre *Exiguobacterium*, on retrouve le genre *Marinobacter* représenté cette fois par l'espèce *Marinobacter litoralis* qui est une bactérie Gram négative, non sporulée, modérément halophile pouvant être isolée de l'eau de mer (**Yoon et al., 2003**).

La saison d'Hiver et printemps sont marquées par la dominance du genre *Pseudoalteromonas* avec trois espèces qui sont : *Pseudoalteromonas issachenkonii*, *Pseudoalteromonas undina*, *Pseudoalteromonas nigrifaciens*. Ceux sont des espèces marine et se trouvent généralement en association avec des eucaryotes marins et présentent des activités antibactériennes, bactériolytiques, agarolytiques et algicide (**Holmström et Kjelleberg, 1999**).

La saison d'été est marquée par la dominance de trois espèces bactérienne ; la première est *Pseudomonas aestusnigri* qui est une bactérie hydrocarbonoclastique isolée d'habitude à partir des eau marine dont certaines souches ayant la capacité de dégrader le polyester (**Bollinger et al., 2020**), la deuxième espèce est *Citrobacter freundii* qui une entérobactérie qui est une "cousine germaine du colibacille" est qui peut provoquer des infections des voies urinaires et se retrouvent dans les plaies, les voies respiratoires, la méningite et la septicémie (**Wanger et al., 2017**), la troisième espèce appartient au genre *Marinobacter*, mais il s'agit cette fois de *Marinobacter litoralis* qui est une bactérie Gram négative, non sporulée, modérément halophile pouvant être isolée de l'eau de mer (**Yoon et al., 2003**).

➤ La St5 et St6 (eau de mer)

La saison d'automne, en plus de l'espèce *Marinobacter hydrocarbonoclasticu*, trois autres espèces sont retrouvées: *Kocuria rosea* qui est une bactérie aérobie stricte dont la température

idéale de croissance est entre 22 et 37 °C et peut provoquer des infections des voies urinaires chez les personnes dont le système immunitaire est affaibli et certaines souches et ayant l'habilité de dégrader des colorants comme le vert de malachite (**Parshetti et al., 2005**). La deuxième espèce isolée appartient au genre *Exiguobacterium* qui doté d'une capacité à survivre à des températures et des pH extrêmes variables et aussi considéré comme halotolérantes (jusqu'à 13% de NaCl ajouté au milieu) de ce fait les Exiguobacteries sont des bactéries diversifiées qui se trouvent dans une variété d'environnements y compris les eaux de mer et océans (**Ordoñez et al., 2013 ; Kim et al., 2005**). Il s'agit dans notre cas d'*Exiguobacterium aurantiacum*. La troisième espèce est *Staphylococcus haemolyticus* qui fait partie de la flore cutanée des humains et peut tolérer des taux de salinité important (**De Silva et al., 2002**).

Dans la saison d'Hiver et de printemps, les espèces dominantes sont pratiquement les mêmes (A l'exception de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* qui est présente seulement en printemps). On retrouve une espèce appartenant au genre *Pseudoalteromonas* et Deux autres espèces appartenant au genre *Vibrio*, il s'agit d'une part de *Vibrio gigantis* qui est une espèce marine pouvant être isolée à partir de l'hémolymphe des huîtres d'élevage (*Crassostrea gigas*) (**Le Roux et al., 2005**) et d'autre part de *Vibrio cyclitrophicus* qui est reconnu comme étant une bactérie marine dont certaine souches ont la capacité de dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques (**Hedlund et Staley, 2001**).

A la saison d'été, en plus de l'espèce *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* on constate la présence des mêmes espèces retrouvées dans la St3 et St4, c'est le cas de : *Pseudomonas aestusnigri*, *Citrobacter freundii*, et une autre espèce du genre *Marinobacter* qui est *Marinobacter litoralis* considérée comme modérément halophile pouvant être isolée de l'eau de mer (**Yoon et al., 2003**).

En générale, cette différence entre les stations et les saisons peut être attribuée d'une part aux conditions physico-chimiques comme la différence des températures entre les saisons, la différence de la salinité du milieu entre les stations de prélèvement. D'autre part à la source et le taux de pollution au niveau des stations de prélèvement. Ces trois facteurs qui favorisent ou répriment la prolifération et l'abondance de certaines bactéries au détriment des autres selon leur capacité d'adaptation.

1.2. Construction d'arbres phylogénétiques

Un arbre phylogénétique présente les relations d'évolution entre les organismes. A chaque nœud correspond un regroupement de plusieurs organismes qui forment alors une unité taxinomique ou taxon. Les branches illustrent leurs relations généalogiques. Les longueurs des branches peuvent être proportionnelles à la distance d'évolution entre les organismes.

Les méthodes d'analyse phylogénétique cherchent à établir les relations phylogénétiques entre organismes, à partir de l'information contenue dans les acides nucléiques. Les arbres phylogénétiques sont une représentation des résultats obtenus. Le principe de l'analyse phylogénétique est le suivant : plus le nombre de substitutions entre deux séquences est élevé, plus la probabilité que ces deux séquences aient un ancêtre commun est faible. Les différentes méthodes visent donc à évaluer les divergences entre plusieurs séquences par observations de substitutions, et à reconstituer les liens généalogiques. Les schémas des arbres phylogénétiques des bactéries isolées durant les quatre saisons de cette étude sont représentés dans les figures 21, 22, 23 et 24.

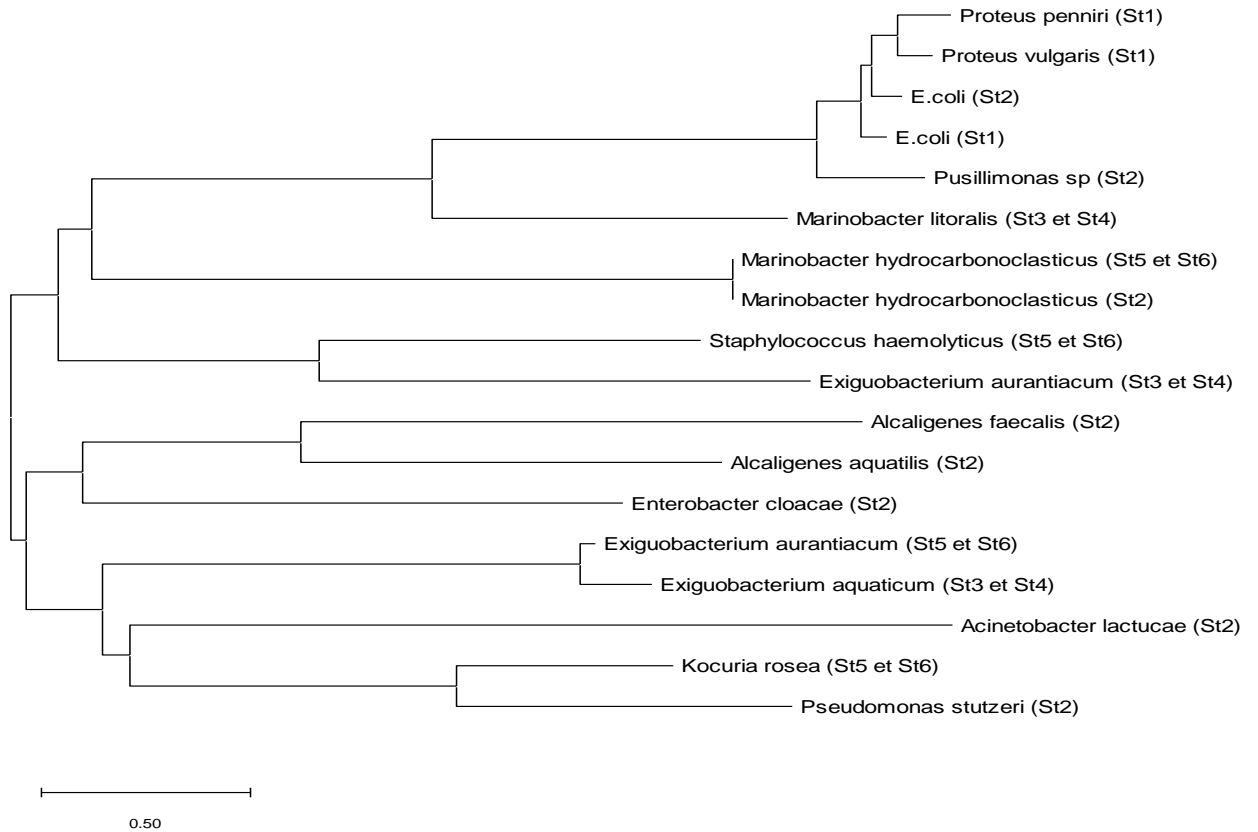


Figure 21 : Arbre phylogénétique des bactéries isolées durant la saison d'Automne

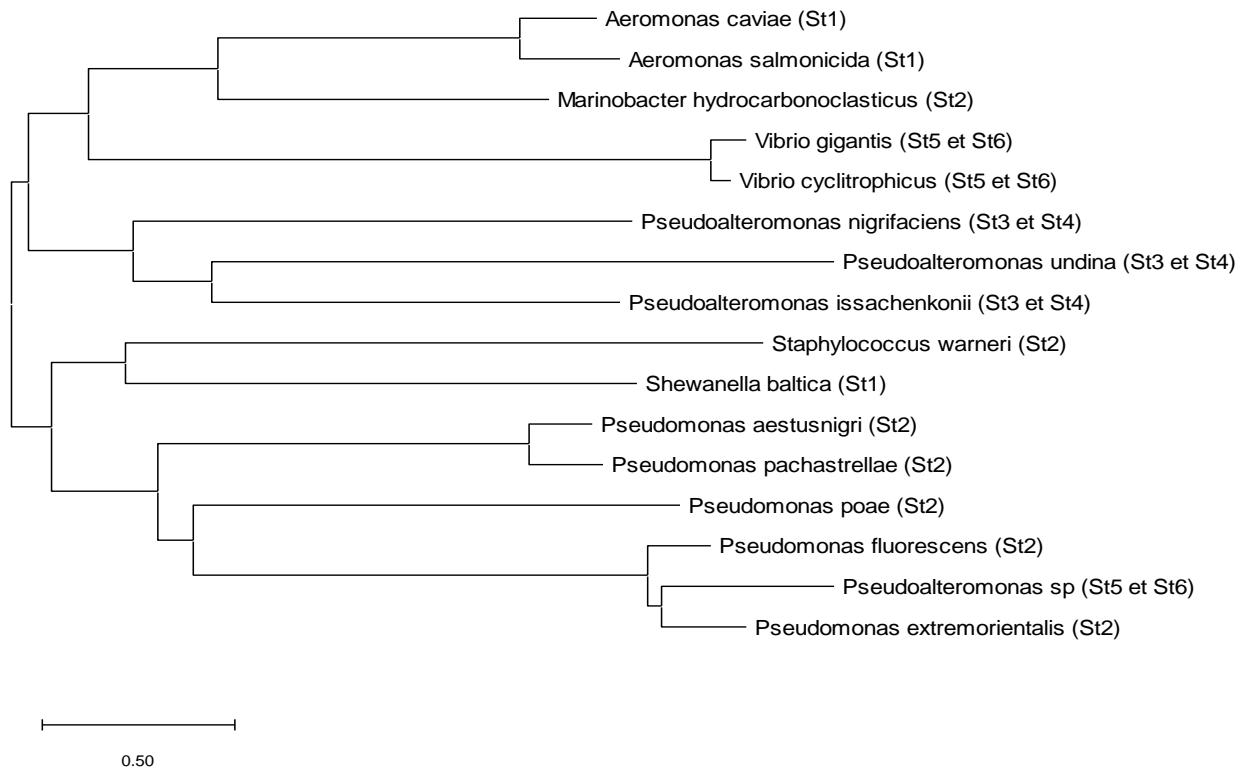


Figure 22 : Arbre phylogénétique des bactéries isolées durant la saison d'Hiver

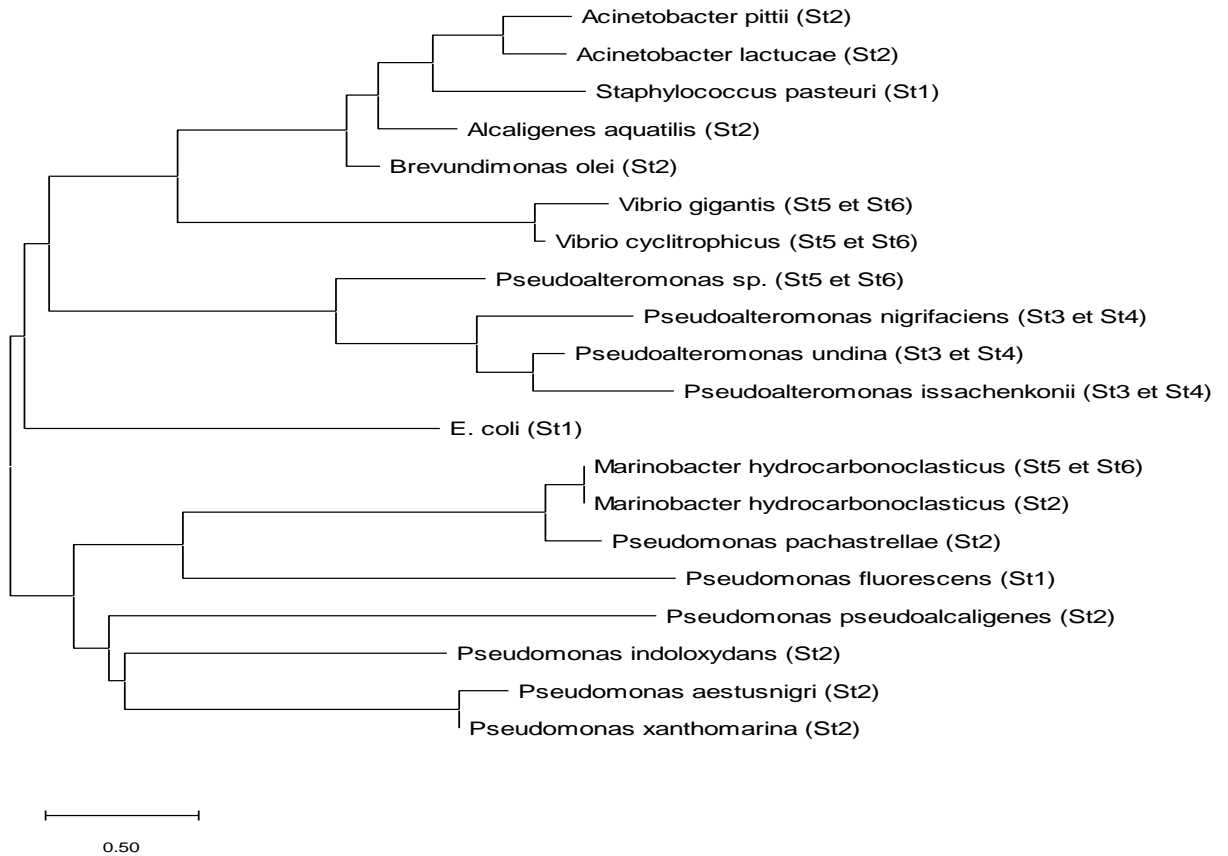


Figure 23 : Arbre phylogénétique des bactéries isolées durant la saison de Printemps

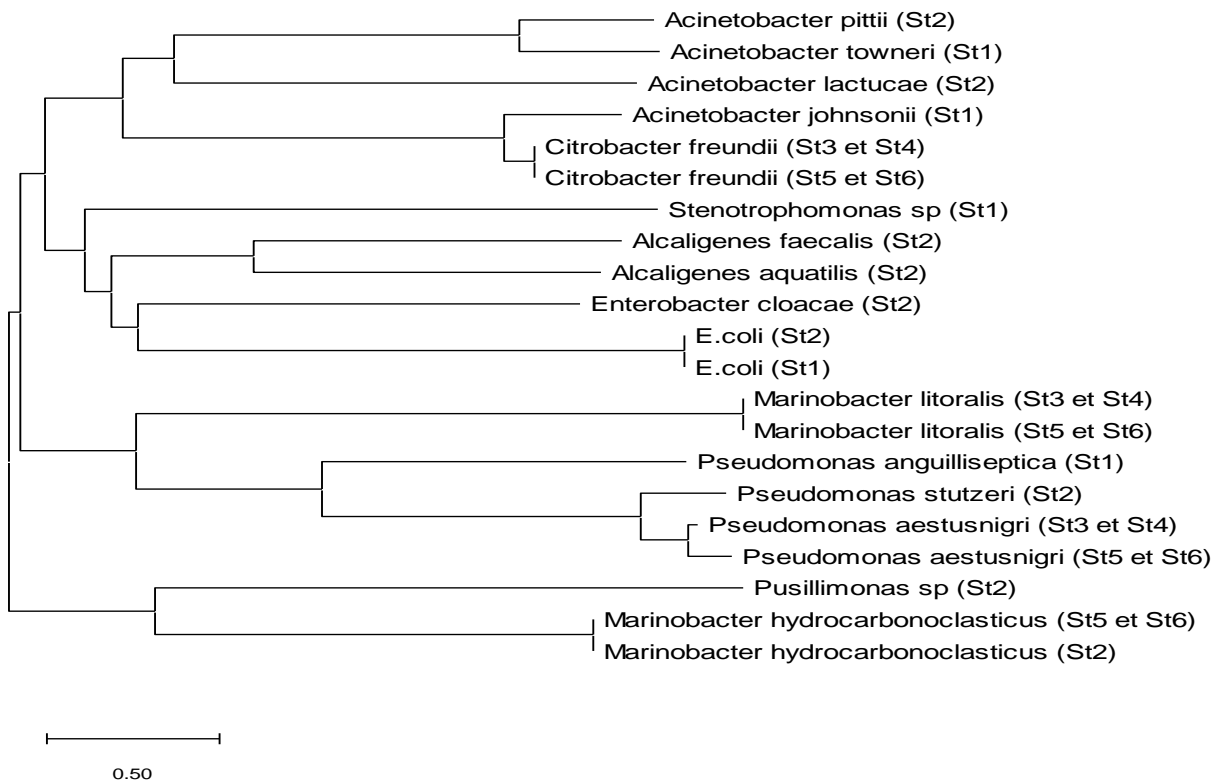


Figure 24 : Arbre phylogénétique des bactéries isolées durant la saison d'Été

1.3. Micro-algues

Les micro-algues sont des micro-organismes unicellulaires ou pluricellulaires indifférenciées Vivant dans les milieux fortement aqueux, ce sont généralement photosynthétiques et peuvent comprendre des eucaryotes ou procaryotes.

Les micro-algues procaryotes regroupent l'ensemble des cyanobactéries ou cyanophycées ou encore algues bleues-vertes (leurs anciens noms), qui sont un embranchement de bactéries qui possèdent à la fois les caractéristiques des procaryotes et des plantes. On connaît plus de 7 500 espèces de cyanobactéries réparties dans plus de 150 genres dont au moins 200 pouvant être libres, c'est-à-dire non symbiotiques et capables d'une vie indépendante (**World Health Organisation 'WHO'. 1999**).

Les micro-algues eucaryotes et les cyanobactéries procaryotes sont des microorganismes photosynthétiques capables de bio-convertir le CO₂ en biomasse de en utilisant les électrons libérés lors de la photolyse de l'eau dépendante de la lumière (**Posadas et al., 2017**).

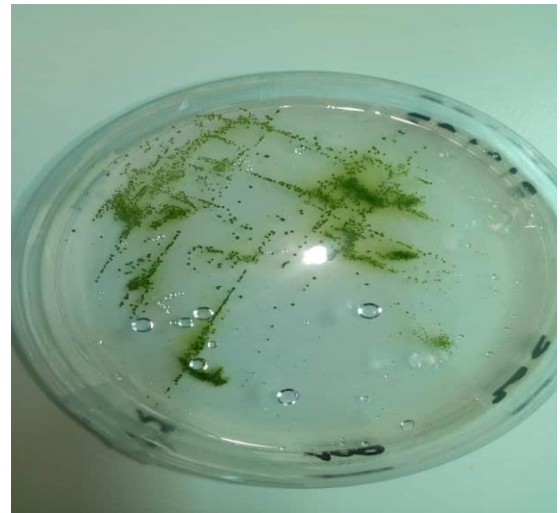
Durant les saisons d'études deux espèces de micro-algues ont été isolé à partir de la zone estuaire et les stations de prélèvement de l'eau de mer et d'eau douce. En étudiant leur aspect macroscopique, microscopique (Fig. 25 et 26) en plus du séquençage de leur ADNr 16S. Les résultats montrent que l'une d'entre elles est une micro-algue eucaryote appartenant au genre *Chlorella* et l'autre est une cyanobactérie appartenant au genre *Anacystis*, qui sont des genres de micro-algues qu'on retrouve dans fréquemment dans les eaux de surface.

Généralement pour les eucaryotes comme *Chlorella*, l'identification se fait par le séquençage d'ADNr 18S ou 23S, mais une identification peut se faire via le séquençage l'ADNr 16S du chloroplaste (**Yamada, 1988**). Le genre *Chlorella* est l'un des eucaryotes phototrophes les mieux étudiés. La diversité évolutive de *Chlorella* avait fait l'objet de discussions approfondies au cours de la dernière décennie. Ce genre de micro-algue est cosmopolite ; des espèces de *Chlorella* sont connues aussi bien en eau douce qu'en eau salée (**Heeg et Wolf, 2015**). Ce qui justifie sa présence dans les stations de prélèvement d'eau marine, de la zone estuaire et même de l'eau douce (point de confluence des oueds «Safsaf» et «Zramna») durant toutes les saisons.

Le genre *Anacystis* fait partie des cyanobactéries qui se trouvent principalement dans les petits plans d'eau des zones tempérées. Certaines espèces se trouvent également dans les zones littorales, les lacs, les marais et même dans les sols.

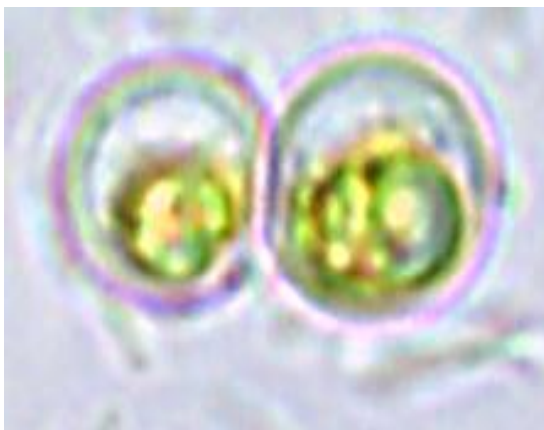


A

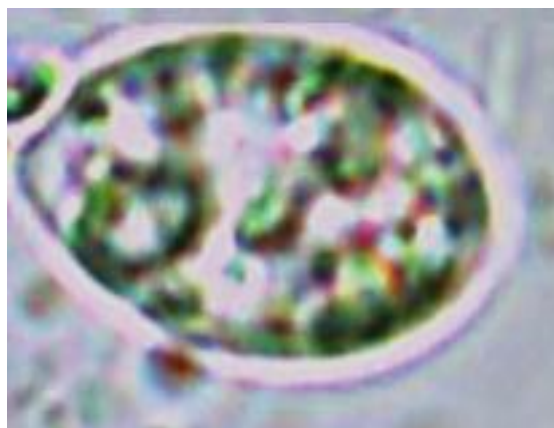
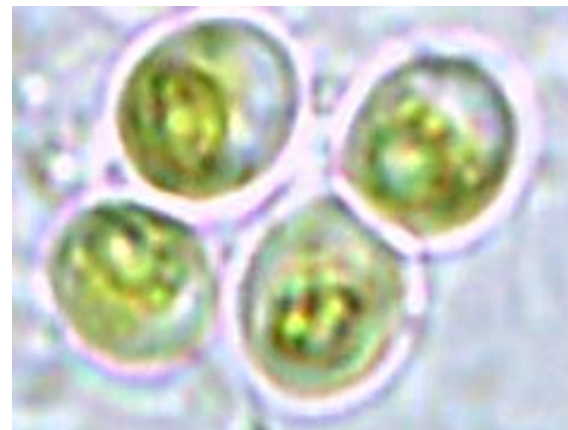


B

Figure 25 : Les deux micro-algues isolées et cultivées sur milieu BG11 ; A : *Chlorella*, B : *Anacystis*



A



B



Figure 26 : Aspect microscopique des deux espèces de micro-algues (x700) ; A : *Chlorella*, B : *Anacystis*

Dans les eaux douces et marines, le genre *Anacystis* peut faire partie d'événements de «merlan» où de fines particules en suspension de carbonates sont produites et augmentent avec le temps les dépôts de carbonates sédimentaires.

❖ Troisième partie : Suivi de la dégradation du Pyrène

5. Cinétique de biodégradation du Pyrène

5.1. Début de la cinétique biodégradation

Généralement, la biodégradation des composés organique relativement difficile à dégrader comme les HAP commence après une phase de latence, cette dernière correspond à une période d'adaptation du microbiote au nouveau substrat, ce qui est une situation commune. La durée de cette période est variable en fonction des souches bactérienne utilisées et des concentrations des composés à dégrader qui peut prolonger la phase de latence de 24h jusqu'à des jours. Cette phase de latence semble nécessaire pour la synthèse des enzymes requises pour la biodégradation (**Pelmont, 2005**). Certains auteurs, pour réduire la phase de latence, procèdent à une activation des microorganismes par aération pendant 24 heures (**LU, 2009**).

Dans notre étude, la phase de latence lors de la biodégradation des différentes concentrations du Pyrène est de quelques heures seulement à cause de l'adaptation préalable des bactéries lors de leur culture dans un milieu minimum en présence du pétrole brute comme seule source de carbone et d'énergie où on constate, après 48h, une production de bio-surfactant qui émulsifier le pétrole brute en lui rendant plus accessible au bactéries, ce qui a entraîné une dégradation de pétrole et une production de biomasse après 5 jours (figure 27).

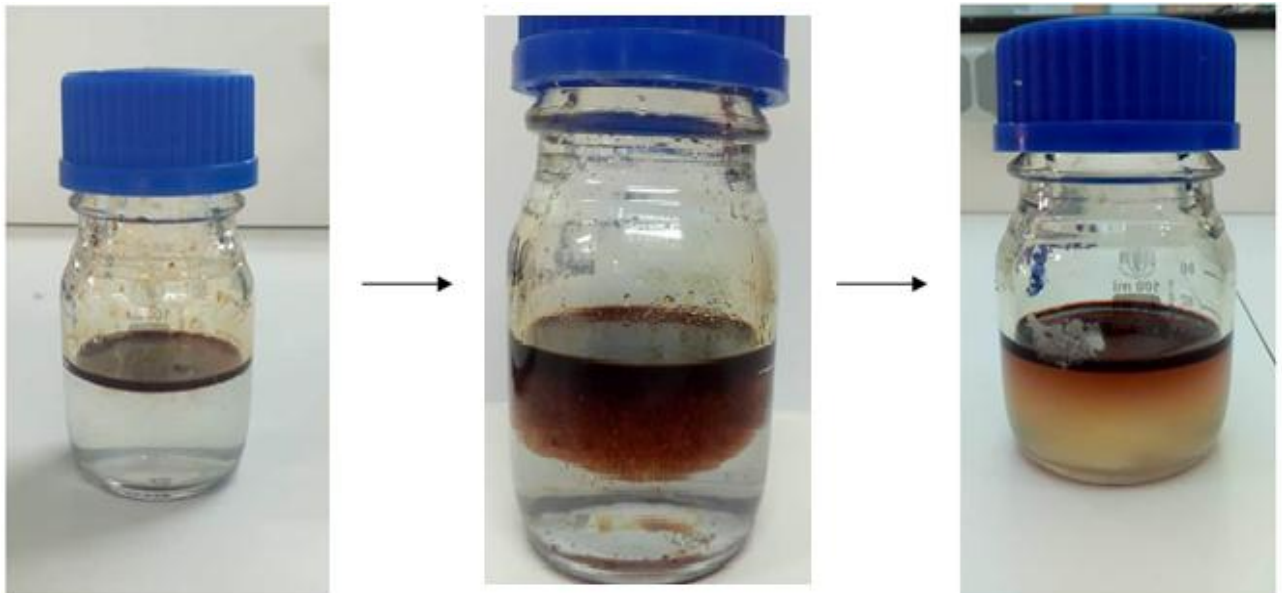


Figure27 : Adaptation des bactéries à la dégradation des HAP ; émulsifiassions du pétrole et production de biomasse

Alors que les HAP de 2 à 3 noyaux aromatiques sont relativement facilement dégradés par des bactéries, les HAP de haut poids moléculaire sont beaucoup plus récalcitrants à la biodégradation comme le cas du Pyrène. Le catabolisme aérobie des HAP est toujours initié par leur oxygénation, l'enzyme qui intervient dans cette première étape de biodégradation est la Di-oxygénase. Cette dernière est une enzyme intracellulaire d'une spécificité élargie et elles peuvent même être induites par d'autres composés apparentés au HAP (Krivobok *et al.*, 2003 ; Pelmont, 2005).

La biodégradation du Pyrène commence selon un profil relativement rapide durant les 5 premiers jours pour l'ensemble des concentrations du substrat (Figure 28). Après cette période, on remarque un ralentissement dans le processus de biodégradation qui perdure jusqu'au 9^{ème} jour. Les pourcentages de la biodégradation du Pyrène, jusqu'au 9^{ème} jour, par le microbiote de la zone estuaire (St2) ne dépasse pas 22% pour l'ensemble des concentrations du Pyrène (Figure 28). Ce ralentissement dans le processus de biodégradation peut être expliqué par la formation de métabolites intermédiaires, pouvant être toxique (voire même plus toxique et récalcitrants que le Pyrène) ce qui a, probablement engendrer une inhibition de la croissance de certaines bactéries dans le consortium.

Après ce ralentissement, la biodégradation se relance durant la période qui s'étale du 10^{ème} jour au 20^{ème} jour, où la vitesse de dégradation atteint son maximum et le pourcentage de de disparition du substrat atteint son maximum avec la disparition de plus de 90% pour l'ensemble des concentrations du Pyrène utilisées (Figure 28).

Après cette période qui semble correspondre à la phase exponentielle de la croissance des microorganismes, ce qui est confirmé par l'apparition d'un trouble microbien significatif dans tous les fermenteurs, le rythme de la biodégradation commence à se ralentir et la vitesse de biodégradation devient de plus en plus faible (Figure 28). Cette période de ralentissement entre le 20^{ème} et le 30^{ème} jour peut être expliquée par l'épuisement de l'oxygène dans le milieu (mini fermenteur). En milieu naturel, le dernier ralentissement de la vitesse de biodégradation (sans épuisement de substrat) constaté dans notre étude ne se produit probablement pas, car nos mini fermenteurs sont des milieux clos qui n'ont pas un approvisionnement en matière d'oxygène, alors que les milieux aquatiques sont des milieux ouverts qui permettent une régénération permanente en oxygène.

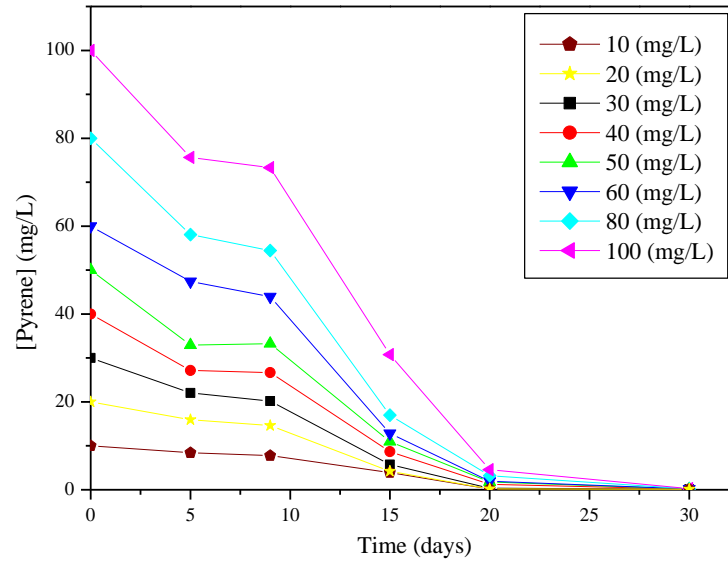
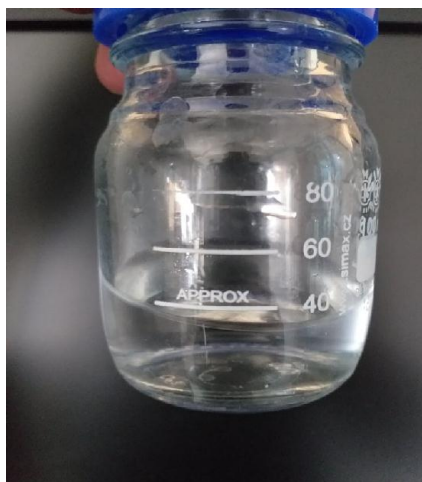


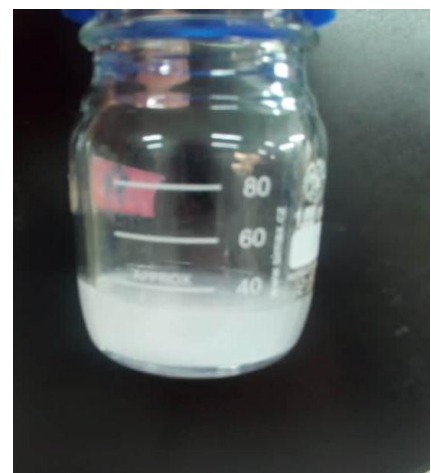
Figure 28 : Cinétique de dégradation de différentes concentrations de du pyrène par un consortium bactérien isolé de la zone estuaire dans 40 ml de MSM.

5.2. Fin de la cinétique de biodégradation

Vers la fin de la cinétique de biodégradation et après 30 jours d'incubation, la vitesse de biodégradation tend à s'annuler et on remarque une disparition quasi complète des différentes concentrations du Pyrène. Une production de biomasse et un changement de couleur du milieu de culture est constatée (figure 29).



Début d'incubation



Fin d'incubation

Figure 29 : Changement de la couleur du milieu de culture.

Selon la littérature scientifique, les concentrations élevées du Pyrène inhibent toujours la croissance microbienne, en agissant négativement sur les oxygénases. Certains auteurs constatent une inhibition de la croissance de certaines souches microbiennes comme *Pseudomonas putida* PL2 dont leur genre est connu pour sa capacité à dégrader les HAP à des concentrations de 60mg/l, 50mg/l et voire même de 40mg/l (Ping et al., 2011). D'autres auteurs constatent une croissance de souches de *Pseudomonas aeruginosa* RS1 sur des concentrations de Pyrène allant de 20mg/l à 500mg/l mais sans élimination complète du Pyrène dans les concentrations qui ne dépassent pas les 100mg/l (Indrani et al., 2014).

Dans notre étude le taux de la biodégradation constaté, durant la période d'incubation et dès les Premières heures, indique que la croissance microbienne n'est pas inhibée malgré l'utilisation de concentrations beaucoup plus élevées. Cela dénote la résistance du microbiote de nos échantillons et surtout sa grande efficacité dans l'élimination complète du Pyrène en l'utilisant comme seule source de carbone et d'énergie.

6. Effet de la concentration de la molécule sur la biodégradation

La concentration du substrat semble avoir un effet sur sa biodégradation selon certains auteurs (Indrani et al., 2014). Lu et al., en 2014 constate que La capacité d'un mélange de souches *Sphingomonas sp. GY2B* et *Pseudomonas sp. GP3A* à dégrader le pyrène, comme seule source de carbone et d'énergie, augmentée de 18% à 46% avec la diminution de la concentration en pyrène de 100 mg/L à 15 mg/L, alors que cette augmentation peut être plus importante en utilisant le phénanthrène et le naphthalène comme co-substrat, le pourcentage de dégradation peut atteindre 42% et 78%, respectivement.

En fait, ce n'est pas le cas dans notre étude, plus la concentration de la molécule est élevée plus le pourcentage de biodégradation et l'élimination du Pyrène est élevé (figure 28), Cela est constaté surtout durant la phase comprise entre 0 et 20 jours d'incubation. Après le 20^{ème} jour d'incubation les pourcentages de biodégradation du Pyrène se rapprochent jusqu'au 30^{ème} jour où on constate une élimination complète des différentes concentrations du Pyrène.

Ce qui nous mène à conclure que la concentration du substrat a un effet sur le taux et la vitesse de sa disparition, et c'est d'ailleurs ce qui a été confirmé par l'analyse statistique de la variance qui montre que l'effet de la concentration du Pyrène dans les mini-fermenteurs est significatif ($p < 0,05$) durant toute la période d'incubation.

7. Témoin et contrôle

Dans les mini-fermenteurs non inoculés et stérilisés, une perte de Pyrène qui ne dépasse pas les 10%, pour l'ensemble des concentrations étudiées, est enregistrée après les 30 jours d'incubation. Cette perte abiotique est notée dès les premiers intervalles de dosage et suit un profil graduel (Figure 30).

Les HAP, y compris le Pyrène, peuvent être dégradés par plusieurs processus abiotique, tels que : l'oxydation, l'hydrolyse et la photolyse. Dans nos conditions de travail, la photolyse est certainement limitée car les échantillons ne sont exposés à la lumière du laboratoire que durant leurs phases de manipulations et de mesures. Quant à l'hydrolyse et à l'oxydation leur effet pourrait aussi être limité dans nos conditions de travail. De ce fait, la probabilité de l'effet de l'oxydation et de l'hydrolyse est probablement limitée sinon éliminée, alors que d'autres processus de dégradation abiotique ne sont pas à exclure.

Le test de Student effectué en fin d'incubation, entre la dégradation abiotique et la biodégradation la plus faible (menée par le microbiote de de la zone estuaire St2) montre que la différence entre les deux processus de dégradation est très hautement significatif ($p < 0,001$).

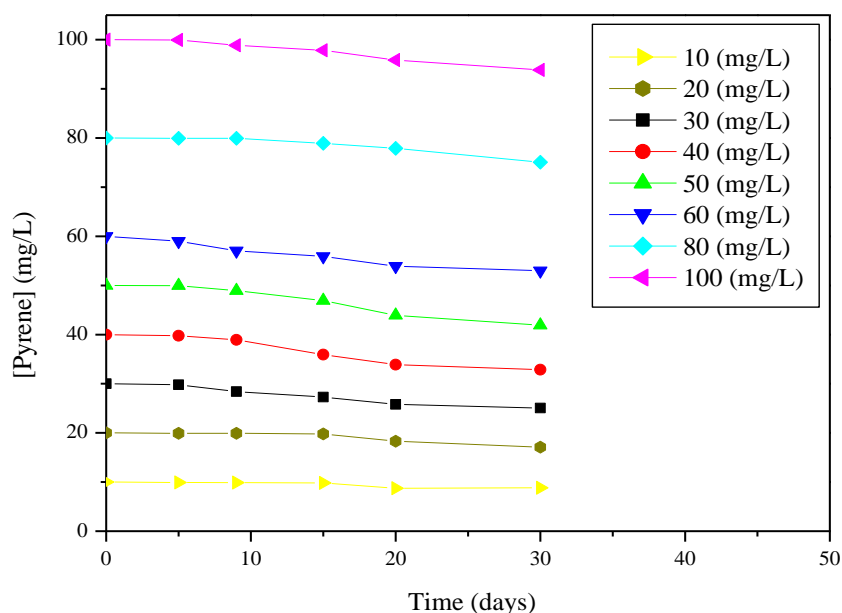


Figure 30 : Cinétique de dégradation abiotiques des différentes concentrations de du pyrène

8. Evolution de la biomasse

En général, l'évolution de la biomasse bactérienne est proportionnelle à la concentration du substrat dans le milieu. C'est-à-dire que plus le substrat est disponible et abondant dans le milieu de culture plus la biomasse est importante. Dans cette étude on constate que c'est le cas ; à la fin d'incubation les fermenteurs contenant des concentrations de Pyrène plu élevées enregistre un taux de biomasse important.

Durant la période d'incubation allant du 0 au 15^{ème} jour, l'augmentation de la biomasse est très remarquable surtout dans les mini-fermenteurs contenant des concentrations relativement plus élevé notamment 80 et 100mg/l (Figure 31). Cette phase correspond à la phase exponentielle de l'incubation où les bactéries ont tous les facteurs nécessaires favorisant leur croissance en l'occurrence la disponibilité du substrat, les enzymes requises et l'oxygène nécessaire.

Après le 15^{ème} jour, un ralentissement dans la croissance bactérienne est constaté (Figure 31), ce qui correspond à une phase stationnaire où les conditions de croissance commencent à devenir moins favorables, cette phase d'incubation perdure jusqu'au 20^{ème} jour.

Après le 20^{ème} jour la phase de déclin s'installe et la biomasse bactérienne commence à diminuer (Figure 31), Cette diminution peut être attribuée au début d'épuisement de substrat et d'oxygène dans le milieu.

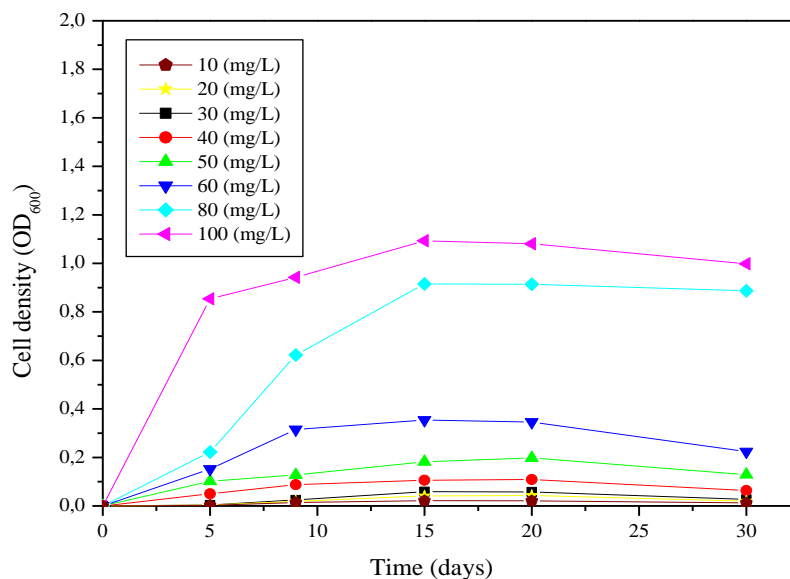


Figure 31 : Densité cellulaire des différentes concentrations de dégradation du pyrène en utilisant un consortium bactérien isolé de la zone estuaire dans 40 ml de MSM

A la fin d'incubation, et après isolement et identification moléculaire des souches bactériennes ayant le pouvoir de dégrader et d'utiliser le Pyrène comme seule source de carbone et d'énergie, les résultats montrent que parmi 10 souches bactériennes contenu dans le consortium de départ, seulement deux souches ont survécu aux différentes concentrations du Pyrène et ont montré un pouvoir bioremédiateur intéressant en utilisant le Pyrène comme seule source de carbone et d'énergie. Il s'agit d'*Alcaligenes aquatilis* et *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, qui sont, d'une part, des espèces bactériennes qui se trouvent souvent dans les écosystèmes marins contaminés par les hydrocarbures (Klein et al., 2008 ; Grimaud et al., 2012), et d'autre part reconnues pour leur pouvoir bioremédiateur et rapportées par des auteurs comme étant capable de dégrader le Pyrène entre autres HAP. (Deppe et al., 2005 ; Fathepure, 2014 ; Mahjoubi et al., 2019 ; Durán et al., 2019).

Cette étude fournit des connaissances précieuses sur les caractéristiques physicochimiques de l'écosystème aquatique du golfe de Skikda, la distribution spatio-temporelle du THC et des HAP, ainsi que sur leur activité et leur devenir dans l'environnement. Le THC et les HAP étudiés sont principalement concentrés dans la zone estuaire (St2) juste après le point de rejet des eaux usées de la raffinerie de pétrole considérée comme la principale source de pollution de cet écosystème par les hydrocarbures. Puis cette pollution se propage de part et d'autre de cette zone pour atteindre St3 et St5 avec des concentrations relativement affaiblies par l'effet de la dilution mais relativement élevées, du fait des activités maritimes, en St5 par rapport au St3.

Des facteurs externes tels que la température et les microorganismes peuvent avoir une forte influence sur le comportement des contaminants. Par ailleurs, plusieurs facteurs tels que le poids moléculaire, le nombre d'anneaux et la solubilité des HAP jouent un rôle très important dans leur persistance et dissipation dans l'écosystème aquatique étudié.

La contamination dans les sédiments est toujours plus élevée que celle dans l'eau en raison de la nature hydrophobe des hydrocarbures et de leur tendance à s'adsorber sur les matières organiques et en suspension et à s'accumuler finalement dans les sédiments. Cette étude nous prévient que les eaux usées industrielles, rejetées par la raffinerie de pétrole de Skikda, sont mal traitées et peuvent affecter la faune et la flore de l'écosystème. Il peut également représenter une grande menace pour la santé humaine via la chaîne trophique.

Une grande variation spatiotemporelle est également enregistrée dans les espèces bactérienne isolées, cette différence entre les stations et les saisons peut être attribuée d'une part à la différence des températures entre les saisons, à la différence de salinité et même à la source le taux de pollution au niveau des stations de prélèvement, ces trois facteurs qui favorisent ou répriment la prolifération et l'abondance de certaines bactéries au détriment des autres selon leur capacité d'adaptation.

Dans notre étude, le taux de la biodégradation constaté durant la période d'incubation et dès les Premières heures, indique que la croissance microbienne n'est pas inhibée malgré l'utilisation de concentrations beaucoup plus élevées. Cela dénote la résistance du microbiote de nos échantillons et surtout sa grande efficacité dans l'élimination complète du Pyrène en l'utilisant comme seule source de carbone et d'énergie. La majeure partie de la biodégradation se réalise entre le 10^{ème} et 20^{ème} jour. Au-delà, le processus de biodégradation décélère avec le temps jusqu'à atteindre des vitesses remarquablement faibles. La concentration du Pyrène dans

le milieu semble avoir un effet sur sa biodégradation car celle-ci est proportionnelle à la concentration de la molécule. L'effet dose est clairement confirmé par l'analyse de la variance ($p < 0,05$).

Une perte abiotique de substrat est relevée dans les fermenteurs stériles et non inoculés, après les 30 jours d'incubation. Elle est relativement faible et ne dépasse pas les 10% quelle que soit la concentration du milieu en Pyrène. Cette perte abiotique est notée dès les premiers intervalles de dosage et suit un profil graduel. La différence entre les deux processus de dégradation (biotique et abiotique) est très hautement significative ($p < 0,001$).

A la fin d'incubation, une production de biomasse est enregistrée et les espèces bactériennes qui ont été capables de dégrader le pyrène et de l'utiliser comme seule source de carbone et d'énergie jusqu'à la fin de l'incubation appartiennent aux genres *Alcaligenes* et *Marinobacter* à savoir : *Alcaligenes aquatilis* et *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* qui sont des espèces bactériennes qui se trouve des écosystèmes marins et estuariens récepteurs de déchets pétroliers. Par ailleurs ces deux espèces bactériennes sont reconnues pour leur pouvoir bioremédiateur et leur capacité à dégrader les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.

Résumé

La présente étude vise, d'une part, l'évaluation et le suivi spatio-temporels de la contamination par les hydrocarbures dans l'eau et les sédiments de la baie de Skikda (Algérie), suite à la présence d'eaux usées industrielles rejetées par un complexe de raffinerie de pétrole dans la zone. Et d'autre part de faire un inventaire des espèces microbiennes existantes et de les réutilisé pour la dégradation du Pyrène. Des échantillons d'eau et de sédiments ont été prélevés sur six sites différents au cours des quatrièmes saisons. Les hydrocarbures totaux (THC) ont été déterminés par une méthode gravimétrique, tandis que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (anthracène, pyrène et benzo (a) pyrène) par chromatographie liquide haute performance (HPLC-UV/Vis). Les résultats obtenus indiquent une forte contamination par les hydrocarbures dans les échantillons d'eau et de sédiments des sites exposés à la raffinerie industrielle. Les concentrations de THC, d'anthracène, de pyrène et de benzo (a) pyrène enregistrées dans l'eau au cours des quatre saisons étaient dans ordre de : 78 - 9457 $\mu\text{g} / \text{L}$; $<\text{LOD}_{\text{Anthracène}} - 157,1 \mu\text{g} / \text{L}$; $<\text{LOD}_{\text{Pyrène}} - 188,6 \mu\text{g} / \text{L}$; $<\text{LOD}_{\text{Benzo (a) pyrène}} - 2224,45 \mu\text{g} / \text{L}$ respectivement. Alors que les concentrations de THC, d'anthracène, de pyrène et de benzo (a) pyrène enregistrées dans les sédiments au cours des quatre saisons étaient dans cet ordre: 323 - 185450 $\mu\text{g} / \text{g ps}$; $<\text{LOD}_{\text{Anthracène}} - 87624,7 \mu\text{g} / \text{g ps}$; $<\text{LOD}_{\text{Pyrène}} - 17485,5 \mu\text{g} / \text{g ps}$; $<\text{LOD}_{\text{Benzo (a) pyrène}} - 39555,5 \mu\text{g} / \text{g ps}$ respectivement. Un impact saisonnier important dans l'eau a été mis en évidence par les trois composés sélectionnés pour cette analyse. Dans les sédiments, seul le THC a montré des variations saisonnières significatives. Les eaux usées de la raffinerie devraient être bien traitées pour protéger la vie marine et la sécurité humaine.

Une grande variation spatiotemporelle a également été enregistrée dans les espèces bactériennes isolées, cette différence entre les stations et les saisons peut être attribuée aux facteurs environnementaux et au taux de pollution au niveau des stations de prélèvement. Le microbiote de nos échantillons a montré une grande efficacité dans l'élimination complète du Pyrène en l'utilisant comme seule source de carbone et d'énergie. Les espèces bactériennes qui ont été capables de dégrader le Pyrène et de l'utiliser comme seule source de carbone et d'énergie jusqu'à la fin de l'incubation sont : *Alcaligenes aquatilis* et *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*.

Mots clés : Raffinerie de pétrole, eaux usées, THC, anthracène, pyrène, benzo (a) pyrène, baie de Skikda.

Abstract

The present study aims, on the one hand, to evaluate and monitor the spatio-temporal contamination by hydrocarbons in the water and sediments of the bay of Skikda (Algeria), following the presence of industrial wastewater. discharged from an oil refinery complex in the area. And on the other hand, to make an inventory of existing microbial species and to reuse them for the degradation of Pyrene. Water and sediment samples were collected from six different sites during the fourth seasons. Total hydrocarbons (THC) were determined by a gravimetric method, while polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (anthracene, pyrene and benzo (a) pyrene) by high performance liquid chromatography (HPLC-UV / Vis). The results obtained indicate a strong contamination by hydrocarbons in the water and sediment samples of the sites exposed to the industrial refinery. The concentrations of THC, anthracene, pyrene and benzo (a) pyrene recorded in the water during the four seasons were in the range of: 78 - 9457 $\mu\text{g} / \text{L}$; <LOD Anthracene -157.1 $\mu\text{g} / \text{L}$; <LOD Pyrene - 188.6 $\mu\text{g} / \text{L}$; <LOD Benzo (a) pyrene - 2224.45 $\mu\text{g} / \text{L}$ respectively. While the concentrations of THC, anthracene, pyrene and benzo (a) pyrene recorded in the sediments during the four seasons were in this order: 323 - 185450 $\mu\text{g} / \text{g dw}$; <LOD Anthracene - 87624.7 $\mu\text{g} / \text{g dw}$; <LOD Pyrene - 17485.5 $\mu\text{g} / \text{g dw}$; <LOD Benzo (a) pyrene - 39555.5 $\mu\text{g} / \text{g dw}$ respectively. A significant seasonal impact in water was demonstrated by the three compounds selected for this analysis. In sediments, only THC showed significant seasonal variations. Refinery wastewater should be well treated to protect marine life and human safety.

A large spatiotemporal variation was also recorded in the isolated bacterial species, this difference between stations and seasons can be attributed to environmental factors and to the pollution rate at the sampling stations. The microbiota in our samples has shown great efficiency in the complete elimination of Pyrene using it as the sole source of carbon and energy. The bacterial species which have been able to degrade Pyrene and use it as the sole source of carbon and energy until the end of incubation are: *Alcaligenes aquatilis* and *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*.

Key words

Petroleum Refinery, Wastewater, THC, Anthracene, Pyrene, Benzo (a) pyrene, Skikda bay.

الملخص :

تهدف الدراسة الحالية ، من جهة ، إلى تقييم ورصد التلوث المكاني والزمني بالمحروقات في المياه والرواسب بخليج سكيكدة (الجزائر) ، بعد وجود مياه الصرف الصناعي التي تم تصريفها من مجمع لتكرير البترول في المنطقة. ومن ناحية أخرى ، لعمل جرد للأنواع الميكروبية الموجودة وإعادة استخدامها لتحلل البيرين. جمعت عينات المياه والرواسب من ستة مواقع مختلفة خلال الموسم الرابع. تم تحديد إجمالي الهيدروكربونات (THC) بطريقة قياس الجاذبية ، بينما تم تحديد الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات (الأنتراسين والبايرين والبنزو (أ) البيرين) بواسطة كروماتوجرافيا سائلة عالية الأداء (HPLC-UV / Vis) تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى وجود تلوث شديد بالمواد الهيدروكربونية في عينات المياه والرواسب في المواقع المعرضة للمصفاة الصناعية. كانت تركيزات THC والأنتراسين والبايرين والبنزو (أ) البيرين المسجلة في الماء خلال الفصول الأربعة في حدود: 78 - 9457 ميكروغرام / لتر. > LOD أنتراسين - 157.1 ميكروغرام / لتر ؛ > LOD Pyrene - 188.6 ميكروغرام / لتر ؛ > LOD Benzo (a) pyrene - 2224.45 ميكروغرام / لتر على التوالي. بينما كانت تركيزات THC والأنتراسين والبايرين والبنزو (أ) بايرين المسجلة في الرواسب خلال الفصول الأربعة بهذا الترتيب: 323 - 185450 ميكروغرام / غرام وزن جاف ؛ > LOD أنتراسين - 87624.7 ميكروغرام / غرام وزن جاف ؛ > LOD Pyrene - 17485.5 ميكروغرام / غرام وزن جاف ؛ > LOD Benzo (a) pyrene - 39555.5 ميكروغرام / غرام وزن جاف على التوالي. تم إثبات تأثير موسمي كبير في الماء من خلال المركبات الثلاث المختارة لهذا التحليل. في الرواسب ، أظهر التتراهيدروكانابينول فقط اختلافات موسمية معنوية. يجب معالجة مياه الصرف من المصفاة بشكل جيد لحماية الحياة البحرية وسلامة الإنسان.

كما تم تسجيل تباين زمني مكاني كبير في الأنواع البكتيرية المعزولة ، ويمكن أن يعزى هذا الاختلاف بين المحطات والمواسم إلى العوامل البيئية ومعدل التلوث في محطات أخذ العينات. أظهرت الكائنات الحية الدقيقة في عيناتنا كفاءة كبيرة في القضاء التام على البيرين باستخدامها كمصدر وحيد للكربون والطاقة. الأنواع البكتيرية التي تمكنت من تحلل البيرين واستخدامها كمصدر وحيد للكربون والطاقة حتى نهاية الحضانة هي: *Alcaligenes aquatilis* و *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

الكلمات المفتاحية : مصفاة بترول ، مياه صرف ، THC ، أنتراسين ، بيرين ، بنزو (أ) بيرين ، خليج سكيكدة.

1. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), (1995). Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.
2. Aitken, M.D. Stringfellow, W.T. Nagel, R.D. Kazunga, C. Chen, S.H. (1998). Characteristics of phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, *Canadian Journal of Microbiology*. 44 : 743–752.
3. Ambrosoli, R. Petruzzelli, L. Minati, J.L. Marsan, F.A. (2005). Anaerobic PAH degradation in soil by a mixed bacterial consortium under denitrifying conditions, *Chemosphere*. 60 (9): 1231–1236.
4. AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE (API). (1999). Fate of Spilled Oil in Marine Waters: Where Does It Go? What Does It Do? How Do Dispersants Affect It? An Information Booklet for Decision-Makers, Health and Environmental Sciences Department, Publication number 4691, 47 p.
5. Anderson, R.T. Lovely, D.R. (1999). Naphthalene and benzene degradation under Fe(III)-reducing conditions in petroleum contaminated aquifers, *Bioremediation Journal*. (3): 121–135.
6. Anzai, Y. Kim, H. Park, J.Y. Wakabayashi, H. Oyaizu, H. et al. (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol*. 50 (4): 1563–1589.
7. Arrêté n°01164/MINEEF/CIAPOL/SDIIC du 04 novembre 2008).
8. Arruda-Santos, R. H. Augusto, C. Schettini, F. Yogui, G. T., Maciel, D. C. Zanardi-Lamardo, E. (2018). Sources and distribution of aromatic hydrocarbons in a tropical marine protected area estuary under influence of sugarcane cultivation. *Science of the Total Environment*. 624: 935-944.
9. Ashiru, O. R. and Ogundare, M. O. (2019). An assessment of total petroleum hydrocarbon and trace metal concentration in the sediments of Ugbo water way, south western Nigeria. *African Journal of Environmental Science and Technology*. 13(1): 13-21.
10. Ayoub, K. Van Hullebusch, E. D. Cassir, M. Bermond, A. (2010). Application of advanced oxidation processes for TNT removal: a review. *Journal of hazardous Materials*. 178(1):10-28.

11. Baek, S. O. Field, R. A. Goldstone, M. E. Kirk, P. W. Lester, J. N. Perry, R. (1991). A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: sources, fate and behavior. *Water, Air, and Soil Pollution*. 60 (3-4): 279-300.
12. Bamforth, S. M. and Singleton, I. (2005). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 80(7): 723-736.
13. Bandara U. C. Yapa P. D. Xie. H. (2011). Fate and transport of oil in sediment laden marine waters. *Journal of Hydro-Environment Research*. 5(3): 145-156.
14. Barnier, C. (2009). Disposition des HAP dans les sols de friches industrielles et influence des conditions rhizosphériques. Thèse de doctorat en science agronomiques, Institut National Polytechniques de Lorraine, France. p22.
15. Baryshnikova, L. M. Grishchenkov, V. G. Arinbasarov, M. U. Shkidchenko, A. N. and Boronin, L. M. (2001). Biodegradation of Oil Products by Individual Degrading Strains and Their Associations in Liquid Media. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 37 (5): 463–468.
16. BATTELLE, (2007). Sediment Toxicity of Petroleum Hydrocarbon Fractions, préparé pour Massachusetts Department of Environmental Protection, Office of Research and Standards, Boston. 28 p.
17. Baumard, P. Budzinski, H. Garrigues, P. (1998). Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and smudges of the western Mediterranean sea. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 17:765–776.
18. Berdicevsky, L. Duek, D. Merzbach, S. Yannai, (1993). Susceptibility of different yeast species to environmental toxic metals, *Environmental Pollution*. (80): 41–44.
19. Bertrand, J.C. and Mille, G. (1989). Devenir de la matière organique exogène. Un modèle : les Hydrocarbures. *Microorganismes dans les écosystèmes océaniques*. Bianchi M., Marty D., Bertrand J.C., Caumette P., Gauthier M.J. et al. Edition Masson, Paris: 343-385.

20. Bollinger, A. Thies, S. Knieps-Grünhagen, E. Gertzen, C. Kobus, S. Höppner, A. Ferrer, M. Gohlke, H. Smits, S. H. J. Jaeger K-E (2020). A Novel Polyester Hydrolase from the Marine Bacterium *Pseudomonas aestusnigri* – Structural and Functional Insights. *Frontiers in Microbiology*. 11 : 1-16.
21. Borde, X. Guieysse, B. Delgado, O. Munoz, R. Hatti-Kaul, R. Nugier Chauvin, C. Patin, H. Mattiasson, B. (2003). Synergistic relationships in algal–bacterial microcosms for the treatment of aromatic pollutants, *Bioresource Technology*. 86 (3) : 293–300.
22. Bouchez M. Blanchet D. Vandecasteele J. P. (1995). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and co-metabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology*. (43): 156-164.
23. Boudreau, L., Sinotte, M. & Defo, M. A. (2019), MELCC. Literature review on surface water quality criteria for petroleum hydrocarbons - carried out as part of the strategic environmental assessment (Study AENV14), Quebec, Ministry of the Environment and the Fight against Climate Change, Directorate general monitoring of the state of the environment.
24. BOUR, O. (2005). Hydrocarbure aromatique polycyclique. Guide méthodologique. Acquisition des données d'entrée des modèles analytiques ou numériques de transferts dans les sols et les eaux souterraines. Rapport d'étude N° 66244-DESP – R01 In Institut National de l'Environnement industriel et des risques (INERIS). <http://www.ineris.fr/centredoc/66244-DESP-R01-pdf> (page consultée 05 juin 2013).
25. Bourcereau, L. (2010). Accumulation des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) dans les sédiments de la rivière Doubs. Rapport final, Université de Franche-Comté (UFC). In Université de Franche-Comté.
26. Boyle, D. Wiesner, C. Richardson, A. (1998). Factors affecting the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by white rot fungi, *Soil Biology and Biochemistry*. 30 (7): 873–882.
27. Bregnard, T. Hoehener, P. Haener, A. Zeyer, J. (1996): Degradation of weathered diesel fuel by microorganisms from a contaminated aquifer in aerobic and anaerobic microcosms. *Environ. Toxicol. Chem.* (15): 299–307.

28. Caiyun, S., Jiquan, Z., Qiyun, M., Yanan, C., & Hanyu, J. (2016). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water and sediment from a river basin: sediment water partitioning, source identification and environmental health risk assessment. *Environmental Geochemistry and Health*. 39 (1), 63-74.
29. Cajthaml, T. Pacakova, V. Sasek, V. (2001). Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Chemické Listy*. (95) : 404.
30. Cajthaml, T. Moder, M. Kacer, P. Sasek, V. Popp, P. (2002). Study of fungal degradation products of polycyclic aromatic hydrocarbons using gas chromatography with ion trap mass spectrometry detection, *Journal of Chromatography A*. (974): 213–222.
31. Canadian Council of Ministers of the Environment (1999). Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Life aquatic - polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), in Canadian quality guidelines for the environment, 1999, Winnipeg, the Council.
32. Carpenter, A. and Kostianoy A. G. (2019). Oil Pollution in the Mediterranean Sea: Part II: National Case Studies. The Handbook of Environmental Chemistry. 1st ed. Springer, Switzerland. 421p.
33. Carr, E. L. Kämpfer, P. Patel, B. K. Gürtler, V. Seviour, R. J. (2003). "Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53 (4): 953–963.
34. Cerniglia, C.E. (1984). Microbial Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Adv. Applied Microbiology*. (30): 31-71.
35. Cerniglia, C.E. Gibson, D.T. Baalen, C.V. (1979) Algal oxidation of aromatic hydrocarbons: formation of 1-Naphthol from naphthalene by *Agmenellum quadruplicatum* strain PR-6, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (88): 50–58.
36. Cerniglia, C.E. Baalen, C.V. Gibson, D.T. (1980) Metabolism of naphthalene by cyanobacterium *Oscillatoria* sp. Strain JCM, *Journal of General Microbiology*. (116): 485–494.
37. Cerniglia, C.E. Gibson, D.T. Baalen, C.V. (1980). Oxidation of naphthalene by cyanobacteria and microalgae. *Journal of General Microbiology*. (116): 495–500.

38. Cerniglia, C.E. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*. (3):351-368.
39. Chakravorty, S. Helb, D. Burday, M. Connell, N. Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods*. 69 (2): 330-339.
40. Chang, B.V. Shiung, L.C. Yuan, S.Y. (2002). Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil, *Chemosphere* (48): 717–724.
41. Clark, J.D. Serdar, B. Lee, D.J. Arheart, K. Wilkinson, J.D. Fleming, L.E. (2012). Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and serum inflammatory markers of cardiovascular disease. *Environmental Research*. (117) : 132-137.
42. Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 17: 840-862.
43. Clemente, A.R. Anazawa, T.A. Durrant, L.R. (2001). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil fungi, *Brazilian Journal of Microbiology*. (32) : 255–261.
44. Coates, J.D. Anderson, R.T. Woodward, J.C. Phillips, E.J.P. Lovley, D.R. (1996): Anaerobic hydrocarbon degradation in petroleum contaminated harbor sediments under sulfate-reducing and artificially imposed iron-reducing conditions. *Environ. Sci. Tech.* (30): 2764–2769.
45. Coates, J.D. Woodward, J. Allen, J. Philp, P. Lovely, D.R. (1997). Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments, *Appl. Environ. Microbiol.* (63) : 3589–3593.
46. Coelhoa, J.P. Flindtb, M.R. Jensenb, H.S. Lilleboa, A.I. Pardala, M.A. (2004). Phosphorus speciation and availability in intertidal sediments of a temperate estuary: relation to eutrophication and annual P-fluxes. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* (61): 583-590.

47. Croteau, M.N. Luoma S.N. Stewart A.R. (2005). Trophic transfer of metals along freshwater foods: Evidence of cadmium biomagnification in nature. *Limnology and Oceanography*. (50):1511-1519.
48. Cultrone, A. Scazzocchio, C. Rochet, M. Montero-Morán, G. Drevet, C. FernándezMartín, R. (2005). Convergent evolution of hydroxylation mechanisms in the fungal kingdom: molybdenum cofactor-independent hydroxylation of xanthine via α ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Molecular Microbiology*. 57(1): 276-290.
49. Cutright, T.J. (1995). Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation and kinetics using *Cunninghamella echinulata* var. *elegans*, *International Biodeterioration & Biodegradation / Journal*. 35 (4): 397–408.
50. Daane, L.L. Harjono, I. Zylstra, G.J. Haggblom, M.M. (2001). Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (6) : 2683–2691.
51. Daane, L.L. Harjono, I. Barns, S.M. Launen, L.A. Palleroni, N.J. Haggblom, M.M. (2002). PAH-degradation by *Paenibacillus* spp. and description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. nov., a naphthalene degrading bacterium from the rhizosphere of salt marsh plants, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. (52) : 131–139.
52. Dachs, J. Lohmann, R. Ockenden, W.A. Méjanelle, L. Eisenreich, S.J. Jones, K.C. (2002). Oceanic biogeochemical controls on global dynamics of persistent organic pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 36 (20): 4229-4237.
53. Das, N. & Chandran, P. (2010). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*. Vol. 2011, 13 pages.
54. De Forest, D.K Brix, K.V. Adams, W.J. 2007. Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: The inverse relationships between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. *Aquat. Toxicol.* (84):236-246.
55. De Silva, G. D. I. Kantzanou, M. Justice, A. Massey, R. C. Wilkinson, A. R. Day, N. P. J. Peacock S. J. (2002). The *ica* Operon and Biofilm Production in Coagulase-Negative Staphylococci

- Associated with Carriage and Disease in a Neonatal Intensive Care Unit. *Journal of Clinical Microbiology*. 40 (2): 382–388.
56. Deleo, D.M. Ruiz-Ramos, D.V. Baums I.B. Cordes, E.E. (201). “Response of Deep-Water Corals to Oil and Chemical Dispersant Exposure”, *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*. 129 :137-147.
57. Delgadillo-Mirquez, L. Lardon, L. Steyer, J.P. Patureau, D. (2011). A new dynamic model for bioavailability and cometabolism of micropollutants during anaerobic digestion. *Water research*. (45): 4511 -4521.
58. Derwich, E., Beziane, Z., Benaabidate, L. et Belghyti D. 2008. Evaluation de la qualité des eaux de surface des oueds Fès et Sebou utilisées en agriculture maraichère au Maroc. *Larhyss Journal*. 7, 59-77).
59. Deppe, U. Richnow, H. H. Michaelis, W. Antranikian, G. (2005). Degradation of crude oil by an arctic microbial consortium. *Extremophiles*. 9: 461–470.
60. Dhananjayan, V. Muralidharan, S. Peter, V. R. (2012). Occurrence and Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water and Sediment Collected along the Harbour Line, Mumbai, India. *International Journal of Oceanography*. 2012, 1-7.
61. Di Toro, D.M. Mcgrath, J.A. Stubblefield, W. (2007). “Predicting the Toxicity of Neat and Weathered Crude Oil: Toxic Potential and the Toxicity of Saturated Mixtures”, *Environmental Toxicology Chemistry* (26): 24-36.
62. DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis, Applied Biosystems Chemistry Guide, Third Edition.
63. Dupuis, A. and 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, Secrétariat canadien de consultation scientifique du ministère des Pêches et des Océans, Document de recherche, 2015/007, 55 p.
64. Durán, R. E. Barra-Sanhueza, B. Salvà-Serra, F. Méndez, V. Jaén-Luchoro, D. Moore, E. R. B. Seeger, M. (2019). Complete Genome Sequence of the Marine Hydrocarbon Degradier *Alcaligenes*

- aquatilis QD168, Isolated from Crude Oil-Polluted Sediment of Quintero Bay, Central Chile. *Microbiology Resource Announcements*. 8(5): 3p.
65. Durán, R. E. Méndez¹, V. Rodríguez-Castro, L. Barra-Sanhueza, B. Salvà-Serra, F. Moore, E. R. B. Castro-Nallar, E. Seeger, M. (2019). Genomic and Physiological Traits of the Marine Bacterium *Alcaligenes* Genomic and Physiological Traits of the Marine Bacterium *Alcaligenes* aquatilis QD168 Isolated from Quintero Bay, Central Chile, Reveal a Robust Adaptive Response to Environmental Stressors. *Frontiers in Microbiology*. 10, 528.
66. Ewerton S., Michel, R.R. S., Antônio, R. V. J., Laiane S. S., Morgana F., & Marcelo R. A., (2018). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in superficial water from a tropical estuarine system: Distribution, seasonal variations, sources and ecological risk assessment. *Marine Pollution Bulletin*. 127, 352–358.
67. Fathepure, B. Z. (2014). Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. *Frontiers in Microbiology*, 5, 173.
68. Fingas M. (2013). The Basics of oil spill cleanup. CRC Press, États-Unis.
69. Fitzpatrick, F.A. Boufadel, M.C. Johnson, R. Lee, K. Graan, T.P. Bejarano, A.C. Zhu, Z., Waterman, D. Capone, D.M. Hayter, E. Hamilton, S.K. Deffer, T. Garcia, M.H. Hassan, J.S. (2015). Oil-particle interactions and submergence from crude oil spills in marine and freshwater environments – Review of the science and future science needs. U.S. Geological Survey Open-file report. 2015-1076, 33 p.
70. Fønnesbech Vogel, B. Venkateswaran, K. Satomi, M. Gram, L. (2005). "Identification of *Shewanella baltica* as the most important H₂S-producing species during iced storage of Danish marine fish". *Applied and Environmental Microbiology*. 71 (11): 89–97.
71. Fusey, P. and Oudot, J. (1973). Note sur l'accélération de la biodégradation d'un pétrole brut par des bactéries. *Mater. U. Organ.* (8): 158-163.
72. Fusey, P. and Oudot, J. (1976). Comparaison de deux méthodes d'évaluation de la biodégradation des hydrocarbures in vitro. *Mater. U. Organ.* 4, 241-251.
73. Fusey, P. Lampin, M. F. Oudot, J. (1981). Recherche sur l'élimination des hydrocarbures par voie biologique. *Mater. U. Organ.* (2): 109-147.

74. Gauthier, M. J. Lafay, B. Christen, R. Fernandez, L. Acquaviva, M. Bonin P. Bertrand, J.C. (1992). "Marinobacter hydrocarbonoclasticus gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium". *International Journal of Systematic Bacteriology*. 42 (4): 568–576.
75. Guergazi, S. et Achour, S. (2005). Caractéristiques physico-chimiques des eaux d'alimentation de la ville de Biskra : Pratique de la chloration. *Larhyss Journal*. 4, 119-127.
76. Gianfreda, L. and Rao, M. A. (2004). Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme and Microbial Technology*. 35 (4): 339-354.
77. Gong, Y. Zhao, X. Cai, Z. O'Reilly, S. E. Hao X. Zhao, D. (2014). A review of oil, dispersed oil and sediment interactions in the aquatic environment: Influence on the fate, transport and remediation of oil spills. *Marine Pollution Bulletin*. 79(1-2): 16-33.
78. Goyer, S. Jaouich, A. Morency, M. Couillard, O. (1995). Techniques de restauration de sites contaminés par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP): 1- Fondements et procédés biologiques. *Vecteur Environnement*. 28 (1): 43-53.
79. Grimaud, R. et al. (2012). Genome sequence of the marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17, which forms biofilms on hydrophobic organic compounds. *Journal of Bacteriology*. 194: 3539–3540.
80. Guergazi, S. et Achour, S. (2005). Caractéristiques physico-chimiques des eaux d'alimentation de la ville de Biskra : Pratique de la chloration. *Larhyss Journal*. 4, 119-127.
81. Guérin, F. (2015). Infections à *Enterobacter cloacae* complex : résistance aux antibiotiques et traitement. *Journal des Anti-infectieux*. 17 (3): 79-89.
82. Haritash, A.K. and Kaushik, C.P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*. 169: 1–15.

83. He, X.R., Pang, Y., Song, X.J., Chen, B.L., Feng, Z.H. & Ma, Y.Q. (2014). Distribution, sources and ecological risk assessment of PAHs in surface sediments from Guan River estuary, China. *Marine Pollution Bulletin*. 80, 52–58.
84. Hedlund, B.P. Staley, J.T. (2001). *Vibrio cyclotrophicus* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51 (1): 61–69.
85. Heeg, J. S. Wolf, M. (2015). ITS2 and 18S rDNA sequence-structure phylogeny of *Chlorella* and allies (Chlorophyta, Trebouxiophyceae, Chlorellaceae). *Plant Gene*. 4: 20-28.
86. Heitkamp, M.A. Franklin, W. Cerniglia, C.E. (1988). Microbial metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: isolation and characterization of a Pyrene-degrading bacterium, *Applied and Environmental Microbiology*. (54): 2549–2555.
87. Hoff, F.H. and Snell, T.W. (2001). *Plankton Culture Manual*. Fifth Ed., 120 p.
88. Hofrichter, M. Schneibner, K. Schneegab, I. Fritzsche, W. (1998). Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii*, *Applied Environmental Microbiology*. (64): 399–404.
89. Holmström, C. and Kjelleberg, S. (1999). Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiology Ecology*. 30 (4):285–293.
90. Indrani, G. Jublee, J. Suparna, M. (2014). Biodegradation of pyrene by a *Pseudomonas aeruginosa* strain RS1 isolated from refinery sludge. *Bioresource Technology*. 166 : 548-558.
91. INERIS (2005). *Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques Guide méthodologique- Rapport d'étude N°66244 DESPR01*, pp85.
92. Institut Bruxellois pour la Gestion de l'Environnement / Observatoire des Données de l'Environnement (2005). *Qualité physico-chimique et chimique des eaux de surface : cadre général*.

- 93.** Janda, M. and Abbott, S. (2007) 16s rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Clinical Microbiology Reviews*. 45 (9): 2761-2764).
- 94.** Jazestani, J. (2011). Bioavailability and Biodegradation of Organic Xenobiotic Recalcitrant Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Different Soil Environments (Doctoral dissertation, McGill University).
- 95.** Jian-Hui, S., Guo-Liang, W., Yan, C., Gan, Z., Jun, L. & Jinglan F. (2009). Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Henan Reach of the Yellow River, Middle China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72, 1614– 1624.
- 96.** Jianyang, L. Mingming, Q. Qiliang, L. Chunming, D. Xiupian, L. Guangyi, W. Zongze, S. (2020). *Pusillimonas maritima* sp. nov., isolated from surface seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 70(5): 3483-3490.
- 97.** Joffin, J. N. & Leyral, G. (2009). Technical microbiology, Tome 1: Dictionary of techniques, 4th Edition, Spain, 363p.
- 98.** Joffin, J. N. et Leyral, G. (2009). Technical microbiology, Tome 1: Dictionary of techniques, 4th Edition, Spain, 363p.
- 99.** Journal officiel de la République algérienne. Numéro 36, juin 2009. Valeurs limites maximales pour la teneur en substance des eaux usées nocives autres que domestiques de leur rejet dans un réseau d'assainissement public ou dans une station d'épuration).
- 100.** Juhasz, A. L. and Naidu, R. (2000 a). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 45(1-2): 57-88.
- 101.** Jung, K.H. Hsu, S.-I. Yan, B. Moors, K. Chillrud, S.N. Ross, J. Wang, S. Perzanowski, M.S. Kinney, P.L. Whyatt, R.M. et al. (2012). Childhood exposure to fine particulate matter and black carbon and the development of new wheeze between ages 5 and 7 in an urban prospective cohort. *Environment International*. (45):44-50.

- 102.** Jung, K.H., Hsu, S.-I., Yan, B., Moors, K., Chillrud, S.N., Ross, J., Wang, S., Perzanowski, M.S., Kinney, P.L., Whyatt, R.M., et al. (2012). Childhood exposure to fine particulate matter and black carbon and the development of new wheeze between ages 5 and 7 in an urban prospective cohort. *Environment International*, 45, 44-50.
- 103.** Kämpfer, P. (2014). *Encyclopedia of Food Microbiology*. Second Edition. Elsevier, United Kingdom. 3248p.
- 104.** Kaushik, C.P. and Haritash, A.K. (2006). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and environmental health, *Our Earth* 3 (3): 1–7.
- 105.** Keith L. H. (2014). The Source of U.S. EPA's Sixteen PAHs Priority Pollutants. *Polycyclic Aromatic Compounds*. 35 (2-4), 147–160.
- 106.** Khairy, M.A., Weinstein, M.P. & Lohmann, R. (2014). Trophodynamic behavior of hydrophobic organic contaminants in the aquatic food web of a Tidal River. *Environmental Science & Technology*. 48, 12533–12542.
- 107.** Khairy, M.A., Weinstein, M.P. Lohmann, R. (2014). Trophodynamic behavior of hydrophobic organic contaminants in the aquatic food web of a Tidal River. *Environmental Science & Technology*. (48) :12533–12542.
- 108.** Kim, I. J. Lee, M. H. Jung, S. Y. Song, J.J. Oh, T.K. Yoon, J. H. (2005). "Exiguobacterium aestuarii sp. nov. and E. marinum sp. nov., isolated from tidal flat of the yellow sea in Korea". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55 (2): 885–889.
- 109.** King, A.J., Readman, J.W. & Zhou, J.L. (2004). Dynamic behaviour of polycyclic aromatic hydrocarbons in Brighton marina, UK. *Marine Pollution Bulletin*. 48, 229–239.
- 110.** Klein, B. Grossi, V. Bouriat, P. Goulas, P. Grimaud, R. (2008). Cytoplasmic wax ester 605 accumulation during biofilm-driven substrate assimilation at the alkane-water interface by 606 *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17. *Research in Microbiology*. 159: 137–144.
- 111.** Koning, M. Hupe, K. Stegmann, R. (2000) Thermal Processes, Scrubbing/Extraction, Bioremediation and Disposal. *Biotechnology*, (11b): 306-317.

- 112.**Kratochvil, D. Volesky, B. (1998). Advances in the biosorption of heavy metals. *Trends Biotechnol.* (16): 291–300.
- 113.**Krivobok, S. Kuony, S. Willison, J. C. Meyer, C. Louwagie, M. Jouanneau, Y. (2003). Identification of Pyrene-Induced Proteins in *Mycobacterium* sp. Strain 6PY1: Evidence for Two Ring-Hydroxylating Dioxygenases. *Journal of Bacteriology.* 185 (13): 3828–3841.
- 114.**Kumar, A. G., Vijayakumar L., Joshi,G., Magesh Peter, D., Dharani, G. &Kirubakaran R. 2014. Biodegradation of complex hydrocarbons in spent engine oil by novel bacterial consortium isolated from deep sea sediment. *Bioresource Technology.* 170, 556-564.
- 115.**Kumar, M. S. Kaur, G. Kaur Sandhu, A. (2014). Genomic DNA Isolation from Fungi, Algae, Plant, Bacteria and Human Blood using CTAB. *International Journal of Science and Research.* 3 (9): 617-618.
- 116.**Lacoste, M.L. (2008). Etude des phénomènes de biotransformation des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) par les organismes aquatiques (poissons). Relation exposition genotoxicite. Thèse de doctorat en Chimie Analytique de l'Environnement, Université de Bordeaux 1, France.
- 117.**Lagenhoff, A. Zehnder, A. Schraa, G. (1996). Behaviour of toluene, benzene and naphthalene under anaerobic conditions in sediment column, *Biodegradation* (7): 267–274.
- 118.**Lalucat, J. Bennasar, A. Bosch, R. García-Valdés, E. Palleroni N.J. 2006). "Biology of *Pseudomonas stutzeri*". *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 70 (2): 510–47.
- 119.**Langlois, P.H., Hoyt, A.T. Lupo, P.J. Lawson, C.C. Waters, M.A. Desrosiers, T.A. Shaw, G.M. Romitti, P.A. Lammer, E.J. (2013). Maternal occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and risk of oral cleft-affected pregnancies. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal.* (50), 337-346.
- 120.**Langlois, P.H., Hoyt, A.T., Lupo, P.J., Lawson, C.C., Waters, M.A., Desrosiers, T.A., Shaw, G.M., Romitti, P.A. &Lammer, E.J. (2013). Maternal occupational exposure to polycyclic aromatic

hydrocarbons and risk of oral cleft-affected pregnancies. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 50, 337-346.

121.Laviad, S. and Halpern, M. (2016). Chironomids Relationship with *Aeromonas* Species. *Frontiers in Microbiology*, 7p.

122.Le Roux, F. Goubet, A. Thompson, F.L. Faury, N. Gay, M. Swings, J. Saulnier, D. (2005). *Vibrio gigantis* sp. nov., isolated from the haemolymph of cultured oysters (*Crassostrea gigas*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55:2251-2255.

123.Leblond, P. Fischer, G. Francou, F. X. Berger, F. Guérineau, M. Decaris, B. (1966). The unstable region of *Streptomyces ambofaciens* includes 210 kb terminal inverted repeats flanking the extremities of the linear chromosomal DNA. *Molecular Microbiology*. 19 (2): 261–271.

124.Leglize, P. (2004). Etudes des interactions Bactéries-Phénanthrène – Charbon actif en vue de l'élaboration d'une Barrière Perméable Réactive. Thèse de doctorat en sciences techniques de la matière et des procédés, Université de Henri Poincaré, Nancy I. In Université de Henri Poincaré.

125.Lei, A.P. Hu, Z.L. Wong, Y.S. Tam, N.F.Y. (2007). Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species. *Bioresource Technology*. 98 (2): 273–280.

126.Lemos, R.T.O., Carvalho, P.S.M., & Zanardi-Lamardo, E. (2014). Petroleum hydrocarbons in water from a Brazilian tropical estuary facing industrial and port development. *Marine Pollution Bulletin*. 82, 183–188.

127.Li, J. et Chan, B.H., (2002). Solubilization of model polycyclic aromatic hydrocarbons by nonionic surfactants. *Chemical Engineering Science*, 57 (2825-2835): 14-20.

128.Liu, B. Liu, J. Ju, M. Lib, X. Yuc, Q. (2016). Purification and characterization of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* Y-1 and its application in remediation of petroleum contaminated soil. *Marine Pollution Bulletin*. 107 (1): 46-51.

129.LU, G. WANG, C. SUN, Z. (2009). Biodegradation of complex cacteria on phenolic derivatives in river water. *Biomedical and environmental sciences*. 22 : 112-117.

- 130.**Lu, J. Guo, C. Zhang, M. Lu, G. Dang Z. (2014). Biodegradation of single pyrene and mixtures of pyrene by a fusant bacterial strain F14. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 87: 75-80.
- 131.**Ludwig, W. (2007). Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification. *Int J Food Microbiol*. 120: 225-236.
- 132.**Lushchak, V. I. (2011). Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 153(2): 175-190.
- 133.**Lutz, S. (2006). Risk assessment of the transfer of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil to milk in dairy ruminants. Doctoral thesis in agricultural sciences. National Polytechnic Institute of Lorraine. University of Lorraine.
- 134.**Ma, W. L., Liu, L. Y., Qi, H., Zhang, Z. F., Song, W. W., Shen, J. M., et al. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediment and soil of the Songhua River Basin, China. *Environmental Monitoring and Assessment*. (185): 8399–8404.
- 135.**Maciel, D.C., Souza, J.R.B., Taniguchi, S., Bicego, M.C. & Zanardi-Lamardo, E. (2015b). Sources and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in an urbanized tropical estuary and adjacent shelf, Northeast of Brazil. *Marine Pollution Bulletin*. 101, 429–433.
- 136.**Mahjoubi, M. Aliyu, H. Cappello, S. Naifer, M. Souissi, Y. Cowan, D. A. Cherif, A. (2019). The genome of *Alcaligenes aquatilis* strain BU33N: Insights into hydrocarbon degradation capacity. *Plos One*. 14 (9):1-16.
- 137.**Mahjoubi, M., Jaouani, A., Guesmi, A., Ben Amor, S., Jouini, A., Cherif, H., Najjari, A., Boudabous, A., Koubaa, N. et Cherif, A. (2013). Hydrocarbonoclastic bacteria isolated from Petroleum contaminated sites in Tunisia: isolation, identification and characterization of the biotechnological potential. *New Biotechnology*. (30): 723-733.
- 138.**Maki, H. Sasaki, T.S. Harayama, S. (2001). Photo-oxidation of biodegraded crude oil and toxicity of the photo-oxidized products. *Chemosphere*. 44 (5):1145-1151.

- 139.**Mansur, A. A. Adetutu, E. M. Kadali, K. K. Morrison, P. D. Nurulita, Y. Ball, A. S. (2014). Assessing the hydrocarbon degrading potential of indigenous bacteria isolated from crude oil tank bottom sludge and hydrocarbon-contaminated soil of Azzawiya oil refinery, Libya. *Environmental Science and Pollution Research*. 21(18):10725-10735.
- 140.**Meckenstock, R. U. Safinowski, M. Griebler, C. (2004). Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Ecology*. 49 (1): 27-36.
- 141.**Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., and Naidu, R. (2011). Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective. *Environment International*. 37(8): 1362-1375.
- 142.**Mohan, S. V. Kisa, T. Ohkuma, T. Kanaly, R. A. and Shimizu, Y. (2006). Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 5(4): 347-374.
- 143.**Moscoso, F. Deive ,F.J. Longo, M.A. Sanromán, M.A. (2012). Technoeconomic assessment of phenanthrene degradation by *Pseudomonas stutzeri* CECT 930 in a batch bioreactor. *Bioresource Technology*. (104): 81-89.
- 144.**Mozo, I., Stricot, M., Lesage, N. & Spérandio M. (2011). Fate of hazardous aromatic substances in membrane bioreactors. *Water research*. 45, 4551 - 4561.
- 145.**MUELLER, J.G. CHAPMAN, P.J. BLATTMANN, B.O. PRITCHARD, P.H. (1990). *Applied and Environmental Microbiology*. (56): 1079-1086.
- 146.**Narro, M.L. Cerniglia, C.E. Baalen, C.V. Gibson, D.T. (1992). Evidence of NIH shift in naphthalene oxidation by the marine cyanobacterium, *Oscillatoria* species strain JCM, *Applied and Environmental Microbiology*. (58): 1360–1363.
- 147.**Narro, M.L. Cerniglia, C.E. Baalen, C.V. Gibson, D.T. (1992). Metabolism of phenanthrene by the marine cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* strain PR-6, *Applied and Environmental Microbiology*. (58): 1351–1359.
- 148.**Naurini, M. P. (2007). Ecodynamique des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) et des communautés microbiennes dans les sols à pollution mixte (HAP, métaux) avant et après

traitement par biopileet par désorption thermique : Influence de la rhizosphère et de la mycorrhization. Thèse de doctorat en géoscience, Université Henri Poincaré, Nancy, France, p.8.

149. Neff, J. M. Ostazeski, S. Gardiner W. Stejskal, I. (2000). Effects of weathering on the toxicity of three offshore Australian crude oils and a diesel fuel to marine animals. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19 (7):1809-1821.

150. NEFF, J.M. (1990). "Composition and Fate of Petroleum and Spill-Treating Agents in the Marine Environment", *Sea Mammals and Oils: Confronting the Risks*, édité par J.R. Geraci et D.J. St-Aubin, Academic Press, p. 1-33.

151. Nölvak, H. (2012). Influence of qPCR workflow on target gene enumeration from environmental samples in the case of bioremediation potential estimation (Doctoral dissertation).

152. Olivier, M.J. (2009). *Chimie de l'environnement*. 6e édition, Québec, Les productions Jacques Bernier p.229-230.

153. Olsen, S.R., Cole, C.V., Watanabe, F.S. & Dean, L.A. (1954). Estimation of Available Phosphorus in Soils by Extraction with Sodium Bicarbonate, U. S. Department of Agriculture Circular N°. 939.

154. Ordoñez, O.F. Lanzarottid, E. Kurtha, D. Gorritia, M.F. Revalec, S. Cortez, N. Vazquez, M.P. Farías, M.E. Turjanskie, A.G. (2013). Draft Genome Sequence of the Polyextremophilic *Exiguobacterium* sp. Strain S17, Isolated from Hyperarsenic Lakes in the Argentinian Puna. *Genome Announcements*. 1 (4): 2037–2042.

155. Ozcan, S. and Aydin, M. E. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in urban air of Konya, Turkey. *Atmospheric Research*. (93) : 715–722.

156. Ozcan, S. Mehmet Emin Aydin 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in urban air of Konya, Turkey. *Atmospheric Research*. 93, 715–722.

157. Park, J.H. Zhao, X. and Voice, T.C. (2001). Biodegradation of non-desorbable naphthalene in soils. *Environmental Science and Technology*. (35): 2734-2740.

- 158.**Parshetti, G.K. Kalme, S.D. Saratale, G. D. Govindwar, S. P (2005). Biodegradation of malachite green by *Kocuria rosea* MTCC 1532. *Acta Chimica Slovenica*. 53(4):492-498).
- 159.**Pavel, L. V., and Gavrilesco, M. (2008). Overview of ex situ decontamination techniques for soil cleanup. *Environmental engineering and management journal*, 7(6): 815-834.
- 160.**Payne, J.R. and Philipps, C.R. (1985). Photochemistry of petroleum in water: Photooxidation causes changes in oil and enhances dissolution of its oxidized products. *Environmental Science and Technology*.19 (7): 569-579.
- 161.**Pelmont J., (2005). Biodégradations et métabolismes : les bactéries pour les technologies de l'environnement. Edition EDP Science(France), 593.
- 162.**Perhar, G.And Arhonditsis, G.B. (2014). Aquatic Ecosystem Dynamics Following Petroleum Hydrocarbon Perturbations: A Review of the Current State of Knowledge, *Journal of Great Lakes Research*. (40): 56-72.
- 163.**Petti, C. A. (2007). Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical Infectious Diseases*. 44: 1108-1114.
- 164.**Ping, L. Zhang, C. Zhu, Y. Wu, M. Hu, X. Li, Z. Zhao, H. (2011). Biodegrading of pyrene by a newly isolated *Pseudomonas putida* PL2. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 16 (5): 1000–1008.
- 165.**Ping, L., Zhang, C., Zhu, Y., Wu, M., Hu, X., Li, Z. & Zhao, H. (2011). Biodegrading of pyrene by a newly isolated *Pseudomonas putida* PL2. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 16 (5), 1000–1008.
- 166.**Pitt, T.L. Malnick, H. Shah, J. Chattaway, M.A.Keys, C.J. Cooke, F.J. Shah, H.N. (2007). Characterisation of *Exiguobacterium aurantiacum* isolates from blood cultures of six patients. *Clinical Microbiology and Infection*. 13(9):946-948.
- 167.**Posadas, E. Alcántara, C. Muñoz, R. (2017). Microalgae cultivation in wastewater. In: *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts, From Feedstock Cultivation to End-products*, edited by: Gonzalez-Fernandez, C. and Muñoz, R. Woodhead Publishing, U.K., 2018. Pages: 67-91.

- 168.**Prince, R. C. Garrett, R. M. Bare, R. E. Grossman, M. J. Townsend, T. Suflita, J. M. Lee, K. Owens, E. H. Sergy, G. A. Braddock, J. F. Lindstrom, J. E. and Lessard, R. R. (2003). The roles of photooxidation and biodegradation in long-term weathering of crude and heavy fuel oils ». *Spill Science & Technology Bulletin*. 8 (2): 145-156.
- 169.**Rafin, C. Veignie, E. Woisel, P. Cazier, F. Surpateanu, G. (2006). New potential of a Deuteromycete fungus *Fusarium solani* in benzo [a] pyrene degradation: an ecophysiological hypothesis. *New frontiers in environmental research. Nova Science Publishers, Inc.; New York:* 165-179.
- 170.**Raichand, R. Pareek, S.,Singh, N. K. Mayilraj, S. (2011). *Exiguobacterium aquaticum* sp. nov., a member of the genus *Exiguobacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 62 (9):2150–2155.
- 171.**Ramaroson, J. (2008). Calcination des sédiments de dragage contaminés. Études des propriétés physico-chimiques. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon. France. 181p.
- 172.**Rathbone, K. Fuchs, J. Anderson, K. Karthikeyan, R. Nurhidayat, N. (1998). Effects of PAHs on microbial activity and diversity in freshly contaminated and weathered soils. In *Proceedings of the 1998 Conference on Hazardous Waste Research* (pp. 383-402).
- 173.**Rehfuss, M. and Urban, J. (2005). *Alcaligenes faecalis* subsp. *Phenolicus* subsp. Nov. A phenol-degrading, denitrifying bacterium isolated from a graywater bioprocessor. *Systematic and Applied Microbiology*. 28 (5): 421.
- 174.**Rehmann, K. Noll, H.P. Steiberg, C.E.W. Kettrup, A.A. (1998). Pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. Strain KR2, *Chemosphere*. 36 (14) : 2977–2992.
- 175.**Rieble, S. Joshi, D. K. Gold, M. H. (1994). Purification and characterization of a 1,2,4-trihydroxybenzene 1,2-dioxygenase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology* 176(16): 4838-4844.
- 176.**Rippka, R. (1988). Isolation and Purification of Cyanobacteria, In: *Methods in Enzymology*, Eds. Glazer, A.N. and Packer, L. Academic Press, San Diego, Vol. 167, pp. 1-7, California.

- 177.**Rodier, J., Legube, B., Merlet N. et al. (2009). *The Water analyze*. 9th Edition. DUNOD, Paris.1528p.
- 178.**Romero, M.C. Cazau, M.C. Giorgieri, S. Arambarri, A.M. (1998). Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream, *Environmental Pollution*. (101): 355–359.
- 179.**Rooney, A.P. Dunlap, C.A. Flor-Weiler, L.B. (2016). *Acinetobacter lactuca* sp. nov., isolated from iceberg lettuce (Asteraceae: *Lactuca sativa*) . *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66 (9): 3566–3572.
- 180.**Rosa, M.J. Jung, K.H. Perzanowski, M.S. Kelvin, E.A. Darling, K.W. Camann, D.E. Chillrud, S.N. Whyatt, R.M. Kinney, P.L. Perera, F.P. et al. (2011). Prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, environmental tobacco smoke and asthma. *Respiratory Medicine*. (105): 869-876.
- 181.**Rosa, M.J., Jung, K.H., Perzanowski, M.S., Kelvin, E.A., Darling, K.W., Camann, D.E., Chillrud, S.N., Whyatt, R.M., Kinney, P.L., Perera, F.P., et al. (2011). Prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, environmental tobacco smoke and asthma. *Respiratory Medicine*. 105, 869-876.
- 182.**Rota, M. Bosetti, C. Boccia, S. Boffetta, P. La Vecchia, C. (2014). Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons and respiratory and urinary tract cancers: An updated systematic review and a meta-analysis to 2014. *Archives of Toxicology*, (88): 1479-1490.
- 183.**Saik, R. K. Gelfand, D. H. Stoffel, S. Scharf, S. J. Higuchi, R. Horn, G. T. Mullis, K. B. et Erlich H. A. (1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*. 239 (4839): 487–491.
- 184.**Sakulthaew, C., Comfort, S., Chokejaroenrat, C., Harris, C. Li, X. (2014). A combined chemical and biological approach to transforming and mineralizing PAHs in runoff water. *Chemosphere*, 117, 2–7.
- 185.**Schneider, J. Grosser, R. Jayasimhulu, K. Xue, W. Warshawsky, D. (1996). Degradation of pyrene, benz[a]anthracene and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site, *Applied and Environmental Microbiology*. (62): 13–19.

- 186.**Stackebrandt, E. and B. M. Goebel. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44: 846-849.
- 187.**STORY P, PARKER H, HAYASAKA SS, RILEY MB & KLINE EL (2001). *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (26): 369-382.
- 188.**Suciu, N. A., Lamastra, L. &Trevisan, M. (2015). PAHs content of sewage sludge in Europe and its use as soil fertilizer. *Waste Management*. 41, 119-127.
- 189.**Tadashi, T. Tetsuya, F. Noritaka, M. Daisuke, I. Kazunari, S. Kazuhiro, M. Shintaro, K. Michihiko, I. (2011). Accelerated biodegradation of pyrene and benzo[a]pyrene in the *Phragmites australis* rhizosphere by bacteriaeroot exudate interactions. *Water Research*. 45: 1629-1638.
- 190.**Talley, J. W. and Sleeper, P. M. (1997). Roadblocks to the implementation of biotreatment strategies. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 829(1) : 16-29.
- 191.**Tam, N.F.Y. Guo, C.L. Yau, W.Y. Wong, Y.S. (2002). Preliminary study on biodegradation of phenanthrene by bacteria isolated from mangrove sediments in Hong-Kong, *Mar. Poll. Bull.* (42): 316–324.
- 192.**Taoufik, M. & Dafir, J. E. (2002). Behavior of phosphorus in the sediment of dams in the downstream part of the OumRabiaa watershed (Morocco). *Journal of Water Science*. 15 (1), 235–249.
- 193.**Technical Committee CEN/TC BT. Soils, sludges and treated bio-waste -Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) - Method by gas chromatography (GC) and high performance liquid chromatography (HPLC). Document BT/TF151 WI CSS99015: 2007 (E).
- 194.**Thavamani, P. Malik, S. Beer, M. Megharaj, M. Naidu, R. (2012). Microbial activity and diversity in long-term mixed contaminated soils with respect to polyaromatic hydrocarbons and heavy metals. *Journal of Environmental Management*. (99): 10-17.
- 195.**Tian, Y. Liu, H.J. Zheng, T.L. Kwon, K.K. Kim, S.J. Yan, C.L. (2008). PAHs contamination and bacterial communities in mangrove surface sediments of the Jiulong River Estuary, China. *Marine Pollution Bulletin*. (57): 707–715.

- 196.**Trzesicka-Mlynarz, D. and Ward, O.P. (1995). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil, *Canadian Journal of Microbiology*. (41): 470–476.
- 197.**Tsai, J.-C. Kumar, M. Lin, J.-G. (2009). Anaerobic biotransformation of fluorene and phenanthrene by sulfate-reducing bacteria and identification of biotransformation pathway. *J. Hazard. Mater.* 164 (2–3) 847–855.
- 198.**Ueno, R. Ureno, N. Wada, S. (2006). Synergistic effect of cell immobilization in polyurethane foam and use of thermotolerant strain on mixed hydrocarbon substrate by *Prototheca zopfii*. *Fisheries Science*. (72): 1027–1033.
- 199.**Ueno, R. Wada, S. Ureno, N. (2008). Repeated batch culture of hydrocarbon-degrading, microalgal strain *Prototheca zopfii* RND16 immobilized in polyurethane foam, *Canadian Journal of Microbiol.* (54): 66–70.
- 200.**Ukiwe, L. N. Egereonu, U. U. Njoku, P. C. Nwoko, C. I. Allinor, J. I. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation techniques: a review. *International Journal of Chemistry*. 5(4): p43.
- 201.**United States Environmental Protection Agency (US EPA) (2014). 16 PAHs on the Clean Water Act List of Priority Pollutants.
- 202.**United States Environmental Protection Agency (US EPA), Chemical Fate rate Constants for SARA Section 113 Chemicals and Superfund Health Evaluation Manual Chemicals., Office of Toxic Substances, Washington, DC 6-02-4245.<http://www.epa.gov>.
- 203.**Van herwijnen, R. Wattiau, P. Bastiaens, L. Daal, L. Jonker, L. Springael, D. Govers, H.A. Parsons, J.R. (2003). Influence of phenanthrene and fluoranthene on the degradation of fluorene and glucose by *Sphingomonas* sp. strain LB126 in chemostat cultures. *Res. Microbiol.* (154): 199-206.
- 204.**Veignie, E. Rafin, C. Woisel, P. Cazier, F. (2004). Preliminary evidence of the role of hydrogen peroxide in the degradation of benzo[a]pyrene by a non-white rots fungus *Fusarium solani*. *Environmental Pollution*. (129): 1-4.

- 205.** VERBRUGGEN, E.M.J. (2012). Environmental Risk Limits for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) for Direct Aquatic, Benthic and Terrestrial Toxicity, RIVM report 6077110007/2012, National Institute for Public Health and the Environment, Ministry of Health, Welfare and Sport, 337p, in BOUDREAU, L., SINOTTE M., & DEFO, M. A. (2019), Literature review on surface water quality criteria for petroleum hydrocarbons - carried out as part of the strategic environmental assessment (Study AENV14), Quebec, Ministry of the Environment and the Fight against Climate Change (MELCC), Directorate general monitoring of the state of the environment.
- 206.** Verbruggen, E.M.J. Beek, M. Pijnenburg, J. Traas, T.P. (2008). “Ecotoxicological Environmental Risk Limits for Total Petroleum Hydrocarbons on the Basis of Internal Lipid Concentrations”, *Environmental Toxicology and Chemistry* 27 (12): 2436-2448.
- 207.** Verrhiest, G.J. Clement, B. Volat, B. Montuelle, B. Perrodin, Y. (2002). Interactions between a polycyclic aromatic hydrocarbon mixture and microbial communities in natural freshwater sediment, *Chemosphere*. (46): 187–196.
- 208.** Vidali, M. (2001). Bioremediation. an overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73(7): 1163-1172
- 209.** Visciano, P. Perugini, M. Conte, F. Amorena, M. (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbons in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processed by traditional flue gas smoking and by liquid smoke flavourings. *Food and Chemical Toxicology*. (46): 1409–1413.
- 210.** Volesky, B., 2001. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. *Hydrometallurgy*. (59): 203–216.
- 211.** Vyas, B.R.M. Bakowski, S. Sasek, V Matucha, M. (1994). Degradation of anthracene by selected white rot fungi, *FEMS Microbiology Ecology*. (14): 65–70.
- 212.** Wadman, M. W. De Vries, R. P. Kalkhove, S. I. C. Veldink, G. A. Vliegthart, J. F. G. (2009). Characterization of oxylipins and dioxygenase genes in the asexual fungus *Aspergillus niger*. *BMC Microbiology*. (9): 1-9.

- 213.**Walkley, A. & Black, C.A. 1934. A critical examination of rapid methods for determining organic carbon in soils, *Soil Sciences*. 62, 251-254.
- 214.**Walkley, A. and Black, C.A. 1934. A critical examination of rapid methods for determining organic carbon in soils, *Soil Sciences*. (62): 251-254.
- 215.**Walter, U. Beyer, M. Klein, J. Rehm, H.J. (1991). Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1, *Applied Microbiology and Biotechnology*. (34): 671–676.
- 216.**Wanger, A. Chavez, V. Dasgupta, A. (2017). *Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology. A Comprehensive Review for Board Preparation, Certification and Clinical Practice.* Elsevier Inc, united States, 304p.
- 217.**Warshawsky, D. Cody, T. Radike, M. Reilman, R. Schumann, B. LaDow, K. Schneider, J. (1995). Biotransformation of Benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light. *Chemico-Biol. Interact.* (97): 131–148.
- 218.**Warshawsky, D. Radike, M. Jayasimhulu, K. Cody, T. (1988). Metabolism of Benzo[a]pyrene by a dioxygenase system of freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (152): 540–544.
- 219.**Wei, G., Mengchang, H., Zhifeng, Y., Chunye, L., Xiangchun, Q. & Haozheng, W. (2007). Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, suspended particulate matter and sediment from Daliao River watershed, China. *Chemosphere*. 68, 93–104.
- 220.**Weisburg, W. G. Barns, S. M. Pelletier, D. A. Lane, D. J. (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 173:697-703.
- 221.**WILSON, S. C. JONES K, C. (1993). Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review, *Environment Pollution*. (81): 229-249.
- 222.**Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological reviews*. 51(2) : 222-270.

223. Wolska, L., Mechlińska, A., Rogowska, J., & Namieśnik, J., 2012. Sources and fate of PAHstand PCBs in the marine environment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 42, 1172–1189.
224. World Health Organisation (WHO). Toxic cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. 1^{ère} edition, London and New York, 1999. 400p.
225. Xu, X.H. Cook, R.L. Ilacqua, V.A., Kan, H.D. Talbott, E.O. Kearney, G. (2010). Studying associations between urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and cardiovascular diseases in the United States. *Science of the Total Environment*. (408) : 4943-4948.
226. Yamada, T. (1988). Nucleotide sequence of the chloroplast 16S rRNA gene from the unicellular green alga *Chlorella ellipsoidea*. *Nucleic Acids Research*. 16 (20): 9865–9865.
227. Yanan, C., Caiyun, S., Jiquan, Z. & Feng Z., (2018). Assessing 16 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in River Basin Water and Sediment Regarding Spatial-Temporal Distribution, Partitioning, and Ecological Risks. *Polish Journal of Environmental Studies*. 27(2): 579–589.
228. Yang, X. (2014). *Encyclopedia of Food Microbiology*. Second Edition. Elsevier, United Kingdom. 3248p.
229. Yap C.L. Gan, S. Ng, H.K. (2010). Application of vegetable oils in the treatment of polycyclic aromatic hydrocarbons-contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*. (177): 28–41.
230. Ye, B. Siddiqi, M.A. Maccubbin, A.E. Kumar, S. Sikka, H.C. (1996). Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*, *Environmental Science & Technology*. (30):136–142.
231. Yoon, J.H. Shin, D. Y. Kim, I. G. Kang, K. H. Park, Y. H. Yoon, J.H. (2003). *Marinobacter litoralis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from sea water from the East Sea in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53(2): 563–568.

232. Yuan, S.Y. Shiung, L.C. Chang, B.V. (2002). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by inoculated microorganisms in soil, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. (69): 66–73.

233. Zheng, J., Chen, B., Thanyamanta, W., Hawboldt, K., Zhang, B. & Liu. B. (2016). Offshore produced water management: A review of current practice and challenges in harsh/Arctic Environments. *Marine Pollution Bulletin*. 104 (1–2), 7–19.

234. Ziemke, F. Hofle, M. G. Lalucat, J. Rossello-Mora, R. (1998). "Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov". *International Journal of Systematic Bacteriology*. 48 (1): 179–186.

Annexe 1: Microorganismes capables de dégrader les HAP.

Bactéries	Cyanobactéries et algues	Moisissures	
<i>Acinobacter calcoaceticus</i>	<i>Agmenellum</i>	<i>Absidia glauca</i>	<i>Panoeolus subbalteatus</i>
<i>Acinobacter</i> sp.	<i>quadruplicatum</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicilium chrysogenum</i>
<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Anabaena</i> sp.	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Penicilium</i> sp.
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	<i>Amphora</i> sp.	<i>Basidiobolus ranarum</i>	<i>Pestalotia</i> sp.
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Aphanocapsa</i> sp.	<i>Bjerkandera adusta</i>	<i>Phanaerochaete</i>
<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	<i>Chlorella autotrophica</i>	<i>Bjerkandera</i> sp.	<i>chrysosporium</i>
<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>Chlorella sorokiniana</i>	<i>Candida maltosa</i>	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Chlamydomonas angulosa</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Phlyctochytrium reinboldiae</i>
<i>Beijerinckia</i> sp.	<i>Coccochloris elabens</i>	<i>Candida utilis</i>	<i>Phytophthora cinnamomi</i>
<i>Corynebacterium renale</i>	<i>Cylindrotheca</i> sp.	<i>Choanephora campinctor</i>	<i>Psilocybe cubensis</i>
<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	<i>Chrysosporium pannorum</i>	<i>Psilocybe strictipes</i>
<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Microcoleus</i>	<i>Circinella</i> sp.	<i>Psilocybe stuntzii</i>
<i>Moraxella</i> sp.	<i>chthonoplastes</i>	<i>Claviceps paspali</i>	<i>Psilocybe subaeruginascens</i>
<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>Navicula</i> sp.	<i>Cokeromyces poitrassi</i>	<i>Ramaria</i> sp.
<i>Nocardia</i> sp.	<i>Nitzschia</i> sp.	<i>Conidiobolus gonimodes</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Oscillatoria</i> sp.	<i>Cunninghamella bainieri</i>	<i>Rhizophlyctis harderi</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Porphyridium cruetum</i>	<i>Cunninghamella elegans</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	<i>Selenastrum</i>	<i>Cunninghamella japonica</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>capricornutum</i>	<i>Emericellopsis</i> sp.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Pseudomonas testeroni</i>	<i>Synedra</i> sp.	<i>Epicoccum nigrum</i>	<i>Saprolegnia parasitica</i>
<i>Pseudomonas vesicularis</i>	<i>Ulva fasciata</i>	<i>Gilbertella persicaria</i>	<i>Smittium culicis</i>
<i>Pseudomonas</i> sp.		<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Smittium culisetae</i>
<i>Rhodococcus</i> sp.		<i>Helicostylum piriforme</i>	<i>Smittium simuli</i>
<i>Staphylococcus auriculans</i>		<i>Hyphochytrium catenoides</i>	<i>Sordaria fimicola</i>
<i>Streptomyces griseus</i>		<i>Lindera pennisporea</i>	<i>Syncephaslastrum</i>
<i>Streptomyces</i> sp.		<i>Mortierella verrucosa</i>	<i>racemosum</i>
<i>Vibrio</i> sp.		<i>Mucor hiemalis</i>	<i>Thamnidium anomalum</i>
		<i>Neurospora crassa</i>	<i>Trametes versicolor</i>
		<i>Panaeolus cambodginensis</i>	<i>Trichoderma viride</i>
			<i>Zygorhynchus moelleri</i>

Annexe 2: Réactifs utilisés pour le dosage de la matière organique:

- Acide sulfurique concentré 95% (d=1,85).
- Solution de bichromates de potassium (0,1666 mole/L).
- Solution de sel de Mohr (0,156mol/L).
- Ferroïne indicateur de Fe (II).

Annexe 3: Réactifs utilisés pour le dosage du phosphore :

- Eau déminéralisée ayant une conductivité inférieure à 0,5µs.cm
- Carbonate de sodium anhydre (Na₂CO₃).
- Solution de carbonates de sodium (Na₂CO₃) 1 mol/L.
- Solutions d'acide sulfurique (H₂SO₄) (2 N).
- Solution de molybdate d'ammonium [(NH₄)₆Mo₇O₂₄, 4H₂O] 1%.
- Solution d'acide ascorbique (C₂H₈O₆) 10 %.
- Solution d'antimoine [K (SbO), C₄H₄O₆) 0.5H₂O] (oxytartrates d'antimoine III et de potassium) 2,668 g/L.
- Solution d'acide ascorbique et d'antimoine (v/v)
- Solution mère étalon de phosphore (P) 500 µg/ml

Solutions étalon de phosphore (P) : Pipeter à la micropipette respectivement 0, 2, 4, 6, 8, et 10 mL de la solution fille du phosphore, et verser dans une série des fioles jaugées de 50 mL. Ajuster avec l'eau déminéralisée. Homogénéiser. On obtient ainsi des solutions de 0, 1, 2, 3, 4 et 5 µg/mL.

Annexe 4 : Les résultats d'analyses statistiques (test de Dunn)

Effet saison dans l'eau

Echantillon	Effectif	Somme des rangs	Moyenne des rangs	Groupes	
[HCT] Summer	18	525,500	29,194	A	
[HCT] Autumn	18	593,500	32,972	A	B
[HCT] Spring	18	696,000	38,667	A	B
[HCT] Winter	18	813,000	45,167	B	

Effet station dans l'eau

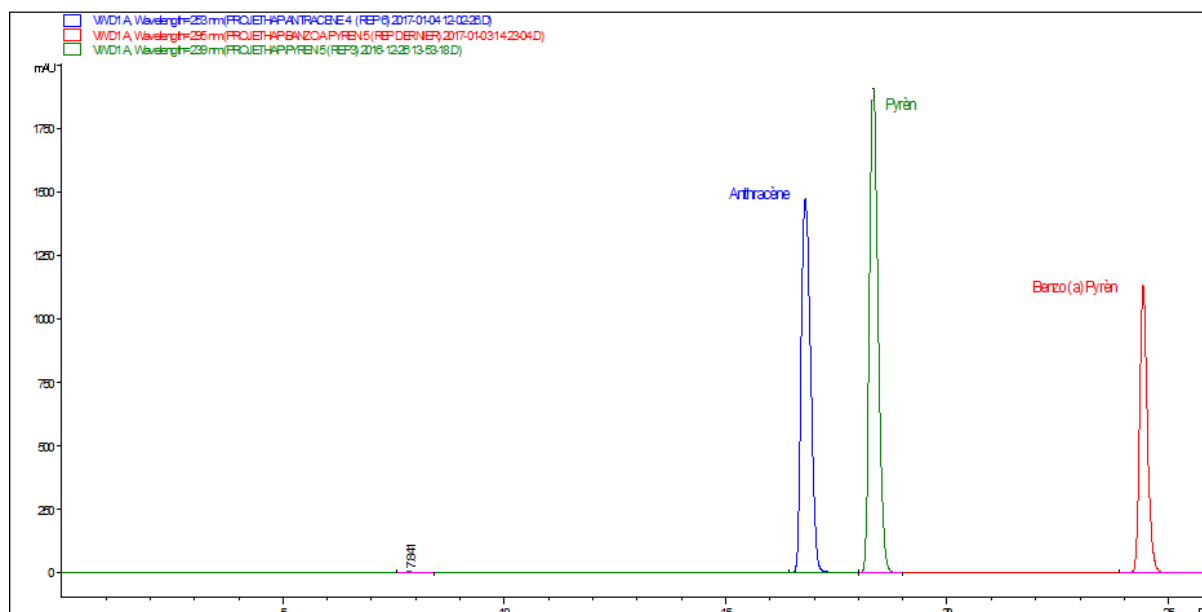
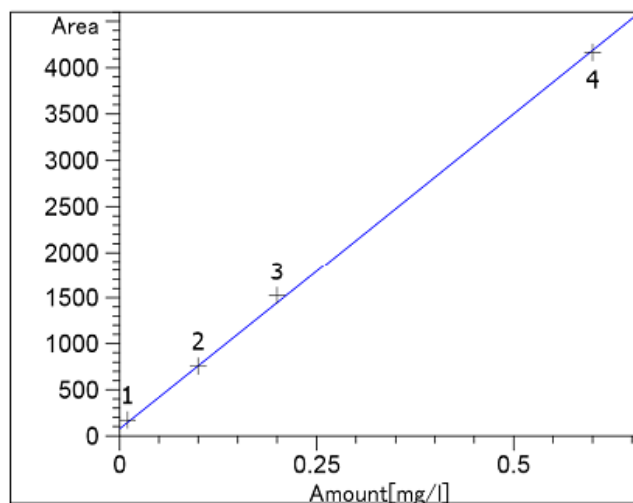
Echantillon	Effectif	Somme des rangs	Moyenne des rangs	Groupes	
[HCT] s4	12	223,500	18,625	A	
[HCT] s6	12	246,500	20,542	A	
[HCT] s3	12	399,000	33,250	A	B
[HCT] s1	12	453,000	37,750	B	
[HCT] s5	12	508,000	42,333	B	
[HCT] s2	12	798,000	66,500	C	

Effet saison dans les sédiments

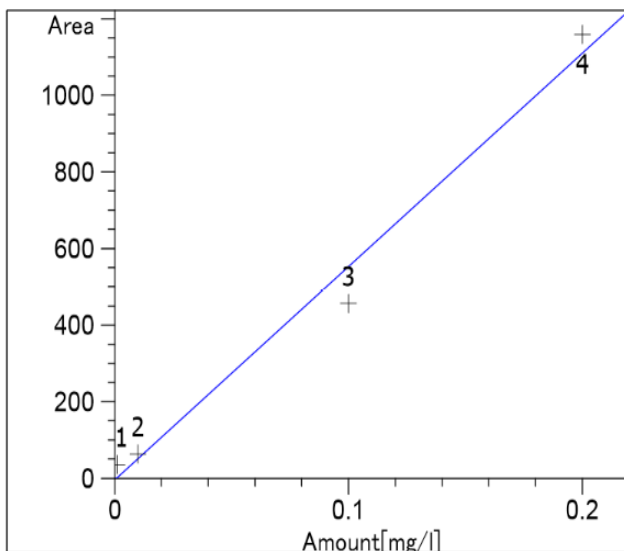
Echantillon	Effectif	Somme des rangs	Moyenne des rangs	Groupes	
[HCT] Summer	18	525,000	29,167	A	
[HCT] Spring	18	548,000	30,444	A	
[HCT] Autumn	18	583,000	32,389	A	
[HCT] Winter	18	972,000	54,000	B	

Effet station dans les sédiments

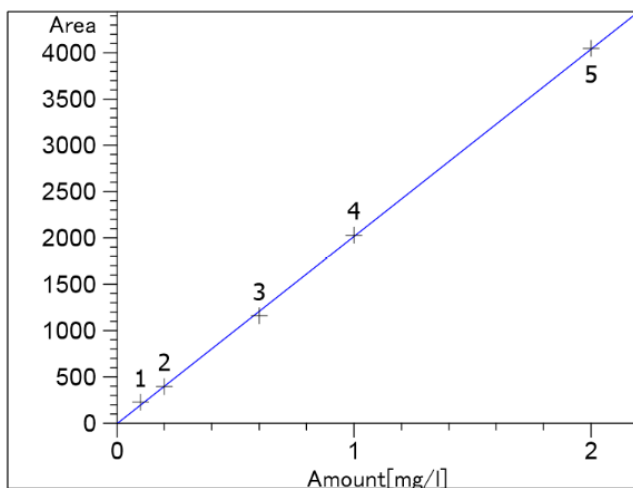
Echantillon	Effectif	Somme des rangs	Moyenne des rangs	Groupes		
[HCT] s4	12	205,000	17,083	A		
[HCT] s6	12	226,000	18,833	A		
[HCT] s3	12	361,500	30,125	A	B	
[HCT] s5	12	463,000	38,583		B	C
[HCT] s1	12	574,500	47,875			C
[HCT] s2	12	798,000	66,500			D

Annexe 5 : Chromatogrammes HPLC-UV-vis (détection à 253 nm, 239 nm et 295 nm) des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) utilisés dans cette étude (anthracène, pyrène et benzo (a) pyrène)**Annexe 6 : Courbes d'étalonnage des différents Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) utilisés dans cette étude (1- Anthracène, 2- Pyrène et 3- Benzo (a) pyrène)**

Anthracene at exp. RT: 17.391
DAD1 E, Sig=253,4 Ref=360,100
Correlation: 0.99945
Residual Std. Dev.: 65.24516
Formula: $y = mx + b$
m: 6858.82297
b: 75.36022
x: Amount
y: Area



Pyrene at exp. RT: 19.948
 DAD1 D, Sig=239,4 Ref=360,100
 Correlation: 0.99322
 Residual Std. Dev.: 66.07112
 Formula: $y = mx + b$
 m: 5573.65661
 b: -3.87604
 x: Amount
 y: Area



Benzo a Pyrene at exp. RT: 24.798
 DAD1 F, Sig=295,4 Ref=360,100
 Correlation: 0.99985
 Residual Std. Dev.: 29.85281
 Formula: $y = mx + b$
 m: 2023.44696
 b: -5.94386
 x: Amount
 y: Area

Annexe 7 : Paramètres de performance HPLC pour la quantification des trois HAP

PAH Compounds	Ret. Time (min)	Cal. Range (mg/L)	Linearity (R^2)	HPLC-UV-vis detection (nm)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Anthracene	17.391	0.01 - 0.6	0.99945	253	0.028	0.095
Pyrene	19.948	0.001 - 0.2	0.99322	239	0.035	0.118
Benzo (a) pyrene	24.978	0.1 - 2	0.99985	295	0.044	0.147

Annexe 8 : Analyse du certificat du matériau de référence certifié utilisé dans cette étude

Certificate of Analysis

PAH, PCBs, and Pesticides on Sediment 50g

**Certified
Reference
Material****Description**

Product ID CNS391-50G
 Lot LRAC1441
 Expiration Date December 2023
 Manufacturing Date December 2018
 Storage Conditions Refrigerate
 Solvent/Matrix SEDIMENT

Certified Values

Analyte	Units	Certified Value ^{1,4}	Elution order	Raw Material Lot	CAS
Naphthalene	µg/Kg	302 ± 9	1	LRAB7153	91-20-3
Acenaphthylene	µg/Kg	36.5 ± 3.0	2	LRAB4214	208-96-8
Acenaphthene	µg/Kg	3770 ± 117	3	LRAB9330	83-32-9
Fluorene	µg/Kg	672 ± 35	4	LRAB2524	86-73-7
alpha-BHC	µg/Kg	60.2 ± 5.1	5	018950	319-84-6
Hexachlorobenzene	µg/Kg	46.0 ± 2.9	6	LRAC1531	118-74-1
beta-BHC	µg/Kg	27.4 ± 2.1	7	021952	319-85-7
gamma-BHC (Lindane)	µg/Kg	30.0 ± 3.0	8	LRAC0931	58-89-9
Phenanthrene	µg/Kg	856 ± 59	9	LRAA8780	85-01-8
Anthracene	µg/Kg	88.8 ± 13.9	10	LRAB6310	120-12-7
delta-BHC	µg/Kg	26.7 ± 3.6	11	021973	319-86-8
PCB 28	µg/Kg	58.8 ± 4.9	12	LRAC1414	7012-37-5
Heptachlor	µg/Kg	2.9 ± 0.9	13	LRAB6247	76-44-8
PCB 52	µg/Kg	107.0 ± 8.2	14	LRAC1104	35693-99-3
Aldrin	µg/Kg	20.1 ± 1.2	15	LRAA3337	309-00-2
Heptachlor epoxide (beta)	µg/Kg	45.5 ± 3.5	16	LRAB3222	1024-57-3
Endosulfan I	µg/Kg	30.5 ± 6.4	17	LRAC1521	959-98-8
Fluoranthene	µg/Kg	741 ± 52	18	LRAB6312	206-44-0
2,4-DDE	µg/Kg	52.1 ± 3.9	19	021032	3424-82-6
PCB 101	µg/Kg	58.3 ± 4.4	20	LRAB4650	37680-73-2
Pyrene	µg/Kg	686 ± 44	21	LRAB6501	129-00-0



SIGMA-ALDRICH®
 2931 Soldier Springs Rd. Laramie, Wyoming 82070 USA
 307-742-5452
 rttechgroup@sial.com www.sigma-aldrich.com

Description

Lot LRAC1441
 Expiration Date December 2023
 Manufacturing Date December 2018
 Storage Conditions Refrigerate
 Solvent/Matrix SEDIMENT

4,4-DDE	µg/Kg	26.0 ± 2.1	22	LRAB5328	72-55-9
2,4-DDD	µg/Kg	26.6 ± 2.8	23	021031	53-19-0
Dieldrin	µg/Kg	36.1 ± 2.8	24	LRAA7806	60-57-1
Endrin	µg/Kg	7.7 ± 1.2	25	LRAC1522	72-20-8
PCB 118	µg/Kg	40.1 ± 3.3	26	LRAC1103	31508-00-6
4,4-DDD	µg/Kg	34.3 ± 4.3	27	LRAC1519	72-54-8
2,4-DDT	µg/Kg	55.1 ± 5.4	28	021033	789-02-6
PCB 153	µg/Kg	52.9 ± 2.7	29	LRAB4130	35065-27-1
4,4-DDT	µg/Kg	28.1 ± 3.1	30	LRAC1520	50-29-3
PCB 138	µg/Kg	38.5 ± 1.8	31	LRAB4651	35065-28-2
Benzo(a)anthracene	µg/Kg	462 ± 22	32	LRAB6500	56-55-3
Chrysene	µg/Kg	440 ± 17	33	LRAB6311	218-01-9
PCB 180	µg/Kg	59.6 ± 3.2	34	LRAC1558	35065-29-3
Benzo(b)fluoranthene	µg/Kg	266 ± 20	35	LRAB9465	205-99-2
Benzo(k)fluoranthene	µg/Kg	323 ± 12	36	LRAB4286	207-08-9
Benzo(a)pyrene	µg/Kg	165 ± 29	37	LRAB6333	50-32-8
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	µg/Kg	301 ± 15	38	LRAB9332	193-39-5
Dibenz(a,h)anthracene	µg/Kg	305 ± 59	39	LRAB4215	53-70-3
Benzo(g,h,i)perylene	µg/Kg	243 ± 12	40	LRAB7154	191-24-2

Certificate of Analysis

PAH, PCBs, and Pesticides on Sediment 50g

**Certified
Reference
Material**

Description

Product ID CNS391-50G
Lot LRAC1441
Expiration Date December 2023
Manufacturing Date December 2018
Storage Conditions Refrigerate
Solvent/Matrix SEDIMENT

The PAHs, PCBs, Pesticides on Soil Certified Reference Material (CRM) consists of a single amber glass sample jar, with a Teflon lined closure containing approximately 50 grams of soil, fortified with chlorinated pesticide compounds, PAHs and PCB congeners. Being a natural matrix waste sample the analyst is challenged by the same preparation problems, analytical interferences, etc. as is typical for similar matrices received by the laboratory for analysis.

Rigorous analyses identified, quantified, and certified the compounds which are listed on the enclosed Certificate of Analysis. The sample has been analyzed by 30 independent laboratories in a round-robin to meet the requirements specified by the ISO Guides 34 and 35, and ISO 17025. The sample was certified by Dustch standard methods (NEN 5771, 5718, and 5719) and EPA extraction methods 3540/3541 and 3550A, followed by Method 8270. The sample is suitable for use by these and other similar methods.

1 Metrological traceability: Traceable to the SI and higher order standards from NIST through an unbroken chain of comparisons. The balance used to weigh raw materials is accurate to +/-0.0001 g and calibrated regularly using mass standards traceable to NIST. All dilutions were performed gravimetrically. Additionally, individual analytes are traceable to NIST SRMs where available and specified above.
4 UCRM - Uncertainty values in this document are expressed as Expanded Uncertainty (U_{CRM}) corresponding to the 95% confidence interval. U_{CRM} is derived from the combined standard uncertainty multiplied by the coverage factor k, which is obtained from a t-distribution and degrees of freedom. The components of combined standard uncertainty include the uncertainties due to characterization, homogeneity, long term stability, and short term stability (transport). The components due to stability are generally considered to be negligible unless otherwise indicated by stability studies. The mathematical representation of the U_{CRM} calculation is as follows:

$$U_{CRM} = \sqrt{U_{char}^2 + U_{homogeneity}^2 + U_{stability}^2}$$

k: Coverage factor derived from a t-distribution table, based on the degrees of freedom of the data set. Assume 2.0 for a Confidence Interval = 95%

6 Analytical Value- For QC verification of the certified value only- not to be used in calculations. Represents the analytical data obtained by comparison to a standard as analyzed by the method described in the CoA or another acceptable method. The result may differ from the certified value and UCRM based on method uncertainty as well as the uncertainty associated with the standard used for comparison.

Traceability: The standard was manufactured under an ISO/IEC 17025:2017 certified quality system. The balance used to weigh raw materials is accurate to +/- 0.0001g and calibrated regularly using mass standards traceable to NIST. All dilutions were performed gravimetrically. Additionally, individual analytes are traceable to NIST SRMs where available and specified above.

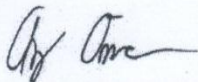
Homogeneity: Homogeneity was assessed in accordance with ISO 17034:2016. Completed units were sampled using a random stratified sampling protocol. The results of chemical analysis were then compared using a one-way analysis of variance approach as described by TNI EL-V3-2009 Appendix A.2. See instructions for minimum sub-sample size.

Expiration is at end of month given on certificate and label.

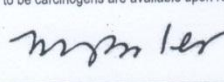
THIS PRODUCT WAS DESIGNED, PRODUCED AND VERIFIED FOR ACCURACY AND STABILITY IN ACCORDANCE WITH ISO/IEC 17025:2017 (ANAB Cert AT-1467) and ISO 17034:2016 (ANAB Cert AR-1470).

MSDS reports for components co

tion or 0.1% for components known to be carcinogens are available upon request.



Andy Ommen - QC Manager



Mark Pooler - QA Supervisor

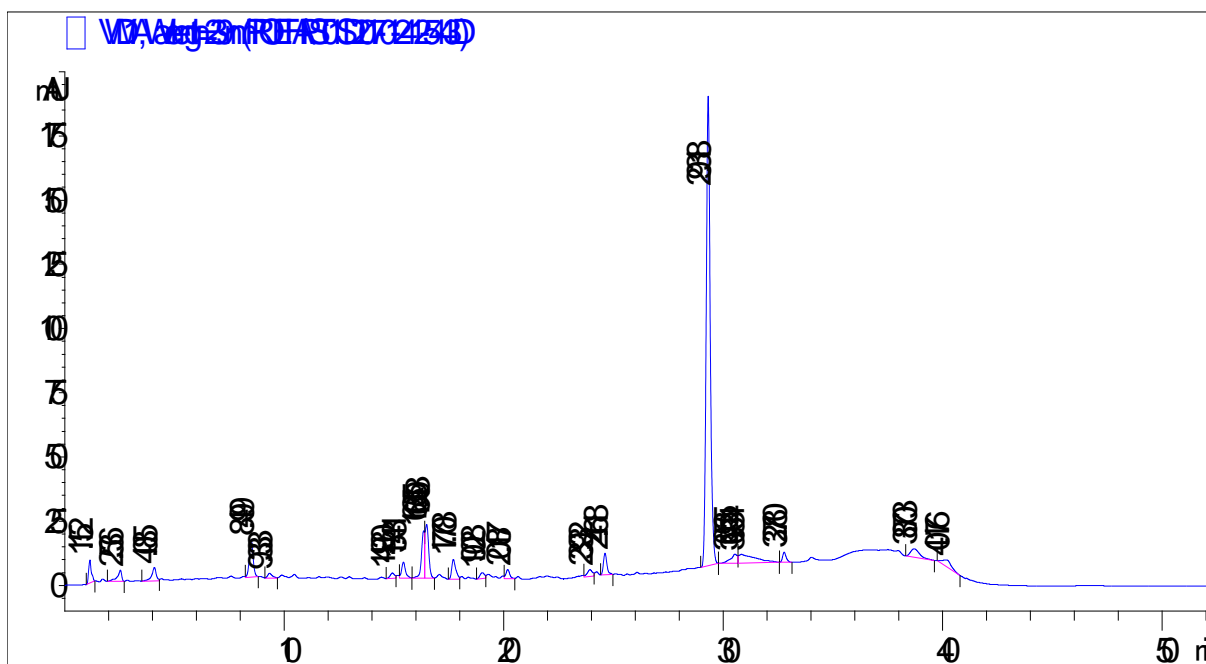
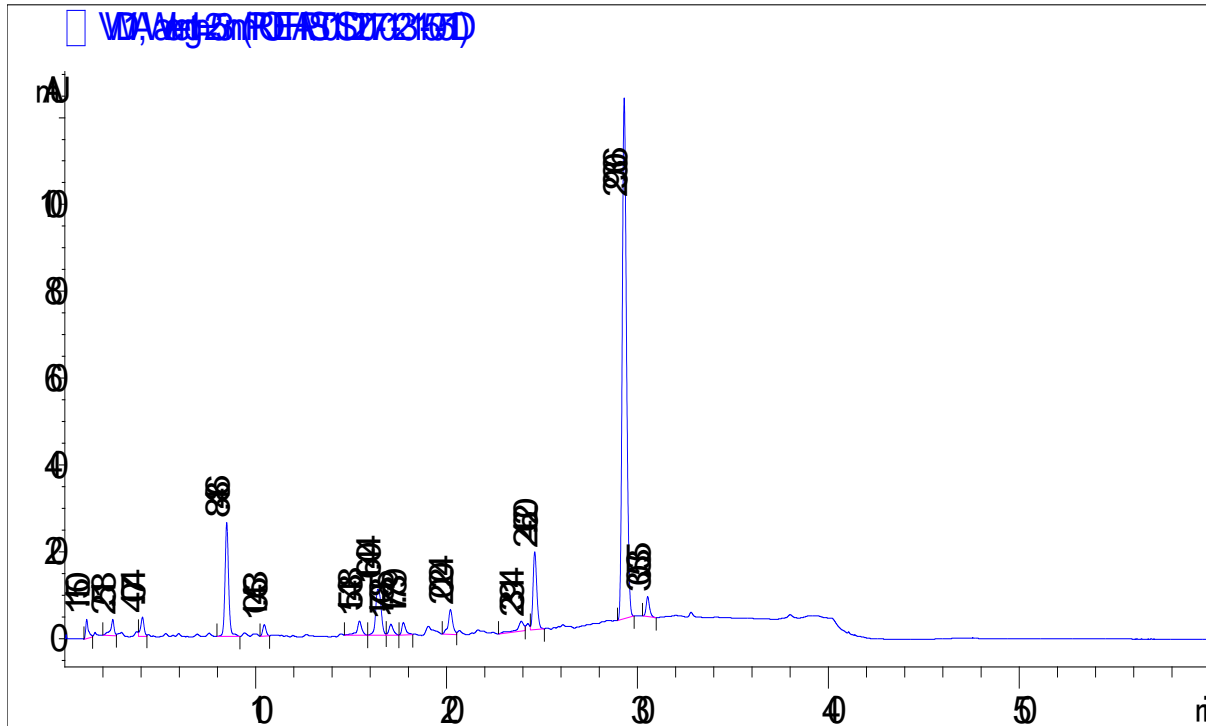
Certification Date April 01, 2019
Version 0-412019

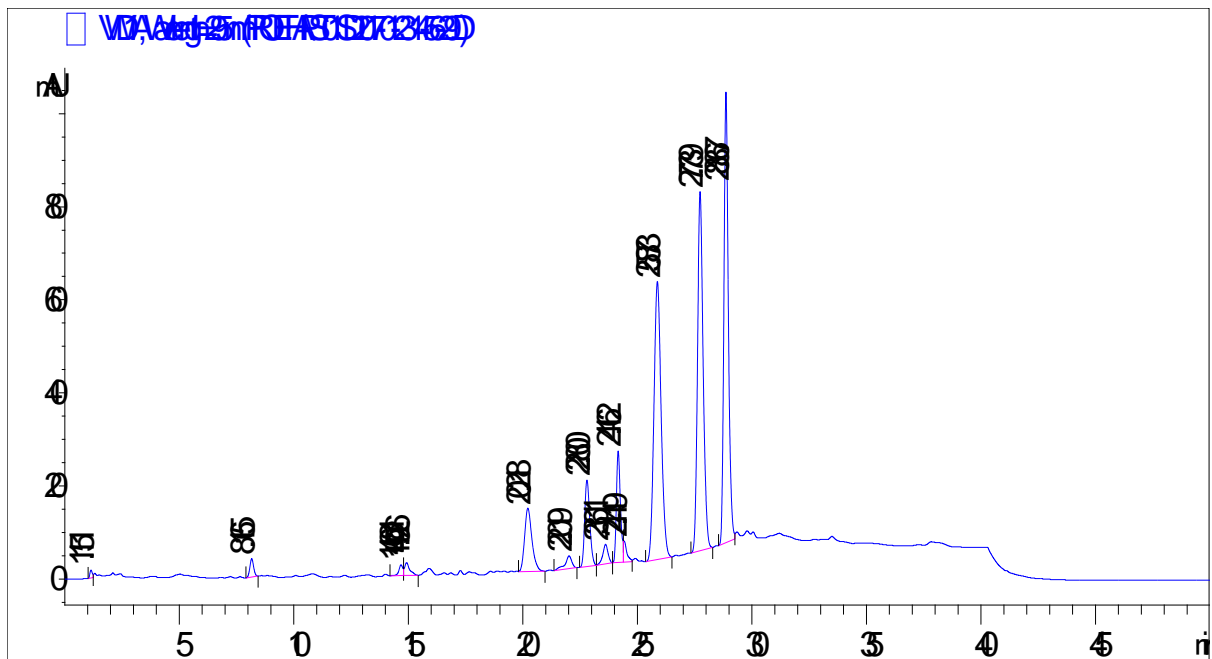


SIGMA-ALDRICH®
2931 Soldier Springs Rd. Laramie, Wyoming 82070 USA
307-742-5452
rlctechgroup@sial.com www.sigma-aldrich.com

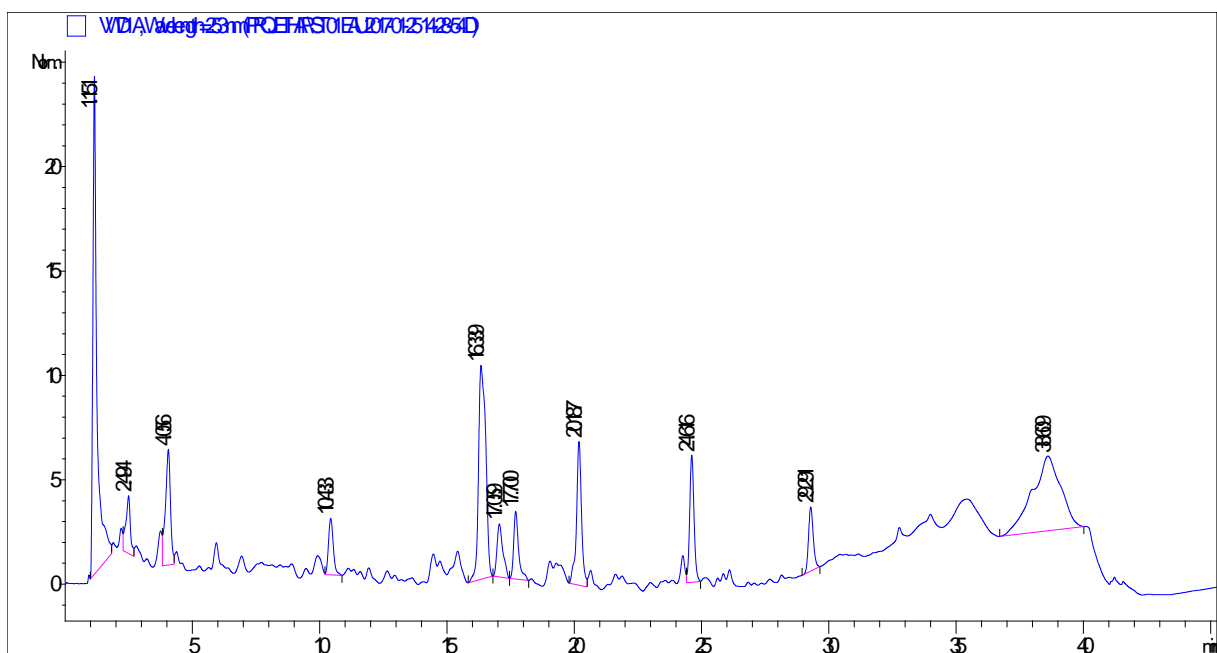
Annexe 9 : Les résultats de l'HPLC (quelques chromatogrammes)

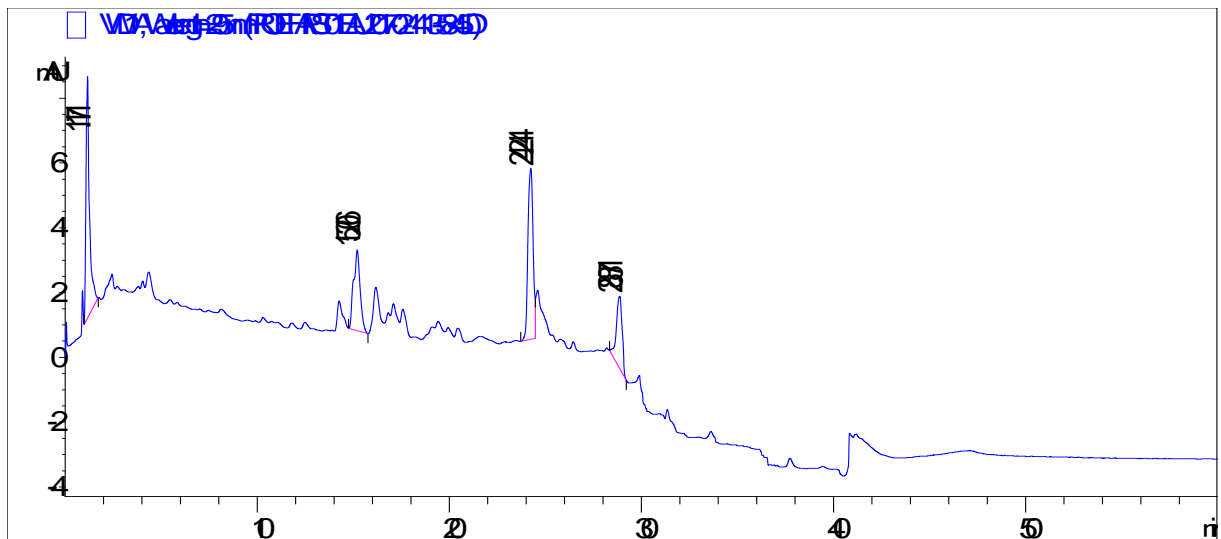
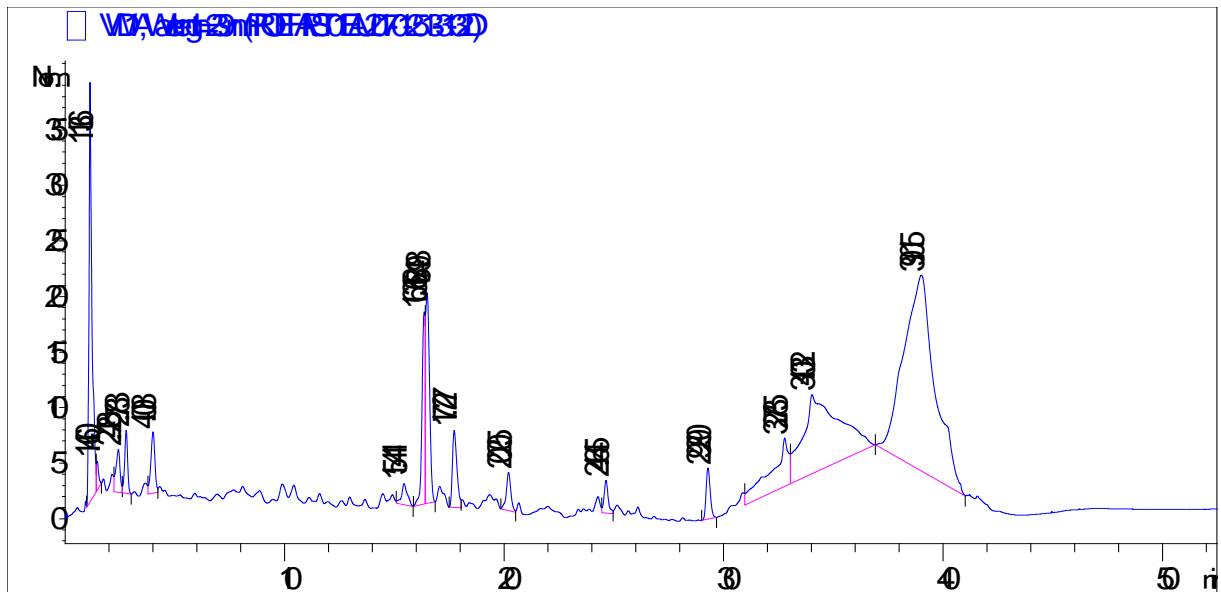
Chromatogrammes HPLC-UV-Vis collectés de (1-anthracène, 2-pyrène et 3-benzo (a) pyrène) dans des échantillons de sédiments de la St1 en octobre 2016.





Chromatogrammes HPLC-UV-Vis collectés de (1-anthracène, 2-pyrène et 3-benzo (a) pyrène) dans les échantillons d'eau de la St1 en octobre 2016





Annexe 10: Article.

M. S. O. Belahmadi, A. Abdessemed, A Gherib, N. Charchar, K. Houali, M. Houhamdi (2021). Spatiotemporal assessment and monitoring of hydrocarbons contamination of water and sediments in Skikda bay, Algeria. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. doi.org/10.1080/03067319.2021.1879801.