

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ MOULOU D MAMMERI DE TIZI-OUZOU



FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES

Département d'Ecologie et Environnement

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

Master

Filière : Ecologie et Environnement

Spécialité : Biodiversité et Environnement

Thème

**ESSAIS DE BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES
PAR LES CHAMPIGNONS AU LABORATOIRE**

Réalisé par:

Mr. BENTAYEB Said

Mr. BACHIR Mohand

Soutenu publiquement le : 17/ 09 /2024

Devant le jury :

Présidente SADOUDI ALI AHMED D.

Professeur à L'UMMTO

Promotrice BACHI K.

Maitre de conférences B à L'UMMTO

Examinatrice ALI AHMED S.

Maitre de conférences B à L'UMMTO

Année universitaire : 2023/2024



Dédicace

'' Être une étoile, c'est briller seul, mais tu brilles mieux entouré. ''

With heartfelt dedication and fond memories, this work is lovingly dedicated to the one we dearly miss.

Remerciements

Un mémoire de fin d'étude fut une expérience très spéciale. C'est un long chemin qu'on commence avec une multitude de questions et avec des périodes des hauts et des bas. Quand les travaux sont achevés, on se rend compte que sur ce temps de travail, nous avons réalisé beaucoup de progrès au niveau du savoir et surtout du savoir-faire. Ce mémoire reste, une belle aventure humaine et scientifique dans laquelle la curiosité, l'envie d'acquérir le savoir, nous incitent à avancer toujours plus loin. Si cette expérience a été menée à bien c'est grâce à de nombreuses personnes que nous avons rencontrées durant la réalisation de ce mémoire et que nous souhaitons remercier vivement.

Que Mme BACHI K. enseignante chercheur et maitre de conférences B à l'UMMTO, en soit ici remerciée avec beaucoup de reconnaissance pour les efforts qu'elle a déployé pour la réussite du travail, pour son encadrement, ses conseils et ses orientations le long de notre expérimentation. Nous exprimons également nos remerciements particuliers à Mme ALI AHMED S. enseignante chercheur et maitre de conférences à l'université MOULOUD MAMMARI de TIZI-OUZOU, pour l'aide qu'elle nous a apporté durant ce travail au laboratoire et nous tenons à la remercier également d'avoir accepté d'examiner notre mémoire de fin d'étude. Nous souhaitons vivement continuer à bénéficier de son expérience et de son aide pour nos travaux ultérieurs.

Nos vifs Remerciements vont aussi à Mme SADOUDI ALI AHMED D. Professeur à l'UMMTO pour l'honneur qu'elle nous a fait de présider le jury.

Nous tenons à exprimer toute notre gratitude à tout le personnel du laboratoire en particulier Mme ABROUSH pour leur sympathie et leur gentillesse. Nous avons passé vraiment des moments inoubliables au sein de votre laboratoire. Nous adressons par la même occasion nos remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de ce travail. Merci à vous tous.

Liste des figures

Figure 1. Les Cycloalcanes.....	4
Figure 2. Principaux types d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs).....	6
Figure 3. Oxydations des hydrocarbures aromatiques par des champignons ligninolytiques	12
Figure 4. Illustrations des basidiomycètes	13
Figure 5. Mesure de pH pour l'échantillon de sol.....	17
Figure 6. Mesure de la capacité au champ	20
Figure 7. Préparation de milieu PDA.....	21
Figure 8. Coulage de milieu PDA.....	21
Figure 9. Technique de bouturage des carpophores d' <i>Agaricus bisporus</i> et ensemencement des fragments mycéliens sur milieu PDA.....	22
Figure 10. Entretien et multiplication du mycélium d' <i>Agaricus bisporus</i> sur milieu PDA....	23
Figure 11. Incubation des boîtes de Pétri ensemencées par <i>Agaricus bisporus</i>	24
Figure 12. Schéma expliquant la méthode de mesure du diamètre moyen de la colonie mycélienne.....	25
Figure 13. Dispositif expérimental de l'essai de culture de l'inoculum d' <i>Agaricus bisporus</i> sur 100µl ou 500µl de gasoil sur milieu PDA.....	26
Figure 14. Essai de la biodégradation de différentes doses gasoil dans le sol avec le champignon <i>Agaricus bisporus</i>	27
Figure 15. Dispositif expérimental du test respirométrique	28
Figure 16. Titration du NaOH par le HCL 0,25M	
Figure 17. Évaluation de la quantité des hydrocarbures résiduels dans le sol.....	32
Figure 18. Diamètre moyen des colonies mycéliennes d' <i>Agaricus bisporus</i> en fonction de temps.....	33
Figure 19. Croissance mycélienne sur milieu PDA après 192h	34
Figure 20. Diamètre moyen des colonies mycéliennes d' <i>Agaricus bisporus</i> sur milieu PDA additionné de 100µl de gasoil.....	34
Figure 21. Croissance mycélienne sur milieu PDA additionné 100 µl de gasoil après 168H	35

Figure 22. Diamètre moyen des colonies mycéliennes d' <i>Agaricus bisporus</i> sur milieu PDA additionné de 500µl de gasoil.....	35
Figure 23. Croissance mycélienne sur milieu PDA additionné de 500 µl de gasoil après 264h	36
Figure 24. Croissance mycélienne moyenne d' <i>Agaricus bisporus</i> sur les trois traitements en fonction du temps.....	36
Figure 25. Quantité de CO ₂ cumulée en fonction des différents traitements.....	37
Figure 26. Poids des hydrocarbures résiduels des différents traitements étudiés.....	38

Liste des Tableaux

Tableau 1. Composition élémentaire des hydrocarbures pétroliers (Speight, 2014).....	5
Tableau 2. Propriétés physico-chimiques du gasoil (Colombano et al., 2014).....	10
Tableau 3. Classifications de champignons de Paris (Chang, 1996).....	23
Tableau 4. Rapport des analyses du sol (INRF d'Alger).....	47
Tableau 5. Tableau des absorbances des HAP pour les différents traitements.....	50

Liste des abréviations

PDA : Potato Dextrose Agar

SH1 : Sol avec hydrocarbure 1%

SH2 : Sol avec hydrocarbure 2%

SHC1 : Sol avec 1% d'hydrocarbures avec inoculum

SHC2 : Sol avec 2% d'hydrocarbures avec inoculum

SC : Sol avec inoculum

SOMMAIRE

Introduction	1
---------------------	----------

Chapitres I : Synthèse bibliographique

I. Hydrocarbures pétroliers.....	3
I.1 Pollution par les hydrocarbures.....	3
I.2 Généralités sur les hydrocarbures.....	3
I.3 Nature chimique des hydrocarbures.....	3
I.4 Origine des hydrocarbures.....	3
I.5 Utilisations des hydrocarbures.....	4
I.6 Composition des hydrocarbures.....	4
I.7 Classification des Hydrocarbures.....	4
I.7.1 Hydrocarbures Aliphatiques.....	5
I.7.2 Cycloalcanes.....	5
I.7.3 Hydrocarbures aromatiques.....	6
I.7.3.1 Hydrocarbures Aromatiques Monocycliques.....	6
I.7.3.2 Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs).....	6
I.7.3.3 Caractéristiques physico- chimiques des composés aromatiques.....	6
I.8 Propriétés physico-chimiques des hydrocarbures.....	6
I.8.1 Densité.....	6
I.8.2 La solubilité.....	6
I.8.3 Polarité.....	7
I.8.4 Viscosité.....	7
I.9 Le gasoil.....	7
I.9.1 Propriétés du gasoil.....	7
I.10 Les hydrocarbures en Algérie.....	7
I.10.1 Problèmes liés aux hydrocarbures en Algérie.....	8
I.11 Comportement et devenir des hydrocarbures dans le sol.....	8
I.12 L'impact de la pollution pétrolière.....	8
a. Impact sur les humains.....	8

b. Impact sur l'environnement.....	9
b.1 Sur le sol.....	9
b.2 Impact sur la qualité d'eau.....	9
b.3 Impact sur la qualité de l'air ambiant.....	9
II. Bioremédiation.....	10
II.1 Bioremédiation des sols pollués aux hydrocarbures pétroliers.....	10
II.2 Techniques de bioremédiation.....	10
II.2.1 Bioremédiation in-situ.....	10
a. Biostimulation.....	10
b. Bio-augmentation.....	10
II.2.2 Bioremédiation ex-situ.....	10
a. Land farming.....	10
b. Biopiling.....	10
c. Compostage.....	10
d. Bioréacteurs.....	10
II.3 Biodégradations des hydrocarbures pétroliers.....	10
II.4 Biodégradation des hydrocarbures par les champignons de la pourriture blanche.....	10
II.4.1 Règnes des Fungi (champignons).....	11
II.4.2 Champignons de la pourriture blanche.....	11

Chapitre II : Matériel et Méthodes

1. Matériel.....	14
1.1 Sol.....	14
1.2 Carburants.....	14
1.3 Matériel biologique.....	14
1.4 Milieu de culture gélosé utilisé.....	15
a-Composition chimique.....	15
1.5 Matériel de laboratoire.....	16
2. Méthodes.....	17
2.1 Préparation du sol.....	17
2.2 Préparation et stérilisation du milieu PDA.....	18
2.3 Coulage du milieu PDA.....	18

2.4 Bouturage des carpophores.....	19
2.5 Entretien du mycélium et repiquage.....	20
2.6 Incubation.....	22
2.7 Evaluation de la croissance mycélienne après 24h ,48h,72h et 96h d'incubation.....	23
3. Essais de Biodégradation du gasoil par <i>Agaricus bisporus</i>	24
3.1 Essais de Biodégradation du gasoil par <i>Agaricus bisporus</i> sur milieu PDA.....	24
3.1.1. Essai avec 100µl.....	25
3-1-2 Essai avec 500µl de gasoil.....	25
4. Essais dans le Sol.....	26
4.1 Essais de Biodégradation du gasoil par <i>Agaricus bisporus</i> dans le sol.....	26
4.1.1 Essai avec 1% de gasoil.....	27
4-1-2 Essais avec 2% de gasoil.....	27
4.2 Protocole de la mesure de la respiration microbienne.....	28
5. Détermination de l'activité biologique.....	29
5.1 Titrage du NaOH.....	30
a.Préparation de la burette.....	30
b.Préparation de la solution de chlorure de Baryum.....	31
6. Mesure de pH.....	31
a. Préparation des solutions.....	31
7. Évaluation de la Capacité au champ.....	32
8. Évaluation de la quantité des hydrocarbures résiduelle dans le sol.....	32
8.1 Protocole.....	33
8-2 Dosage des hydrocarbures résiduels.....	34
9. Méthodes d'analyse statistique.....	35

Chapitre III : Résultats et Discussions

1. Essais de Biodégradation du gasoil par <i>Agaricus bisporus</i>	32
1.1 Evaluation de la croissance mycélienne moyenne d' <i>Agaricus bisporus</i> sur milieu PDA(Témoin).....	32
2.1 Essais de Biodégradation du gasoil par <i>Agaricus bisporus</i> sur milieu PDA.....	32
a. Essai avec 100µl.....	33
b.Essai avec 500µl de gasoil.....	34

c. Comparaison de la croissance mycélienne moyenne d' <i>Agaricus bisporus</i> entre les trois traitements.....	34
3. Essais de Biodégradation du gasoil par <i>Agaricus bisporus</i> dans le sol	36
3.1 Caractéristiques du sol.....	37
4. Essais de biodégradation du gasoil à 1% et 2% par <i>Agaricus bisporus</i> dans le sol.....	37
4.1 Mesure de la quantité de CO2 cumulée des différents traitements.....	37
4.2 Poids résiduels du carburant..... ;;	38
5. Etude qualitative des hydrocarbures.....	38
6. Discussion.....	52
Conclusion générale et perspectives.....	44

Références bibliographiques

Annexes

Abstract

Introduction

La demande mondiale ininterrompue des produits pétroliers comme sources d'énergie à augmenté les activités de production, de raffinage et de distribution de pétrole, ce qui à entraîné le déversement d'énormes quantités d'hydrocarbures pétroliers dans l'environnement.

La pollution du sol par les hydrocarbures pétroliers est un problème préoccupant dans le monde entier, car plus que 90% de la charge environnementale des hydrocarbures pétroliers est simplement stockée dans le sol, ce qui indique que ce dernier est le principal puits de ces hydrocarbures dans l'environnement terrestre (Kuppusamy et al., 2020).

Les déversements accidentels des hydrocarbures peuvent contenir du pétrole brut ou des produits pétroliers raffinés tels que le diesel, le mazout ou les huiles lubrifiantes. Les composés toxiques dans le pétrole brut consistent une large gamme d'hydrocarbures, de composés azotés, oxygénés, soufrés et de métaux lourds, qui peuvent avoir des effets aigus et chroniques sur la flore et la faune (Yavari et al., 2015). Les produits pétroliers, par leur nature persistante, affectent la qualité du sol en modifiant ses propriétés physiques, biochimiques et la diversité microbienne hétérogène intrinsèque (Roy et al., 2014). En général, la santé humaine et la sécurité des écosystèmes sont directement influencées par l'accumulation de produits pétroliers dans l'environnement (Hussain et al., 2019).

Cependant, dans un contexte où notre pays demeure fortement axé sur l'énergie fossile, la problématique des hydrocarbures devient encore plus pressante. Cette réalité renforce l'importance de solutions novatrices telles que les méthodes biologiques parmi lesquelles figurent la bioremédiation

La bioremédiation est une alternative respectueuse de l'environnement et économique pour la conversion efficace des composés toxiques et récalcitrants à la biodégradation tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les hydrocarbures halogénés et les hydrocarbures aromatiques monocycliques en produits non toxiques en appliquant des processus biologiques naturels. Cette technique fait intervenir différents types d'organismes (bactéries, champignons, plantes) qui sont appliqués dans le système pollué afin d'entraîner la dégradation et l'élimination des polluants en effectuant diverses réactions physiques et chimiques comme une partie de leur métabolisme (Deshmukh et al., 2016)

Plusieurs auteurs dont Schützendübel et al. (1999), Jové et al. (2016), Balaji et coll.(2014), ainsi que Benguenab (2016) ont réalisé des travaux sur la biodégradation des hydrocarbures par les champignons de la pourriture blanche et leurs résultats étaient très prometteurs.

Notre travail, consiste à effectuer un essai de biodégradation dans le sol d'un carburant à savoir le gasoil, qui selon (références) est constitué d'hydrocarbures les plus lourds et ce, par un champignon de la pourriture blanche *Agaricus bisporus* appelé communément champignon de Paris. C'est un champignon comestible et qui provient du commerce local de la wilaya de Tizi Ouzou. Sa production est limitée à la consommation, mais vu qu'il appartient aux champignons ligninolytiques dotés d'un équipement enzymatique capable de dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques les plus récalcitrants dans l'environnement (Haritash et Kaushik ,2009) (Davis et coll ,1993), nous l'avons choisi pour cet essai de biodégradation du gasoil d'abord sur un milieu gélosé PDA, puis dans le sol. Ce travail est

réalisé au laboratoire PSEMRVC de la faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques de l'UMMTO.

L'objectif de la présente étude est de confirmer la capacité du champignon *Agaricus bisporus* à dégrader le gasoil. Et en perspective, il serait intéressant à l'avenir de trouver des techniques adéquates d'apporter notre essai réalisé au laboratoire sur terrain tout en respectant les conditions de l'environnement.

Notre présent travail se subdivise en trois chapitres : Le premier consiste en un rappel bibliographique sur les hydrocarbures, la pollution du sol, un aperçu sur les champignons de la pourriture blanche et la description de quelques techniques de décontamination des sols pollués (mycoremédiation). Le deuxième chapitre aborde la partie matériels et méthodes utilisées. Le troisième expose les résultats obtenus ainsi que leur discussion. Il sera suivi d'une conclusion générale et de quelques perspectives.

I. Hydrocarbures pétroliers

1 Généralités

Les hydrocarbures pétroliers, sont des composés organiques plus ou moins fluides, visqueux, combustibles est de couleurs variables, de claire à très foncée. Ils sont constitués d'un mélange de nombreuses molécules gazeuses, organiques, liquides, solides, de divers types hydrocarbures, de soufre, et de métaux lourds (nickel, cuivre, fer, vanadium...) (Fattal, 2008).

Les hydrocarbures peuvent être liquides comme le méthane qui est le principal constituant du gaz naturel et du gaz naturel liquéfié GNL, ils sont souvent odorants et peuvent migrer dans les différents compartiments de l'environnement (Kuppusamy et al., 2020).

1.2 Nature et origine

Les hydrocarbures sont naturellement présents dans l'environnement, et ils proviennent de la dégradation d'une grande quantité de matière organique végétale ou animale, par des microorganismes. Cette dégradation a lieu dans des conditions particulières et s'étale sur plusieurs années (Soltani, 2004). Ils proviennent le plus souvent d'une pollution pétrolière (production, raffinage, transport et utilisation des hydrocarbures) ou de la pétrochimie, d'usines à gaz, secteur énergétique et industriels (Jeannot, 2000).

1.3 Pollution par les hydrocarbures

Les hydrocarbures pétroliers sont parmi les contaminants les plus courants dans l'environnement. Ils comprennent une large famille de plusieurs composés d'hydrocarbures qui proviennent du pétrole brut utilisé pour fabriquer des produits pétroliers. Le rejet d'hydrocarbures dans l'environnement, accidentellement ou suite à des activités humaines, est la principale cause de la pollution des sols, de l'eau et de l'air (Bardi et al., 2000).

La pollution par les hydrocarbures (pétrole, essence, gasoil, huile pour moteur, etc.) est très importante, elle intervient dans 80% des cas de pollution du sol (Belhabib, 2002 in Lardjane et Mechraoui, 2001). D'après Colin (2000), la pollution par les hydrocarbures légers est très fréquente du fait de l'utilisation généralisée de ces hydrocarbures couramment commercialisés. Comparativement à d'autres hydrocarbures lourds qui ont des viscosités élevées, peu solubles dans l'eau et peu volatils, ces composés sont assez biodégradables à l'exception de certains d'entre eux qui peuvent se révéler toxiques.

Le traitement du pétrole brut et l'utilisation généralisée de différents hydrocarbures pétroliers pour le transport, le chauffage, l'industrie, etc., entraînent la libération d'hydrocarbures dans l'environnement par des défaillances opérationnelles, des fuites à long terme ou des déversements accidentels (Kuppusamy et al., 2020 ; Lima et al., 2020).

1.4 Classification des Hydrocarbures

Les hydrocarbures sont classés en hydrocarbures aliphatiques, hydrocarbures cycliques et aromatiques (Soltani, 2004 ; Ouahbi, 2012).

1.4.1 Hydrocarbures Aliphatiques

Ce sont les plus simples. Ils se présentent sous formes alcanes, alcène ou alcyne. (Soltani, 2004)

-Les alcanes de formule chimique $C_n H_{2n+2}$: Ce sont des hydrocarbures ayant des simples liaisons entre les atomes de carbone exemple : l'Octane $C_8 H_{18}$ à la structure chimique suivante : $CH_3 - (CH_2)_6 - CH_3$.

- Les alcènes de formule chimique $C_n H_{2n}$: ce sont des hydrocarbures insaturés possédant des doubles liaisons entre les atomes de carbones ($C=C$) exemple : le Pentène $C_5 H_{10}$ de structure chimique: $CH_2=CH - (CH_2)_2 - CH_3$.

- Les alcynes de formule chimique $C_n H_{2n-2}$: sont des hydrocarbures possédant des triples liaisons entre les atomes de carbone ($C \equiv C$) exemple : l'acétylène appelé aussi l'Éthine de structure chimique : $HC \equiv CH$.

Tous les hydrocarbures de doubles ou triples liaisons sont des oléfines et les hydrocarbures de type alcanes de très longue chaîne et de hauts poids moléculaires sont des asphaltènes.

1.4.2 Hydrocarbures cycliques ou Cycloalcanes

Ce sont des hydrocarbures qui renferment des composés cycliques à 5 ou 6 atomes de carbones saturés et le plus souvent substitués comme le cyclohexane et le cyclopentane (figure 1).

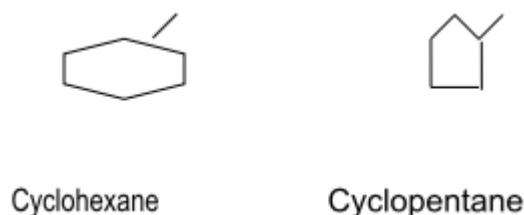


Figure 1 : Les Cycloalcanes (Soltani, 2014)

1.4.3 Hydrocarbures aromatiques

Ils sont caractérisés par la présence en alternance de liaisons simples et doubles entre les atomes de carbone. On distingue les hydrocarbures aromatiques monocycliques et les hydrocarbures aromatiques polycycliques.

1.4.3.1 Hydrocarbures Aromatiques Monocycliques

Ce sont principalement les BTEX le Benzène ou ses dérivés qui sont le Toluène, Ethylbenzène, Xylène.

1.4.3.2 Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs)

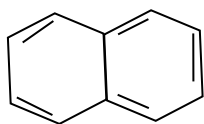
Ils constituent un groupe de composés, résultant de la fusion de cycles benzéniques, le plus simple des HAP est le naphthalène $C_{10}H_8$, résultant de la fusion de deux cycles benzéniques, et le plus complexe est le coronène $C_{24}H_{12}$ (Ramade, 1992).

Les HAPs ont une faible solubilité dans l'eau et ils s'accumulent dans l'environnement (Bliefert & Perraud, 2001).

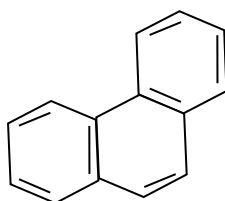
1.4.3.3 Caractéristiques physico- chimiques des composés aromatiques

D'après Ramade (1992) et Bliefert & Perraud, (2001), tous les composés aromatiques ont en commun les propriétés suivantes :

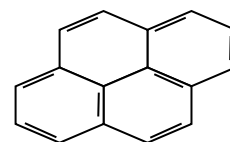
- Ils sont très stables. Le cycle aromatique réagit difficilement avec d'autres composés chimiques et lorsqu'il réagit, le nouveau composé formé contient toujours le cycle aromatique.
- Ils sont très résistants à l'action des oxydants donc difficilement biodégradables, ils persistent dans l'environnement et se concentre d'un maillon à l'autre dans la chaîne alimentaire. Ils sont très souvent toxiques et pour certains cancérigènes (Figure 02).



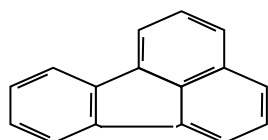
Naphtalène



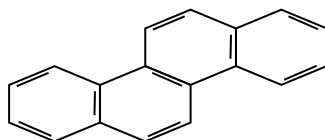
Phénanthrène



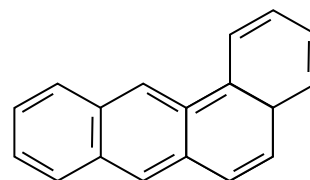
Pyrène



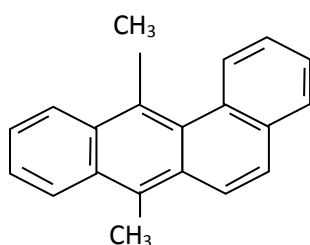
Fluoranthène



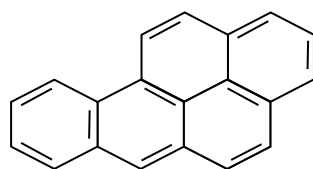
Chrysène



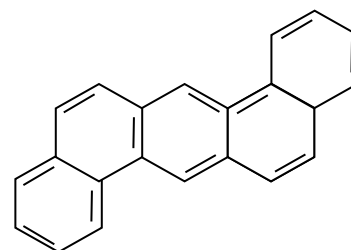
Benzanthrène



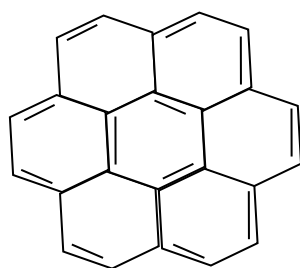
7,12 Diméthylbenzant



Benzo [a] pyrène



Dibenz [a,h] anthracène



Coronène

Figure 2 :Principaux types d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)

(Ramade, 1992)

1.5 Propriétés physico-chimiques des hydrocarbures

I.5.1 Densité

Elle correspond à la masse par unité de volume. Elle tend à diminuer lors des processus d'altération des hydrocarbures : augmentation de la température, évaporation des fractions plus légères, ou interaction avec les particules du sol (Mbogne, 2017). Presque tous les hydrocarbures sont plus légers que l'eau, pour les produits les plus courants la densité varie de 0.7 à 0.9 (Fattal, 2008).

I.5.2 La solubilité

La solubilité est la capacité d'une substance à se dissoudre dans la colonne d'eau. Elle est de l'ordre de : $\mu\text{g/l}$ (solubilité faible) ; mg/l (solubilité moyenne) ; g/l (solubilité importante). En général, les HAP ont une faible solubilité, comprise entre 30 mg/l pour les composés légers et 10 – 4 mg/l pour les plus lourds (Hassaine, 2016).

I.5.3 Polarité

Ils sont faiblement polaires avec des points d'ébullition et de fusion élevés (Mazeas, 2004). Les HAP sont apolaires ou peu polaires (Benyahia, 2012).

I.5.4 Viscosité

Elle est définie comme la résistance à l'écoulement d'un liquide. Les hydrocarbures pétroliers ayant une faible viscosité sont très fluides et se propagent rapidement, rendant leur confinement difficile. La viscosité est influencée par la température. En effet, plus la température est faible, plus la viscosité est élevée (Gruyer, 2015).

1.6 Les hydrocarbures en Algérie

L'Algérie occupe une place importante dans l'exportation de pétrole et de gaz naturel, et fait partie de l'Organisation of the Petroleum Exporting Countries (OPEC). L'économie algérienne repose en grande partie sur les hydrocarbures, avec des réserves de 12,2 milliards de barils de pétrole et 4,5 billions de mètres cubes de gaz. L'Algérie détient les 16^{ème} plus grande réserve de pétrole et la 10^{ème} plus grande réserve de gaz naturel au monde, elle représente le 6^{ème} plus grand exportateur de gaz (Dilmi, 2019). En Afrique, l'Algérie se positionne au troisième rang parmi les pays producteurs de pétrole, et au 12^{ème} rang à l'échelle mondiale (Attar et Hammat, 2009).

Les réserves conventionnelles d'hydrocarbures découvertes en Algérie sont contenues dans un peu plus de 200 gisements de pétrole et de gaz, dont 73 sont situés dans le bassin d'Illizi, 57 dans les bassins du Sahara central, 34 dans les bassins Ghadames-Rhourde Nous et 31 dans le Bassin d'Oued Maya (Abada & Bouharkat, 2018). L'Algérie constitue un centre important de raffinage avec 5 raffineries ; Skikda, Alger, Arzew, Hassi Messaoud et Adrar. Avec une capacité totale du traitement du pétrole brut de 25,565 millions de tonnes/an (Ministère de l'énergie et des mines).

1.6.1 Problèmes liés aux hydrocarbures en Algérie

Au cours de différentes activités liées à l'extraction du pétrole, à son transport et à l'utilisation de ces produits finis, des accidents peuvent avoir lieu et résultent à une contamination de l'environnement par plusieurs types d'hydrocarbures pétroliers. En effet, 21,2 % des accidents constatés dans l'industrie pétrolière en Algérie ont des conséquences sur l'environnement (Chettouh et Hamzi, 2014).

De plus, la pollution par les hydrocarbures en Algérie a attiré l'attention de plusieurs chercheurs, parmi lesquels nous citons les travaux de Talbi et al. (2009) et Ghouas et al. (2010) qui adaptent des techniques physico-chimiques pour l'élimination des carburants des effluents industriels. Ladjji (2010) a étudié la composition organique du sable du Sahara pollué par les hydrocarbures des différentes régions d'Algérie, Hassi-Messaoud, Hassi-Bahbah, Laghouat, Touggourt et Ghardaia, la plus grande pollution est d'origine d'hydrocarbures de type n-alcane détectée à Hassi-Bahbah avec 66% (C16 à C35). Laghouat était la ville la plus polluée en HAPs avec 21.8% entre aromatiques légers et lourds.

1.7 Comportement et devenir des hydrocarbures dans le sol

Une fois déversés sur le sol, les hydrocarbures y pénètrent, ils migrent alors sous l'influence de la gravité, de la porosité et de la perméabilité du sol. Ils passent selon Jose (1999) par plusieurs phases :

- **Vapeur** : volatilisation des composés légers qui deviennent alors très mobiles et sont entraînés par l'air.
- **Résiduelle** : les hydrocarbures (souvent liquides) se retrouvent dans la zone vadose (non saturée en eau), ou dans les pores.
- **Liquide ou flottante** : les liquides qui ne sont pas restés dans la zone vadose vont atteindre la nappe (ou une surface imperméable) où ils se dispersent latéralement.
- **Dissoute** : certains composés d'hydrocarbures sont solubles et donc dissous au contact de l'eau, ce qui complique et rend quasi impossible leur récupération.

Dès leur arrivée dans le sol, les hydrocarbures se distribuent dans les trois phases : solide, liquide et gazeuse. Selon des constantes d'équilibre, d'adsorption, de désorption et de volatilisation, ces constantes sont caractéristiques de chaque produit, mais elles sont modifiées en fonction des conditions pédoclimatiques.

1.8 Impact des hydrocarbures sur le sol

Les hydrocarbures représentent les principaux polluants qui affectent les propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol.

a. Impact sur les propriétés physiques du sol

Les études concernant les effets des hydrocarbures sur les propriétés physiques d'un sol sont très limitées, cependant, Mettauer et ses collaborateurs (1987) cités par Fezzani et Khider (2007), soutiennent l'idée que la présence des hydrocarbures améliore la stabilité structurale d'un sol, accroît sa rétention en eau et réduit sa mouillabilité.

b. Impact sur les propriétés chimiques du sol

Les effets des hydrocarbures sur les propriétés chimiques du sol généralement consistent en une augmentation de la concentration du sol en éléments chimiques à l'état de trace tel que le manganèse (Mn), le zinc (Zn) et le fer (Fe) (Sauchelli, 1969 in Fezani et Khider, 2007).

L'augmentation de la conductivité électrique (CE) entraînant l'inhibition de la croissance de certaines plantes très sensibles à la présence des sels (Karaginnidis, 1999). Une légère acidification du sol (2 à 3 dixièmes) qui traduit sans doute l'apparition de faibles quantités d'acide résultant soit de l'oxydation des n-alcanes, soit de celle des composés provenant de la rupture du noyau aromatique. Il y a peu de variation de composition chimique en ce qui concerne les éléments majeurs du sol. Tout fois une teneur en soufre légèrement plus importante peut être attribuée aux hydrocarbures. Les métaux sont retenus dans l'horizon superficiel (Bergue et Mérienne, 1986).

L'évolution du carbone des hydrocarbures légers est décelée par chromatographie dans l'atmosphère environnante : méthane-éthane-propane-butane. Ces gaz n'étant pas présents dans les produits polluants se forment donc dans le sol. De la matière organique fraîche se trouve synthétisée à partir de carbone et d'azote.

Les synthèses organiques s'accomplissent grâce à la source d'énergie qui est le carbone des hydrocarbures. Le CO₂ étant le terme final de l'oxydation de carbone il peut être pris comme indice des activités globales des microorganismes ; et le calcul de la quantité totale du carbone perdue sous cette forme permet de connaître la quantité d'hydrocarbures dégradés (Bergue et Mérienne, 1986). Quant à l'azote organique, il augmente de façon continue dans les parcelles traitées. Cet enrichissement est la conséquence du déséquilibre carboné provoqué par l'apport d'hydrocarbures (le rapport C /N voisin de 45). Il traduit l'activité d'une microflore capable de métaboliser les déchets hydrocarbonés en utilisant une source d'azote autre que celle des réserves insuffisantes du sol (Rouquerol et al., 1987).

c. Impact sur les propriétés biologiques du sol

Les effets des hydrocarbures sur l'activité biologique du sol dépendent de leur nature, de leur concentration dans le sol et d'autres facteurs liés au milieu (Duchaufour, 1991). Les composés organiques contaminants peuvent inhiber la croissance des microorganismes et leur métabolisme. Cette inhibition est liée à des interactions avec la membrane cellulaire de ces composés fortement hydrophobes et à la formation de métabolites toxiques (Girart, 2005).

2. Bioremédiation

La bioremédiation est un moyen de réhabiliter les environnements pollués en exploitant les diverses capacités métaboliques des micro-organismes pour convertir les polluants en produits moins nocifs par minéralisation, génération d'oxyde de carbone et d'eau (Sardroud et al., 2013). Ces microorganismes peuvent être indigènes, présents déjà sur le site contaminé ou exogènes, cultivés au laboratoire puis réintroduits dans le sol. Les différentes techniques de bioremédiation sont résumées dans le (tableau 1)

Tableau 1. Différentes techniques de bioremédiation (VIDALI, 2001in Ben kherfia Imene 2020)

Techniques	Principe
Bioaugmentation	Introduction dans le sol des micro-organismes exogènes adaptés aux polluants à traiter, Utilisée couramment dans les bioréacteurs et le système ex-situ.
Biofiltration	Utilisation d'un bio filtre pour traiter les émissions gazeuses.
Biostimulation	Réensemencement de population prélevée sur le site (dans le sol ou les eaux souterraine) dont la croissance a été stimulée en laboratoire ou en bioréacteur, elle peut être utilisée in-situ ou ex-situ.
Bioréacteurs	Déroulement de la biodégradation dans des réacteurs ou bassins.
Biolixiviation	Solubilisation et entrainement dans la phase aqueuse par les micro-organismes de polluants fixés ou piégés dans le sol. Utilisé pour la dépollution des métaux non dégradables (cu,pb...)

2.3 Biodégradations des hydrocarbures pétroliers

Les bactéries et les champignons ont été largement étudiés pour leur capacité à dégrader une gamme de polluants environnementaux, y compris les hydrocarbures aromatiques polycycliques récalcitrants, les hydrocarbures halogénés et les composés nitro-aromatiques (Singh et Ward, 2004).

La bioremédiation fongique appelée mycoremédiation se révèle également prometteuse grâce à la présence de diverses enzymes non spécifiques qui augmentent le processus de dégradation en raison de la non spécificité des substrats (Singh, 2006 ; Fayeulle, 2013)

2.4 Biodégradation des hydrocarbures par les champignons de la pourriture blanche

Les champignons appartiennent au règne des Fungi, un groupe qui se distingue nettement des végétaux, des animaux et des bactéries. Il leur manque la caractéristique principale des végétaux : la capacité d'utiliser directement l'énergie du soleil grâce à la chlorophylle. Ils doivent donc assurer leur alimentation à partir d'autres organismes, en absorbant les substances nutritives du matériel organique dans lequel ils vivent après leur décomposition. (Pomerleau, 1980).

Les champignons sont connus pour dégrader ou provoquer la détérioration d'une grande variété de matériaux et de composés, processus connus sous le nom de mycodégradation. Ils sont équipés d'un système enzymatique bien développé qui leur donne la possibilité de se

développer sur une large gamme de substrats naturels et synthétiques. Ils sécrètent différentes enzymes extracellulaires dans leur environnement périphérique et dégradent divers substrats en petites molécules qui peuvent être absorbées et métabolisées dans leurs cellules (Sardrood et al., 2013 ; Balaji et coll, 2014).

Anastasi (2009) ; Barrasa et coll (2009), ont révélé par leur études que les champignons de la pourriture blanche suivants *Pleurotus ostreatus* , *Bjerkandera adusta* et *Phanerochaete chrysosporium* ont la capacité de dégrader quatre HAP différents : phénanthrène, anthracène, fluoranthène et pyrène grâce aux enzymes ligninolytiques et LiP, MnP et laccase. Récemment, Jové et al. (2016) ont révélé l'efficacité de la dégradation de l'anthracène par trois champignons ligninolytiques de la pourriture blanche qui sont *Phanerochaete chrysosporium*, *Irpex lacteus* et *Pleurotus ostreatus*. Ce dernier, est considéré comme l'un des champignons de la pourriture blanche le plus documenté pour sa capacité à dégrader les HAP (Bezalel et coll., 1996a, 1996b, 1996c, 1997 ; Tortella et coll., 2015).

Bezalel et coll. (1996a, 1996b, 1996c) ont signalé que *P. ostreatus* clive une grande variété de HAP, y compris le phénanthrène. Ces mêmes auteurs, ont démontré dans une étude ultérieure que *P. ostreatus* est capable de métaboliser le phénanthrène en phénanthrène trans-9,10-dihydrodiol et acide diphénique ainsi que sa minéralisation en CO₂. (Bezalel et coll., 1997).

Le champignon de Paris, ou *Agaricus bisporus*, est une espèce comestible largement cultivé et consommée à travers le monde. C'est un basidiomycète, appartenant à la classe des Agaricomycètes, et fait partie des champignons de la pourriture blanche (Rodriguez, 2014) (figure 7). *Agaricus bisporus* est doté d'enzymatiques lignolytiques d'où la nécessité de l'utiliser dans la biodégradation du gasoil. Des études récentes ont révélé la capacité à dégrader le gasoil dans un sol agricole à l'aide de substrats résiduels du champignon *Agaricus bisporus* (Mauricio-Gutiérrez et al., 2022)

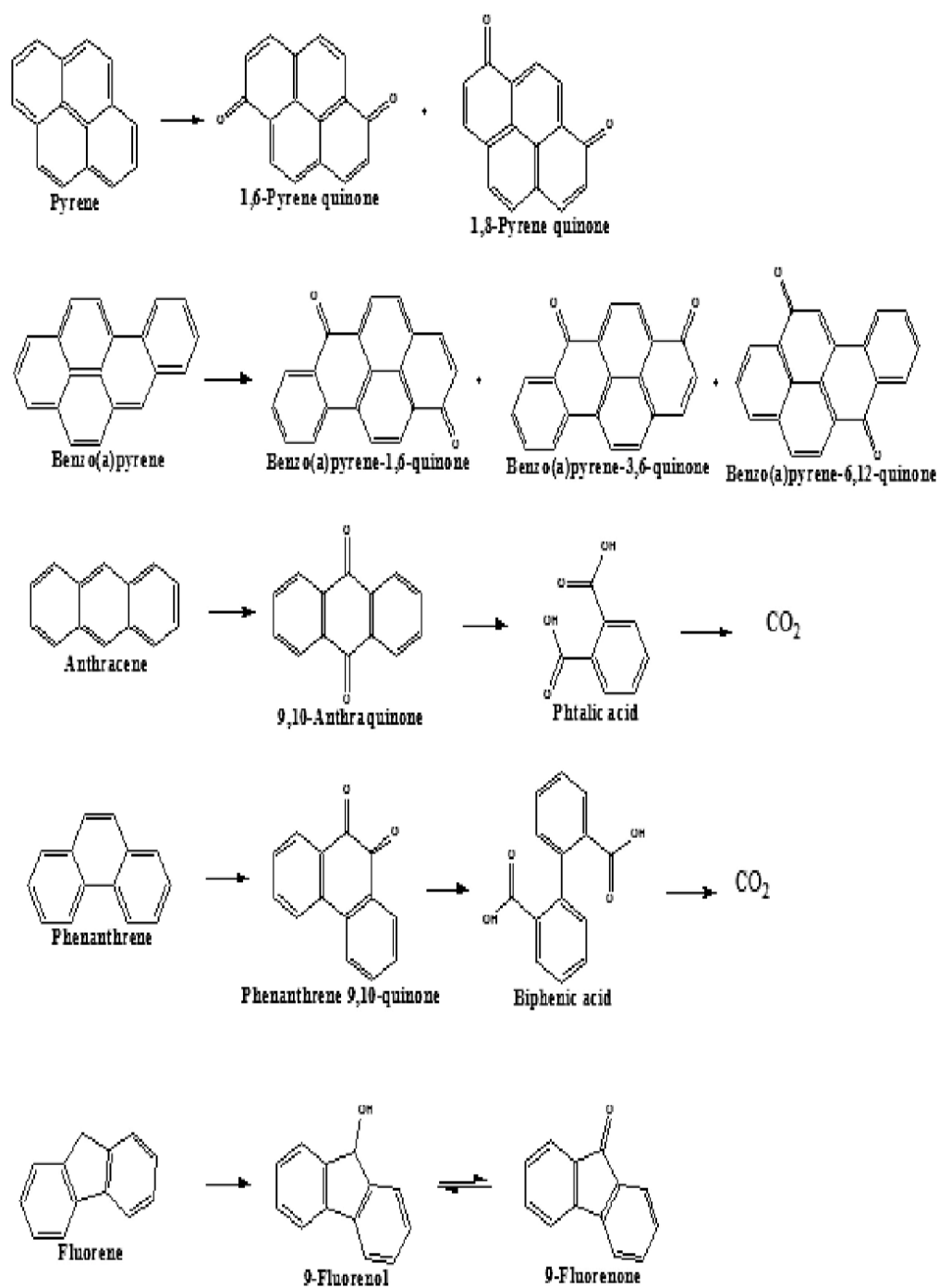


Figure 3 : Oxydations des hydrocarbures aromatiques par des champignons ligninolytiques (Kadri et al., 2016)

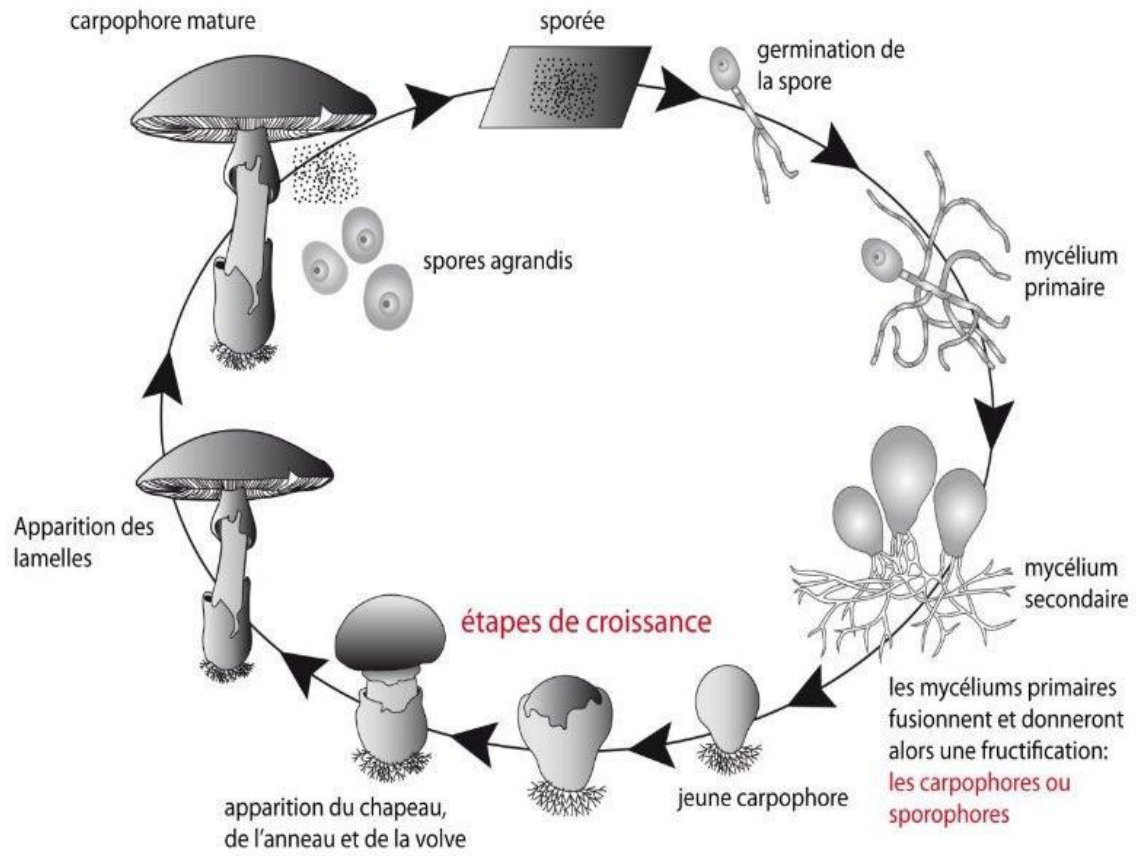


Figure 4: Biocycle d'un basidiomycète (Vertil ,2012)

1 – Matériel

1-1 Sol

Nous avons utilisé le sol pour l'étude de la biodégradation par un champignon de la pourriture blanche *Agaricus bisporus* dans un sol pollué par le gasoil.

1.2.1 Le gasoil

Le gasoil est un produit jaune clair, légèrement visqueux et distillant habituellement entre 190 °C et 300 °C (Wauquier, 1994). Le choix de gasoil pour la dépollution, par rapport à d'autres hydrocarbures, s'explique par le fait qu'il est plus toxique, sa structure chimique permet une meilleure solubilisation des polluantes organique (Singh, 2006)

1.2.2 Propriétés du gasoil

Les principales propriétés du gasoil sont représentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 2 : propriétés physico-chimiques du gasoil (Colombano et al., 2014).

Température d'ébullition	Solubilité dans l'eau	Masse volumique à 15°C	Limites d'explosivité dans l'air	Pression de vapeur saturante
170-390 °C	Très peu soluble	0.82-0.89g/cm ³ (820-890g/l)	Inférieure : 1% vol Supérieure : 6% vol	1Pa à 20°C

1-3 Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé dans la biodégradation du gasoil est le champignon de Paris *Agaricus bisporus* qui appartient à la famille *Agaricaceae*. Il provient du commerce local de la wilaya de Tizi Ouzou.

a-Classification

Selon (Chang, 1996) *d'Agaricus bisporus* appartient à :

Règne Fungi

Division Basidiomycota

Classe Agaricomycetes

Sous-classe Agaricomycetidae

Ordre Agaricales

Famille Agaricaceae

Genre *Agaricus*

Espèce *Agaricus bisporus* (J.E Lange) Imbach, 1946

b- Morphologie

Agaricus bisporus possède un pileus rond, dont la largeur oscille entre 4 et 6 cm, d'un blanc velouté qui va se tacher d'ocre ou de brun. Le chapeau est attaché au pied par un voile secondaire quand il est jeune (on n'aperçoit pas ses lamelles). L'ouverture de ce voile libère ainsi un petit anneau. En vieillissant, le chapeau va s'aplatir. La cuticule est blanche avec des écailles bien différenciées et des lamelles blanchâtres au début et de couleur café à la fin. Ces lamelles sont serrées et libres avec un bord de ton plus clair. Le pied est cylindrique de 3-4 cm de longueur et sa superficie est fibreuse, squameuse avec l'anneau en position médiane. Les basides sont majoritairement bisporiques et leurs spores ovales. Leurs cistides sont claviformes. Il a aussi une texture (chair) ferme, et est épais, de couleur blanchâtre et une légère saveur de noix (Rodriguez, 2014)

1-4 Milieu de culture gélosé utilisé

Le milieu de culture gélosé utilisé pour l'entretien du champignon *Agaricus bisporus* est le milieu PDA (Potato Dextrose Agar).

a-Composition chimique

D'après Rapilly (1968) la composition du milieu PDA est la suivante

- 200g de pomme de terre lavée et épluchée puis coupée en petits cubes.
- 20 g de Glucose
- 20 g Agar- agar
- 1 litre d'eau distillée

1.5 - Matériel de laboratoire

a- Gros matériel

- Hôte stérile à flux laminaire
- Réfrigérateur ENIEM.
- Incubateur BINDER.
- Balance de précision

b-Petit matériel

- Agitateur magnétique RUHROMAG.
- Bec bunsen.
- Pinces.
- Scalpels.
- Spatule.
- Emporte-pièce de 1 cm de diamètre.

c- Verrerie

- Boîtes de Pétri en verre de 8 cm de diamètre

-Béchers de 1000 ml.

-flacons

-Erlenmeyers de 1000 ml.

d- Matériel consommable

-Coton.

-Papier Aluminium.

-Boîtes de Pétri en plastique.

-Étiquettes.

e- Produits chimiques

-Agar-Agar.

-Ethanol à 75°.

-Glucose (C,H,20%).

-Eau distillée (H,O).

-Sulfate de magnésium $MgSO_4$.

-Hypochlorite de sodium NaOH.

2-Méthodes

2.1 Méthode d'échantillonnage de sol

Les échantillons de sol ont été prélevés de manière aléatoire selon une diagonale, ces prélèvements sont effectués au niveau de la couche superficielle du sol (0 – 25 cm). Le site de prélèvement est une parcelle rectangulaire de 10 m², située à l'université Mouloud Mammeri Tizi Ouzou (Hasnaoua 2).

2-2 Préparation du sol

Après l'échantillonnage sur terrain, le sol est préalablement séché à température ambiante du laboratoire (figure 9). Il est ensuite broyé manuellement, puis tamisé à 2mm. Puis, il est divisé en lots à raison de 100 g/flacon. Ensuite il a été stérilisé dans un four à une température qui égale à 120 pendant 2h.

2.2 Caractéristiques physicochimiques du sol

Avant de faire les tests de biodégradation du gasoil dans le sol par *Agaricus bisporus*, nous avons d'abord réalisé la caractérisation de notre sol. Les analyses physicochimiques telles que l'évaluation du potentiel hydrique du sol (pH) et l'évaluation du pouvoir de rétention d'eau ont été réalisées au laboratoire PSEMRVC de la faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques de L'UMMTO. Le reste des analyses physicochimiques et granulométriques ont été complétées par le laboratoire de pédologie de l'INRF de Bainem à Alger.

a- Mesure de pH

Nous avons préparé une suspension de sol dans l'eau au rapport de 1/ 2,5 (p/v). Pour obtenir ce rapport, nous avons donc mélangé avec une baguette en verre 10 g de sol dans 12.5 ml d'eau distillée. Nous avons agité la suspension pendant 15mn à l'aide d'une baguette en verre à fin d'assurer une bonne dispersion du sol dans l'eau. Trois répétitions sont réalisées pour ce test de PH. Enfin, nous avons laissé la suspension décanter pendant deux heures pour permettre la lecture au pH mètre.

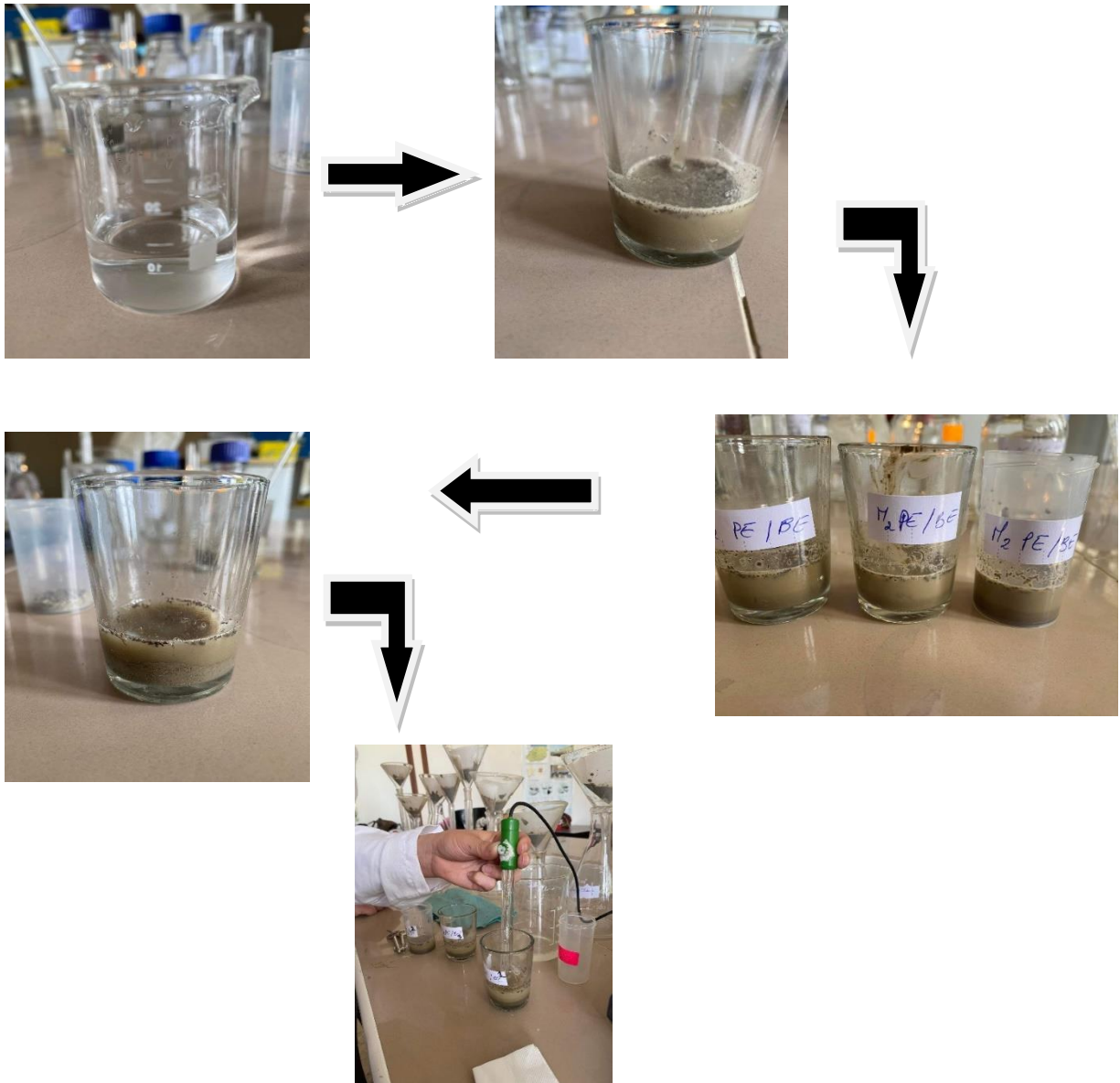


Figure 5: Mesure de pH pour l'échantillon de sol

b - Mesure de la Capacité au champ

Pour mesurer la capacité au champ qui est la capacité de rétention maximal en eau du sol, de nos différents traitements nous adoptants les étapes suivantes :

- Prélevé 10g de sol pour chacun des trois échantillons (boite de pétrie)
- Ajouter de l'eau distillée au sol pour chaque échantillon jusqu'à ce qu'ils soient complètement saturés en eau
- Laisser les échantillons reposer pendant 3h pour assurer une saturation complète
- Filtrer le sol saturé à l'aide d'un papier filtre
- Peser à nouveau le poids de chaque échantillon filtré saturé à l'état humide
- Peser le poids sec du filtrat après 48h, peser pour obtenir le poids sec (Figure 21)
- Calculer la capacité au champ en utilisant la formule suivante :

Capacité au champ (%) = (Poids du sol humide – poids du sol sec) / poids du sol sec x 100

c -Le dosage de l'azote

L'azote (N) stimule la croissance de la plante et il est responsable de sa coloration verte. Comme il est le facteur de rendement le plus important, car il entre dans la composition des protéines, de la chlorophylle et d'enzymes essentielles à la photosynthèse (captation de la lumière par la plante) et de la respiration (Pierzynski et al., 2005)

La méthode employée est celle de Kjeldahl, par l'acide sulfurique. Ainsi la matière organique azotée est minéralisée par l'acide sulfurique concentré à chaud (action oxydante du H₂SO₄) L'azote transformé en ammoniac est fixé par l'acide sulfurique à l'état de sulfate d'ammoniac. Le sulfate de potassium permet d'élever la température d'ébullition de l'acide sulfurique (de 317 à 330 C°). Cette première phase s'appelle la digestion, l'acide sulfurique sera additionné à l'acide salicylique. Dans cette méthode de Kjeldahl, l'ion NH₄⁺ est déplacé par l'hydroxyde de sodium et entraîné à la vapeur d'eau puis fixé par l'acide borique à l'état de borate, lui-même dosé par H₂SO₄ titré. Cette dernière phase s'appelle la distillation

d- Le dosage du carbone organique

C'est une mesure de la qualité des résidus en décomposition, exprimée en pourcentage (%).

Le taux de carbone organique est déterminé par la méthode ANNE. Une quantité de 2g de terre fine suivant sa teneur présumée en matière organique, est pesée et introduite dans un bécher de 250ml avec 10ml de la solution aqueuse de bichromate de potassium à 8% et 15ml d'acide sulfurique concentré. Le bécher est porté à ébullition douce sur une plaque chauffante pendant 5 minutes. A partir de la première goutte condensée, le bécher est retiré et laissé refroidir. Le contenu est ensuite transvasé dans une fiole de 200ml en ajustant avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge. A l'aide d'une pipette, 25 ml sont prélevés auxquels sont ajoutés 100ml d'eau distillée. 1,5g de fluorure de sodium et 4 à 5 gouttes de

diphénylamine sont ajoutés au mélange. L'excès de bichromate non réduit par le carbone organique est titré par une solution de sel de Mohr dont la couleur passe du bleu foncé au bleu vert.

e- Matière organique (MO)

Les classes d'appréciation de la teneur du sol en matière organique sont réalisées en fonction du taux de carbone.

La détermination de la matière organique est effectuée par la méthode de Walkley-Black : le carbone organique est oxydé par du bichromate de potassium en milieu sulfurique (Najib et al ,2014).

Le calcul du pourcentage de carbone organique se fait par le titrage direct du bichromate de potassium avec la solution de Mohr.

f - Rapport d'analyse de sol

Tableau 3 : Rapport des analyses du sol (INRF d'Alger)

Paramètre	Résultat	Commentaire
Carbone total (%)	1.78	/
Matière organique (%)	3.07	Moyenne pauvre en MO
Granulométrie (%)	A (%) : 31,45 L (%) : 52,308 S (%) : 18,384	Texture : Limon argilo-sableux
Azote (%)	0,35	Méthode d'analyse Kjeldahl
Potentiel hydrogène	7,23 ± 0,02.	Neutre
Capacité au champ	75,15 % ± 4,19	/

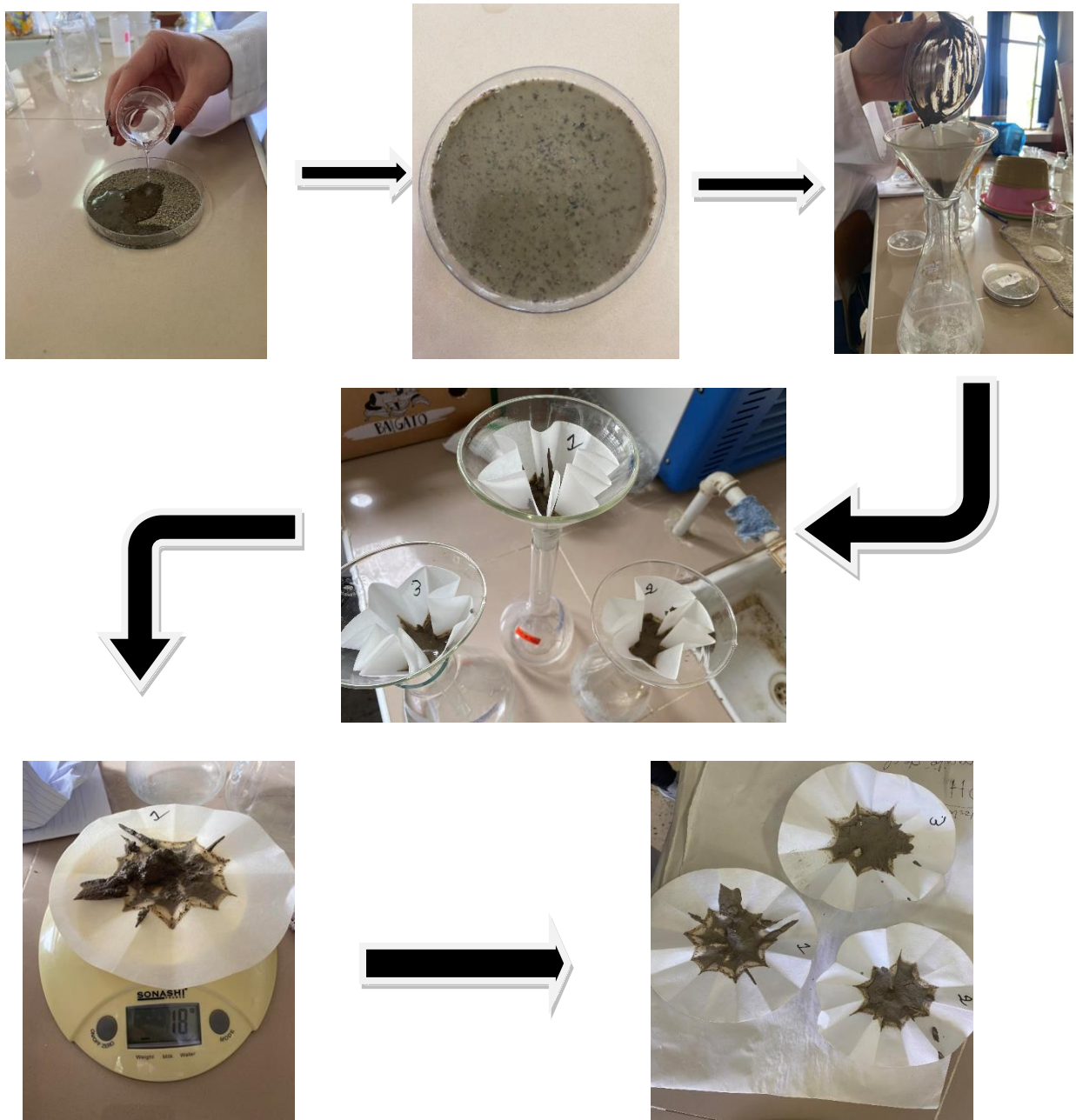


Figure 6 : dispositif expérimental de la mesure de la capacité au champ des différents sols étudiés (inoculés ou non par *Agaricus bisporus* avec ou sans gasoil)

3 Préparation et stérilisation de milieu PDA

Selon Rappilly (1968), il faut faire cuire 200g de pommes de terre dans 200 ml d'eau distillée pendant 20 minutes. Ensuite, nous avons récupéré le filtrat, puis ce dernier est ajouté à 20 g de glucose et 20 g de gélose ou l'agar agar contenu dans un erlenmeyer. Nous avons ensuite

ajusté à 1 litre d'eau distillée. Enfin, pour assurer la stérilité du milieu de culture, nous avons procédé à sa stérilisation à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C. (figure10)



Figure 7 : Préparation de milieu PDA

3.1 Coulage dumilieu PDA

Après stérilisation, le milieu PDA a été coulé aseptiquement dans des boîtes de Pétri à raison de 23 ml de milieu par boîte, sous hôte stérile (Figure 11).

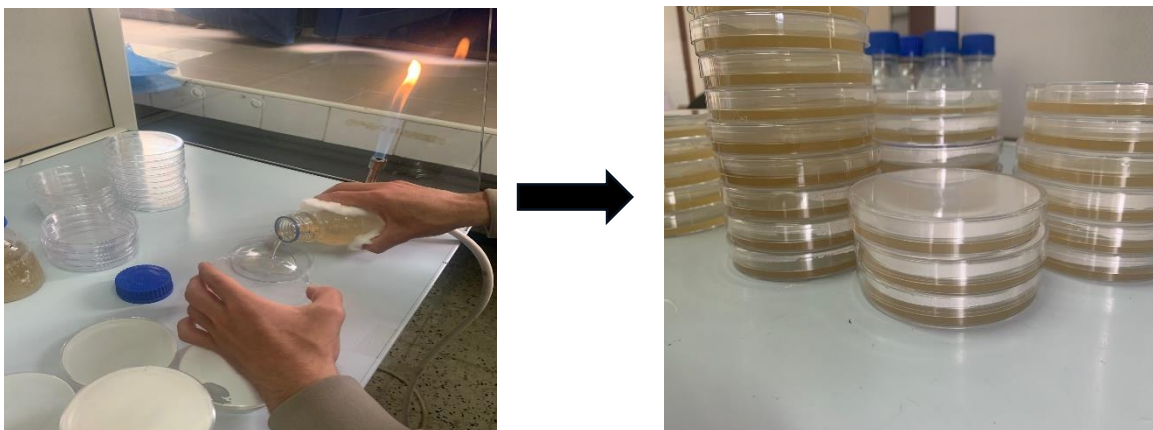


Figure 8 : Coulage de milieu PDA

3.2 Bouturage des carpophores

Pour le bouturage des carpophores, nous avons adopté la technique de Mansour-Benamar et al (2013) :

Le bouturage nécessite des conditions d'asepsie rigoureuse. Il faut bouturer le mycélium dicaryotique qui compose le carpophore. Bien sûr il faudrait d'abord choisir un carpophore en très bon état, puis l'ouvrir à l'aide d'un couteau stérile dans le sens de la longueur ou le déchirer à la main, puis découper à l'aide d'un scalpel stérile des morceaux de mycélium du carpophore dans les parties mises à nu, car elles sont les plus stériles. Ensuite à l'aide d'une pince stérile, nous avons prélevé des fragments de mycélium, puis chacun des fragments a été déposé au centre des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA. Les boîtes ainsiensemencées ont été filmées à l'aide d'un film étirable (figure12) et mise à incuber à 24°C.



Figure 9 : Technique de bouturage des carpophores d'*Agaricus bisporus* et ensemencement des fragments mycéliens sur milieu PDA

3.3 Entretien du mycélium et repiquage

Après incubation des boîtes de Pétri, nous avons sélectionné celles qui présentent une bonne croissance mycélienne d'*Agaricus bisporus* avec un mycélium présentant un bel aspect filamenteux et dense. Ce dernier sera repiqué et ensemencé sur un nouveau milieu PDA. Les cultures mycéliennes repiquées sont âgées de huit jours. Nous avons procédé à l'ensemencement et repiquage d'inoculum d'*Agaricus bisporus* en respectant les étapes suivantes :

- Stérilisation par chauffage à la flamme rouge de l'extrémité d'un emporte-pièce suivi d'un refroidissement dans de l'alcool.
- Ouverture aseptique d'une boîte de Pétri contenant l'inoculum d'*Agaricus bisporus* sélectionné.
- Découpage des implants d'inoculum de 1 cm de côté à l'aide de l'emporte-pièce ou scalpel stérilisé, les prélever à l'aide d'une spatule stérile (Figure13).

- Stérilisation des bords de la boîte contenant le milieu de culture PDA frais, suivi de son ouverture.
 - Dépôt aseptique de l'implant d'inoculum au centre de chaque boîte de Pétri contenant le milieu PDA.
 - Fermeture hermétique des boîtes de Pétri ainsiensemencées à l'aide d'un film
 - Transparent.

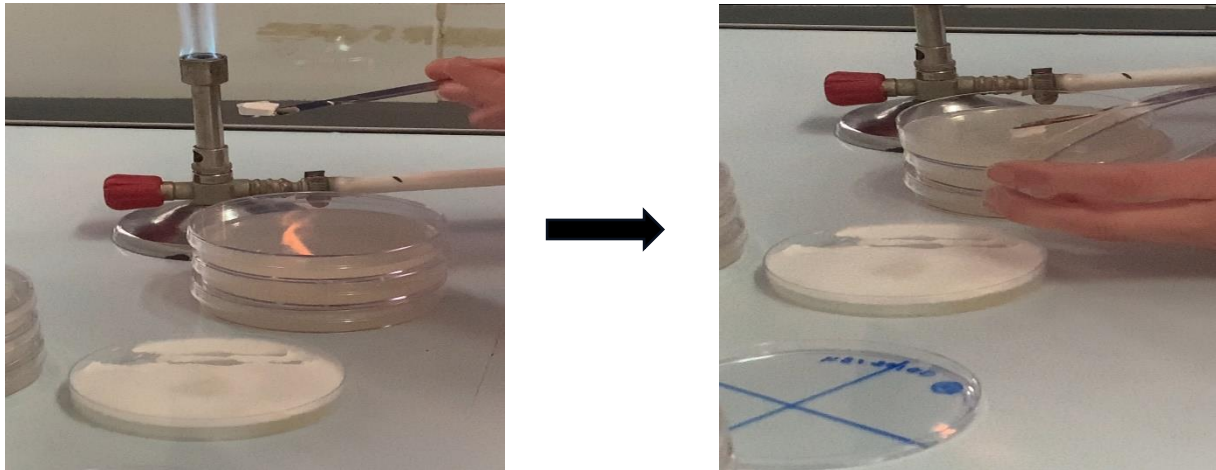


Figure 10 : Entretien et multiplication du mycélium d'*Agaricus bisporus* sur milieu PDA

3.4 Incubation

Une foisensemencé, ces boîtes de Pétri contenant l'inoculum d'*Agaricus Bisporus* sont mise à incuber à 24°C, pendant une semaine (Figure 14).



Figure 11 : Incubation des boîtes de Pétriensemencées par *d'Agaricus Bisporus*

3.5 Evaluation de la croissance mycélienne après 24h, 48h,72h et 96h d'incubation

Nous avons calculé le diamètre moyen (cm) des colonies mycéliennes *d'Agaricus Bisporus*. Ce diamètre a été mesuré chaque 24h selon deux axes perpendiculaires (l'axe des X et l'axe des Y) tracés sur chacune des boîtes de Pétri, passant par le centre de l'implant *d'Agaricus Bisporus* selon la formule suivante : $(D1 + D2) / 2$, en précisant le numéro de la boîte et la date d'ensemencement (figure 15)

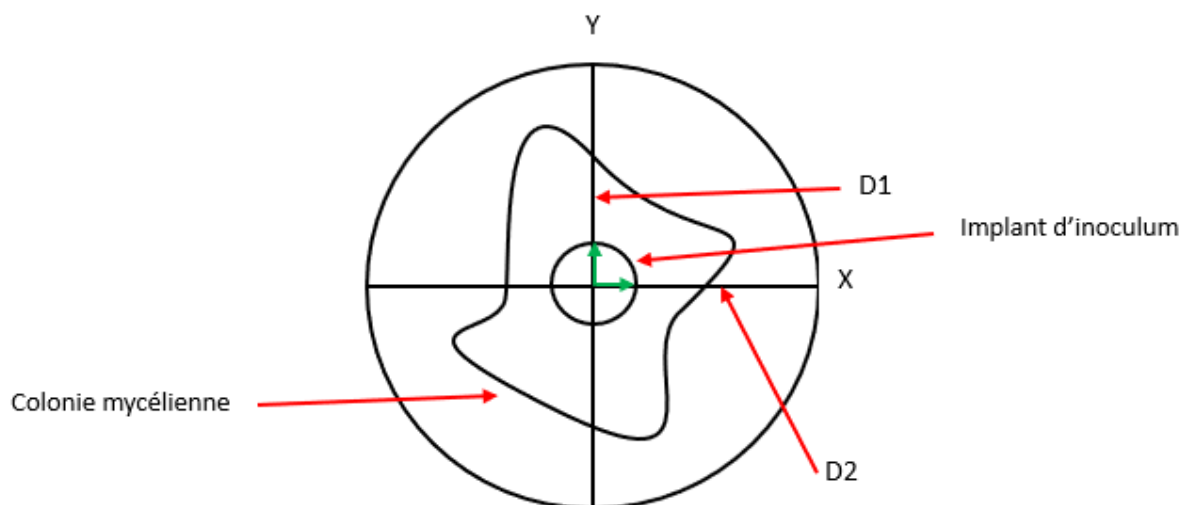


Figure 12: Schéma expliquant la méthode de mesure du diamètre moyen de la colonie mycélienne

4 Essais de Biodégradation du gasoil par *Agaricus bisporus*

Au cours de notre essai de biodégradation du gasoil par *Agaricus bisporus* nous avons testé deux substrats différents et qui sont les suivants : le milieu gélosé PDA et le sol inoculé par des fragments mycéliens d'*Agaricus bisporus*

4-1 Essais de Biodégradation du gasoil par *Agaricus bisporus* sur milieu PDA

Deux doses ont été testées afin d'évaluer la capacité du champignons *Agaricus bisporus* à dégrader le gasoil. Nous avons premièrement testé la dose la plus faible 100µl, ensuite, après des résultats positifs nous avons décidé d'augmenter cette dose à 500µl.

4.1.1. Essai avec 100µl

Nous avons étalé à l'aide d'une micropipette Pasteur 100µl de gasoil sur toute la surface gélosée du milieu PDA contenant l'inoculum d'*Agaricus bisporus* au centre de la boîte de Pétri. Nous avons effectué dix répétitions pour ce test. En parallèle des témoins ont été réalisés (figure 16).

-**Témoin 1** : boîte de Pétri contenant le milieu PDA avec l'inoculum d'*Agaricus bisporus* sans gasoil.

- **Témoin 2** : boîte de Pétri contenant 100µl de gasoil seul sur milieu PDA sans l'inoculum d'*Agaricus bisporus*

-Fermer les boîtes de Pétri avec un film transparent pour éviter toute contamination.

- Incuber les boîtes à 24°C.

4-1-2 Essai avec 500µl de gasoil

Avec une micro pipette on étale 500µl de gasoil dans les 10 boîtes Pétri contenant l'inoculum du champignon *Agaricus bisporus* (figure 16)

13 répétitions ont été réalisées y compris les 3 témoins

Témoins :

-**Témoin 1** : boîte de Pétri contenant le milieu PDA avec l'inoculum d'*Agaricus bisporus* sans gasoil.

- **Témoin 2** : boîte de Pétri contenant le gasoil seul sur le milieu PDA, sans l'inoculum

-Fermer les boîtes de Pétri avec un film transparent pour éviter toute contamination.

- Incuber les boîtes à 24°C

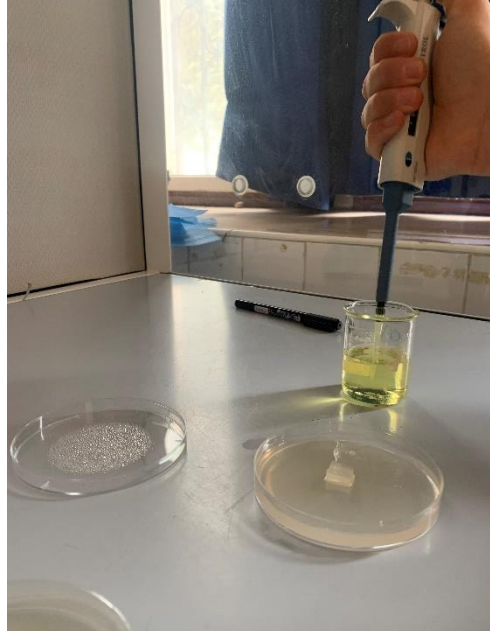


Figure 13: Dispositif expérimental de l'essai de culture de l'inoculum d'*Agaricus bisporus* sur 100µl ou 500µl de gasoil sur milieu PDA

5 Essais dans le Sol

5-1 Essais de Biodégradation du gasoil par *Agaricus bisporus* dans le sol

Deux tests ont été réalisés à fin d'évaluer la capacité du champignons *Agaricus bisporus* à dégrader le gasoil dans le sol à savoir 1% et 2%

Nous avons préparé des flacons en verre contenant 100g de sol stérilisé et humidifié avec 1 ml d'eau stérile et inoculé le sol avec (15,26g) d'inoculum d'*Agaricus bisporus*.

Ensuite nous avons réalisé deux essais :

5-1-1 Essai avec 1% de gasoil

Dans chaque flacon, 1g de gasoil est additionné à 100g de sol inoculé par 15,26g d'inoculum d'*Agaricus bisporus*. Dix répétitions ont été réalisées pour cet essai. Deux témoins sont réalisés en parallèle

Témoin 1: sol sans champignons avec 1g de gasoil (3répétitions)

Témoins 2 : sol inoculé par 15,26g d'inoculum d'*Agaricus* sans gasoil(3répétitions)

Nous avons conservé tous les flacons testés à l'abri de la lumière et à et incubé à une température de 28°C pendant 28 jours et nous agitions les flacons chaque 48 heures pour assurer une répartition homogène du mycélium dans le sol.

5-1-2 Essais avec 2% de gasoil

Dans chaque flacon, 2g de gasoil est additionné à 100g de sol inoculé par 15,26g d'inoculum d'*Agaricus bisporus*. Dix répétitions ont été réalisées pour cet essai. Deux témoins sont réalisés en parallèle

Témoins 1 : sol sans champignons avec 2g de gasoil (3 répétitions)

Témoins 2 : sol inoculé par 15,26g d'inoculum d'*Agaricus* sans gasoil (3 répétitions)

(Figure 17)

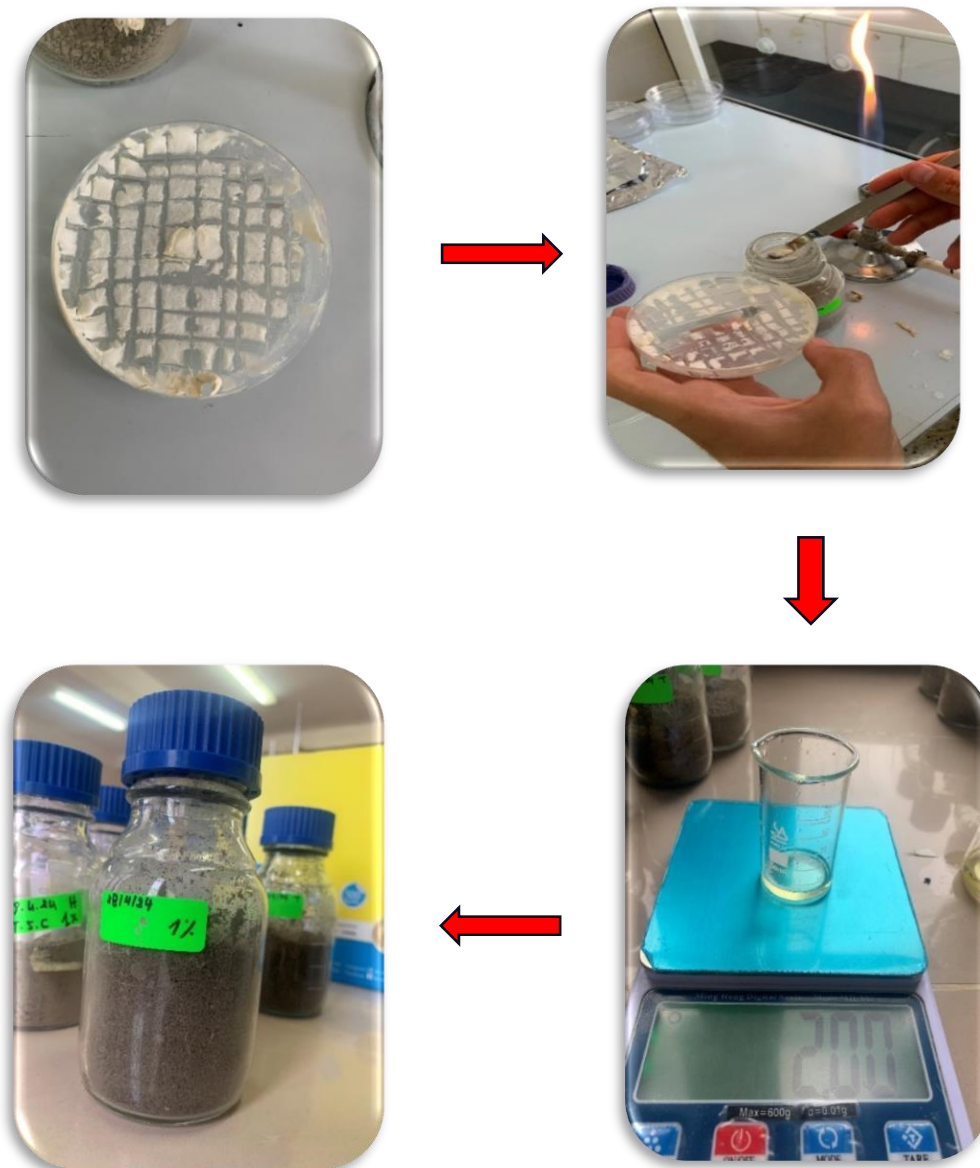


Figure 14 : Essai de la biodégradation de différentes doses gasoil dans le sol avec le champignon *Agaricus bisporus*

5-2 Test respirométrique

Dans des flacons de 250 ml, contenant 100g de chaque sol, deux tubes à hémolyse ont été placés :

- Un tube contenant 5 ml de NaOH à 0,5 N pour fixer le CO₂ dégagé
- Un tube contenant 5 ml d'eau stérile pour maintenir une atmosphère humide du sol dans le flacon.
- Pour chaque sol nous avons réalisé 8 répétitions. Les sols ont été ensuite incubés pendant (donner le nombre exact de jours) à l'obscurité à 28°C (Figure 18)



Figure 15 : Dispositif expérimental du test respirométrique)

Témoins :

Témoin 1 : sol inoculé avec 1% de gasoil.

Témoin 2 : sol inoculé avec 2% de gasoil

Témoin 3 : sol inoculé avec l'inoculum d'*Agaricus bisporus* sans gasoil.

Témoin 4 : flacon de 250 ml contenant uniquement deux tubes à hémolyse. L'un d'entre eux contenant 5 ml de solution mère NaOH à 0,5 Met l'autre 5ml d'eau distillée.

Trois répétitions ont été réalisées pour chaque témoin.

6 Détermination de l'activité biologique

Pour déterminer l'activité biologique nous avons adopté le protocole de Dommergues (1968). Dans le sol inoculé par 15,26g d'*Agaricus bisporus* et les différents témoins nous avons récupéré les tubes à hémolyse de NaOH des différents flacons, ensuite, nous avons procédé au titrage acido-basique

6-1 Titrage du NaOH**a-Préparation de la burette**

Une burette préparée au préalable a été rincée avec de l'eau distillé puis avec la solution titrante HCL à 0,25M. Cette dernière, est ensuite rempli avec la solution titrante HCL, en éliminant toutes les bulles d'air et en ajustant le niveau à 0.

b-Préparation de la solution de chlorure de Baryum

Du Baryum à 20% à partir d'une solution que nous avons préalablement préparé en diluant 20g de baryum dans 100ml d'eau distillée.

c- titrage

Le NaOH contenu dans les tubes à hémolyse est titré par l'acide chloridrique HCL 0,25M en ajoutant trois gouttes de chlorure de Baryum à 20%. La solution deviendra immédiatement blanche en raison de la formation d'un précipité (figure 19), quelques gouttes de phénolphtaléine à 1% ont été ajoutées à la solution blanche, cette dernière va changer de couleur pour devenir rose, indiquant la présence d'une base forte (NaOH). La fin de la titration sera marquée par la disparition de la couleur rose.

La quantité de CO₂ fixée dans chaque échantillon est calculée comme suit :

$$\text{La quantité de CO}_2 \text{ fixée} = (8,6 - V) * 2,2$$

- **8,6** : Cela correspond à la quantité initiale de NaOH (mL) présente avant la fixation du CO₂ par la respiration fongique.
- **V** : C'est le volume d'acide chlorhydrique (HCl) utilisé lors du titrage pour neutraliser l'excès de NaOH qui n'a pas réagi avec le CO₂. Cette valeur est mesurée lors du titrage.

- 2,2 : Ce facteur de conversion permet de transformer la différence de volume (8,6 - V) en une quantité de CO_2 .

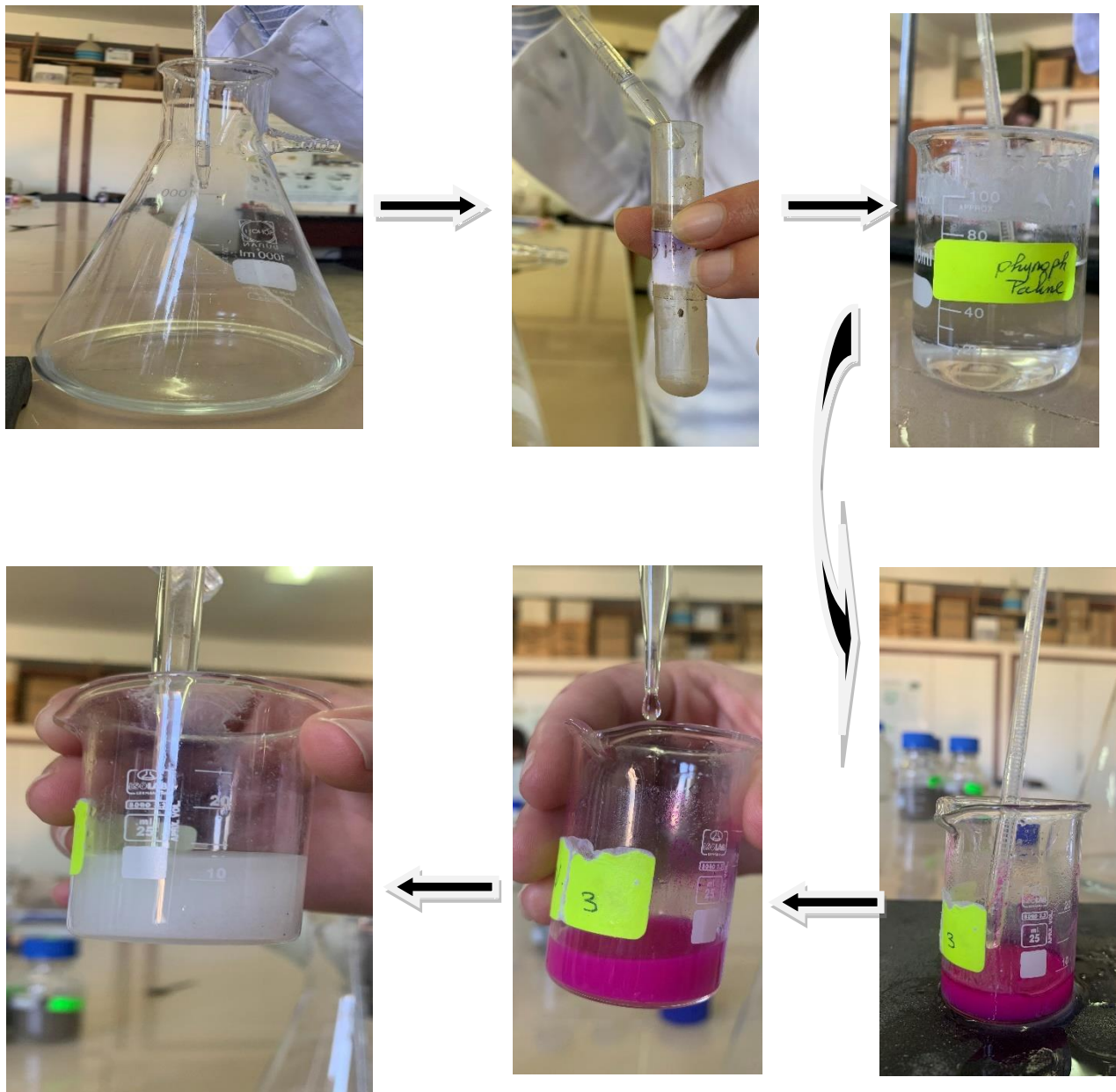


Figure 16 : Titrage du NaOH par le HCL 0, 25M

7 Évaluation de la quantité des hydrocarbures résiduelle dans le sol

Juste après les essais de biodégradation, l'évaluation est effectuée par l'extraction des hydrocarbures contenus dans le sol avec l'hexane, le but de cette évaluation est de déterminer la quantité des hydrocarbures restante dans le sol, autrement dit la capacité du champignon à dégrader les différentes doses de gasoil.

7-1 Protocole

Après avoir séché le contenu des flacons séparément à température ambiante, chaque sol par échantillon est analysé

Echantillons :

SH 2 : Sol sans champignon avec 2% de gasoil

SH 1 : Sol sans champignon avec 1% de gasoil

SCH 2 : Sol avec champignon avec 2% de gasoil

SCH 1 : Sol avec champignon avec 1% de gasoil

SC : sol avec inoculum (témoin positif)

Sol sans champignon sans gasoil : Témoin négatif

7-2 Dosages hydrocarbures résiduels

Nous avons pesés dans des flacons en verre 4g de sol sec de chaque échantillon séparément, ensuite on a ajouté 20ml d'hexane, puis nous avons agité chaque flacon 6h et laissé reposer pendant 30min.

Après agitation, nous avons centrifugé le contenu de chaque flacon à 4500 tour/minute pendant 15 minutes, puis récupéré le surnageant dans des tubes étiquetés pour ne pas confondre, ensuite on a fait passer chaque tube au spectrophotomètre dans 16 longueurs d'ondes à deux reprises (195, 200, 205, 210, 220, 227, 229, 236, 238, 241, 251, 256, 268, 286, 297, 300), premièrement nous avons utilisé l'hexane comme blanc, puis le gasoil dissous dans l'hexane (Figure 22).

Enfin pour calculer la quantité des hydrocarbures résiduels, nous avons versé le surnageant de chaque tube dans des boîtes de Pétri en verre pré-pesées et étiquetées. Après évaporation du surnageant, les quantités d'hydrocarbures extraites sont pesées à l'aide d'une balance de précision.

La quantité des hydrocarbures résiduels = poids des boîtes après évaporation - poids des boîtes pré-pesées

8-Méthodes d'analyse statistique :

Le traitement des résultats obtenus a été réalisé avec le logiciel R.3.3.4. Les résultats obtenus sont soumis au test non paramétrique de Kruskal Wallis car la normalité n'est pas vérifiée, il est suivi par une comparaison des moyennes des rangs lorsque la différence est significative, hautement ou très hautement significative.

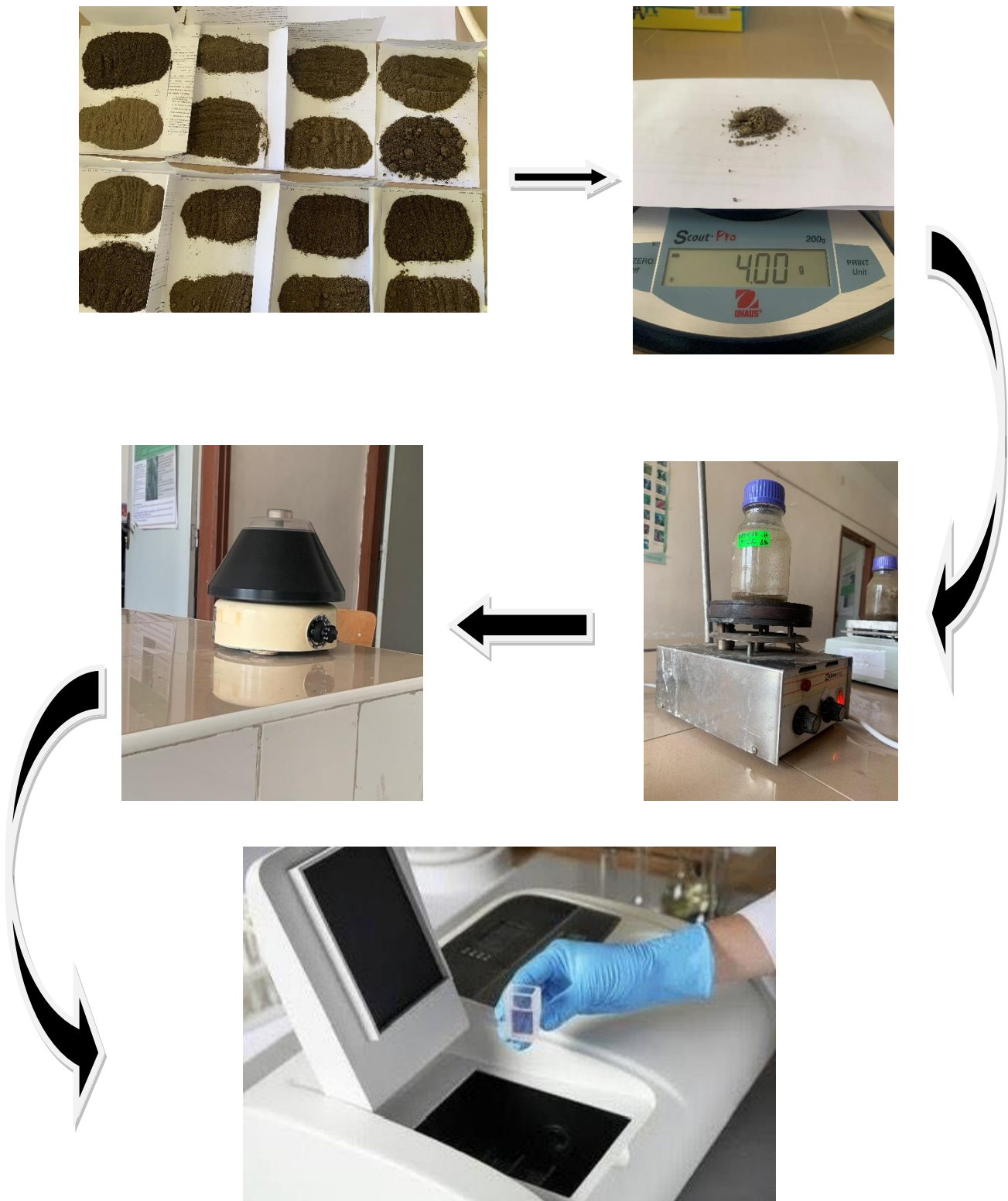


Figure 17 : Évaluation de la quantité des hydrocarbures résiduels dans le sol

1. Essais de Biodégradation du gasoil par *Agaricus bisporus*

1.1 Evaluation de la croissance mycélienne moyenne d'*Agaricus bisporus* sur milieu PDA (témoin)

Les résultats de la figure 18, révèlent que le témoin (sans gasoil) présente une croissance mycélienne moyenne de l'ordre de 2,51cm après 24heures d'incubation. Cette dernière augmente à 7,42 cm à 96 heures d'incubation et devient maximale après 120heures d'incubation où le mycélium d'*Agaricus bisporus* envahit toute la surface du milieu PDA contenu dans boîte de Pétri.

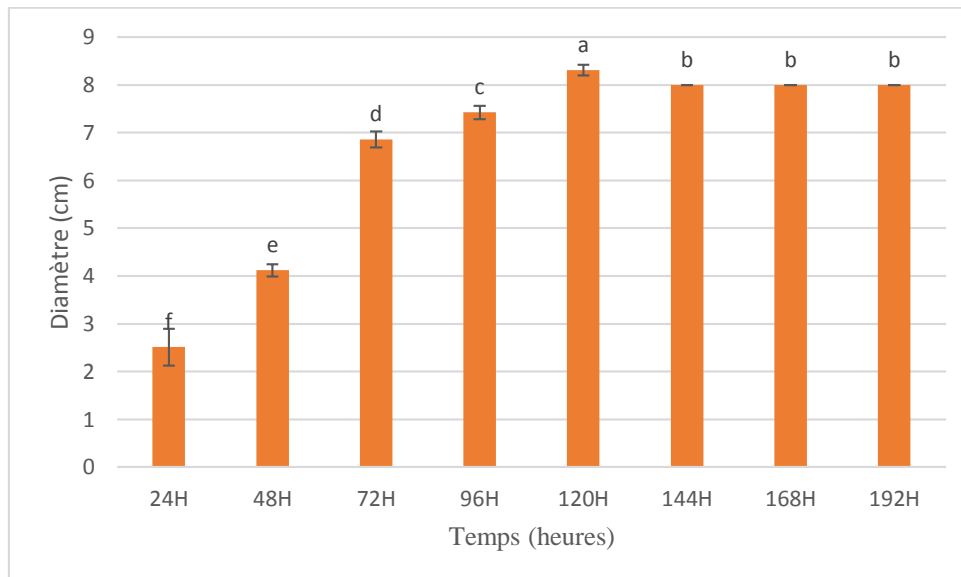


Figure 18 : Diamètre moyen des colonies mycélienne d'*Agaricus bisporus* en fonction de temps

L'analyse statistique des résultats révèle une différence très hautement significative pour le facteur temps du témoin ($P = 1,28 \cdot 10^{-13}$). Le test de Kruskal-Wallis classe le facteur temps en six groupes homogènes qui sont les suivants : (a), (b), (c), (d), (e) et (f) (Annexe 1)

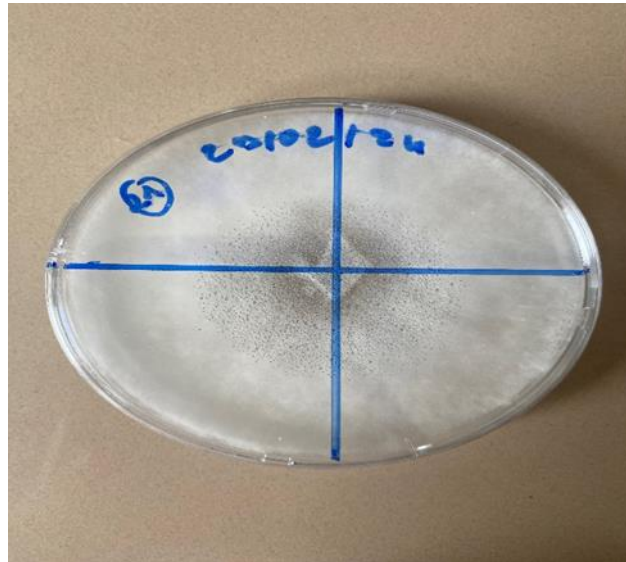


Figure 19 : croissance mycélienne d'*Agaricus bisporus* sur la boîte de pétri après 192h sur milieu PDA (Originale, 2024)

1.2 Croissance mycélienne d'*Agaricus bisporus* sur milieu PDA en présence du gasoil

a-Essai avec 100 μ l

Les résultats de la figure 20, révèlent que ce n'est qu'après 48 heures d'incubation que nous avons enregistré le diamètre moyen le plus faible des colonies mycélienne d'*Agaricus bisporus* qui est de l'ordre de 2,19cm. Par contre, ce diamètre moyen des colonies mycéliennes devient maximal à partir de 168 heures d'incubation qui est de l'ordre de 8 cm et le mycélium envahi toute la surface gélosée de la boîte de Pétri.(figure 26)

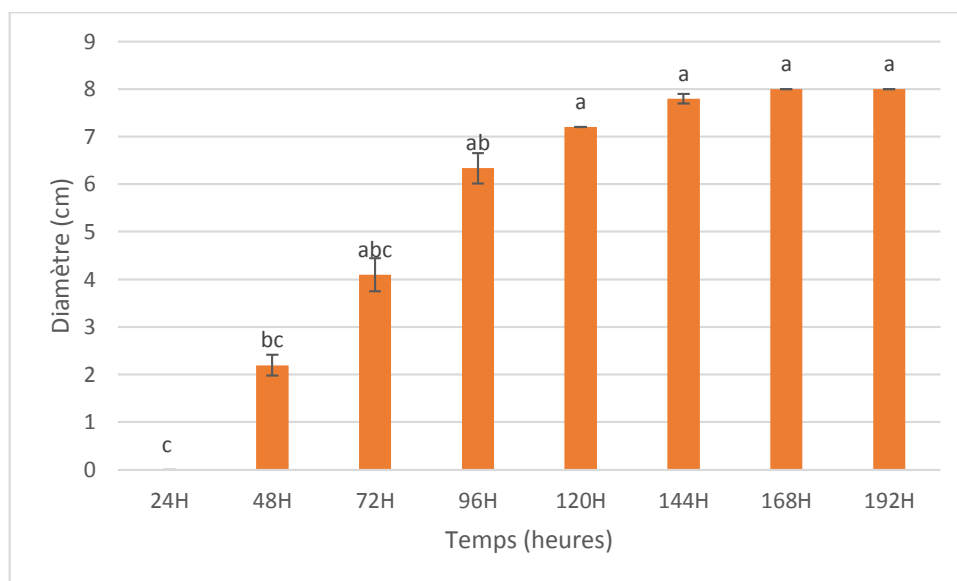


Figure 20 :Diamètre moyen des colonies mycélienne d'*Agaricus bisporus* sur milieu PDA additionné de 100 μ l de gasoil

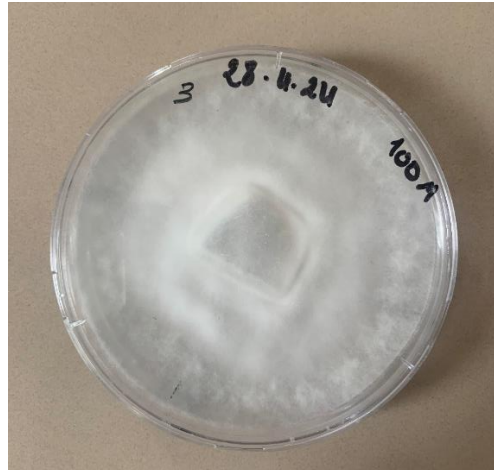


Figure 21 : Croissance mycélienne d'*Agaricus bisporus* sur la boîte de pétri après 168H sur 100 µl de gasoil

b-Essai avec 500µl

Les résultats de la figure 22, révèlent que ce n'est qu'après 192 heures d'incubation que nous avons enregistré une faible croissance mycélienne car le diamètre moyen le plus faible des colonies d'*Agaricus bisporus* est de l'ordre de 0,4cm. Par contre, ce diamètre moyen des colonies mycéliennes devient maximal à partir de 264 heures d'incubation qui est de l'ordre de 1,5 cm. (figure 28)

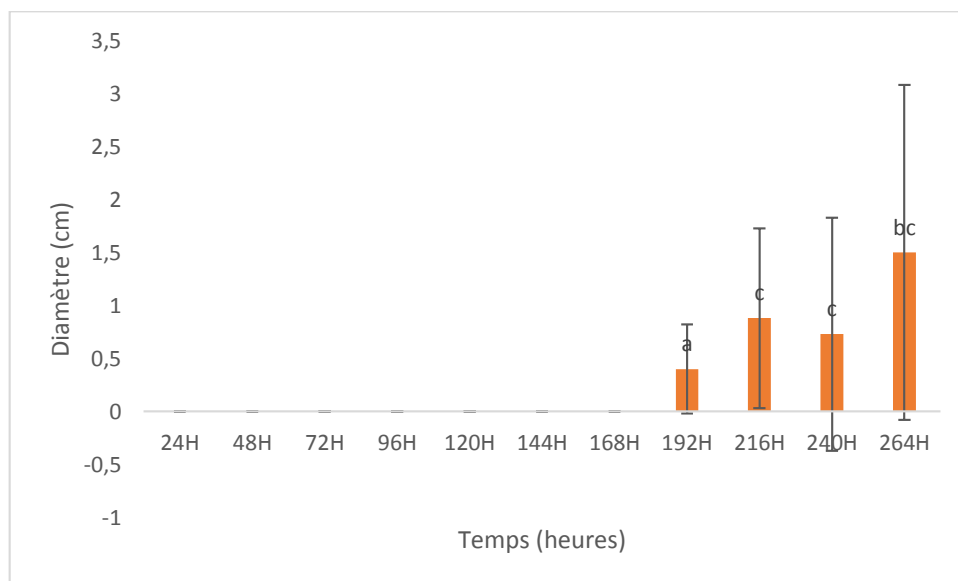


Figure 22 : Diamètre moyen des colonies mycéliennes d'*Agaricus bisporus* sur milieuPDA additionné de 500µl de gasoil

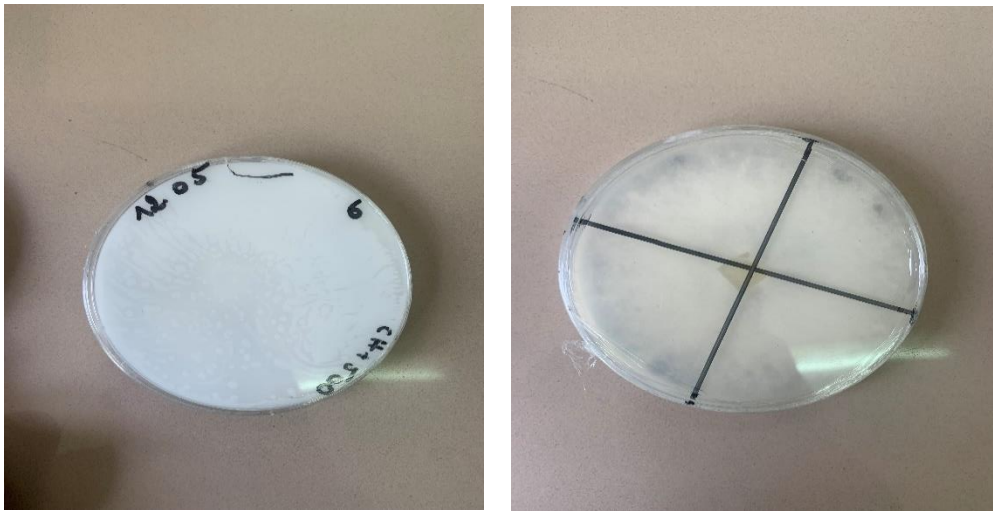


Figure 23 : Croissance mycélienne d'*Agaricus bisporus* sur la boîte de pétri après 264h sur 500 μ l de gasoil

L'analyse statistique des résultats révèle une différence très hautement significative pour le facteur temps ($P = 8,11 \cdot 10^{-11}$) que ce soit sur 100 ou 500 μ l de gasoil et pour le témoin.

Le test de Kruskal-Wallis classe le facteur temps pour les traitements sur gasoil en cinq groupes homogènes qui sont les suivants : (a), (ab), (abc), (bc) et (c).

L'analyse statistique des résultats révèle une différence très hautement significative aussi pour le facteur traitement. Les trois traitements à savoir la croissance mycélienne sur 100 μ l de gasoil (CH100), sur 500 μ l de gasoil (CH500) et le témoin (CH) révèlent une différence très hautement significative ($P = 2,2 \cdot 10^{-16}$). Le test de Kruskal-Wallis classe le facteur traitement en trois groupes homogènes qui sont les suivants : (a), (b) et (c)(Annexe2)

c-Comparaison de la croissance mycélienne moyenne d'*Agaricus bisporus* entre les trois traitements

D'après les résultats de la figure 24 on voit clairement que la croissance mycélienne est supérieure chez le témoin CH et le traitement CH100 où leur croissance mycélienne est de l'ordre de 8,3 et 7,2 cm respectivement après 120heures d'incubation. Par contre, la croissance mycélienne est absente sur le traitement CH500 et ce n'est qu'après 192 heures d'incubation que nous nous avons enregistré une reprise d'activité de la croissance mycélienne d'un diamètre moyen de 0,4 cm et qui augmente à 1,5 cm après 264heures d'incubation.

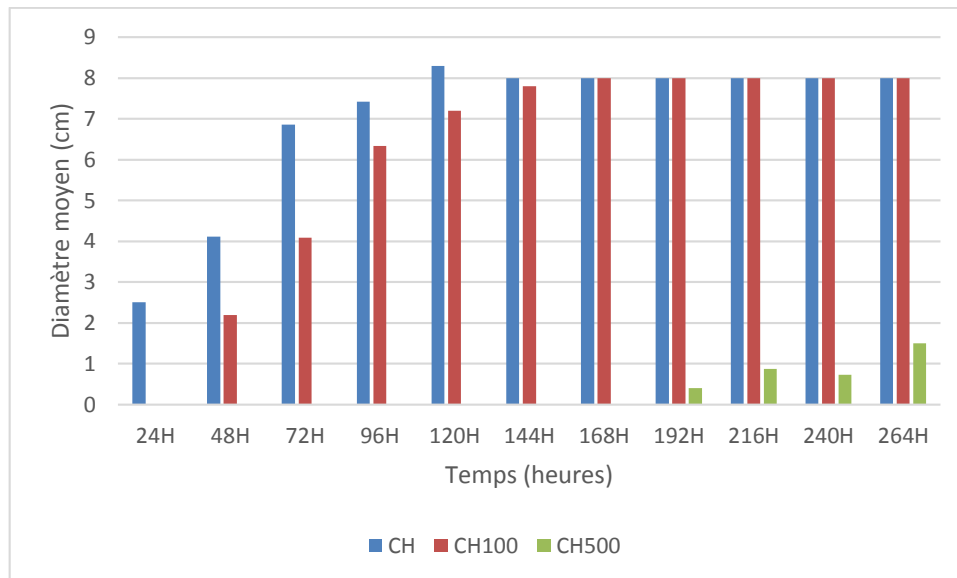


Figure 24 : Croissance mycélienne moyenne diamétrale (cm) d'*Agaricus bisporus* sur les trois traitements en fonction du temps

4 Essais de biodégradation du gasoil à 1% et 2% par *Agaricus bisporus* dans le sol

Nous avons évalué la biodégradation du gasoil à 1% et 2% dans le sol par la mesure de la quantité de CO₂ cumulée (test respirométrique), par le poids des hydrocarbures et la détermination de leur composition en HAP.

4-1 Mesure de la quantité de CO₂ cumulée des différents traitements

Selon les résultats de la figure 25, la quantité de CO₂ cumulée dans le traitement SCH2 (sol contaminé avec 2% de gasoil et avec inoculum) est maximale, elle est de l'ordre de 17,82g. Elle est suivie par le traitement SCH1 (sol contaminé avec 1% de gasoil et avec inoculum) qui présente une quantité de CO₂ de l'ordre de 16,06g. Tandis que le traitement SC (sol inoculé uniquement avec le champignon) présente une quantité de 14,96 g de CO₂.

En dernier, les deux traitements SH1, SH2 (sols contaminés par le gasoil à 1% et sols contaminés par le gasoil à 2% et sans inoculum) présentent une quantité faible de CO₂ cumulé qui est respectivement de l'ordre de 2,86 et 1,98 g.

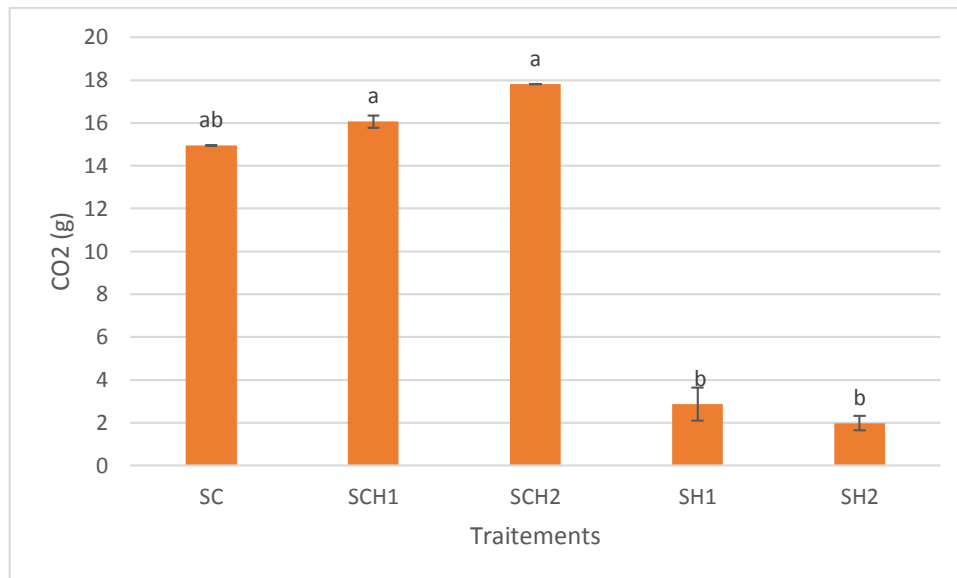


Figure 25 : Quantité de CO₂ cumulé en fonction des différents traitements

Les résultats de l'analyse statistique indiquent une différence significative entre les quantités de CO₂ cumulées (p -value = 0,02042) en fonction des différents traitements étudiés (SC, SCH1, SCH2, SH1, SH2) (Voir annexe 3)

Le test de Kruskal-Wallis classe les différents traitements selon les groupes suivants :

Les traitements SCH1, SCH2 appartiennent au groupe (a), car ils présentent les quantités moyennes en CO₂ les plus élevées. Le traitement SC appartient au groupe (ab), il est suivi par les deux traitements SH1, SH2 qui appartiennent au groupe (b), ces derniers représentent une respiration fongique la plus faible.

4-2 Poids résiduel du carburant

Les résultats de la figure 26, révèlent que le traitement SH1 (sol avec 1% de gasoil sans inoculum) a présenté la quantité la plus élevée qui est de l'ordre de 22mg de résidus d'hydrocarbures après évaporation du solvant. Il est suivi par le traitement SH2 (sol avec 2% de gasoil sans inoculum) qui a présenté une quantité de l'ordre de 7 mg. Par contre, le traitement SCH1 (sol avec 1% de gasoil avec inoculum) a présenté une quantité faible de 2 mg d'hydrocarbure résiduel. Cette dernière diminue à 1g pour le témoin SC et le traitement SCH2 (sol avec 2% de gasoil avec inoculum).

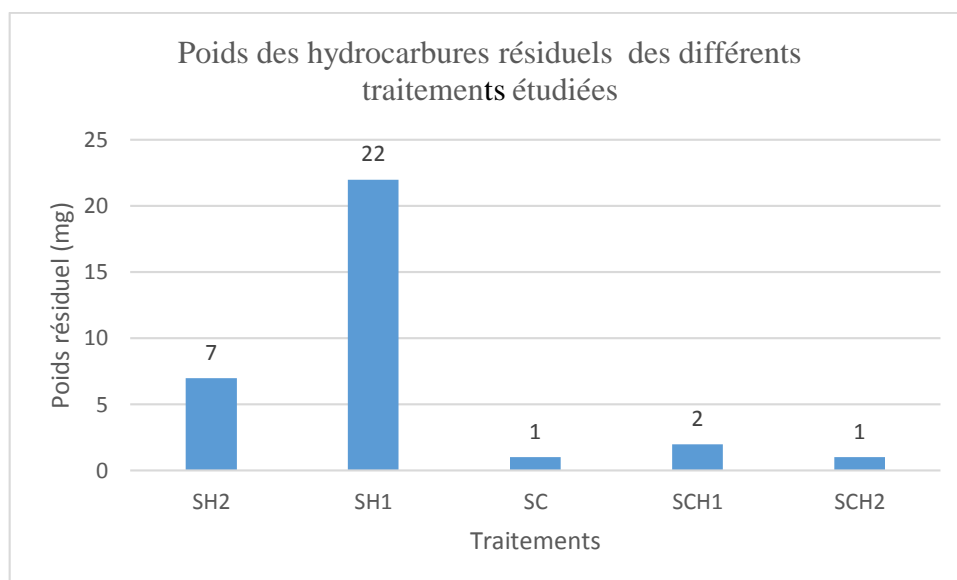


Figure 26 : Poids des hydrocarbures résiduels des différents traitements étudiés

5 Etude qualitative des hydrocarbures

L'analyse des HAP résiduels dans le sol a fait ressortir des variations dans leur composition

Les résultats du tableau 4 révèlent que le traitement SH2 a présenté l'absorbance la plus élevée pour le composé Benzène de l'ordre de 4. Par contre, que cette dernière est nulle pour le reste des traitements à savoir le SH1, Témoin (SC), SCH1, SCH2 et le Gasoil. Pour le Fluorène l'absorbance est nulle pour l'ensemble des traitements. Le Benzo[g,h,i]pérylène a présenté l'absorbance la plus élevée pour les traitements SH1 et SH2 de l'ordre de 4, alors qu'elle est nulle pour le reste des traitements. Le traitement SH2 présente les valeurs les plus élevées pour les composés Naphtalène et Acénaphène de l'ordre de 0,172. L'Acénaphylène a présenté l'absorbance la plus élevée pour l'échantillons SH1 et le témoin SC de l'ordre de 0,654 pour les deux.

D'une manière générale la quantité des composés comme (Fluoranthène, Benzo[k]fluoranthène, Pyrène, Phénanthrène, Anthracène, Indéno[1,2,3-c,d]pyrène, Benzo[b]fluoranthène, Benzo[a]anthracène, Benzo[a]pyrène, Dibenz[a,h]anthracène) sont plus élevées pour le traitement SCH2 et elle varie entre 0,5 et 3,8 pour le reste des traitements. Concernant le Chrysène l'absorbance la plus élevée est enregistrée avec le traitement SH1 qui est de l'ordre de 3,7115.

Tableau 4: Tableau des absorbances les plus élevés des HAP pour les différents traitements.

HAP	Nb de cycles aromatiques	LO (nm)	SH1	SH2	SC	SCH1	SCH2	Gasoil dans l'hexane
Benzène	1	200	0	4	0	0	0	0
Fluorène	2	205	0	0	0	0	0	0
Benzo[g,h,i]pérylène	6	210	4	4	0	0	0,157	0
Naphtalène	2	220	0	0,172	0	0	0	0
Acénaphène	2	227	0,1	0,172	0,021	0,059	0,059	0
Acénaphthylène	2	229	0,654	0,603	0,654	0,515	0,244	0
Fluoranthène	3	236	0,709	0,348	0,057	0,574	0,9945	0
Benzo[k]fluoranthène	4	238	2,299	2,255	2,0565	1,9645	3,2005	0,405
Pyrène	4	241	2,5025	2,3795	2,151	1,9035	3,2425	0,692
Phénanthrène	2							
Anthracène	3							
Indéno[1,2,3-c,d]pyrène	6	251	3,324	2,645	2,8415	2,409	3,783	1,045
Benzo[b]fluoranthène	4	256	3,562	2,593	3,0855	2,5765	3,854	1,105
Chrysène	4	268	3,7115	2,2145	3,186	2,466	3,487	1,171
Benzo[a]anthracène	4	286	1,7055	1,7185	1,6355	1,5945	1,922	1,432
Benzo[a]pyrène	5	297	1,5235	1,596	1,5345	1,537	1,704	1,653
Dibenzo[a,h]anthracène	5	300	1,4845	1,5555	1,5065	1,512	1,646	1,689

6 Discussion

Nos résultats nous ont permis de constater que la croissance mycélienne sur le milieu PDA est bien plus élevée chez le témoin (sans gasoil). Ceci est due à la capacité du mycélium d'*Agaricus bisporus* à couvrir entièrement la surface du milieu de culture après 120heures d'incubation, et ceci démontre son potentiel de colonisation et de dégradation des substrats organiques. Ces résultats prouvent aussi que le milieu de culture PDA est favorable à la croissance mycélienne (Mondo et al., 2016) en l'absence du gasoil contrairement à sa présence. Les hydrocarbures sont donc toxiques pour la croissance mycélienne(Singh, 2006)

6.1 Essai avec 100 ul et 500ul de gasoil

Les résultats ont montré qu'à 100ul de gasoil la croissance mycélienne est proche de celle du témoin. Ainsi, nous avons constaté que le champignon dégrade le gasoil à faibles doses. Tandis qu'à la dose la plus élevée 500ul la croissance mycélienne était inhibée. Le mycélium d'*Agaricus bisporus* avait besoin d'un temps d'adaptation à la concentration élevée de carburant, car ce n'est qu'après 8 jours d'incubation qu'il y a eu une reprise de la croissance mycélienne.

Le développement assez rapide du mycélium en présence de 100ul de gasoil peut s'expliquer par sa faible teneur en HAPs et en BTEX, sa richesse en molécules de carbone et d'azote accessibles au champignon. Le gasoil contient des hydrocarbures de type n-alcanes de 12 à 22 atomes de carbones (Anonyme, 2000c) considérés comme les composés les plus facilement biodégradables et les moins toxiques .

Le gasoil renferme une petite quantité d'eau (traces) qui favorise le développement de micro-organismes comme les levures, les bactéries et les moisissures qui trouvent les conditions idéales pour se développer dans l'interface carburant/eau (Botton et al., 1990).

En outre, les champignons ligninolytiques ont été largement étudiés ces dernières années (Haritash et Kaushik, 2009) car ils produisent des enzymes extracellulaires (peroxydase (LiP), peroxydase Mn-dépendante (MnP), phénol oxydase (laccase, tyrosinase) avec une spécificité de substrat extrêmement réduite. Cela a évolué en raison de la structure irrégulière de la lignine, mais a également entraîné la capacité de dégrader et de minéraliser divers organopolluants (Hatakka, 1994 ; Vyas et coll., 1994 ; Hammel, 1995).

Des recherches récentes ont montré que les peroxydases extracellulaires de ces champignons sont responsables de l'oxydation initiale des HAP (Acevedo et al., 2011, Paris, 2012 ; Li et coll., 2014, Zhanget coll., 2015).

Les peroxydases de lignine fongiques oxydent un certain nombre de HAP directement, tandis que les peroxydases fongiques de manganèse les co-oxydent indirectement par peroxydation de la lignine médiée par des enzymes.

6.2 Essais de biodégradation du gasoil à 1% et 2% par *Agaricus bisporus* dans le sol

Le rapport des analyses du sol révèle que le sol contient 1.78% de carbone total et 3.07% de matière organique. Ce qui indique que ce dernier est riche en matière organique. Il fournit les nutriments essentiels pour la croissance du champignon *Agaricus bisporus*, favorisant ainsi la biodégradation du gasoil. La présence de matière organique enrichit le sol en nutriments, soutenant une activité fongique diverse et active, ce qui augmente le taux de biodégradation. La quantité d'inoculum est également importante car une quantité élevée peut accélérer la biodégradation,

La granulométrie indique une texture limon argilo-sableux avec 31.45% d'argile, 52.308% de limon et 18.384% de sable, créant une bonne rétention d'eau et une circulation adéquate de l'air, conditions idéales pour l'activité fongique. La texture du sol, déterminée par la proportion de sable, de limon et d'argile, affecte également la biodégradation : les sols sableux, avec une meilleure porosité, favorisent la circulation de l'air et de l'eau, alors que les sols argileux peuvent retenir les hydrocarbures, limitant leur disponibilité pour les micro-organismes. La porosité du sol, influençant l'aération et la disponibilité en eau, est essentielle, car un sol bien aéré avec une porosité adéquate permet une meilleure activité microbienne.

De plus, le sol contient 0.35% d'azote, apportant un nutriment crucial pour le champignon de la pourriture blanche *Agaricus bisporus*. Ces caractéristiques combinées, notamment la

richesse en carbone, en azote et la texture favorable, rendent le sol particulièrement adapté à la biodégradation efficace des hydrocarbures par *Agaricus bisporus*.

Le pH du sol est de l'ordre de 7,23, il joue un rôle crucial pour la croissance fongique, car la plupart des champignons de la pourriture blanche dégradant les hydrocarbures préfèrent un pH neutre à légèrement alcalin, tandis qu'un sol trop acide ou basique peut inhiber leur activité. Gerrits (1988) et Runker (1993), ont rapporté que le pH de 7,5 était utilisé dans le substrat pour *Agaricus bisporus* sur culture.

La stérilisation du sol est généralement utilisée lors des études de biodégradation dans le cadre d'expériences en laboratoire afin d'éliminer les microorganismes compétitifs avec le champignon étudié *Agaricus bisporus* présents dans le sol et garantir une capacité de dégradation élevée. Cette stérilisation du sol n'est pas appliquée dans le domaine de la bioremédiation ex situ. Des études ont décrit les effets de la stérilisation des sols sur la vitesse de biodégradation des hydrocarbures ; Northcott et Jones (2001) ; Nam et coll (2003), ; Kelsey et coll (2010) ; Wang et colin (2014) ont observé que la stérilisation augmentait la dégradation du pyrène en raison de la suppression de la compétition des microbes indigènes.

Les résultats du test respirométrique dans le sol, mettent en évidence la quantité de CO₂ cumulée des différents traitements à savoir, avec ou sans gasoil, inoculés ou non par des fragments mycéliens d'*Agaricus bisporus*. Cette production de CO₂ est un indicateur clé de la respiration fongique et de l'activité métabolique et elle varie de manière significative en fonction des différents traitements étudiés.

Les traitements SCH2 et SCH1 avec des sols contaminés à 2% et 1% de gasoil respectivement et inoculés par des fragments mycéliens d'*Agaricus bisporus*, ont montré une production des quantités les plus élevées de CO₂ cumulées. SCH2 produit 17,82 g de CO₂ et SCH1 en produit 16,06 g. Ces résultats suggèrent que la présence de gasoil stimule la respiration fongique lorsque le champignon est également présent, peut-être en raison de l'utilisation du gasoil comme source de carbone par le champignon (Jové et al., 2016).

L'utilisation de xénobiotiques comme substrats peut induire l'activité enzymatique (Lee et coll, 2014). Cette technique est réalisable pour les espèces fongiques qui produisent des enzymes ligninolytiques comme les champignons de la pourriture blanche avec une plus grande efficacité, telles que les champignons basidiomycètes suivants : *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Bjerkandera adusta* (Novotny et al., 2004)

En comparant le traitement SC (sol inoculé uniquement avec le champignon) par rapport aux traitements précédents, ce dernier présente une quantité de CO₂ de 14,96 g. Bien que ce soit une quantité significative, elle est inférieure à celle observée dans les traitements contenant du gasoil. Cela indique que le champignon *Agaricus bisporus* produit du CO₂ principalement par la dégradation des composants organiques présents dans le sol.

Les traitements SH1 et SH2, où les sols sont contaminés par 1% et 2% de gasoil respectivement, mais sans inoculum fongique, montrent des quantités de CO₂ beaucoup plus faibles, à savoir 2,86 g et 1,98 g. L'origine de cette faible quantité de CO₂ pourrait s'expliquer par une erreur de manipulation lors du titrage du NaOH par le HCL. La comparaison des résultats obtenus avec les sols pollués inoculés à savoir, les deux traitements SCH2 et SCH1

et pollués non inoculé à savoir, SH1 et SH2 mettent en évidence l'importance de la présence de l'inoculum du champignon *Agaricus bisporus* dans le sol pour la dégradation du gasoil.

Les résultats du poids résiduel des hydrocarbures après évaporation du solvant utilisé lors de l'extraction à savoir l'hexane, mettent en évidence la quantité d'hydrocarbures dégradés en fonction des différents traitements à savoir, avec ou sans gasoil, inoculés ou non par des fragments mycéliens d'*Agaricus bisporus*. Cette quantité d'hydrocarbures résiduels (mg) nous renseigne sur la quantité de gasoil dégradé dans 100g de sol à partir du poids initial du carburant à savoir 1 et 2 g de gasoil pour les différents traitements. En effet, c'est un indicateur clé de l'activité fongique et de la dégradation du gasoil par *Agaricus bisporus* elle varie de manière significative en fonction des différents traitements étudiés.

Le traitement SH1 (sol avec 1% de gasoil sans inoculum) présente la plus grande quantité de résidus d'hydrocarbures, atteignant 22 mg après évaporation du solvant. Cela indique une dégradation limitée des hydrocarbures en l'absence d'inoculum d'*Agaricus bisporus*. Il est suivi par le traitement SH2 (sol avec 2% de gasoil sans inoculum) avec une quantité de 7 mg de résidus. L'augmentation de la concentration de gasoil pourrait conduire à une auto-inhibition partielle de la biodégradation.

En revanche, les traitements avec inoculum montrent des résultats bien plus prometteurs. Le traitement SCH1 (sol avec 1% de gasoil, avec inoculum) présente seulement 2 mg d'hydrocarbures résiduels, indiquant une biodégradation efficace grâce à l'ajout de l'inoculum d'*Agaricus bisporus*. Cette réduction substantielle des résidus d'hydrocarbures dans les sols inoculés souligne l'importance de l'ajout du champignon d'*Agaricus bisporus* pour accélérer le processus de biodégradation des hydrocarbures.

Nous avons aussi, constaté que le témoin SC (sol sans gasoil avec inoculum) présente une quantité d'hydrocarbure résiduel de 1 mg bien que nous n'ayons pas mis de carburants dans le sol. Cela pourrait s'expliquer d'une contamination accidentelle du sol lors des manipulations au laboratoire ou bien dans le site de prélèvement ou de dépôts atmosphérique.

Les résultats de tableau 5 indiquent que la présence des HAPs dans le sol varie en fonction des traitements appliqués, notamment en présence ou en absence d'inoculum et de différentes concentrations de gasoil.

L'absorbance observée dans cette étude est utilisée comme indice de biodégradation des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) dans le sol

Dans le Traitement SH2 (sol avec 2% de gasoil sans inoculum) :

Le Benzène, le Benzo[g,h,i]pérylène, le Naphtalène, l'Acénaphène, Acénaphylène, et Fluoranthène présente des absorbances élevées. Elle varie de 0,603 pour Acénaphylène, 0,343 pour le Fluoranthène à 4 pour le Benzène et le Benzo[g,h,i]pérylène. Ces HAP seraient probablement déjà présents dans le sol prélevé car leur absorbance est nulle dans le blanc (gasoil dilué dans l'hexane). Pour d'autres composés comme le Fluorène, son absorbance est nulle dans tous les traitements testés, ce qui signifie que ce type de HAP est absent dans le gasoil.

Le traitement SH1 (sol avec 1% de gasoil sans inoculum) : Montre une absorbance significative pour le Benzo[g,h,i]pérylène et l'Acénaphylène, sachant que ces dernier

n'existent pas dans le blanc, cela indique que ces derniers existaient déjà dans le sol préalablement contaminé par des dépôts atmosphériques.

Le témoin (SC) (sol avec inoculum sans gasoil) présente les différents HAP suivants : Acénaphthalène, Acénaphthylène, Fluoranthène, Benzo[k]fluoranthène, pyrène, Phénanthrène, Anthracène, indéno[1,2,3-c, d] pyrène, Benzo[b]fluoranthène, Chrysène, Benzo[a]anthracène, Benzo[a]pyrène, Dibenzo[a, h]anthracène. Leurs présences ne peuvent s'expliquer que par l'hypothèse suivante : est que le sol ait déjà été contaminé par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) qui peuvent provenir de sources telles que des débris organiques en décomposition ou des phénomènes environnementaux naturels (par exemple, la combustion de matière organique, les incendies de forêt, etc.).

Les traitements SCH1 et SCH2 (sol avec 1% et 2% de gasoil avec inoculum) montrent des absorbances plus élevées pour plusieurs HAPs tels que Fluoranthène, Benzo[k]fluoranthène, Pyrène, Phénanthrène, Anthracène, Indéno[1,2,3-c,d]pyrène, Benzo[b]fluoranthène, Benzo[a]anthracène, Benzo[a]pyrène, Dibenzo[a,h]anthracène, chrysène.

Nous avons aussi constaté que l'absorbance des HAP suivants, Phénanthrène, Anthracène, indéno[1,2,3-c, d] pyrène, Benzo[b]fluoranthène, Chrysène, Benzo[a]anthracène, Benzo[a]pyrène, Dibenzo[a, h]anthracène a augmenté par rapport à leur absorbance dans le blanc qui est un mélange de gasoil dilué dans de l'hexane. Ces résultats montrent que les absorbances élevées des HAP des deux traitements SCH1 et SCH2 sont soit les résultats de la biodégradation de certains HAP en métabolites secondaires ou soit ils sont déjà présents dans le sol qui était contaminé auparavant par des HAP. Cela pourrait être confirmé par l'exemple du Benzo [g,h,i] pérylène absent dans le gasoil et qui apparaît dans le traitement SCH2 avec une absorbance de 0,157. De même, les HAP suivants Acénaphthène, Acénaphthylène, Fluoranthène absents dans le blanc (gasoil dilué dans l'hexane) et qui apparaissent les deux traitements SCH1 et SCH2 avec des absorbances allant de 0,059 à 0,9945.

Ces observations sont cruciales pour comprendre les interactions entre les contaminants hydrocarbures et les champignons dans les sols. Les résultats montrent le potentiel des champignons, comme *Agaricus bisporus*, pour la bioremédiation des sols contaminés par le gasoil, en raison de leur capacité à dégrader certains HAP.

Boyle et coll. (1998) ont montré que les champignons de la pourriture blanche dégradent dans le sol des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Bogan et Lamar (1995) ; Novotny et al. (2004), révèlent que les champignons de la pourriture blanche dégradent une large gamme de HAP, notamment le phénanthrène, le fluorène, le benzofluorène, l'anthracène, le fluoranthène, le pyrène, le benzo[a]anthracène et le benzo[a]pyrène

En outre, les enzymes lignolytiques des champignons de la pourriture blanche ne sont pas spécifiques car elles peuvent dégrader certains HAPs (Hammel et coll., 1991), (Schutzendubel et al. 1999), par exemple, la laccase de *Trametes versicolor* peut dégrader des HAP comme le benzo[a]pyrène mais est moins efficace sur les hydrocarbures linéaires comme le décane. De même, la manganèse peroxydase (MnP) de *Phanerochaete chrysosporium* peut dégrader le chrysène, mais montre peu d'activité sur des composés tels que l'hexane ou certains organochlorés (Pointing, S.B., 2001), (Bogan, B.W., et Lamar, R.T., 1996)

Conclusion générale

Au terme de notre travail nous concluons que le champignon *Agaricus bisporus* est capable de dégrader le gasoil à faibles doses à savoir 100 et 500 µl, bien qu'à des doses relativement élevées, le champignon a besoin d'un temps d'adaptation pour une reprise de la croissance mycélienne et la dégradation du gasoil. Les teneurs les plus élevées en hydrocarbures (500µl) demandent plus de temps pour être éliminées contrairement aux plus faibles. De même, nous concluons que les doses élevées du précédent carburant sont toxiques pour la croissance mycélienne et dans certains cas, cette dernière est inhibée.

Le milieu de culture PDA est un milieu favorable à la croissance mycélienne d' *Agaricus bisporus* car la croissance mycélienne est maximale au bout de 96 heures dans les boîtes de Pétri.

De ce fait, l'inoculum d' *Agaricus bisporus* s'avère prometteur dans la bioremédiation d'un sol pollué par les hydrocarbures. Il a permis de mettre en exergue l'efficacité des champignons de la pourriture blanche afin d'éliminer les hydrocarbures contenus dans les sols pollués.

Nous avons étudié la biodégradation du gasoil dans le sol à différentes concentrations à savoir 1 et 2%. Le suivi dans le temps, nous a renseigné sur l'efficacité de son élimination à travers les différents traitements réalisés.

En un premier temps, l'étude physico-chimique du sol testé révèle qu'il est riche en matière organique 3,07% et en azote organique 0,35%. Ces deux facteurs sont indispensables à la croissance et à la stimulation de l'activité fongique dans le sol et favorisent ainsi la dégradation du gasoil par *Agaricus bisporus*. De ce fait, il a été révélé qu' *Agaricus bisporus* est efficace pour la biodégradation des sols pollués aux hydrocarbures en présence de carbone et d'azote dans le sol (stimulation biologique).

Le pH du sol est crucial pour la bioremédiation des sols pollués par le gasoil car il influence profondément l'activité d' *Agaricus bisporus* dégradant ce contaminant. La valeur du pH de notre sol est de 7.23

De plus, un sol limono-argileux sableux est essentiel pour la bioremédiation des sols pollués par le gasoil en raison de sa texture qui permet une bonne aération et une rétention d'eau modérée. Ces caractéristiques favorisent l'activité d' *Agaricus bisporus*, facilitant ainsi la décomposition du gasoil présents dans le sol.

Les résultats du test respirométrique réalisés reflètent la réussite de la technique de remédiation utilisée dans notre étude. La quantité de Co₂ cumulée pour les deux traitements SCH2 et SCH1 respectivement est de l'ordre (17,82% et 16,06%), ce sont les valeurs les plus importantes sont enregistrées au niveau des sols inoculés par *Agaricus bisporus*.

Les deux traitementsSCH1et SCH2 ont présenté les quantités les plus faible d'hydrocarbures résiduels à savoir 2 g et 1g respectivement. D'où l'importance de l'ajout d'inoculum d' *Agaricus bisporus* dans les sols pollués par le gasoil. Ces deux traitements montrent que la plus grande quantité de gasoil est dégradée.

Le champignon *Agaricus bisporus* s'avère capable de dégrader une large gamme des HAP contenu le gasoil et/ou dans le sol étudié.

Au terme de notre étude, nous concluons que les champignons de la pourriture blanche particulièrement *Agaricus bisporus* est capable de s'adapter à des environnements pollués par des hydrocarbures pétroliers et de les dégrader.

Les essais de mycoremédiation par *Agaricus bisporus*, réalisés au sein de notre laboratoire, représentent un premier pas dans l'élaboration d'un protocole de bioremédiation à échelle pilote, d'autres études complémentaires seront nécessaires et en perspectives nous proposons:

- Il apparaît crucial de réaliser, en amont de toute étude, une analyse préliminaire visant à évaluer la contamination éventuelle du sol par des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP). Cette étape permettrait de mieux cibler les recherches et d'adapter les méthodologies en fonction des résultats obtenus, garantissant ainsi la pertinence et l'efficacité des investigations ultérieures
- Des stratégies innovantes intégrant les champignons de la pourriture blanche avec d'autres agents de bioremédiation pour une efficacité accrue.
- Inoculation des souches fongiques dans des sols non stériles au sein des microflore endogènes (bioaugmentation), bioremédiation des échantillons de sols qui proviennent des sites naturellement contaminés par hydrocarbures,
- Tester la concentration minimale des spores fongiques nécessaires pour l'inoculation des sols contaminés en optimisant l'aération des sols durant la période de bioremédiation.
- Il serait intéressant à d'étudier la présence des HAP dans le sol et ce, avant de réaliser les tests de biodégradation des hydrocarbures.

- Abada, Z., & Bouharkat, M. (2018).** Study of management strategy of energy resources in Algeria. *Energy Reports*, 4, 1-7.
- Adrian, C. A. (1974).** Paraffin and proteins. pp. 32-35. France.
- Adams, G.O., Fufeyin, P.T., Okoro, S.E., Ehinomen, I., 2015.** Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review. *Int. J. Environ. Biorem. Biodegrad.* 3, 28–39.
- Alexander, S.1., Pilz, D., Weber, N.S., Brown, E., Rockwell, V. A. (2002).** Mushrooms, Trees and Money: Value Estimates of Commercial Mushrooms and Timber in the Pacific Norwest. *Environmental Management* 30 (1): 129-141.
- Anastasi (2009).** Bioremediation potential of basidiomycetes isolated from compost
- Attar, M., & Hammat, M. (2009).** Le Potentiel en Hydrocarbures de L'Algérie. Rapport, Schlumberger – WEC – SONATRACH.
- Ajayi, T., Torto, N., Tchokossa, P. et Akinlua, A. (2009).** Natural radioactivity and trace metals in crude oils: implication for health. *Environmental geochemistry and health*, 31(1), 61-69. doi: 10.1007/s10653-008-9155-z
- Ana, G. R., Sridhar, M. K. et Bamgboye, E. A. (2009).** Environmental risk factors and health outcomes in selected communities of the Niger delta area, Nigeria. *Perspectives in Public Health*, 129(4), 183-191. doi: 10.1177/1466424008094803
- Acevedo F., Pizzul L., Castillo M. d. P., Cuevas R. and Diez M. C. 2011.** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the Chilean white-rot fungus *Anthracyllum discolor*. *Journal of Hazardous Materials* 185(1): 212-219
- Bardi, L., Mattei, A., Steffan, S., Marzona, M. (2000).** Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with β -cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability. *Enzyme Microb Technol*, 27, 709–713.
- Basak, B., & Dey, A. (2016).** Bioremediation approaches for recalcitrant pollutants: Potentiality, successes and limitation. In *Toxicity and waste management using bioremediation* (pp. 178-197). IGI Global
- Balaji, V., Arulazhagan, P., Ebenezer, P., 2014.** Enzymatic bioremediation of polyaromatic hydrocarbons by fungal consortia enriched from petroleum contaminated soil and oil seeds. *J. Environ. Biol. Environ. Biol. India* 35, 521–529.
- Barrasa, J.M., Martínez, A.T., Martínez, M.J., 2009.** Isolation and selection of novel basidiomycetes for decolorization of recalcitrant dyes. *Folia Microbiol. (Praha)* 54, 59–66.

Bennett, J. W., Wunch, K. G., & Faison, B. D. (2002). Use of fungi in biodegradation. In C. J. Hurst (Ed.), *Manual of Environmental Microbiology*, Second Edition (pp. 960-971). Washington : ASM Press.

Bezalel, L., Hadar, Y., Cerniglia, C.E., 1996a. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 292–295.

Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, P.P., Freeman, J.P., Cerniglia, C.E., 1996b. Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene, and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2554–2559.

Bezalel, L., Hadar, Y., Cerniglia, C.E., 1997. Enzymatic mechanisms involved in Phenanthrene degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2495–2501.

Botton B., Breton A., Fèvre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P., (1990), Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, *Ed. Masson*, Paris

Boyle, D., Wiesner, C., Richardson, A., 1998. Factors affecting the degradation of polyaromatic hydrocarbons in soil by white-rot fungi. *Soil Biol. Biochem.* 30, 873–882.

Boopathy, R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource technology*, 74(1), 63-67.

Bogan, B.W., Lamar, R.T., 1995. One-electron oxidation in the degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61,2631–2635.

Benyahia, M. (2012). La pollution des sols par les Hydrocarbures. En vue l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en écologie et environnement, Thèse de doctorat. université Abderahmane mira de Bejaia.

Benchouk, A. (2017). Bioremédiation des sols pollués de pétrole par les microorganismes indigènes et amélioration génétique de leur pouvoir. thèse de doctorat, université d'ibn badis mostaganem, algérie.

Bliefert C et Perraud R, 2001 Chimie de l'Environnement : Air, Eau, Sols, Déchets. Editions De Boeck Université. Vol. 1ère Ed.

Chang, R. (1996). Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition reviews.* 54 : 91-93.

Clombano ,(2014) Nature des produits pétroliers et origine du vieillissement : tentative de l'identification de la source via la prise en compte des impacts et l'analyse de l'âge approximatif des déversements. Rapport final. Rapport BRGM RP. 6417. FR, 163 p.

Colin.F, (2000). Pollution localisée des sols et des sous-sol par l'hydrocarbure et par les solvants chlorés, Académie des sciences, rapport n°44, Eddition tec&doc,(2000)

Chettouh, S., & Hamzi, R. (2014). Algerian oil refining industry: Analysis of past industrial accidents of the period 2002–2013. *World Applied Sciences Journal*, 29(7), 933-939.

Ceci, A., Pinzari, F., Russo, F., Persiani, A. M., & Gadd, G. M. (2019). Roles of saprotrophic fungi in biodegradation or transformation of organic and inorganic pollutants in co-contaminated sites. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(1), 53-68.

C Laugero et al (1997) Can J Micro biol 43, 378-383

Davis, M.W., Glaser, J.A., Evans, J.W., Lamar, R.T., 1993. Field evaluation of the lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* to treat creosote-contaminated soil. *Environ. Sci. Technol.* 27, 2572–2576.

D'Andrea, M. A. et Reddy, G. K. (2014a). Crude oil spill exposure and human health risks. *Journal of occupational and environmental medicine*, 56(10), 1029-1041.

Deshmukh, R., Khardenavis, A. A., & Purohit, H. J. (2016). Diverse metabolic capacities of fungi for bioremediation. *Indian journal of microbiology*, 56(3), 247-264.

Del Pilar, Ana maria. Rodríguez, Navarro. Adaptation des températures élevées du champignon de paris *Agaricus bisporus*. [en ligne] thèse de doctorat en Biologie végétale :Paris : Université de Bordeaux, 2014.142P.

Dommergues Y, 1968. Dégagement tellurique de CO₂. Mesure et signification. *Annales de l'Institut Pasteur* 115 : 627-656.

Dilmi, F. (2019). Isolation and characterization of oil degrading microorganisms from arzew oil refinery. these de doctorat Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem (Algérie), 212p

Fattal, P. (2008). La pollution des cotes par les hydrocarbures. Presses universitaires de Rennes : PUR.

Fayeulle, A. (2013). Etude des mécanismes intervenant dans la biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques par les champignons saprotrophes telluriques en vue d'applications en bioremédiation fongique de sols pollués. Thèse de doctorat. Université du Littoral Côte d'Opale, Dunkerque (France), 204p.

Fingas, M. (2012). The basics of oil spill cleanup. Troisième édition, Boca Raton. CRC press, États-Unis, 266 p.

Fokou Mbogne, P. M. (2017). Biorémédiation augmentée de sols contaminés aux hydrocarbures lourds par ajout de substrats organiques. Mémoire de maîtrise électronique. École de technologie supérieure, université de Québec (Canada). 109p.

Ghouas, H., Haddou, B., Bouabdesselam, H., Boubarka, Z., & Derriche, Z. (2010). Elimination of fuel spills from effluent using cloud point extraction methods. *Journal of hazardous materials*, 180(1-3), 188-196.

- Gruyer. (2015).** Hydrocarbures pétroliers : caractéristiques, devenir et criminalistique environnementale, P 04-55.
- Hassaine. (2016).** biodégradation des hydrocarbures (pétrole brut et kérosène) par la microflore microbienne des eaux de la région de skikda. Thèse de doctorat, Annaba.
- Hammel, K.E., 1995.** Mechanisms for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by ligninolytic fungi. *Environ. Health Perspect.* 103, 41–43.
- Haritash, A.K., Kaushik, C.P., 2009.** Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *J. Hazard. Mater.* 169, 1–15.
- Hatakka, A., 1994.** Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 125–135.
- Horel, A. A. (2009).** Biodegradation of petroleum and alternative fuel hydrocarbons in moderate to cold climate. Thèse de doctorat. University of Alaska Fairbanks. Fairbanks (AK). 262 p.
- Jean Pierre wauquier (1994.)** raffinage du pétrole, pétrole brut produits pétrolier, schéma de fabrication. pages (339-349)
- Jeannot R., Lemièrre B., Chiron S., Augustin F., et Darmendrail D., 2000.** Guide méthodologique pour l'analyse des sols pollués. 4eme Ed., rapport du BRGM/RP-50128-FR. 109p.
- Jose, f. (1999).** Essai de biodégradabilité sur les sols contaminés par les hydrocarbures, 3eme édition. Dunad.paris.
- Jové, P., Olivella, M.À., Camarero, S., Caixach, J., Planas, C., Cano, L., De Las Heras, F.X., 2015.** Fungal biodegradation of anthracene-polluted cork: a comparative study. *J. Environ. Sci. Health A* 1–8.
- J. M. MONDO, E. M. BAGULA, A. Z. BALEZI et G. N. MUSHAGALUSA,** Effets des substrats à base de fanes de haricot et de feuilles de bananier sur la productivité des souches de *Pleurotus ostreatus* (P969 et HK51) sur étagère et gobetage. *VertigoO - la revue électronique en sciences de l'environnement*, (2016) 9
- J. Noguera,** “The Seven Sisters versus OPEC: Solving the mystery of the petroleum market structure,” *Energy Economics*, vol. 64, pp. 298–305, 2017, doi: 10.1016/j.eneco.2017.03.024.
- Kernaghan, G., Harper, K.A. (2001).** Community structure of fungi across alpine/subalpine ecotone. *Ecography* 24: 181-188.
- Kelsey, J.W., Slizovskiy, I.B., Peters, R.D., Melnick, A.M., 2010.** Sterilization affects soil organic matter chemistry and bioaccumulation of spiked p, p'-DDE and anthracene by earthworms. *Environ. Pollut.* 158, 2251–2257.

- Kuppusamy, S., Maddela, N. R., Megharaj, M., & Venkateswarlu, K. (2020).** An overview of total petroleum hydrocarbons. In *Total Petroleum Hydrocarbons* (pp. 1-27). Springer, Cham.
- Ladji, R., Yassaa, N., Balducci, C., & Cecinato, A. (2010).** Organic components of Algerian desert dusts. *Chemosphere*, 81(7), 925-931.
- Lary, L. d., Fabriol, h., Moretti, I., Kalaydjian, F., & .Didier, C. (2011).** Maîtrise des impacts et risques liés à l'exploitation des hydrocarbures de roche-mère : enjeux, verrous et pistes de recherche. BRGM/RP-60312-FR.
- Lefebvre. (1986).** Notion de chimie du pétrole. *Ed, technique*, pp. 41. Paris: Technip.
- Lee, H., Jang, Y., Choi, Y.-S., Kim, M.-J., Lee, J., Lee, H., et al., 2014.** Biotechnological procedures to select white rot fungi for the degradation of PAHs. *J. Microbiol. Methods* 97, 56–62.
- Lim, M. W., Von Lau, E., & Poh, P. E. (2016).** A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil - present works and future directions. *Mar Pollut Bull*, 109, 14–45.
- Lima.S. D., Oliveira A. F., Golina R., Lopes V.C.P., Caixeta D.S., Lima Z. M., Y et Morais E.B., 2020.** Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from gas station leaking-contaminated groundwater in the Southern Amazon, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 80. pp.354-361.
- Li, X., Wang, Y., Wu, S., Qiu, L., Gu, L., Li, J., Zhang, B., Zhong, W., 2014.** Peculiarities of metabolism of anthracene and pyrene by laccase-producing fungus *Pycnoporus sanguineus* H1. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 61, 549–554.
- Mansour – Benamar M., Savoie J-M. & Chavant L., 2013.** Valorization of a solid olive mill wastes by cultivation of a local strain of edible mushroom. *Comptes Rendus Biologies*, 336, 407- 415.
- Mbogne, P. M. (2017).** Biorémediation augmentée de sols contaminés aux hydrocarbures lourds par ajout de substrats organiques. 109p. Montréal.
- Ministère de l'énergie et des mines.** Raffinage. Disponible sur : <https://www.energy.gov.dz/?rubrique=produits-petroliers>. [Consulté le 14 février].
- Mougin, C., Boukcim, H., & Jolival, C. (2009).** Soil bioremediation strategies based on the use of fungal enzymes. In *Advances in Applied Bioremediation* (pp. 123-149). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Macaulay, B. M., & Rees, D. (2014).** Bioremediation of oil spills: a review of challenges for research advancement. *Annals of Environmental Science*, 8, 9-37.

Novotný, Č., Svobodová, K., Erbanová, P., Cajthaml, T., Kasinath, A., Lang, E., et al., 2004. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biol. Biochem.* 36, 1545–1551.

Northcott, G.L., Jones, K.C., 2001. Partitioning, extractability, and formation of nonextractable PAH residues in soil. 1. Compound differences in aging and sequestration. *Environ. Sci. Technol.* 35, 1103–1110. <https://doi.org/10.1021/es000071y>

Nam, K., Kim, J.Y., Oh, D.I., 2003. Effect of soil aggregation on the biodegradation of phenanthrene aged in soil. *Environ. Pollut.* 121, 147–151.

Nriagu, J.O. Oil industry and the health of communities in the Niger Delta of Nigeria. *Environ. Health* 2011, 4, 558–567.

Nriagu, J.O.; Martin, J.; Smith, P.; Socier, D. Residential hazards, high asthma prevalence and multimorbidity among children in Saginaw, Michigan. *Sci. Total Environ.* 2012, 416, 53–61.

Pomerleau R. (1980). La Flore des Champignons du Québec. Éditions La Presse, Montréal. 653.

Ramade F., 1992. Précis d'écotoxicologie. Ed. Masson, Paris, 300 p.

Ramade F, 2002 Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement. 2ème ed. Paris: EdiScience international.

Rapilly F., 1968—La technique de mycologie en pathologie végétale.

Ritz, K. & Young, I. M. (2004). Interactions between soil structure and fungi. *Mycologist*, 18, 52-59.

Roy, A. S., Baruah, R., Borah, M., Singh, A. K., Boruah, H. P. D., Saikia, N., Deka, M., Dutta, N., & Bora, T. C. (2014). Bioremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial strains in crude oil contaminated soil under microcosm study. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 94, 79–89.

Sardrood, B. P., Goltapeh, E. M., & Varma, A. (2013). An introduction to bioremediation. In E. M. Goltapeh, Y. R. Danesh, A. Varma (Ed.), *Fungi as bioremediators*

Schützendübel, A., Majcherczyk, A., Johannes, C., Hüttermann, A., 1999. Degradation of fluorene, anthracene, phenanthrene, fluoranthene, and pyrene lacks connection to the production of extracellular enzymes by *Pleurotus ostreatus* and *Bjerkandera adusta*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 43, 93–100.

Shahsavari, E., Poi, G., Aburto-Medina, A., Haleyr, N., & Ball, A. S. (2017). Bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon-contaminated environments. In *Enhancing cleanup of environmental pollutants* (pp. 21-41). Springer, Cham.

- Singh, A., & Ward, O. P. (2004).** Biotechnology and bioremediation—an overview. In *Biodegradation and bioremediation* (pp. 1-17). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Singh, H. (2006).** *Mycoremediation: fungal bioremediation*. John Wiley & Sons.
- Soltani, M. (2004).** Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes variation en fonction de la source de carbone. Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie curie, Paris (France)
- SPEIGHT., 2014.** *The Chemistry and Technology of Petroleum*. Fifth Edition. CRC Press, États-Unis, 984 p.
- Sylvain, A., & Jean-Patrick, T. (2016).** Risques et impacts associés à l'exploration et à l'exploitation des hydrocarbures dans le golfe du Saint-Lauren. *Le Naturaliste canadien.*, 140 (2), 35-40.
- Talbi, Z., Haddou, B., Boubarka, Z., & Derriche, Z. (2009).** Simultaneous elimination of dissolved and dispersed pollutants from cutting oil wastes using two aqueous phase extraction methods. *Journal of hazardous materials*, 163(2-3), 748-755.
- Tayssir Kadri, Tarek Rouissi, Satinder Kaur Brar, Maximiliano Cledon, Saurabh Jyoti Sarma, Mausam Verma. (2016).** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review
- Tortella, G., Durán, N., Rubilar, O., Parada, M., Diez, M.C., 2015.** Are white-rot fungi a real biotechnological option for the improvement of environmental health? *Crit. Rev. Biotechnol.* 35, 165–172.
- Vertil, H. (2012).** *Illustration de la reproduction des Basidiomycètes*
- Vyas, B.R.M., Bakowski, S., Šašek, V., Matucha, M., 1994.** Degradation of anthracene by selected white rot fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 14, 65–70.
- Wauquier JP.** *Le raffinage du pétrole: Pétrole brut, produits pétroliers, schémas de fabrication*. Paris: Editions Technip; 1994.
- Wang, C., Sun, H., Liu, H., Wang, B., 2014.** Biodegradation of pyrene by *Phanerochaete chrysosporium* and enzyme activities in soils: effect of SOM, sterilization and aging. *J. Environ. Sci.* 26, 1135–1144.
- Yang, Y., Ma, F., Yu, H., Fan, F., Wan, X., Zhang, X., Jiang, M., 2011.** Characterization of a laccase gene from the white-rot fungus *Trametes* sp. 5930 isolated from Shennongjia nature Reserve in China and studying on the capability of decolorization of different synthetic dyes. *Biochem. Eng. J.* 57, 13–22.
- Zhang, S., Ning, Y., Zhang, X., Zhao, Y., Yang, X., Wu, K., et al., 2015.** Contrasting characteristics of anthracene and pyrene degradation by wood rot fungus *Pycnoporus sanguineus* H1. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 105, 228–232.

Annexe 1

Tableau1 : Croissance mycélienne moyenne diamétrale (cm) sur milieu PDA pour le témoin CH.

	24H	48H	72H	96H	120H	144H	168H	192H
D (cm)	2,51	4,12	6,855	7,42222222	8,31	8	8	8
Ecartype	0,76623176	0,26997942	0,35154421	0,28717977	0,223358208	0	0	0

Test Kruskal-Wallis chi-squared = 75.243, df = 7, p-value = 1.28e-13 (facteur temps)

Tableau2 : Résultats du test de Kruskal walis pour le facteur temps du témoin CH

Groupes	Temps
a	120H
b	144H
b	168H
b	192H
c	96H
d	72H
e	48H
f	24H

Annexe2

Tableau1 : Croissance mycélienne moyenne diamétrale (cm) sur milieu PDA pour le traitement CH100

	24H	48H	72H	96H	120H	144H	168H	192H
D (cm)	0	2,195	4,095	6,335	7,2	7,795	8	8
Ecartype	0	0,445	0,705	0,645	8,88178E-16	0,207431381	0	0

Tableau 2: Croissance mycélienne moyenne diamétrale (cm) sur milieu PDA pour le traitement CH500

	24H	48H	72H	96H	120H	144H	168H	192H	216H	240H	264H
D (cm)	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0,88	0,73	1,5
Ecartype	0	0	0	0	0	0	0	0,85	1,71	2,21	3,16

Test Kruskal-Wallis chi-squared = 68.638, df = 10, p-value = 8.119e-11 pour le facteur temps.

Tableau 3: Résultats du test de Kruskal walis pour le facteur temps

Groupes	Temps
a	192H
a	168H
a	144H
a	120H
ab	96H
abc	72H
bc	48H
bc	264H
c	24H
c	240H
c	216H

Test Kruskal-Wallis chi-squared = 177.42, df = 2, p-value < 2.2e-16 pour le facteur traitement.

Tableau 3: Résultats du test de Kruskal walis pour le facteur traitement

Groupes	traitements
a	CH
b	CH100
c	CH500

Annexe3

Tableau 1: quantité de CO2 cumulée en fonction des cinq traitements

	SC	SCH1	SCH2	SH1	SH2
	14,96	16,06	17,82	2,86	1,98
CO2 (g)	0	0	0	1,54	0,66
Ecartype	0	2,59376175	0	1,54	0,66

data: CO2 by Trt

Test Kruskal-Wallis chi-squared = 11.645, df = 4, p-value = 0.02019 pour le facteur traitement.

Tableau 2: Résultats du test de Kruskal walis pour le facteur traitement

Groupes	traitements
a	SCH2
a	SCH1
ab	SC
b	SH1
b	SH2

Résumé

Notre présente étude, consiste à tester la biodégradation d'un carburant à savoir, le gasoil par un champignon de la pourriture blanche *Agaricus bisporus* appelé communément champignon de Paris.

Au laboratoire PSEMRVC de la faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques de l'UMMTO, nous avons testé et évalué la croissance mycélienne d'*Agaricus bisporus* sur milieu gélosé PDA. Ensuite, nous avons également testé la biodégradation du gasoil dans un sol inoculé par *Agaricus bisporus* à raison de 1 % et 2%.

Les résultats du test respirométrique révèlent que la respiration fongique a été intense dans les sols inoculés par *Agaricus bisporus* et contaminés avec 2% et 1% de gasoil. En outre, ces deux traitements SCH1 et SCH2 ont présenté les quantités les plus faibles d'hydrocarbures résiduels à savoir 2 g et 1g respectivement. Ces derniers, montrent que la plus grande quantité de gasoil est biodégradée dans le sol. Par contre dans les sols contaminés avec 1% et 2% de gasoil sans inoculum SH1 et SH2 la quantité d'hydrocarbures résiduels est élevée, d'où l'importance de l'ajout d'inoculum d'*Agaricus bisporus* dans les sols pollués par le gasoil.

Les traitements montrant les absorbances les plus élevées dans l'analyse des HAP résiduels sont le SH2, le SH1 et le SCH2. Au terme de notre étude, nous estimons qu'*Agaricus bisporus*, champignon de la pourriture blanche est un agent biologique prometteur pour la réhabilitation des sols pollués par le gasoil.

Mots clé : *Agaricus bisporus*, gasoil, HAP, biodégradation, sol.

Abstract

Our current study focuses on testing the biodegradation of diesel fuel by a white rot fungus, *Agaricus bisporus*, commonly known as the button mushroom. In the PSEMRVC laboratory at the Faculty of Biological and Agronomic Sciences at UMMTO, we tested and evaluated the mycelial growth of *Agaricus bisporus* on PDA agar medium. We then assessed the biodegradation of diesel in soil inoculated with *Agaricus bisporus* at concentrations of 1% and 2%.

The results of the respirometric test revealed that fungal respiration was intense in soils inoculated with *Agaricus bisporus* and contaminated with 2% and 1% diesel. Moreover, these two treatments, SCH1 and SCH2, showed the lowest amounts of residual hydrocarbons, specifically 2 g and 1 g, respectively. This indicates that the largest quantity of diesel was biodegraded in the soil. Conversely, in soils contaminated with 1% and 2% diesel without inoculum, SH1 and SH2, the amount of residual hydrocarbons was high, highlighting the importance of adding *Agaricus bisporus* inoculum to diesel-contaminated soils.

The treatments showing the highest absorbance in the analysis of residual PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) were SH2, SH1, and SCH2. Based on our study, we conclude that *Agaricus bisporus*, a white rot fungus, is a promising biological agent for the rehabilitation of diesel-contaminated soils.

Keywords : *Agaricus bisporus*, diesel, PAHs, biodegradation, soil.