



Université Mohamed Khider de Biskra

Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie

Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Référence / 2022

Présenté et soutenu par :

Maroua ATMANI et Chahinaz SAOULA

Thème

**Bioremédiation de l'eau de mer polluée
par le diesel**

Jury:

Titre	BOULMAIZ Sara	MMA	Université biskra	Président
Titre	DENDOUGA Wassila	MCB	Université biskra	Examineur
Titre	BENGUERAICHI Fatiha	MMA	Université biskra	Rapporteur

Année universitaire: 2021 – 2022

Remerciement

En tout premier lieu, je remercie le bon Dieu,
tout puissant, de m'avoir donné la force pour dépasser toutes les difficultés,
permis de mener à bien ce travail.

Nous tenons à remercier infiniment et à exprimer mon plus profond respect à mon encadreur,
Mme.BENGUERAICHI

qui m'a guidé et aidé durant ce travail, pour sa patience, sa disponibilité
et surtout pour ses conseils.

Nous tenons également à remercier tous les membres du jury d'avoir accepté de juger ce
travail.

Dédicace

Je commence ma dédicace au nom du Dieu et le salut sur

Mohamed le messager de Dieu

A mes chers parents Ibrahim et Fadja

Toujours à mes côtés pour me soutenir, m'encourager, et me guider.

Ton affection me couvre, ta présence à mes côtés a toujours été la source de ma force pour affronter tous les obstacles. Je ne trouve pas les mots justes pour exprimer ma gratitude pour tes sacrifices et tes prières.

Grâce à vous. Je vous aime.

A mes chères sœurs et frères

Soraya, Maryem, Samia, Tarek, Othman

Je vous remercie de tout ce que vous m'avez appris et donné, pour votre optimisme, votre dynamisme, vos aides et soutiens précieux,

A secret de mon bonheur

Manisa, Aya, Nour, Mohamed, Sidra, Iline

Je vous souhaite tout le bonheur et la réussite du monde,

A tous mes amis proches

Il dit qu'un meilleur ami peut te faire sourire même dans les moments les plus tristes de ta vie Razan.A, Rayan.A MERCI mes proches. A tous mes amis sans exception, je vous remercie infiniment pour tous vos soutien dans les moments difficiles et d'être toujours à côté de moi toujours.

Maroua ...



Dédicace

Avant tous, Tout cela est dû à la grâce de Dieu Tout-Puissant

*À la faculté de la Science de la vie et tous les camarades en
microbiologie*

A celui qui m'a aidé et soutenu.

Ma chère maman Taïba

*A ceux qui partagent mes joies et mes peines, à la femme la plus
merveilleuse qui soit*

Mon cher père Djmouai

*A celui qui m'a appris que le monde suffit, à l'homme le plus
merveilleux de l'univers*

A mes chères sœurs et frères

Hamza, Hessin, ,abdelFateh, Amin, Marwa, sabah, Amel

Et à la femme de mon frère

Widad

À mes chers amis

*aux âmes sœurs et à la tranquillité d'esprit Sara, Manar, Meriem et
insaf*

Finalement

Enfin j'ai levé mon chapeau adieu les années passées.

Chahinaz



Table des matières

Liste des Tableaux.....	I
Liste des Figures.....	II
Liste des abréviations.....	III
Introduction.....	1

Première parti. Etude bibliographique

Chapitre 01. Pollution de l'eau de mer

1. Pollution de l'eau de mer	3
2. Définition des hydrocarbures	3
3. Origine des hydrocarbures	3
3.1. Hydrocarbures naturels.....	3
3.2. Origine anthropique des hydrocarbures.....	3
3.2.1. Sources pyrolytiques.....	3
3.2.2. Sources pétrogéniques.....	3
4. Devenir des hydrocarbures en milieu marin.....	4
4.1. Dégradation abiotique.....	4
4.2. Facteurs biologiques.....	4
5. Exemples d'accidents de navires entraînant une pollution de l'eau de mer par le diesel.....	4

Chapitre 02. Bioremédiation

1- Définition de la bioremédiation.....	6
2- Intérêt de la bioremédiation	6
3- Avantages et inconvénients de la bioremédiation	6
4- Types de la bioremédiation.....	7
5- Biodégradation des hydrocarbures par les micro-organismes.....	8

5-1-Biosurfactant (BS)	8
------------------------------	---

Deuxième partie. Partie expérimentale

Chapitre 3. Matériel et Méthodes

1-Echantillonnage	9
2- Isolement	9
2.1. Milieux de culture	9
3. Identification des souches isolées	10
3.1. Identification morphologique	10
3.1.1. Aspect macroscopique.....	10
3.1.2. Aspect microscopique.....	10
3.2. Identification biochimique.....	11
3.3. Identification moléculaire.....	11
3.3.1. Extraction d'ADN	11
3.3.2. Amplification du fragment du gène 16Spar PCR	13
3.3.3. Séquençage des fragments amplifiés	13
3.3.4. Analyse phylogénétique.....	14
4. Immobilisation des cellules bactériennes	14
4.1. Préparation de biochar (support d'immobilisation).....	15
4.2. Préparation de suspension cellulaire concentrée.....	15
4.3. Immobilisation des cellules bactériennes sur le biochar.....	15
4.4. Observation au microscope électronique à balayage (MEB).....	16
5. Bioremédiation de l'eau de mer polluée par le diesel	16
5.1. Traitement de l'eau de mer polluée par le diesel	16
5.2. Analyse de diesel résiduel par Chromatographie Gazeuse couplée Spectromètre de Masse (GC-MS)	17

Chapitre 04 : Résultats et Discussion

1. Isolement.....	19
2. Identification des bactéries isolées	19
2.1. Examen macroscopique et microscopique	19
2.2. Identification biochimique.....	22
2.3. Identification moléculaire	23
3. Observation sur MEB de biochar avant et après immobilisation	24
4. Bioremédiation de l'eau de mer polluée par le diesel	24
5. Efficacité de la bioremédiation selon la taille du biochar.....	26
Conclusion	29
Référence Bibliographiques	30

Liste des Tableaux

Tableau 1. Avantages et inconvénients de la bioremédiation .	6
Tableau 2. Résumé des types de techniques de bioremédiation et leur mécanisme.....	7
Tableau 3. Sites de prélèvement des échantillons..	9
Tableau 4. Programme de PCR.	13
Tableau 5. Nombres des souches.....	19
Tableau 6. Caractéristiques macroscopique et microscopiques des souches isolées..	20
Tableau 7. Caractéristique biochimique des souches	22
Tableau 8. Pourcentage d'efficacités de dégradation dans différents traitements.	27
Tableau 9. Pourcentage de la bioremédiation de l'eau de mer de chaque souche	28

Liste des Figures

Figure 01. Catastrophe de l'Exxon Valdez (1989)	5
Figure 02. Accident de fuite de pétrole du cargo Amorgos à Taiwan	5
Figure 03. Marée noire de BP dans le Golfe du Mexique	5
Figure 04. Protocole de l'extraction d'ADN	12
Figure 05. Etapes d'Amplification de l'ADN par PCR	13
Figure 06. Etapes de séquençage de Sanger	14
Figure 07. Préparation de suspension cellulaire concentrée	15
Figure 08. Immobilisation des cellules bactériennes sur le biochar	16
Figure 09. Traitements de l'eau de mer polluée par le diesel	17
Figure 10. Arbre phylogénétique de l'isolat 1 (la souche LQ2)	23
Figure 11. Images de MEB de biochar et des cellules immobilisées et libres sous différents grossissements	24
Figure 12. Diésel résiduelle dans les phases solide et aqueuse des traitements	25
Figure 13. Diésel résiduelle dans les phases solide et aqueuse des traitements au biochar et par IB	27

Liste des abréviations

SW: SeaWater.

SW-CO: SeaWater -Crude Oil.

Ch -SW-CO: Chitin- SeaWater -Crude Oil.

EDTA: Ethylène Diamine Tétra Acétique.

dNTP: désoxyNucléoside 5'-TriPhosphate.

MRS: Gélose de Man, Rogosa, Sharpe.

BS : Biosurfactent.

TPH: hydrocarbures pétroliers totaux.

Introduction

Introduction

La totalité des écosystèmes de la planète sont désormais affectés d'une façon ou d'une autre par le développement des sociétés humaines et les phénomènes de pollution qui en résultent. Le développement des activités humaines est devenu aujourd'hui une menace pour l'environnement marin qui subit depuis plusieurs décennies des agressions majeures (Chalghmi, 2015).

Ces activités ont engendré des contraintes sur l'environnement causant souvent la dégradation du milieu marin et modifiant ses écosystèmes (DAdamo, 2007). Dans certains écosystèmes, les produits chimiques introduits dans le milieu marin, qu'elle soit chronique ou accidentelle, peuvent être à l'origine de la disparition de certaines espèces animales et/ou végétales et par conséquent, entraînent le dysfonctionnement de la chaîne trophique (Chalghmi, 2015).

Les hydrocarbures pétroliers ou bien le diesel sont parmi les déchets les plus toxiques, déversés en mer. Ils auront comme conséquence une pollution importante et précoce à l'échelle globale. L'exploitation humaine des gisements de pétrole n'a cessé d'augmenter depuis le début du siècle dernier. Cependant, l'extraction, le transport et l'utilisation de cette source d'énergie entraînent des risques de pollution pour l'environnement marin pouvant influencer l'équilibre écologique et parfois entraîner la destruction de l'écosystème (Gilbert *et al*, 2007).

Les différents traitements de dépollution sont principalement le dégrillage, le tamisage, le dégraissage, le dessablage, les traitements visant à éliminer spécifiquement les composés organiques, les traitements par ultra-violets, par le chlore. Cependant, en raison des limites des processus physico-chimiques qui sont coûteux, non écologiques, complexes, peuvent conduire à la destruction de la texture et les caractéristiques du mer et ne conduisent pas toujours à la neutralisation complète des polluants. La bioremédiation est reconnu comme une alternative précieuse pour la désintoxication et l'élimination de la substance toxique, en raison de leur rentabilité, leur respect à l'environnement, leur simplicité technologique et la conservation de la texture et des caractéristiques du l'eau (Agarry et Oladipupo, 2012)

La bioremédiation est l'utilisation de microorganismes pour détoxifier ou éliminer les polluants en raison de leurs diverses capacités métaboliques, c'est une méthode évolutive pour l'élimination et la dégradation de nombreux polluants environnementaux, y compris les produits de l'industrie pétrolière. La biodégradation par les populations naturelles de microorganismes représente l'un des principaux mécanismes par lesquels le pétrole et les autres polluants hydrocarbonés peuvent être éliminés de l'environnement (Das et Preethy, 2011).

Le présent travail, qui représente une synthèse d'articles scientifiques, dont leur objectif est l'exploitation des bactéries isolées de différents milieux dans la bioremédiation des environnements marins pollués par le diesel.

Ce mémoire est divisé en deux parties, la première consiste en une synthèse bibliographique regroupant les principales informations sur la pollution de mer et leur causes, la technique de la bioremédiation qui a été utilisée pour éliminer cette pollution. La deuxième partie de notre mémoire a été consacrée à l'analyse des méthodes, des résultats et discussions des différents articles traitant la technique de l'immobilisation et la bioremédiation, l'isolement, l'identification des bactéries qui y sont utilisées. Enfin nous terminerons par une conclusion générale.

Première partie.

Synthèse bibliographique

Chapitre 01.
**Pollution de l'eau de
mer**

1. Pollution de l'eau de mer

La pollution du bassin méditerranéen est causée par les rejets d'origine naturelle ou anthropique arrivant en mer par les fleuves, l'air, le drainage des territoires littoraux ou par rejet direct en mer (navires et émissaires de rejet en mer), près de 20 % des pollutions marines ont pour origine les activités en mer dont les rejets d'hydrocarbures ou d'autres substances chimiques (Chalghmi, 2015).

2. Définition des hydrocarbures

D'après Standards et Pancanadiens (2008), le terme « hydrocarbure pétrolier » (HCP) est un terme générique qui désigne les mélanges de composés organiques présents dans des matières géologiques comme l'huile, le bitume et le charbon ou dérivés de ces matières (Khlil-radji, 2015).

3. Origine des hydrocarbures

3.1. Hydrocarbures naturels

Les hydrocarbures naturels sont produits par les plantes, animaux et micro-organismes qui synthétisent des composés dont la structure chimique varie en fonction des organismes considérés (Chalghmi, 2015)

3.2. Origine anthropique des hydrocarbures

La pollution anthropique par les hydrocarbures résulte de plusieurs activités liées à l'extraction du pétrole, à son transport et en aval à l'utilisation de produits finis (carburants, lubrifiants,...) (Chalghmi, 2015)

3.2.1. Sources pyrolytiques

Les hydrocarbures d'origine pyrolytique peuvent parvenir en milieu marin soit par dépôt direct sec ou humide rabattues par les eaux de pluie, soit indirectement suite au déversement des déchets de lessivage des sols et des zones urbaines dans la mer (Bousquet, 2003) .

3.2.2. Sources pétrogéniques

Les activités pétrolières engendrent une contamination continue et chronique des points de rejets souvent marins et aussi peuvent causer des déversements accidentels au cours des différentes étapes des activités pétrolières: les fuites des oléoducs, les opérations de vidange réalisées par les pétroliers en mer (Chalghmi, 2015).

4. Devenir des hydrocarbures en milieu marin

Une fois déversé en mer, le pétrole est soumis à différents processus qui vont entraîner des modifications de son aspect général et de ses caractéristiques physico-chimiques. (Chalghmi, 2015).

4.1. Dégradation abiotique

- L'évaporation
- La photo-oxydation
- L'émulsification
- La dissolution
- La sédimentation

4.2. Facteurs biologiques

- La bioremediation

5. Des exemples sur les accidents de navires qui causent la pollution de gasoil diesel

Avec le développement croissant de la société humaine, la demande de ressources pétrolières a augmenté, et exploration et à un transport plus fréquents du pétrole en mer, qui entraîné des accidents de déversement de pétrole en mer, par exemple :

- La catastrophe de l'Exxon Valdez (1989) (figure 01).
- L'accident de fuite de pétrole du cargo Amorgos à Taiwan (2001) (figure 02).
- La marée noire de BP dans le Golfe du Mexique (2010) (figure 03).
- La cote algérienne a connu plus de cinq cents accidents de marée noire depuis 1977.
- Le comité Tel Bahr a indiqué que 11 accidents enregistré sur la coté d'Alger, Skikda et Jijel.



Figure 01. Catastrophe de l'Exxon Valdez (1989)



Figure 02. Accident de fuite de pétrole du cargo Amorgos à Taiwan



Figure 03. Marée noire de BP dans le Golfe du Mexique

- Pour éliminé la pollution qui elle est dans l'eau de mer les chercheurs on suggéré la technologie de bioremédiation qui nous allons parlée dans le chapitre suivant.

Chapitre 02.

Bioremédiation

1- Définition de la bioremédiation

La bioremédiation ou bien la biodégradation est définie comme un processus qui utilise des organismes vivants, principalement des micro-organismes, des plantes vertes et leurs enzymes, pour éliminer, dégrader, minéraliser, transformer et détoxifier les polluants environnementaux et les composants dangereux des déchets environnementaux en formes inoffensives ou moins toxiques pendant le traitement des sites contaminés afin de les ramener à leur état d'origine. Le processus de bioremédiation a été utilisé pour réduire la concentration et la toxicité de divers polluants chimiques, tels que les pesticides, les hydrocarbures polycycliques aromatiques (Gaurav *et al*, 2020)

2- Intérêt de la bioremédiation

La bioremédiation a été reconnue comme une stratégie de décontamination intéressante par rapport aux traitements physiques et chimiques. Cela est dû à son faible coût et au fait qu'elle perturbe peu l'environnement pendant son application (Laura et Kirk, 2010).

3- Avantages et inconvénients de la bioremédiation

Les avantages et les inconvénients de la bioremédiation sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1. Avantages et inconvénients de la bioremédiation (Bhat et Hakeem, 2020)

Avantage	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> - Processus naturel ; - Ce processus peut être réalisé sur place, sans causer d'interruption majeure de l'activité ; - Les coûts d'exploitation sont plus faibles que dans le cas d'autres procédés conventionnels appliqués (lavage, incinération, désorption thermique) ; - Efficacité, bien meilleur que beaucoup d'autres techniques. 	<ul style="list-style-type: none"> • Limitée aux seuls composés biodégradables ; • Il est difficile d'extrapoler des conditions de laboratoire à une grande échelle (terrain) ; • Ne fonctionne pas très bien sur les sols compacts et argileux ; • Processus prend beaucoup plus de temps que d'autres traitements, comme l'excavation ou l'incinération du sol.

4- Types de la bioremédiation

Le tableau 2 résume les types de techniques de la bioremédiation et leur mécanisme.

Tableau 2. Résumé des types de techniques de bioremédiation et leur mécanisme (Gaurav *et al*, 2020).

Bioremédiation	Techniques	Types	Détails de la technique
In situ	Bioventing	L'air et les nutriments sont fournis par le puits	Faible coût d'exploitation
	Biosparging	De l'air est injectée sous pression pour renforcer l'activité microbienne.	Relativement passif
	Bioaugmentation	Des microbes spécialisés et génétiquement modifiés sont fournis pour cibler des polluants spécifiques	Non invasif
	Biostimulation	Les nutriments sont fournis pour optimiser la croissance et l'activité de la population microbienne naturelle.	L'atténuation naturelle processus Traite à la fois le sol contaminé et l'eau
Ex situ	Landfarming	La terre arable est labourée et on y ajoute de l'eau et des nutriments.	Faible coût d'exploitation
	Biocompostage	Décomposition des déchets organiques en présence de microbes dans des conditions aérobies et à forte teneur en nutriments.	Vitesse de réaction rapide
	Biopiles	C'est une combinaison du compostage et de la mise en décharge.	Faible contamination des eaux souterraines
	Bioréacteurs	Dans un réservoir, les micro-organismes réalisent la réaction biologique.	Fournit un environnement favorable aux microbes indigènes Meilleur taux de dégradation Meilleure étendue de la dégradation

5- Biodégradation des hydrocarbures par les micro-organismes

La dégradation microbienne est un mécanisme naturel et primordial pour dépolluer les sites contaminés par le déversement des hydrocarbures pétroliers. Les différents genres bactériens qui dégradent les hydrocarbures dans les environnements d'eau de mer caractérisés par la production de biosurfactant (BS) (Benchouk, 2017).

5-1-Biosurfactant (BS)

Est une classe de molécules amphiphiles avec des domaines à la fois hydrophiles et lipophiles (Shengli Sun, 2019). Il peut interagir avec interfaces de diverses polarités, réduit la tension superficielle (ST) et augmente la solubilité de nombreux polluants organiques, améliorant ainsi leur élimination. Quand l'ajout de BS (0,3 %) favorisait de manière significative l'élimination des HAP de 57 % à 86,5 % (Bezza et Chirwa, 2016).

- Après la dégradation par bactérie à l'aide de microorganisme native plus le support de l'immobilisation (supports naturelle, supports biochimique...) qui fournit une matrice agissant les micro-organismes de se former les biofilms essentiels pour que les bactéries résistent aux environnements, le polluant diesel est transformé en dioxyde de carbone (CO₂), en eau et en plusieurs intermédiaires (Zhou et al, 2021).

On va voir tout ça dans les deux chapitres suivants (chapitre 03. Matériel et méthode, chapitre 04. Résultats et discussion).

Deuxième partie.

Partie expérimentale

Chapitre 03.

Matériel et Méthodes

1-Echantillonnage

Plusieurs échantillons sont prélevés dans différentes régions et résumés dans le tableau Ci-dessous.

Tableau 3. Sites de prélèvement des échantillons.

	Echantillon	Localisation	Référence
1 ^{er} région	Environ 0,2 g de sédiments ont été collectés dans la région de suintement froid de la mer de Chine	suintement froid de la mer de Chine méridionale, 22° 06' 57.142" N, 119° 17' 6.579" E, 1300 m de profondeur, 2–4 °C.	(Hanghai <i>et al.</i> , 2021)
2 ^{ème} région	Une quantité de sol et d'égouttoir à boues d'une station-service ont été collectés.	station-service situé dans le centre de Taïwan.	(Pao-Wen <i>et al.</i> , 2015) (Pao-Wen <i>et al.</i> , 2016) (Chih-Hung <i>et al.</i> 2017)
3 ^{ème} région	5g de sédiment ont été prélevé.	port de pêche sévèrement contaminé par des produits pétroliers (diesel et huile lubrifiante usée) situé dans la baie de Bou-Ismaïl, Wilaya de Tipaza, Algérie.	(Billal <i>et al.</i> , 2018)

2- Isolement

2.1. Milieux de culture

Divers milieux ont été utilisés pour isoler et cribler les souches bactériennes capables de dégrader le pétrole. Leur composition est indiquée comme suit :

- Milieu SeaWater (SW) : une eau de mer prélevée d'un endroit non contaminé et autoclavée à 120 °C pendant 20 min ;
- Milieu SeaWater -Crude Oil (SW-CO) : eau de mer contaminé par le pétrole brut ; 18g de gélose, 1L de SW avec 1 mL de pétrole brut);
- Milieu Chitin- SeaWater -Crude Oil (Ch -SW-CO): 4 g Chitine, 18 g agar, 1L SW. Le milieu est réparti dans des boîtes de Pétri, puis laisser se solidifier. Par la suite, 1mL de pétrole brut est étalé à la surface des boîtes.
- Milieu Luria Bertani (LB) : 10 g de peptone, 5 g d'extrait de levure, 23 g de NaCl dans 1L d'eau distillée. Le pH du milieu est ajusté à $7,0 \pm 0,2$ avec une solution de la soude caustique (NaOH, 1 mol/L). Pour la préparation de LB solide, 18 g d'agar sont ajoutées au milieu (Billal *et al.*, 2018).

- Selon (Billal *et al*, 2018), Des bactéries marines ont été isolées à partir de différents échantillons comme suit :

Une quantité de sédiment ou de sol, prélevée à l'aide d'une spatule stérile, est ajoutée dans un 100 mL de milieu SW. Le contenu est agité 2 min au vortex pour libérer le consortium bactérien de l'échantillon. Le pétrole brut est additionné au milieu à concentration de 1% (v/v). Le milieu de culture est incubé à 30 °C sur agitateur rotatif à 150 rpm pendant 7 jours. Trois repiquages successifs de la suspension microbienne à raison de 3% (v/v) ont été réalisés chaque deux jour dans un milieu SW-CO frais. A la fin de cette étape, des dilutions décimales (jusqu'à 10⁻⁶) sont préparées à partir d'inoculum de la suspension microbienne. Ensuite, un volume de chaque dilution est étalé sur la surface du milieu Ch-SW-CO, les boites Pétri sont incubées à 30 °C pendant trois jours. Pour la purification, les colonies obtenues sont successivement repiquées sur milieux LB et NSW-CO solides, jusqu'à l'obtention des isolats purs. Ces souches purifiées sont conservées sur milieu MRS (Gélose de Man, Rogosa, Sharpe) solide incliné, les cultures sont maintenues à 4°C (Badis et Kihal, 2005).

3. Identification des souches isolées

3.1. Identification morphologique

3.1.1. Aspect macroscopique

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies (forme, taille, couleur, l'élévation...) permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification (Germouche, 2014).

3.1.2. Aspect microscopique

L'observation microscopique consiste à observer les cellules bactériennes à l'état frais et après une coloration de Gram :

- **Etat frais** : permet de déterminer la forme, l'arrangement et la mobilité des bactéries. Il consiste en l'observation d'une goutte de suspension bactérienne préparée avec de l'eau physiologique et placée entre lame et lamelle. L'observation se fait au microscope photonique à grossissement X 100.
- **Coloration de Gram** : est une double coloration qui permet de connaître la forme, l'arrangement, la pureté, ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées.

Cette coloration permet de classer les bactéries selon leur capacité à fixer le cristal violet. Celles qui possèdent une couche de peptidoglycane mince sont décolorées lors

du lavage à l'éthanol (Gram-), alors que celles qui possèdent une couche de peptidoglycane épaisse vont retenir le colorant (Gram+). La consistance et la valeur de la coloration de Gram correspond à des différences biochimiques entre la paroi des bactéries Gram positif et les bactéries Gram négatif (Germouche, 2014).

- **Recherche de spore:** coloration de Moeller, fuschine de Ziehl à chaud + bleu de méthylène. Les spores apparaissent rouges sur fond bleu (Germouche, 2014).

3.2. Identification biochimique

L'étude biochimique nous oriente sur le métabolisme suivi par les micro-organismes étudiés et les enzymes qu'ils possèdent. Ces tests ont été réalisés en utilisant la galerie biochimique pour les souches microbiennes.

Les épreuves biochimiques permettent, en général, de distinguer les espèces, même étroitement apparentées entre elles (Germouche, 2014).

3.3. Identification moléculaire

3.3.1. Extraction d'ADN

- **Pour les bactéries Gram (+) :** resuspendre les cellules dans 480µl d'EDTA 50mM, ajouter une enzyme lytique (120µl) [Lysosyme et/ou lysostaphin], incubé à 37°C pendant 30-60min, centrifuger à 13000-16000 rpm pendant 2min. Eliminer le surnageant et aller à l'étape lyse des cellules (ci-dessous) (Angebault *et al*, 2020).
- **Pour les bactéries Gram (-):** Aller directement à l'étape de la lyse des cellules (ci-dessous) (Angebault *et al*, 2020).

- Lyse des cellules

1. Ajouter au culot 600µl de solution de lyse. Pipeter pour mélanger.
2. Incuber les microtubes pendant 5min à 80°C puis refroidir à température ambiante.
3. Ajouter 3µl de la RNase. Mélanger, incubé à 37°C pendant 15-60min, puis refroidir à température ambiante

- Précipitation des protéines

4. Ajouter 200µl de solution de précipitation de protéines et vortexer.
5. Incuber dans la glace pendant 5min.

6. Centrifuger à 13000-16000 rpm pendant 3min

-Précipitation et réhydratation de l'ADN

7. Transférer le surnageant dans un tube propre contenant 600µl d'isopropanol. Mélanger par inversion jusqu'à apparition des filaments d'ADN.

8. Centrifuger pendant 2min à 13000-16000 rpm et éliminer le surnageant.

9. Ajouter 600µl d'éthanol 70% et mélanger.

10. Centrifuger à 13000-16000 rpm pendant 2min.

11. Aspirer l'éthanol au maximum et faire sécher le culot (tube ouvert) jusqu'à évaporation complète de l'éthanol restant (10-15min).

12. Solubiliser l'ADN dans 100µl de solution de réhydratation de l'ADN pendant 1h à 65°C ou toute la nuit à 4°C (Angebault *et al*, 2020).

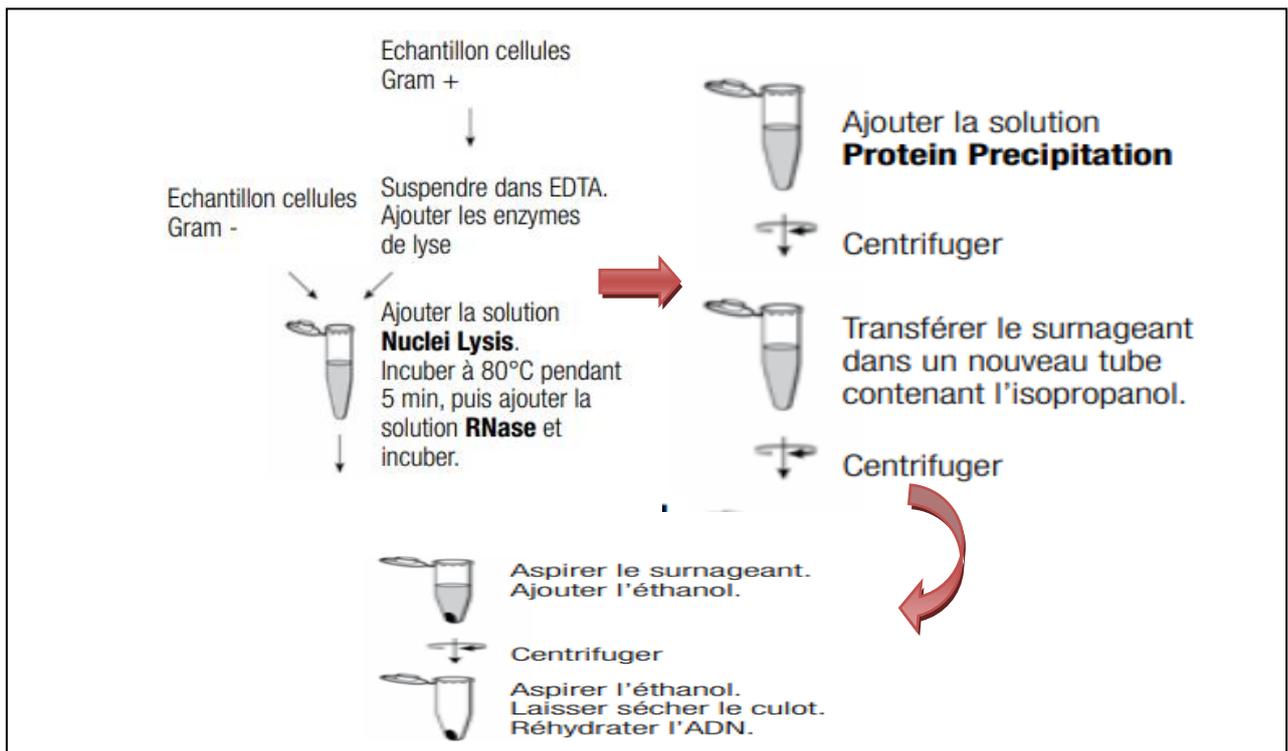


Figure 04. Protocole de l'extraction d'ADN

3.3.2. Amplification du fragment du gène 16S par PCR

La PCR permet d'amplifier *in vitro* le fragment cible du gène 16S qui sert de marqueur moléculaire pour l'identification des bactéries car ce gène est hautement conservée et son évolution (mutation) est très rare. La paire d'amorce utilisée est:

16S-27F AGAGTTTGATCCTGGCTCAG

16S-1492R GGTTACCTTGTTACGCTT (Shuai *et al*, 2019)

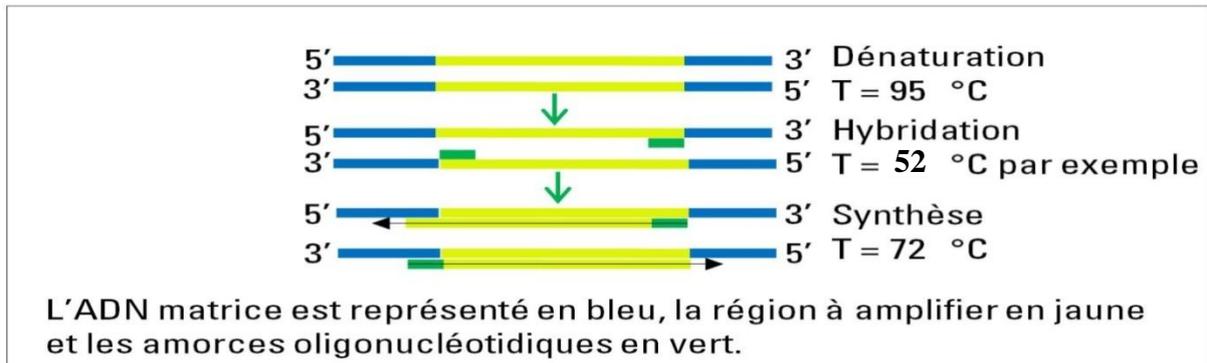


Figure 05. Etapes d'Amplification de l'ADN par PCR

Le programme de PCR est indiqué dans le tableau. Elle se déroule par cycles composés de trois étapes :

Tableau 4 : Programme de PCR

Nombre de cycles	Etape	Durée	Température
1	Dénaturation initiale	5-15 minutes	95°C
40 cycles	Dénaturation	30 secondes	95°C
	Hybridation	30 secondes	52°C
	Elongation	1,3 minute	72°C
1	Elongation finale	5 minutes	72°C

3.3.3. Séquençage des fragments amplifiés

Les amplicons sont séquencés selon la méthode Sanger et le protocole appliqué comme suit :

- (1) l'ADN double brin est dénaturé en deux ADN simple brin;
- (2) une amorce qui correspond à une extrémité de la séquence est attachée;
- (3) quatre solutions de polymérase avec quatre types de dNTP mais un seul type de

ddNTP sont ajoutées;

(4) la réaction de synthèse de L'ADN commence et la chaîne s'étend jusqu'à ce qu'un nucléotide de terminaison soit incorporé de manière aléatoire;

(5) les fragments d'ADN résultants sont dénaturés en ADN simple brin ;

(6) les fragments dénaturés sont séparés par électrophorèse sur gel et la séquence est déterminée (Stinga *et al*, 2019).

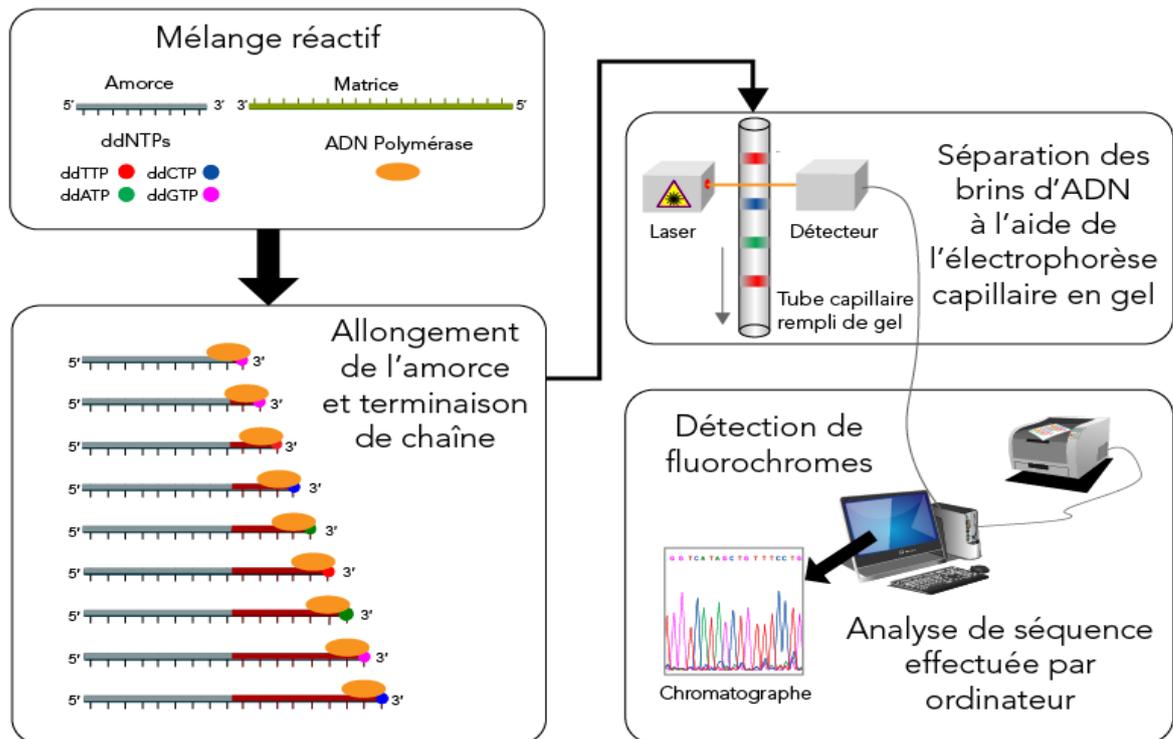


Figure 06. Etapes de séquençage de Sanger

3.3.4. Analyse phylogénétique

Les distances évolutives par paires ont été calculées en utilisant la méthode de Jukes et Cantor (1969). Un dendrogramme a été construit à l'aide de la méthode de neighbour-joining avec le programme Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) version 6.

4. Immobilisation des cellules bactériennes

Au cours des vingt dernières années, de nombreuses bactéries bénéfiques pour l'environnement ont été isolées et étudiées. Ces bactéries sont utilisées généralement dans la bioremédiation sous forme immobilisée sur un support. Il y a des supports naturels comme coquille de cannelle (Fu *et al*, 2021) et des supports biochimiques comme : l'alginate, le chlorure de

calcium (Pao-Wen *et al*, 2015), l'alcool polyvinylique (PVA) et le charbon actif (Pao-Wen *et al*, 2016)

L'immobilisation est préparée en quatre étapes selon Zhou *et al*,(2021)

4.1. Préparation de suspension cellulaire concentrée

La figure 07 ci-dessous résume l'étape de préparation de suspension cellulaire concentrée (Zhou *et al*, 2021).

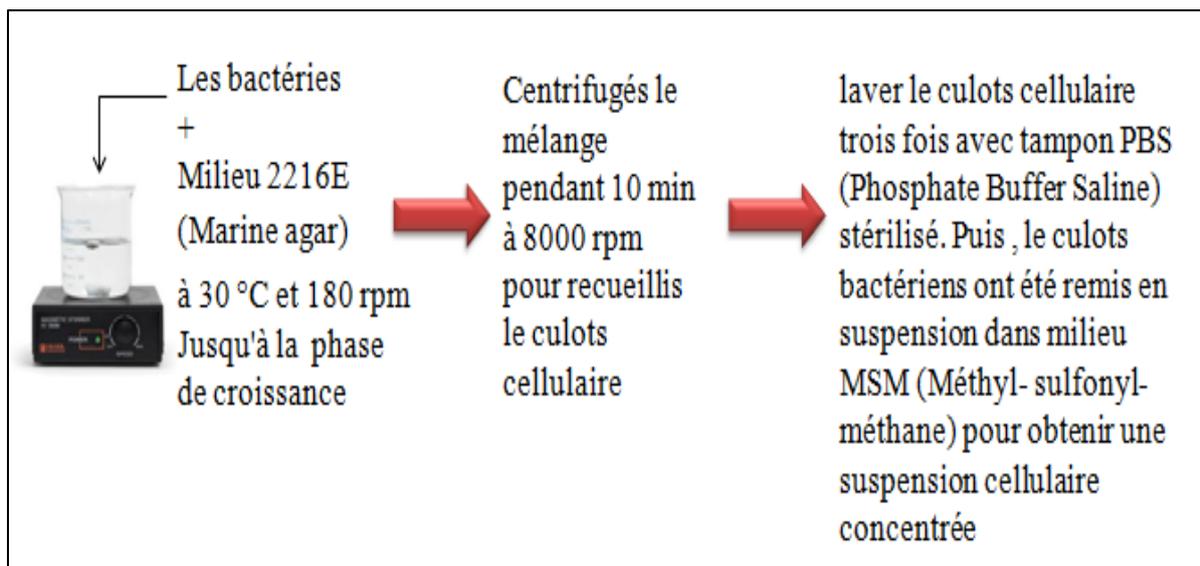


Figure 07. Préparation de suspension cellulaire concentrée

4.2. Préparation de biochar (support d'immobilisation)

Le biochar est produit par pyrolyse du maïs paille sous conditions limitées d'oxygène à 500°C pendant 8 h dans un four à moufle. Le biochar obtenu a été broyé et tamisé pour classer à base de taille, la grande taille (L, > 4,75 mm), la taille moyenne (M, 1,4–4,75 mm) et petite taille (S, <1,4 mm). Ensuite, le biochar a été lavé avec l'eau déminéralisée trois fois et séchée au four à 60 °C (Zhou *et al*, 2021).

4.3. Immobilisation des cellules bactériennes sur le biochar

Cette étape est illustrée dans la figure suivante (Zhou *et al*, 2021).

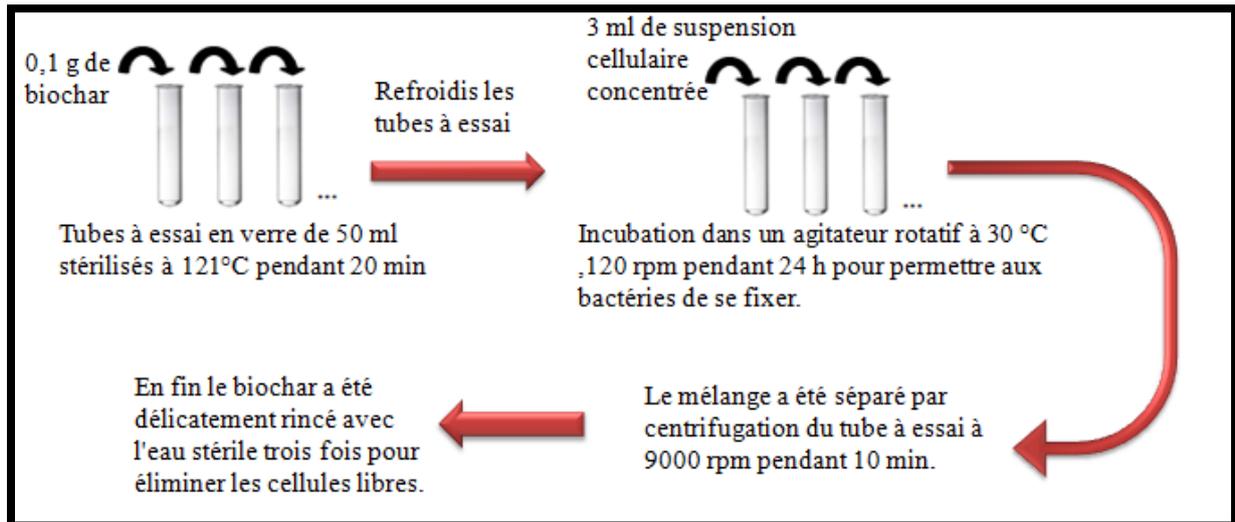


Figure 08. Immobilisation des cellules bactériennes sur le biochar

4.4. Observation au microscope électronique à balayage (MEB)

L'observation au MEB menées pour étudier les morphologies de la surface du biochar avant et après l'immobilisation des cellules. Tout d'abord, les échantillons de biochar ont été fixés dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5% (v/v) à 4°C pendant la nuit, suivie d'une centrifugation à 4000 rpm pendant 10 min pour éliminer le réactif. Ensuite, le précipité a été lavé trois fois avec du PBS, et déshydraté avec une série de concentrations croissantes d'éthanol (30 %, 50 %, 70 %, 90 % et 100 %) pendant 15 min chacune. De plus, les échantillons ont été lyophilisés et recouverts de poudre d'or. Enfin, les préparations ont été observées au microscope électronique à balayage (Zhou *et al*, 2021).

5. Bioremédiation de l'eau de mer polluée par le diesel

5.1. Traitement de l'eau de mer polluée par le diesel

Afin d'évaluer l'effet des bactéries immobilisées sur l'eau de mer polluée par le diesel quatre traitements ont été effectués selon Zhou *et al*, (2021). Ces traitements sont illustrés dans la figure 09.

La plupart des biochar-cellules bactériennes immobilisées flottent à la surface de l'eau, indiquant un bon contact entre le système de biochar bactérien et le carburant diesel.

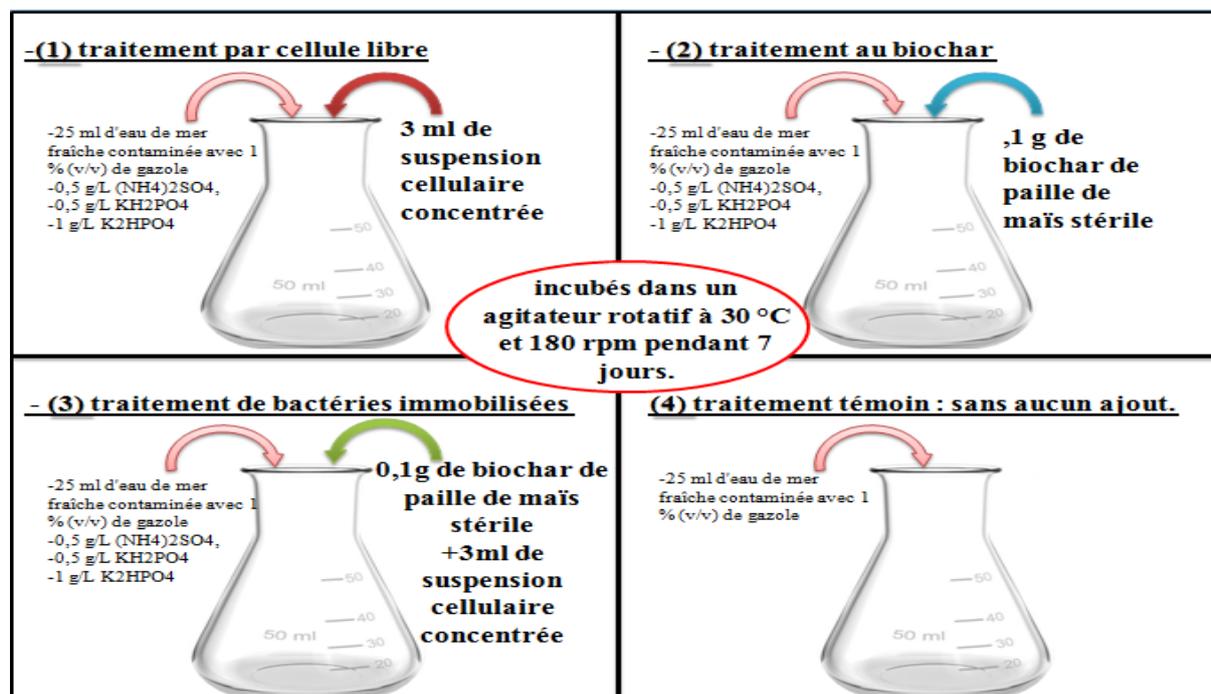


Figure 09. Traitements de l'eau de mer polluée par le diesel

Après l'incubation, les échantillons centrifugés pour séparer les phases solide et aqueuse. Le diesel résiduel dans les phases solide (biochar/biomasse bactérienne) et aqueuse a été récupérés séparément à l'aide de n-hexane (Zhou *et al*, 2021). L'extraction a été répétée deux fois, à chaque fois avec 5 ml de n-hexane (Imron et Titah, 2018) . Les efficacités de récupération du diesel à partir de l'eau de mer et du biochar étaient supérieures à 80 %, ce qui suggère que les données de quantification du diesel résiduel sont valides (Zhou *et al*, 2021).

2.2. Analyse de diesel résiduel par Chromatographie Gazeuse couplée Spectromètre de Masse (GC-MS)

La dégradation du diesel dans les traitements précédents a été évaluée par GC-MS.

Les paramètres de l'analyse sont : la colonne capillaire utilisée pour séparer les hydrocarbures est Rxi5Sil MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) dans les conditions de fonctionnement d'une taille d'échantillon de 0,8 μl. Le gaz vecteur est l'hélium pour l'injecteur et la température du détecteur a été maintenue à 310°C. La température du four : constante et égale à 50 °C pendant 5 min, puis variant de 5 °C/min jusqu'à 360 °C pendant 1h et maintenue pendant 15 min. L'ionisation par impact électronique adoptée dans cette analyse a été ajustée à 70 eV. La concentration de diesel a été exprimée en hydrocarbures pétroliers totaux (TPH) et la mesure

a été effectuée à l'aide de la solution d'étalonnage interne de série fournie par le code AccuStandard DRH-TX-002-D-40X (Imron *et al*, 2019).

Le pourcentage de dégradation du diesel a été calculé à l'aide de l'équation :

$$R = \frac{C_0 - C_e}{C_0} \times 100\%$$

Où R: le pourcentage de dégradation du diesel ; C₀ : l'aire de pic de l'étalon ; C_e : l'aire de pic de l'échantillon (Imron *et al*, 2019).

Chapitre 04.

Résultats et Discussion

1. Isolement

Le nombre des souches après l'isolement s'indiquant selon le tableau 5.

Tableau 5. Les nombres des souches

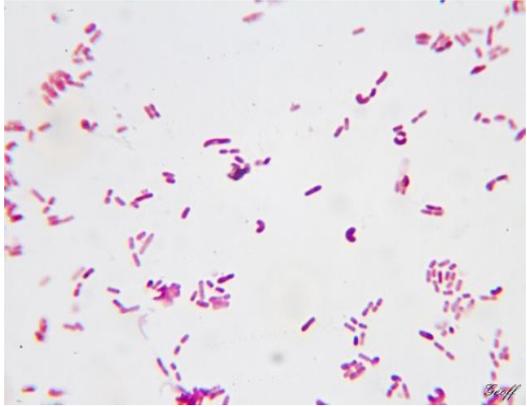
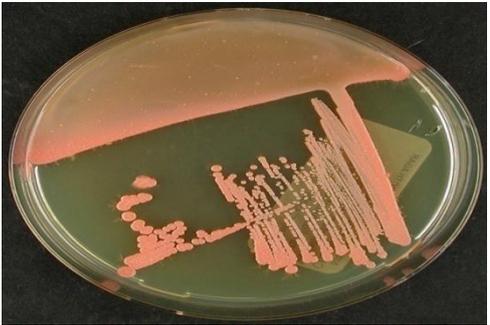
La région	Le nombre de souches isolées	Référence
1 ^{er} (Chine)	une souche	(Zhou <i>et al.</i> , 2021).
2 ^{ème} (Taiwan)	3 souches	(Pao-Wen <i>et al.</i> , 2015) (Pao-Wen <i>et al.</i> , 2016) (Chih-Hung <i>et al.</i> 2017)
3 ^{ème} (Algérie)	une souche	(Billal <i>et al.</i> , 2018)

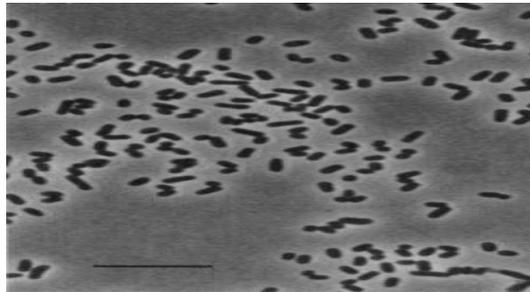
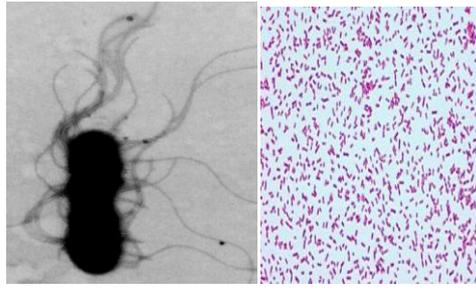
2. Identification des souches isolées

2.1. Examen macroscopique et microscopique

L'étude morphologique des colonies a permis de distinguer 05 souches différentes. Les caractéristiques macroscopique et microscopique de ces isolats sont regroupées dans le tableau 06.

Tableau 6. Caractéristiques macroscopique et microscopiques des souches isolées.

Les isolats	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
Isolat 1	<p>Diamètre 2 à 3 mm, forme bacille, régulier, surface lisses et couleur jaune sur milieu TCBS (Ben-Haim et Rosenberg, 2002).</p> 	<p>bacilles à Gram-négatif incurvés et très mobiles (colonies plates) (Ben-Haim et Rosenberg, 2002).</p> 
Isolat 2	<p>une souche non sporulée, bords légèrement irréguliers, de couleur orange (Yoon <i>et al</i>, 2000)</p> 	<p>Gram positif, forme des tiges et des filaments ramifiés au début de la phase de croissance puis fragmentés en bâtonnets courts ou cocci (Yoon <i>et al</i>, 2000)</p> 

<p>Isolat 3</p>	<p>Couleur brunâtre, brillantes et croissance de colonies crémeuses et rugueuses aux bords irréguliers, le diamètre des colonies est de 0,2-2,0 mm, (Kummer, Peter, & Erko, 1999)</p> 	<p>Gram +, filaments ramifiés qui ont tendance à se briser en courtes chaînes d'éléments coccobacillaires (Kummer, Peter, & Erko, 1999)</p> 
<p>Isolat 4</p>	<p>les cultures sur gélose Trypticasesoy produisent de petites colonies lisses (diamètre 0,2 mm), aucun pigment ou odeur n'est produit, circulaires, lisses, des colonies entières se développent sur gélose nutritive après 24h d'incubation (Kiedjian <i>et al</i>,1986)</p> 	<p>bâtonnets droits à Gram négatif, à coloration uniforme, de 0,5 à 1 µm de diamètre et 1,0 à 1,5 µm de long et ont des côtés parallèles et extrémités arrondies, les cellules non sporulant et non encapsulé et mobile, au moyen de deux à huit flagelles péritriches. (Kiedjian <i>et al</i>,1986)</p> 
<p>Isolat 5</p>	<p>les jeunes colonies sont circulaires, de 1 à 2 mm de diamètre, lisses, convexes et blanches, à bords réguliers. Après 1 semaine d'incubation, les colonies grossir jusqu'à 2 à 4 mm de diamètre et devenir beige rosé (Gauthier <i>et al</i>, 1992)</p>	<p>gram-négatif, organisme en forme de bâtonnet, non sporulé, les cellules sont mobiles au moyen d'un seul flagelle (Gauthier <i>et al</i>, 1992).</p>



2.2. Identification biochimique

Tableau 7. Caractéristique biochimique des souches

Teste biochimique	Isolat 1	Isolat 2	Isolat 3	Isolat 4	Isolat 5
Réduction des nitrates	+	+	+	+	+
Respiration des nitrates				-	
Réduction des nitrites				-	
Respiration des nitrites				-	
Production d'indole	-				
Uréase	+	+	+		-
Production de H ₂ S		+	+		
Gélatinase, protéase	+				
Oxydase	+				+
Production d'indole					
D-Glucose	+	-	-		-
D-Ribose		+	-		
D-Fructose		+	-		
saccharose	+				
β-Galactosidase	+				
Maltose		-	+		
D-Mannitol		+	+		-
D-xylose				-	
Reference	(Ben-Haim et Rosenberg, 2002)	(Yoon <i>et al</i> , 2000)	(Kummer <i>et al</i> , 1999)	(Kiedjian <i>et al</i> , 1986)	(Gauthier <i>et al</i> , 1992)

- L'analyse des résultats mentionnés ci-dessus (tableau 6 et 7) a permis d'identifier les isolats :

- Isolat1: *Vibrio sp.*
- Isolat 2: *Rhodococcus pyridinivorans*.
- Isolat3: *Gordonia alkanivorans*.
- Isolat4: *Alcaligenes piechaudii*.
- Isolat5: *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*.

2.3. Identification moléculaire

L'identification moléculaire basée sur le gène de l'ARNr 16S a montré que la souche LQ2 (isolat 1) avait la plus grande similitude (99,93 %) avec la souche A8 de *Vibrio fluvialis* (Figure 10), suggérant que LQ2 appartenait à *Vibrio sp.*, que l'on trouve couramment dans l'environnement (Zhou *et al*, 2021).

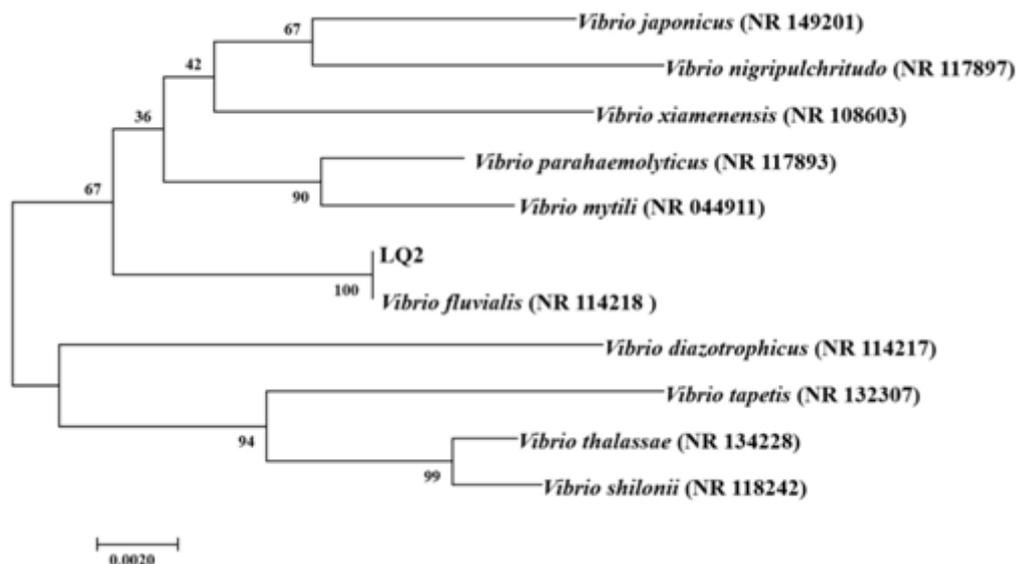


Figure 10. Arbre phylogénétique de l'isolat 1 (la souche LQ2) (Zhou *et al*, 2021).

3. Observation sur MEB de biochar avant et après immobilisation

Le très bon contact entre le biochar et les microorganismes est clairement observé dans la figure 11, avant (Figure 11 a et 11 c) et après (Figure 11 b et 11 d) l'immobilisation (Zhou *et al.*, 2021). Cela indique que les bactéries immobilisées productrices de BS facilitent un bon contact entre l'eau de mer (hydrophile) et le diesel (lipophile) (Shengli Sun, 2019).

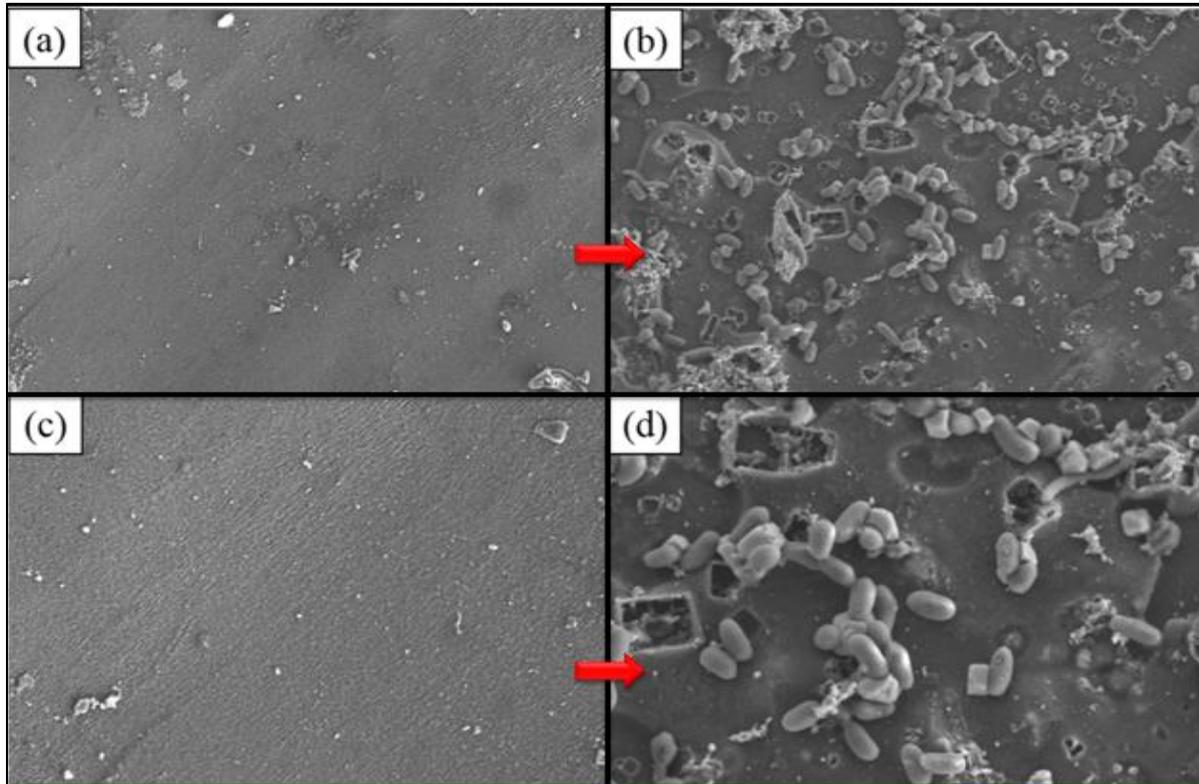


Figure 11. Images de MEB de biochar et des cellules immobilisées et libres avec différents grossissements.

- (a) les cellules libres et biochar de paille de maïs $\times 5000$
- (b) Les cellules immobilisées sur biochar de paille de maïs $\times 5000$
- (c) les cellules libres et biochar de paille de maïs $\times 10,000$
- (d) Les cellules immobilisées sur biochar de paille de maïs $\times 10,000$

4. Bioremédiation de l'eau de mer polluée par le diesel

Selon Zhou *et al.*, (2021) la figure 12 montre la teneur de diesel dans les phases aqueuse et solide dans différents traitements :

- dans le traitement témoin: la teneur a diminué de 0,169 g à 0,159 g \rightarrow efficacité de dégradation de 6,0 % ;
- dans le traitement au biochar: la teneur a diminué de 0,134 g \rightarrow efficacité de dégradation de 20,8 % ;

- dans le traitement par les cellules bactériennes libres : la teneur a diminué de 0,086 g → efficacité de dégradation de 49,3 % ;
- dans le traitement par biochar-cellules immobilisées : la teneur a diminué de 0,019 g → efficacité de dégradation de 86,5 %.

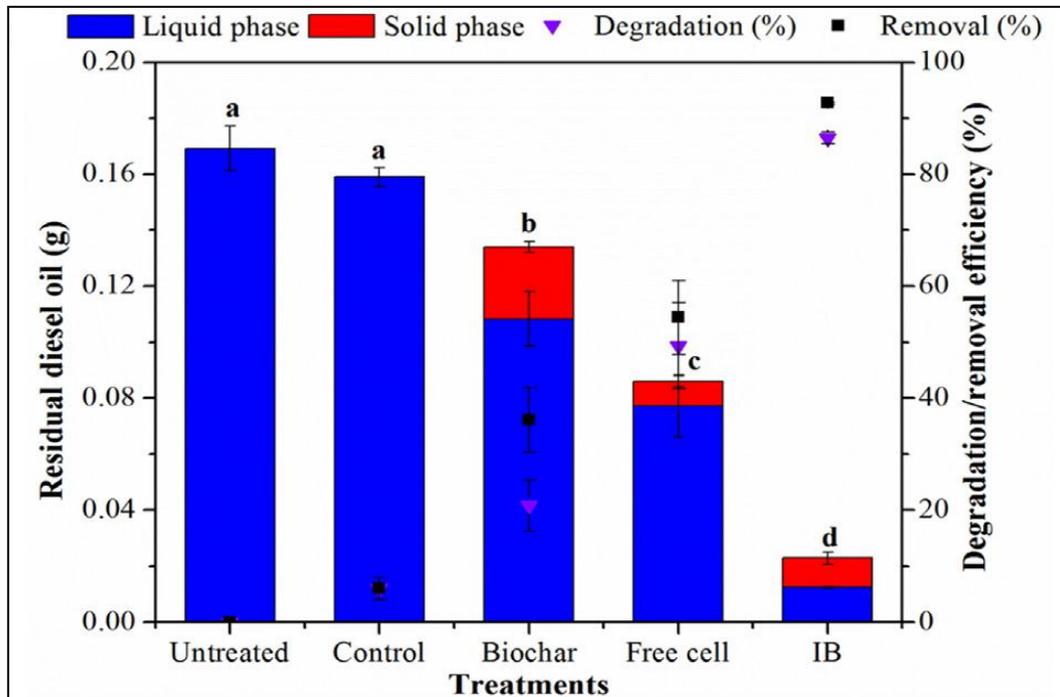


Figure 12. Diésel résiduelle dans les phases solide et aqueuse des traitements : non traités, témoins, biochar, cellules libres et IB avec leurs efficacités de dégradation et d'élimination correspondantes (Zhou *et al*, 2021).

- Pour le traitement témoin : la diminution de la teneur en diesel pourrait être attribuée à son évaporation naturelle (Zhou *et al*, 2021).
- Dans le traitement au biochar : le biochar ajouté a fourni une matrice de fixation pour les micro-organismes natifs, agissant comme une barrière entre le substrat toxique et les bactéries (Chenet *et al*, 2016). Parallèlement, le biochar de paille de maïs a démontré une forte capacité à adsorber le diesel, favorisant le contact entre le diesel et les cellules. Cependant, en raison de la forte hydrophobicité du diesel, la biodisponibilité était encore faible (Zhong *et al*, 2016).
- En ce qui concerne le traitement par cellules libres : les bactéries inoculées ont montré une forte capacité de dégradation du diesel (Figure 12). Le BS produits par les bactéries a amélioré la solubilisation du diesel composé, permettant à d'autres micro-organismes natives dégradants d'utiliser le substrat hydrophobe. Néanmoins, en raison de l'absence d'une matrice d'immobilisation, il est difficile pour les micro-organismes de se former les biofilms, essentiels pour que les bactéries résistent aux

environnements (Zhou *et al*, 2021). Selon Farah Eryssa *et al*. (2021) la dégradation de diesel par les micro-organismes se fait par catalyse des enzymes intracellulaire qui implique ont quatre étape: la première étape cruciale du processus commence par l'absorption des polluants par les micro-organismes et la sécrétion des tensioactifs (agent de surface est un composé qui modifie la tension superficielle entre deux surfaces) pour faciliter l'émulsification. Ensuite, les polluants émulsifiés sont adsorbés à la surface de la membrane cellulaire. De plus, ils entreront directement dans la membrane cellulaire par endocytose sous forme de transport actif ou passif et subiront une réaction enzymatique avec les enzymes respectives comme catalyseurs pour compléter le processus global.

- En conséquence, le traitement IB (biochar-cellules immobilisées) a montré divers mérites dans la remédiation de l'eau de mer pollué par le diesel. Le biochar peut favoriser la formation de biofilms de micro-organismes dégradants natifs et adsorbés des composants hydrophobes sur sa surface, résultant en une meilleure interaction entre les cellules immobilisées et les substrats. Pendant ce temps, les bactéries immobilisées étaient capable de sécréter BS, qui pourrait émulsifier le diesel, augmentant la disponibilité de substrats pour autres bactéries. De plus, la présence de biochar dans le système de culture pourrait réduire les interférences externes avec les micro-organismes, tels que la toxicité des intermédiaires de dégradation et les fortes concentrations de polluants (Liping *et al*, 2019).

5. Efficacité de la bioremédiation selon la taille du biochar

La figure 13 montre les résultats de la biodégradation selon la taille de biochar et la teneur en diesel dans les phases solide et aqueuse.

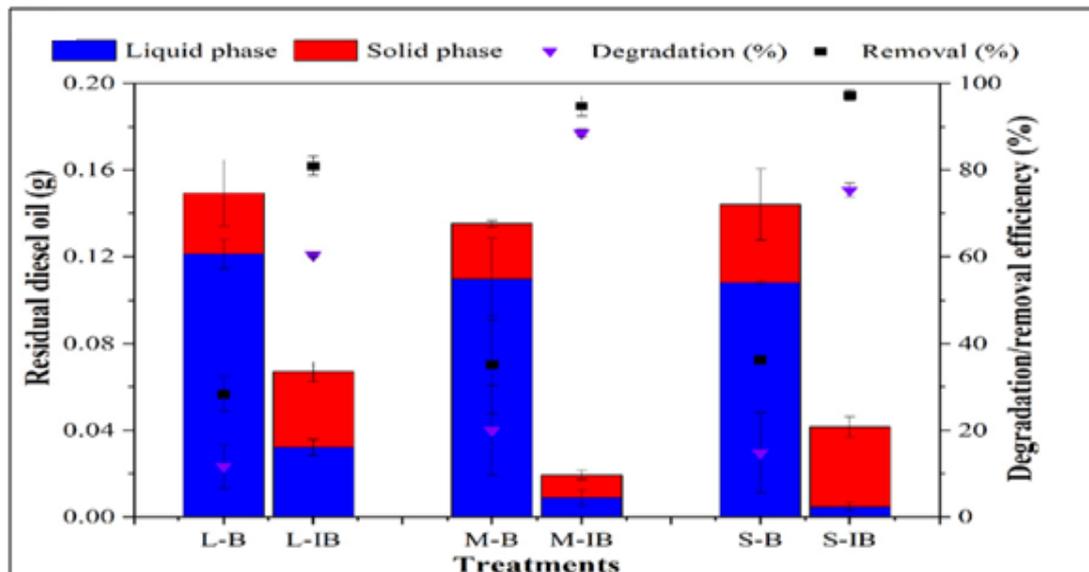


Figure 13. Diesel résiduelle dans les phases solide et aqueuse des traitements au biochar et par IB avec différentes tailles de biochar respectivement et leurs efficacités de dégradation et d'élimination diesel ; **L**> 4,75 mm la grand taille, **M** 1,4–4,75 mm la taille moyenne et **S**<1,4 mm petite taille. **B** : biochar acellulaire LB, MB et SB, **IB** : biochar-cellules immobilisées L-IB, M-IB et S-IB (Zhou *et al*, 2021).

Tableau 8. Pourcentage d'efficacités de dégradation dans différents traitements.

Les traitements	LB	MB	SB	L-IB	M-IB	S-IB
Les efficacités de dégradation en %	11,7	20,1	14,8	60,4	88,5	75,4

- Selon le tableau 8 qui montre les résultats obtenus dans la figure 13 :

Le biochar de taille moyenne a présenté les meilleures performances de biodégradation du diesel pour les formes immobilisées et acellulaires. Cependant, en ce qui concerne l'efficacité totale d'élimination du carburant diesel de l'eau de mer contaminée, les plus petites tailles de biochar ont montré de meilleures performances. Le biochar inférieur à 1,4 mm atteint une efficacité d'élimination de 97,3 % (Figure 13). Cependant le biochar de petite taille présente des surfaces spécifiques et des volumes de pores plus grands que le biochar de plus grande taille, ce qui lui permet d'adsorber plus de polluants. Cela conduit à un meilleur contact entre les cellules bactériennes et les polluants. La grande quantité de diesel adsorbé dans la phase solide des traitements S-B et S-IB a également confirmé que le biochar de petite taille présentait les meilleures performances d'adsorption (Figure 13) (Feiet *al*, 2020).

Le tableau 9 montre le pourcentage de la bioremédiation de l'eau de mer contaminé par le diesel par chaque souche.

Tableau 9. Le pourcentage de la bioremédiation de l'eau de mer par chaque souche

Les souches	Pourcentage de dégradation de diesel %	Référence
<i>Vibriosp</i>	94,7	(Zhou <i>et al</i> , 2021).
<i>Rhodococcuspyridinivoran</i> s.	78	(Pao-Wen <i>et al</i> , 2015)
<i>Gordoniaalkanivorans</i>	75	(Pao-Wen <i>et al</i> , 2016)
<i>Alcaligenespiechaudii</i>	70	(Chih-Hung <i>et al</i> , 2017)
<i>Marinobacterhydrocarbon</i> <i>oclasticus</i>	97,44	(Billal <i>et al</i> , 2018)

La bactérie *Vibrio sp* sont dégradé le diesel et converti les composés initiaux en dioxyde de carbone, en eau et en plusieurs intermédiaires (GG *et al*, 2016). Les genres *Alcanivorax* dominaient les environnements marins souffrant de contamination par les hydrocarbures en utilisant les hydrocarbures comme principale source de carbone, en produisant des biosurfactants et en formant des biofilms autour des gouttelettes d'huile et de l'interface huile-eau (Yakimov *et al*, 2019). *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* et *Marinobacter sp* utilisait les hydrocarbures phénanthrène avec du pyrène dans des conditions salines à 4 %. Le phénanthrène complètement éliminé au fil du temps malgré le faible taux d'élimination à mesure que la salinité augmentait (Jamal, 2020). Aussi, les bactéries halophiles, *Ochrobactrum halosaudis*, *Stenotrophomonas mal tophilia*, *Achromobacter xylooxidans* et *Mesorhizobium halosaudis*, avait réussi à dégrader différents hydrocarbures (phénanthrène, fluorène et pyrène) avec différents poids moléculaires inférieurs à 40 g/L. Environ 40% de diesel éliminés avec succès par des bacteries halophile et les isolats bactériens dominants appartenaient aux genres : *Dietzia*, *Arthrobacter* et *Halomonas* (Somee *et al*, 2018).

Conclusion

Conclusion

Le problème de pollution de l'eau de mer est un problème mondial. Les hydrocarbures diesel sont parmi les polluants marins les plus courants. Il est donc primordial de mettre en œuvre des moyens de dépollution des sites contaminés. La bioremédiation est un moyen pas cher et écologique pour éliminer les hydrocarbures diesel de l'environnement marin. Les microorganismes marins peuvent dégrader partiellement ou complètement le diesel en composés hydrosolubles ou en dioxyde de carbone et en eau.

De ce fait plusieurs échantillons, sédiments et sols contaminés par du diesel, ont été prélevés dans les pays de Chine, de Taiwan et d'Algérie. L'isolement et le criblage des bactéries ont été réalisés sur différents milieux. Cinq souches ont été isolées et purifiées. L'étude des caractères morphologiques, macroscopiques, microscopiques, biochimiques et moléculaire permet d'identifier les souches isolées: *Vibrio sp*, *Rhodococcus pyridinivorans*, *Gordonia alkanivorans*, *Alcaligenes piechaudii*, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. Ces souches ont été mobilisées sur le biochar et les résultats obtenus sont : *Vibriosp* (94,7%), *Rhodococcus pyridinivorans* (78%), *Gordonia alkanivorans* (75%), *Alcaligenes piechaudii* (70%) et *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (97,44 %).

Références

Bibliographiques

1. Agarry S. E., Ogunleye O. O. 2012. Box-Behnken design application to study enhanced bioremediation of soil artificially contaminated with spent engine oil using biostimulation strategy. *International Journal of Energy and Environmental Engineering* 3(1): 1-14.
2. Angebault C., Payen M., Woerther P. L., Rodriguez C., Botterel F. 2020. Combined bacterial and fungal targeted amplicon sequencing of respiratory samples: Does the DNA extraction method matter?. *PloS one* 15(4): e0232215.
3. Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M., Ouzrout R. 2005. Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "arabes et kabyles". *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies* 30-37.
4. Hocine R. Y., Ahmed B., Fatiha, D., Rachid, D., Abdelwaheb C. 2018. Bioremédiation des sols pollués de pétrole par les micro-organismes indigènes et amélioration génétique de leur pouvoir de dégradation. Université de Mostaganem, Mostaganem.
5. Ben-Haim Y., Rosenberg E. 2002. A novel *Vibrio* sp. pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *Marine Biology* 141(1): 47-55.
6. Bezza F. A., Chirwa E. 2016. Biosurfactant-enhanced bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in creosote contaminated soil. *Chemosphere* 144: 635-644.
7. Pashaei R., Zahedipour-Sheshglani P., Dzingelevičienė R., Abbasi S., Rees R. M. 2022. Effects of pharmaceuticals on the nitrogen cycle in water and soil: a review. *Environmental Monitoring and Assessment* 194(2): 1-20.
8. Zenati B., Chebbi A., Badis A., Eddouaouda K., Boutoumi H., El Hattab M., Franzetti A. 2018. A non-toxic microbial surfactant from *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SdK644 for crude oil solubilization enhancement. *Ecotoxicology and environmental safety* 154: 100-107.
9. Narimen G., Hassina H. 2016. Contribution à l'étude de la contamination par les métaux lourds (pb et cd) dans le poisson (*Sardina pilchardus*) au niveau de la côte méditerranéenne (Doctoral dissertation).
10. Chalhmi H. (2015). Etude de la pollution marine par les hydrocarbures et caractérisation de leurs effets biochimiques et moléculaires sur la palourde de *Ruditapes* sp. Doctoral dissertation, Université de Bordeaux, 318p

11. Chen Y., Yu B., Lin J., Naidu R., Chen Z. 2016. Simultaneous adsorption and biodegradation (SAB) of diesel oil using immobilized *Acinetobacter venetianus* on porous material. *Chemical Engineering Journal* 289: 463-470.
12. Chen C. H., Whang L. M., Pan C. L., Yang C. L., Liu P. 2017. Immobilization of diesel-degrading consortia for bioremediation of diesel-contaminated groundwater and seawater. *International Biodeterioration & Biodegradation* 124: 62-72.
13. Das N., Chandran, P. 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international*.
14. Khalid F. E., Lim Z. S., Sabri S., Gomez-Fuentes C., Zulkharnain A., Ahmad S. A. 2021. Bioremediation of diesel contaminated marine water by bacteria: A review and bibliometric analysis. *Journal of Marine Science and Engineering* 9(2): 155.
15. Lian F., Yu W., Zhou, Q., Gu, S., Wang, Z., & Xing, B. (2020). Size matters: nano-biochar triggers decomposition and transformation inhibition of antibiotic resistance genes in aqueous environments. *Environmental science & technology*, 54(14), 8821-8829.
16. Fu X., Qiao Y., Xue J., Cheng D., Chen C., Bai Y., Jiang Q. 2021. Analyses of community structure and role of immobilized bacteria system in the bioremediation process of diesel pollution seawater. *Science of The Total Environment* 799: 149439.
17. Saxena G., Kumar V., Shah M. P. (Eds.). 2020. Bioremediation for environmental sustainability: toxicity, mechanisms of contaminants degradation, detoxification and challenges. Elsevier.
18. Gauthier M. J., Lafay B., Christen R., Fernandez L., Acquaviva M., Bonin P., Bertrand J. C. 1992. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 42(4): 568-576.
19. Guermouche m'rassi A. 2014. Caractérisation moléculaire des bactéries impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures , Thèse de Doctorat. Université d'Oran, 153p.
20. Isiodu G. G., Stanley H. O., Ezebuoro V., Okerentugba P. O. 2016. Role of plasmid-borne genes in the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by consortium of aerobic heterotrophic bacteria. *J Pet Environ Biotechnol*, 7(264): 2.

21. Mille G., Asia L., Guiliano M., Malleret L., Doumenq P. 2007. Hydrocarbons in coastal sediments from the Mediterranean Sea (Gulf of Fos area, France). *Marine pollution bulletin* 54(5): 566-575.
22. Cui H., Su X., Chen F., Holland M., Yang S., Liang J., Hou W. 2019. Microbial diversity of two cold seep systems in gas hydrate-bearing sediments in the South China Sea. *Marine environmental research* 144: 230-239.
23. Cui H., Su X., Chen F., Holland M., Yang S., Liang J., Hou W. 2019. Microbial diversity of two cold seep systems in gas hydrate-bearing sediments in the South China Sea. *Marine environmental research* 144: 230-239.
24. Purwanti I. F., Abdullah S. R. S., Hamzah A., Idris M., Basri H., Mukhlisin M., Latif M. T. 2015. Biodegradation of diesel by bacteria isolated from *Scirpus mucronatus* rhizosphere in diesel-contaminated sand. *Advanced Science Letters* 21(2): 140-143.
25. Purwanti I. F., Abdullah S. R. S., Hamzah A., Idris M., Basri H., Mukhlisin M., Latif M. T. 2015. Biodegradation of diesel by bacteria isolated from *Scirpus mucronatus* rhizosphere in diesel-contaminated sand. *Advanced Science Letters*, 21(2), 140-143.
26. Jamal M. T. 2022. Enrichment of potential halophilic *Marinobacter* consortium for mineralization of petroleum hydrocarbons and also as oil reservoir indicator in Red Sea, Saudi Arabia. *Polycyclic Aromatic Compounds* 42(2): 400-411.
27. Khilil-radji F. 2015. Evaluation du potentiel hydrocarbonoclaste des bactérie marin isolée de la cote oranaise, Oran, département de Biology.
28. Kiredjian M., Holmes B., Kersters K., Guilvout I., De Ley, J. 1986. *Alcaligenes piechaudii*, a new species from human clinical specimens and the environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 36(2):282-287.
29. Kummer C., Schumann P., Stackebrandt E. 1999. *Gordonia alkanivorans* sp. nov., isolated from tar-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 49(4): 1513-1522.
30. Cummings S. P. (Ed.). 2010. *Bioremediation: Methods and protocols* (Vol. 599). *Methods in Molecular Biology*.

31. Lou L., Huang Q., Lou Y., Lu J., Hu B., Lin Q. 2019. Adsorption and degradation in the removal of nonylphenol from water by cells immobilized on biochar. *Chemosphere* 228: 676-684.
32. Bezza F. A., Chirwa E. M. N. 2016. Biosurfactant-enhanced bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in creosote contaminated soil. *Chemosphere* 144:635-644.
33. Liu P. W. G., Yang D. S., Tang J. Y., Hsu H. W., Chen C. H., Lin, I. K. 2016. Development of a cell immobilization technique with polyvinyl alcohol for diesel remediation in seawater. *International Biodeterioration & Biodegradation* 113:397-407.
34. Liu P. W. G., Liou J. W., Li Y. T., Su W. L., Chen C. H. 2015. The optimal combination of entrapped bacteria for diesel remediation in seawater. *International Biodeterioration & Biodegradation* 102: 383-391.
35. D'Adamo R., Di Stasio M., Fabbrocini A., Petitto F., Roselli L., Volpe M. G. 2008. Migratory crustaceans as biomonitors of metal pollution in their nursery areas. The Lesina lagoon (SE Italy) as a case study. *Environmental monitoring and assessment* 143(1), 15-24.
36. Sun S., Wang Y., Zang T., Wei J., Wu H., Wei C., Li, F. 2019. A biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* S5 isolated from coking wastewater and its application for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Bioresource technology* 281: 421-428.
37. Rezaei Somee M., Shavandi M., Dastgheib S. M. M., Amoozegar M. A. 2018. Bioremediation of oil-based drill cuttings by a halophilic consortium isolated from oil-contaminated saline soil. *3 Biotech* 8(5): 1-13.
38. Sting R., Eisenberg, T., Hrubenja, M. (2019). Rapid and reasonable molecular identification of bacteria and fungi in microbiological diagnostics using rapid real-time PCR and Sanger sequencing. *Journal of microbiological methods* 159: 148-156.
39. Yakimov M. M., Golyshin P. N., Crisafi F., Denaro R., Giuliano L. 2019. Marine, aerobic hydrocarbon-degrading Gammaproteobacteria: the family

- Alcanivoracaceae. Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes 167-179.
40. Yoon J. H., Kang S. S., Cho Y. G., Lee S. T., Kho Y. H., Kim C. J., Park Y. H. (2000). *Rhodococcus pyridinivorans* sp. nov., a pyridine-degrading bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 50(6):2173-2180.
41. Zenati B. 2018. Biodégradation des hydrocarbures pétroliers par des bactéries marines: Application en traitement des eaux de mer contaminées par le pétrole, Doctoral dissertation, Université Saad Dahlab Blida 1 (Algérie).
42. Zhang Z., Gai L., Hou Z., Yang C., Ma C., Wang Z., Xu P. 2010. Characterization and biotechnological potential of petroleum-degrading bacteria isolated from oil-contaminated soils. *Bioresource Technology* 101(21): 8452-8456.
43. Yakimov M. M., Golyshin P. N., Crisafi F., Denaro R., Giuliano L. 2019. Marine, aerobic hydrocarbon-degrading Gammaproteobacteria: the family Alcanivoracaceae. Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes 167-179.
44. Zenati B. 2018. Biodégradation des hydrocarbures pétroliers par des bactéries marines: Application en traitement des eaux de mer contaminées par le pétrole, Doctoral dissertation, Université Saad Dahlab Blida 1 (Algérie).
45. Zhong H., Yang X., Tan F., Brusseau M. L., Yang L., Liu Z., Yuan, X. 2016. Aggregate-based sub-CMC solubilization of n-alkanes by monorhamnolipid biosurfactant. *New Journal of Chemistry* 40(3): 2028-2035.
47. Zhou H., Jiang L., Li K., Chen C., Lin X., Zhang C., Xie Q. 2021. Enhanced bioremediation of diesel oil-contaminated seawater by a biochar-immobilized biosurfactant-producing bacteria *Vibrio* sp. LQ2 isolated from cold seep sediment. *Science of The Total Environment* 793: 148529.

ملخص

المعالجة البيولوجية هي تقنية لزيادة التحول الأحيائي للملوثات في مياه البحر من خلال العمليات البيولوجية. بعد التحديد المورفولوجي والميكروسكوبي والكيميائي الحيوي والجزيئي، تكون السلالات المعزولة هي: (1) *Vibriosp*، (2) *Rhodococcus pyridinivorans*، (3) *Gordonia alkanivorans*، (4) *Alcaligenes piechaudii*، (5) *hydrocarbonoclasticus Marinobacter h*. تم استخدام هذه البكتيريا في المعالجة الحيوية في شكل مثبت على دعائم من قش الذرة صغير الحجم. النسبة المئوية لتحلل الديزل التي تم تقييمها بواسطة MS-CG هي كما يلي: (1) 94.7%، (2) 78%، (3) 75%، (4) 70% و (5) 97.44%.

الكلمات المفتاحية: المعالجة الحيوية، مياه البحر، الديزل، قش الذرة، البكتيريا.

Résumé

La Bioremédiation est une technique consistant à augmenter la biotransformation de polluants dans l'eau de mer grâce à des processus biologiques. Après l'identification morphologique, microscopique, biochimique et moléculaire les souches isolées sont: *Vibriosp* (1), *Rhodococcus pyridinivorans* (2), *Gordonia alkanivorans* (3), *Alcaligenes piechaudii* (4), *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (5). Ces bactéries ont été utilisées en bioremédiation sous forme immobilisé sur un support de biochar de petite taille. Le pourcentage de décomposition du diesel évalué par CG-MS est le suivant: (1) 94,7%, (2) 78%), (3) 75%), (4) 70%) et (5) 97,44 %).

Mots clés: Bioremédiation, l'eau de mer, diesel, biochar, les bactéries.

Abstract

Bioremediation is a technique to increase the biotransformation of pollutants in seawater through biological processes. After morphological, microscopic, biochemical and molecular identification the isolated strains are: *Vibriosp* (1), *Rhodococcus pyridinivorans* (2), *Gordonia alkanivorans* (3), *Alcaligenes piechaudii* (4), *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (5). These bacteria were used in bioremediation in immobilized form on a small biochar support. The percentage of diesel decomposition evaluated by GC-MS is as follows: (1) 94.7%, (2) 78%), (3) 75%), (4) 70%) and (5) 97.44%.

Keywords: Bioremediation, sea water, diesel, biochar, bacteria.