

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

1 seul  
ca  
3/96

وزارة التربية الوطنية

MINISTERE DE L'EDUCATION NATIONALE

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
المكتبة -  
BIBLIOTHEQUE -  
Ecole Nationale Polytechnique

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

DEPARTEMENT GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

## PROJET DE FIN D'ETUDES

ANÉE : 1995 - 1996

### SUJET

BIODEGRADATION  
DU BENZENE ET DU TOLUENE  
PAR DES SOUCHES DE  
PSEUDOMONAS ET DE BACILLUS

Proposé par :

Mme KITOUS

Etudié par :

Melle BISKRI Djahida

Dirigé par :

Melle ZOUGLECHE  
Mme KITOUS

PROMOTION

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التربية الوطنية

MINISTERE DE L'EDUCATION NATIONALE

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
BIBLIOTHEQUE — المكتبة  
Ecole Nationale Polytechnique

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

DEPARTEMENT GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

## PROJET DE FIN D'ETUDES

### SUJET

BIODEGRADATION  
DU BENZENE ET DU TOLUENE  
PAR DES SOUCHES DE  
PSEUDOMONAS ET DE BACILLUS

Proposé par :  
Mme O. KITOUS  
Mlle Y. DJEMAI Zoughlache

Etudié par :  
Melle BISKRI Djahida

Dirigé par :  
Melle Y. DJEMAI Zoughlache  
Mme O. KITOUS

PROMOTION

ENP 10, Avenue Hassen Badi - EL-HARRACH - ALGER



## DEDICACES

A ma mère, à mon père, qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde affection.

A mes frères et soeurs,

A mon cher frère Mohamed.

A mes meilleures amies KERKOUCHIE Faiza et BEN EL KADI Hakima ,  
MOKRANE Hind, BOUDRIS Nadia , OUAZENE Naima.

A ma très chère amie BENCHOUHA Amel qui m'a présentée la meilleure aide  
pour la réalisation de ce travail.





المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
المكتبة — BIBLIOTHEQUE  
Ecole Nationale Polytechnique

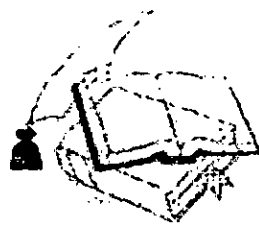
## REMERCIEMENTS

Je remercie M<sup>elle</sup> ZOUGHLECHE et M<sup>elle</sup> KITOUS pour avoir accepté de m'encadrer pour l'élaboration de ce travail, qu'elles trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie également M<sup>r</sup>. MOHAMEDI Assistant à Bab Ezzouar pour son aide , à Mme CHIKHI Chargée de cours à l'E.N.S pour ses conseils utiles.

Je remercie toute l'équipe de l'E.P.E.AL Pour leur accueil chaleureux et leur assistance permanente surtout M<sup>elle</sup> BENCHIOUHA Amel, M<sup>elle</sup> KADI Nacéra, M<sup>r</sup>. BOUAMAMA Mohamed , M<sup>elle</sup> NEHAR Leila, M<sup>elle</sup> AOUSSAT Souhila, M<sup>me</sup> SKANDER Farida et M<sup>r</sup> AMARA Azzedine sans oublier mes reconnaissances à M<sup>elle</sup> BENRAIS Fatma, le Chef de Département du laboratoire pour m'avoir admis et facilité la tâche.

A M<sup>elle</sup> KEBOUCHE Salima pour son aide et ses conseils également à M<sup>elle</sup> BENABDELMOUMENE Fadila, Ingenieur au CRD.



## SOMMAIRE

المدرسة الوطنية المتعددة التخصصات  
المكتبة — BIBLIOTHEQUE  
Ecole Nationale Polytechnique

### Partie théorique :

#### I) INTRODUCTION

A) LA POLLUTION PAR LES HYDROCARBURES EST UNE VERITABLE MENACE POUR LA MEDITERRANEE ET LA COTE ALGERIENNE.

B) LES MOYENS DE LUTTE CONTRE UNE MAREE NOIRE.

1- LES TECHNIQUES DE RECUPERATION.

2- FAVORISER LES MOYENS NATURELS D'ELIMINATION  
DUPETROLE DANS LA MER.

a- LE RECOURS AUX DISPERSANTS.

b- ACCELERER LA BIODEGRADATION.

#### II) GENERALITES SUR LES HYDROCARBURES.

A) FAMILLE DES HYDROCARBURES.

1- HYDROCARBURES ALIPHATIQUES.

2- HYDROCARBURES NAPHTENIQUES.

3- HYDROCARBURES AROMATIQUES.

B) CLASSIFICATION DES HYDROCARBURES.

1- PETROLES BRUTS .

2- PETROLES RAFFINES.

C) NATURE DES HYDROCARBURES DANS LE MILIEU MARIN.

D) PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES HYDROCARBURES.

1- PROPRIETES PHYSIQUES.

2- PROPRIETES CHIMIQUES

E) ANALYSE DES HYDROCARBURE DANS L'EAU.

- 1- ANALYSE DES HYDROCARBURES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.
- 2- LE CHOX D'UNE METHODE D'ANALYSE PAR CPG : LA TECHNIQUE DE HEAD SPACE OU ( L'ESPACE DE TETE ).

III) GENERALITES SUR LA BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES .

A) MECANISMES DE BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES .

- 1- ASSIMILATION DE N- ALCANES .
- 2- ASSEMLATION DES ALCANES RAMIFIES.
- 3- ASSIMILATION DES ALCENES.
- 4- ASSIMILATION DES CYCLO-ALCANES.
- 5- ASSIMILATION DES HYDROCARBURES AROMATIQUES.
- 6- ASSIMILATION DES ASPHALTIQUES

B) MICROORGANISMES UTILISES.

- 1- LE GENRE PSEUDOMONAS.
- 2- LE GENRE BACILLUS.

C) COURBE DE CROISSANCE.

- 1- DEFINITION
- 2- FACTEURS INFLUENCANT LA CROISSANCE BACTERIENNE SUR LES HYDROCARBURES.

Partie expérimentale:

IV) EXPERIMENTATION

A) INTRODUCTION.

B) MATERIELS ET METHODES.

1- MATERIELS

2- METHODES

C) RESULTATS ET INTERPRETATIONS.

1) MISE AU POINT DES CONDITIONS DE CULTURE.

a) CHOIX DES VITESSES D'AGITATION.

b) VERIFICATION DE L'EVAPORATION DES  
HYDROCARBURES.

c) ETUDE DU POUVOIR D'ASSIMILATION DES  
SUBSTRATS CARBONES.

c<sub>1</sub>)- POUR LE GENRE PSEUDOMONAS.

c<sub>2</sub>)- POUR LE GENRE BACILLUS.

2) ETUDE DE LA CROISSANCE SUR LE BENZENE ET SUR LE TOLUENE.

a) ETUDE DES CONCENTRATIONS TESTEES ET  
DETERMINATIONS DES SEUILS DE TOXICITE.

a1)- POUR LE GENRE PSEUDOMONAS.

a2)- POUR LE GENRE BACILLUS.

b) DETERMINATION DES CONCENTRATIONS OPTIMALES  
DES HYDROCARBURES.

b<sub>1</sub>)- POUR LE GENRE PSEUDOMONAS.

b<sub>2</sub>)- POUR LE GENRE BACILLUS.

3) ETUDE DE LA BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES PAR  
CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.

a) APPAREILLAGE D'ANALYSE ET CONDITIONS  
OPERATOIRES GENERALES.

b) MODE OPERATOIRE.

c) DETERMINATION DES COURBES D'ETALONNAGE POUR  
LE BENZENE ET LE TOLUENE.

d) ETUDE DE LA CROISSANCE BACTERIENNE SUR LE  
BENZENE ET SUR LE TOLUENE PAR CHROMATOGRAPHIE  
EN PHASE GAZEUSE.

e) INTERPRETATION DES RESULTATS DE L'ANALYSE PAR  
CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.

4) COMPARAISON DES RESULTATS ENTRE LES SOUCHES.

a) COMPARAISON DES RESULTATS ENTRE LES DEUX  
SOUCHES DE PSEUDOMONAS.

b) COMPARAISON DES RESULTATS ENTRE LE GENRE  
PSEUDOMONAS ET LE GENRE BACILLUS.

v) CONCLUSION.



*Partie Théorique*

## D) INTRODUCTION :

La croissance exponentielle de l'utilisation des hydrocarbures augmente le risque de pollution des sites marins, terrestres même des nappes phréatiques.

Cette pollution a pour origine soit les rejets de produits pétroliers dans le milieu naturel, soit des effluents des usines à gaz ou d'autres industries et raffineries. Il faut ajouter à cela une micropollution des eaux provoquées par les particules contenues dans les fumées évacuées par les cheminées et entraînées par la pluie, la neige ou le brouillard.

Les eaux usées urbaines et industrielles sont souvent très polluées par les huiles, surtout au voisinage des garages et des ateliers de réparation d'automobiles, les stations d'essence ou au voisinage des aérodromes.

Dans le milieu marin des suintements naturels par des fissures de l'écorce terrestre existent depuis des siècles mais les accidents survenus dans le monde comme l'accident du Torrey Canyon 1976; Amoco Cadiz, 1978 furent par leurs ampleurs révélateurs de l'importance du problème et de la faiblesse des moyens que l'on pouvait mobiliser pour y faire face.

Différents traitements physicochimiques peuvent être utilisés dans les stations de traitement des eaux usées urbaines et industrielles mais n'aboutissent qu'à un transfert de la pollution.

Dans la mer, de nombreux équipements ont été développés et expérimentés dans le monde pour écrimer la couche de pétrole étalée à la surface de l'eau.

Malheureusement, ces équipements quelque soit leur valeur atteignent trop rapidement leur limite lorsque les conditions de mer deviennent difficiles, ce qui est souvent le cas lors d'un accident.

Il faut alors s'orienter vers d'autres méthodes et pourquoi pas favoriser les moyens naturels d'élimination du pétrole, un traitement biologique est de ce fait plus approprié.

Il est connu que les microorganismes ont l'aptitude d'utiliser les substances les plus diverses comme source de carbone. A travers notre étude, nous avons voulu exploiter le pouvoir métabolique de trois souches de bactéries appartenant en genre Bacillus et Pseudomonas pour traiter une eau minimum polluée par les hydrocarbures.

Certes, en Algérie, il existe des plans d'intervention, mais ils ont une portée très modeste et inadéquate pour une intervention d'envergure. L'accident du « Capitaine Marcos » en 1980 le long de la côte de Annaba avec 70 000 tonnes d'huiles lourdes, le naufrage en 1982 du « Juan Lavalaya » au large du port d'Arzew avec 4000 tonnes de condensat dont les dégâts n'ont jamais été rendus publics sont d'autant de preuves que la menace pèse sur la côte Algérienne.

Notre pays exporte du pétrole et à ce titre, les accidents sont statistiquement inévitables.

La pression sur les systèmes marins s'exerce également par les boues toxiques des raffineries d'Oran, d'Alger et de Skikda ainsi que des grands complexes de production de gaz naturel et de pétrole liquide d'Arzew et de Skikda.

## A) La pollution par les hydrocarbures est une véritable menace pour la Méditerranée et la côte Algérienne:

**L**a Méditerranée représente à peine 1% de la surface totale des mers de notre planète mais malheureusement elle contient la moitié des matières pétrolières flottantes sur toutes les eaux du globe. Cette palme d'or que nulle autre mer ne lui envie, reviendrait à coup sur, à sa situation de passage obligé de nombre de méthaniers en provenance des pays du Golfe.

Un autre facteur concourant à la pollution grandissante de la Méditerranée est sans doute la lenteur du renouvellement complet de ses eaux qui nécessite 80 à 100 ans puisqu'il s'agit d'une mer presque fermée, sans oublier que son littoral abrite quelque 140 millions d'habitants, tous ces paramètres ont, au fil des temps, fragilisé l'équilibre écologique de cette région. Elle est devenue l'une des mers les plus polluées au monde.

Avec deux millions de tonnes de rejets annuels dus aux déversements accidentels, aux chargements, déchargements et au nettoyage des réservoirs des cargos, le pétrole est la première source de pollution dans la Méditerranée.

La côte Algérienne est soumise à l'un des trafics maritimes les plus intenses au monde.

Plus de 300 millions de tonnes passent par la côte Algérienne. Une expertise de l'Organisation Maritime Internationale ( OMI ) a montré que les ports pétroliers de Béjaïa, d'Arzew et de Skikda sont relativement plus pollués que les ports de la Méditerranée.

De son côté, l'Institut des sciences de la mer ( I S M A L ) estime que les sources de la pollution marine dues aux hydrocarbures sont à 10 % d'origine naturelle, 10 % atmosphérique, 10 % industrielle, 45 % urbaine et 25 % provenant des déversements illégaux et du nettoyage des réservoirs pétroliers.

Les ports Algériens manquent d'infrastructures nécessaires pour recevoir ce genre de déchets en dépit de l'engagement de l'état de doter ces ports en installations adéquates.

De plus, la convention de Barcelone exige des pays signataires d'établir un plan d'urgence en cas d'accidents ( marées noires ).

## B) Les moyens de lutte contre une marée noire :

Les moyens de lutte peuvent être regroupés de façon générale en deux grandes familles correspondant à deux stratégies : récupérer le pétrole répandu ou le disperser pour le faire assimiler par le milieu naturel.

### 1) - Les techniques de récupération

La zone polluée est recouverte d'un produit absorbant et le produit formé est ensuite ramassé par un écremeur.

Les produits absorbants existent sous diverses formes : poudres, granules, plaques ou flocons.

Le travail de l'écremeur est facilité par le confinement des nappes d'huiles à l'aide de barrages flottants, gonflables ou autogonflants. C'est à dire les hydrocarbures sont d'abord déviés et concentrés par des barrages flottants avant d'être récupérés par divers systèmes mécaniques qui, passant à l'interface eau / huile écrèment la fraction d'hydrocarbure.

Les techniques de récupération sont facilement applicables dans les zones abritées ( ports, criques ) mais en pleine mer et en cas d'intempéries, elles ne peuvent être utilisées efficacement.

### 2) - Favoriser les moyens naturels d'élimination du pétrole dans la mer.

Lors des principaux accidents de ces dernières années on avait pu observer que, en l'absence de tout traitement, une fraction importante des hydrocarbures disparaissait petit à petit sous l'action des phénomènes naturels tels que l'évaporation, photo-oxydation, dissolution, biodegradation etc.

Ainsi, lorsque la récupération n'est pas ou plus possible une stratégie s'imposait-elle, favoriser ces moyens naturels d'élimination.

De nombreux bactéries, levures et même les algues sont capables de biodégrader les hydrocarbures. Ces micro-organismes, hydrocarbonoclastes sont partout présents et très diversifiés (1).

### a) - Le recours aux dispersants:

Les dispersants marins sont des mélanges d'agents tensioactifs ( émulsifiants ) dilués dans des solvants oxygénés ( cétone, glycol )

Leur utilisation permet de fractionner l'huile de façon à accélérer son assimilation sous l'action des phénomènes naturels.

La biodégradation est accélérée par l'augmentation de la surface accessible aux bactéries, donc ce processus peut être artificiellement accéléré.

La composition des dispersants a évolué depuis le début de leur utilisation à la fin des années 60; on en est aujourd'hui à la « 3<sup>ème</sup> génération » de dispersants.

Ceux-ci contiennent une proportion plus importante de tensioactifs, étant biodégradables, sont moins toxiques que les produits anciens à base d'hydrocarbures aromatiques.

Ils peuvent être utilisés purs ou en dilution avec de l'eau de mer, le dosage est de 10 % ( 100 litres de dispersant pour 1000 litres de pétrole ).

De plus, la dispersion en mer évite le risque de contamination et réduit le risque d'engluement d'oiseaux ou de mammifères marins. L'efficacité du traitement par dispersant dépend notamment du taux de viscosité du pétrole, en effet, un dispersant modifie la tension à la surface de séparation ( tension interfaciale ) entre l'hydrocarbure et l'eau de mer.

Son application nécessite un état d'agitation minimum de la mer.

### b)- Accélérer la biodégradation :

La biodégradation des hydrocarbures dans le milieu marin est un phénomène lent; dont les principaux facteurs de limitation sont d'une part la température, la teneur en oxygène, les taux très faibles en azote et en phosphore et d'autre part à la période de latence correspondant à la phase d'adaptation des communautés bactériennes autochtones à l'oxydation des hydrocarbures; les systèmes enzymatiques permettant cette oxydation étant généralement de type inductible tout cela limite la prolifération bactérienne.

Le traitement d'une nappe de pétrole brut par l'apport massif de bactéries d'origine marine sélectionnées pour leur aptitude à dégrader les hydrocarbures n'a pas permis d'accroître de façon sensible le potentiel de biodégradation de ces eaux; toutes les espèces allochtones ont disparu de la microflore dominante sept jours après le traitement, alors que les bactéries autochtones démontrent un pouvoir d'adaptation aux produits pétroliers qui se manifeste après, environ quatre jours de contact avec le pétrole.

donc la transposition au milieu marin n'a pas conduit pour l'instant à des résultats satisfaisants, la raison en est probablement que lorsque l'on ajoute à un milieu naturel vivant en équilibre une espèce étrangère, il se produit le phénomène de rejet bien connu en médecine.

des caractéristiques physico-chimiques très différentes, la température, la salinité y sont éminemment variables.

En plus une étude abiotique montre que les composés aromatiques subissent sous l'effet de la lumière solaire des phénomènes de photo-oxydation et de polymérisation, ces processus déterminent une très forte diminution de la biodégradation des produits pétroliers.

Lors des marées noires il paraît donc nécessaire de favoriser la prolifération rapide des bactéries autochtones capable de développer des équipements enzymatiques permettant la dégradation des hydrocarbures en leur apportant les éléments nutritifs qui leur font défaut (2)

## II) GENERALITES SUR LES HYDROCARBURES

### A) FAMILLE HYDROCARBURES:

Les hydrocarbures sont des composés qui renferment seulement des atomes de carbone et d'hydrogène. ils peuvent être subdivisés en trois grandes familles:

#### 1)- hydrocarbures aliphatiques:

Ce sont des composés à chaîne ouverte constituant la série acyclique. suivant la nature des liaisons entre les atomes de carbone on subdivise cette série en:

##### a)- Composés saturés :

Ce sont les paraffiniques ou alcanes de formule générale  $C_n H_{2n+2}$ . Ils sont saturés, c'est à dire que chaque atome de carbone est lié à quatre atomes voisins. Ils peuvent être à chaîne droite unique (paraffiniques normaux) ou encore à chaîne ramifiée ( iso-paraffines).

On les trouve en proportion importante dans les pétroles bruts et la plupart des produits raffinés.

##### b)- Composés non saturés:

Ce sont des composés dont les molécules comportent des liaisons doubles ou triples entre les atomes de carbone. Il s'agit des oléfiniques ou éthyléniques de formule générale  $C_n H_{2n}$ .

S'ajoutent à cette série les hydrocarbures acétyléniques de formule générale  $C_n H_{n-2}$ , à noter que ces composés n'entrent pas dans la composition des pétroles bruts mais apparaissent surtout dans les produits raffinés.

#### 2- hydrocarbures naphténiques :

Ce sont des composés à chaîne fermée, formant la série cyclique. deux ou plusieurs cycles peuvent se condenser entre eux pour donner les polycycliques, Ils peuvent être saturés. ( Cycloalcanes ) ou non saturés.

### 3- Hydrocarbures aromatiques:

Caractérisés par la présence dans leurs molécules d'un groupement cyclique de 6 atomes de carbone présentant un système particulier de liaison entre les atomes de carbone qu'on appelle cycle benzénique et qui confère à la molécule une grande stabilité .

Leur composition répond à la formule générale  $C_nH_{2n-6}$ .

les caractères structuraux des hydrocarbures aromatiques sont:

- une conjugaison cyclique
- l'existence d'un cycle plan

Les hydrocarbures polyaromatiques (HPA) constitués de plusieurs noyaux benzéniques condensés. En effet ils se forment pendant la combustion incomplète des matériaux .

Ces composés (HPA) présentent un réel danger lorsqu'ils contaminent l'eau , seize d'entre eux (voir tableau n° 1) ont été retenus par l'agence américaine pour la protection de l'environnement (E.P.A) comme polluants néfastes pour l'Homme et l'environnement et devant être recherchés en priorité .(3)



Tableau n° 1: H.P.A retenus par L'E.P.A comme micro polluants:

1- Naphtalène	9 - Pyréne
2- Acétonaphtylène	10- Indénone (1,2,3,c,d) pyréne
3- Phénanthrène	11- Benzo( g, h, i) pérylène
4- Fluoranthène	12- Benzo(a) Fluoranthène
5- chrysène	13- Benzo(b) Fluoranthène
6- Dibeng(a, h) anthracène	14- Benzo(k) fluoranthène
7- Acenaphtène	15- Benzo(a) pyréne
8- Anthracène	16- Fluoréne

## B) CLASSIFICATION DES HYDROCARBURES :

On distingue les pétroles bruts et les pétroles raffinés :

### 1) Pétroles bruts :

Le pétrole brut se trouve à l'état naturel dans les gisements naturels décelés par des techniques de prospection et d'où on l'extrait, par le forage des puits, pour servir de matière première aux industries de raffinage et de la pétrochimie et ce sont des hydrocarbures présentant des substances volatiles et des cires complexes et visqueuses qui peuvent contenir des éléments tels que l'oxygène, vanadium, nickel, soufre et sels minéraux en quantité infinie.

### 2) Pétroles raffinés :

#### a)- Gaz Liquéfiés :

Dans les industries, à des pressions de plusieurs atmosphères et à des températures inférieures à 25°C, on liquéfie les gaz C<sub>3</sub> et C<sub>4</sub>. On obtient le propane commercial, le butane commercial et un mélange des deux vendus sous le nom de « butpro » :

Ces gaz liquéfiés sont contenus dans des bouteilles métalliques, sous pression et sont généralement utilisés pour la cuisine et le chauffage domestique.

#### b)- Essences (C<sub>4</sub>-C<sub>12</sub>) :

Cette gamme de produits comprend les carburants pour automobile. Deux types de carburants sont commercialisés il s'agit de :

- Essence auto
- Super carburant

#### c)- Kérosènes : (C<sub>10</sub>-C<sub>14</sub>) :

Appelés aussi pétroles lampants ou carburéacteurs. Il y a deux qualités de carburéacteurs : le TRO et le TR4.

- TRO : c'est une coupe de Kérosène utilisée pour l'aviation commerciale.

- TR4 : Constitué par une coupe très large contenant plus de légers, le TR4 est réservé à l'aviation militaire.

#### d)- Gas-oils (C<sub>14</sub> - C<sub>20</sub>) :

Le gasoil dont les limites de distillation sont (190°C - 360°C) est un combustible utilisé dans les moteurs diesel rapides pour certaines voitures, les camions et les cars.

La propreté, la Combustion et la fluidité se trouvent parmi les qualités requises pour le gas-oils.

e)- Fuels oils :

Le fuel oil est un gas-oil dont le point final de distillation est plus élevé que celui d'un gas-oil normal...

Ces combustibles sont utilisés dans l'industrie et la marine pour la chauffe des fours et des chaudières ainsi que pour les moteurs diesels lourds montés sur les navires.

f)- Lubrifiants (huiles de graissage) :

Extrêmement divers suivant leur destination : les produits les plus importants dans cette catégorie sont les huiles moteurs, les huiles machines et les huiles isolantes.

Ils sont utilisés dans les moteurs, les machines, les turbines etc.

g)- Les paraffines (Cires de pétrole):

Les dérivés solides résultent respectivement du déparaffinage effectuée sur les distillats légers et lourds. Leur caractéristique principale est leur point de fusion qui doit être suffisamment élevée pour éviter tout ramollissement des bougies et tout collage des emballages paraffinés.

h)- Bitumes ( ou Asphaltes) :

Les bitumes sont les fractions les plus lourdes du pétrole brut que l'on obtient, soit par dilution sous vide très poussé, soit encore par désasphaltage au propane d'un résidu sous vide. Ils sont utilisés essentiellement comme revêtement routier et autres travaux **publics (4)**.

## C) NATURE DES HYDROCARBURES DANS LE MILIEU MARIN

Les hydrocarbures présents dans le milieu marin constituent un mélange de produits fossiles et biogènes.

Les hydrocarbures fossiles forment des mélanges complexes de plusieurs dizaines de milliers de composés alors que les hydrocarbures biogènes représentent des mélanges beaucoup plus simples. Les pétroles caractéristiques des mélanges fossiles sont formés de plusieurs familles de composés de structure de poids moléculaire et de polarités variés :

- les n- alcanes :  $C_n H_{2n+2}$  ( $5 < n < 60$ ) avec des chaînes à nombre impair de carbone en proportion sensiblement égales;
- les n- alcanes ramifiés porteurs de groupement méthyle ou éthyle en position iso ou antéiso, ou à structure isoprénoides tels le farnésane, le pristane ou le phytane;
- les cycloalcanes ou naphtés dont les plus abondants sont souvent des dérivés cyclopentaniques ou cyclohexaniques;
- les naphténo-aromatiques qui sont des composés polycycliques en partie aromatiques et relativement abondants ;
- les hydrocarbures aromatiques polycycliques ( 1 à 6 noyaux aromatiques )avec une prédominance des structures alkylées par rapport aux molécules parentales dont elles sont issues;
- les composés non hydrocarbonés ( contenant l'oxygène , l'azote ou le soufre) sont des constituants souvent mineurs d'un pétrole brut les composés soufrés sont souvent les plus abondants;
- la fraction asphaltique, représentant entre 5 et 20% d'un brut pétrolier englobe les asphaltènes ( composés insolubles dans le pentane ou l'héxane) et les résines ;
- des métaux sont également présents à l'état de traces, tels que le vanadium, le nickel, le fer , le cuivre , le sodium , le calcium et l'uranium ;
- des porphyrines sous forme de complexes de nickel ou de vanadium sont souvent présentes dans les bruts pétroliers;
- les oléfines (alcènes) représentant une famille d'hydrocarbures absente des bruts pétroliers mais présente dans les produits de raffinage du pétrole (1).

## D) PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES HYDROCARBURES :

### 1) Prpriétés physiques :

Si les propriétés des composés purs sont connues, par contre celles relatives aux mélanges présentent des fluctuations importantes en fonction de leur composition .

#### a) - DENSITE :

Elle est en corrélation avec la composition des hydrocarbures .

Elle varie entre 0.82 et 1.00 . Elle est fortement influencée par la teneur en fraction légère .

#### b) - VISCOSITE :

Elle est fortement variable en fonction de la fraction pétrolière considérée; elle est de 0.74 cst pour les essences et de 1000 cst pour certains bruts .

#### c) - SOLUBILITE DANS L'EAU :

Il est très difficile de déterminer la solubilité en milieu aqueux d'un mélange d'hydrocarbures. si la fraction légère présente une solubilité relativement importante , la fraction paraffinique y est pratiquement insoluble .

La connaissance d'autres paramètres physiques comme le point d'ébullition , la tension superficielle , le pourcentage d'aromatiques , et le paramètre d'étalement permet d'avoir une idée plus précise sur les risques liés à une pollution par ces produits .

### 2) PROPRIETES CHIMIQUES :

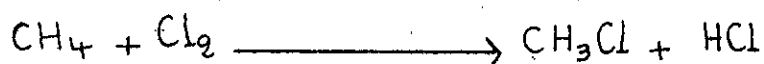
Il s'agit surtout de connaître les propriétés oxydo-réductrices en milieu aqueux et en présence de chlore et d'ozone qui sont les réactifs habituellement utilisés dans les filières de traitement de l'eau .

### a) Hydrocarbures saturés :

Ils ont une réactivité très faible en milieu aqueux .

Même à pression et température élevées , les réactions possibles ne sont que des oxydations ou des deshydrogénations .

Dans les conditions normales et en présence de photons , il peut se produire une réaction de substitution avec les halogènes:

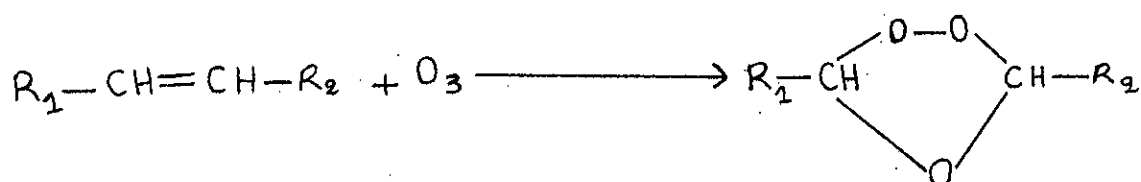


### b) Hydrocarbures insaturés:

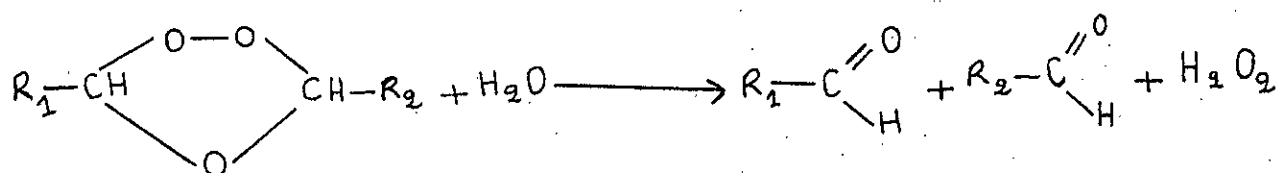
Leur forte réactivité est due aux doubles liaisons qui diminuent leur stabilité.

Ils donnent lieu à des réactions d'addition avec le chlore et l'acide hydrochlorique .

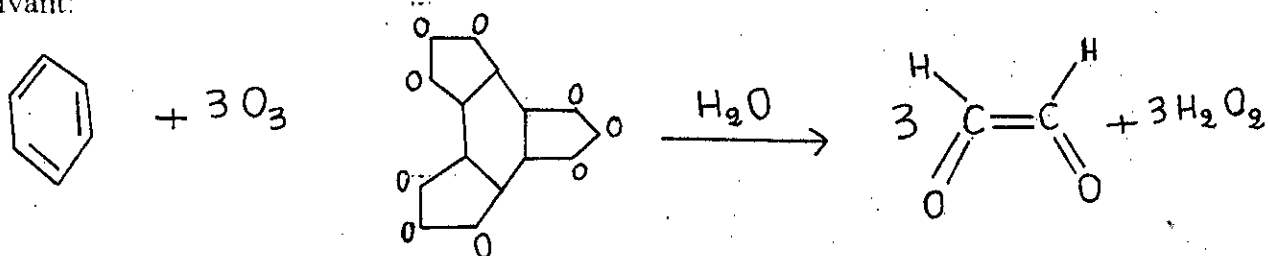
Ils réagissent avec l'ozone en produisant une ouverture de la double liaison conduisant à des ozonides :



Par hydrolyse , les ozonides conduisent à la formation des composés carbonyles très faciles à identifier :



L'ozone réagit également sur les hydrocarbures aromatiques d'après le schémas suivant:



L'étape finale de cette réaction cinétique lente conduit à la formation de  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$ .

Les hydrocarbures polycycliques aromatiques réagissent aussi avec l'ozone d'après le même schémas , mais les produits intermédiaires sont beaucoup plus complexes (5)

## E) Analyse des hydrocarbures :

### 1. Détection et analyse des hydrocarbures dans l'eau :

L'analyse des hydrocarbures dans l'eau est généralement délicate et elle dépend du but recherché, du nombre d'échantillons, des moyens techniques et financiers disponibles, du délai de remise des résultats.

Presque aucun protocole n'a été standardisé, d'où des problèmes de comparaison des résultats et des interprétations qui en découlent.

Les exercices interlaboratoires de comparaison des méthodes d'analyses qualitatives et quantitatives des hydrocarbures doivent donc être poursuivis et développés pour la standardisation des protocoles d'analyses.

Les principales phases de l'analyse qualitative et quantitative des hydrocarbures dans le milieu marin peuvent être résumées comme suit :

- A partir de l'échantillon fraîchement prélevé, congelé ou lyophilisé, on procède à une extraction de la matière organique par un solvant ou un mélange de solvants organiques ( Chloroforme, toluène, méthanol ... )

La matière organique, extractible est ensuite débarrassée des composés polaires et les hydrocarbures sont isolés. Un fractionnement sur colonne de silice ou d'aluminium / silice, ou encore de Florisil isole généralement et les fractions d'hydrocarbures saturés aromatiques et les composés plus polaires.

Chacune des fractions obtenues est ensuite analysée qualitativement et / ou quantitativement par des méthodes chromatographiques ( chromatographie en phase gazeuse CPG ou chromatographie en phase liquide haute performance ( CLHP ), des méthodes spectroscopiques ( absorption infra rouge ou UV , fluorescence UV ) et des techniques couplées telles que le couplage chromatographie phase gazeuse spectrométrie de masse ( CPG / SM ) ou encore le couplage chromatographie phase gazeuse infra rouge à transformée de Fourier ( 1 ).

## 1) ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CPG):

C'est une technique d'analyse basée sur la séparation des mélanges de composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Elle permet l'analyse de mélanges éventuellement très complexes dont les constituants peuvent différer d'une façon considérable par leur nature et leur volatilité.

La chromatographie en phase gazeuse nous permet l'analyse qualitative et quantitative des composés. Le temps de rétention est caractéristique d'un corps, il est donné par le chromatographe et il est nécessaire pour son identification c'est à dire pour l'analyse qualitative.

L'analyse quantitative est liée à la mesure de l'aire du pic chromatographique qui est donné par le chromatographe.

Or l'aire du pic est proportionnel à la quantité de soluté selon la relation :

$$M_i = K A_i$$

$M_i$ : étant la masse de la substance ayant traversé le détecteur.

$K$ : est un facteur tenant compte de la nature du composé à analyser.

Donc en plus d'une colonne chromatographique, d'une bouteille, d'un régulateur et d'un débitmètre du gaz vecteur, le chromatographe est relié à un système d'injection du composé à analyser, d'un système de détection et d'un enregistreur de chromatogramme.

Le soluté est injecté à l'entrée de la colonne chromatographique où s'effectue la séparation des constituants du mélange à analyser (le choix des dimensions de la colonne, de sa nature et de la qualité de remplissage est décisif quant à la réussite de l'analyse); le gaz vecteur va le véhiculer à travers cette colonne et l'apparition du soluté dans le gaz vecteur se traduit par le pic sur l'enregistreur (6).

## 2)- Le choix d'une méthode d'analyse par CPG : La technique de Head Space (ou l'espace de tête) :

La technique de l'espace de tête statique permet d'évaluer d'une façon élégante de faibles concentrations en organo-volatils dans les eaux potables, les eaux de surfaces et les eaux souterraines (dérivés halogénés exemples : tétrachlorure de carbone, chloroforme, bromoforme, tétrachloroéthane, dichlorométhane, dichlorobenzène, etc.).

Il s'agit d'une méthode indirecte pour la détermination des composés volatils dans les liquides par chromatographie en phase gazeuse.

Tous les corps chimiques présentent une tension de vapeur. Dans des conditions spécifiques (flacon hermétique), il s'établit un «équilibre entre les composés volatils et la phase gazeuse, qui dépend de la température, de la durée du conditionnement et de la pression.



Un volume connu de la phase gazeuse est injecté dans le chromatographe et les surfaces des pics à évaluer sont calculées et données par le chromatographe. A l'aide de courbes d'étalonnage préparées dans des conditions données, les taux des différents composés sont évalués.

L'appareil de l'espace de tête automatique est composé :

- D'un bain d'huile silicone (50 à 150°C) garni d'un carrousel de 24 flacons.

Une fraction de la phase gazeuse est prélevé du flacon à l'aide d'une seringue en piquant le bouchon hermétique, puis elle est injectée dans le chromatographe en phase gazeuse.

Ce système est compatible avec tout modèle de chromatographe (colonne remplie et capillaire).

La détermination exacte et précise des micropolluants de l'eau s'impose en toxicologie plus encore que dans d'autres domaines.

En outre, l'utilisation de l'espace de tête statique automatique permet d'obtenir des résultats répétitifs et reproductibles. (7).

### III - GENERALITES SUR LA BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES.

Il s'agit d'un phénomène bien connu décrit par Beerstecher en 1954(8): depuis cette époque plus de deux cents micro-organismes ( bactéries, levures, champignons) ont été reconnus capables de transformer en métabolismes les hydrocarbures.

Ce sont pour la plupart des espèces aérobies. Selon C.E. Zobell en 1963 (8) soixante dix espèces microbiennes peuvent dégrader les hydrocarbures dans le milieu marin.

D'après R.M Atlas en 1973 (8), les bactéries actives les plus fréquentes dans le milieu marin *Pseudomonas*, *Mycobactérium*, *Brévibactérium*, *Corynbactérium* et *Arthobacter*.

Selon J.R VALLANT en 1973 (9) l'attaque microbienne se fait sur un mélange d'hydrocarbures, le plus souvent en présence d'autres matières organiques telles que les intermédiaires du métabolisme des produits pétroliers .

Selon Paul Bishop en 1983 (10) la dégradation microbienne se déroule préférentiellement sur les composés à poids moléculaire supérieure . Les alcanes et les aromatiques à faible poids moléculaire se dégradent rapidement , sont suivis par les alcanes à poids moléculaire le plus fort puis les cycloalcanes ; les aromatiques polynucléaires sont dégradés lentement (10)

On observe alors un effet favorable : c'est le cas de la cooxydation. Ce phénomène d'une grande importance pour l'épuration est mis en évidence pour de nombreux hydrocarbures qui sont oxydés par certains micro-organismes dont la croissance a été obtenue préalablement sur un autre substrat favorable ( les intermédiaires du métabolismes ou autres hydrocarbures plus biodégradables ) (11) voir tableau N°

Les micro-organismes capables de dégrader les hydrocarbures en mer ne sont généralement pas les espèces dominantes et l'apport d'un nutriment minéral ( formé d'azote et du phosphore ) qui est très soluble dans l'eau ne reste pas sur la zone polluée ; ce qui a nécessité de mettre en oeuvre un nutriment à caractère oléophiles c'est à dire ayant une attirance pour les hydrocarbures et restant à l'interface eau huile.

Donc en 1985 on est arrivé à former un composé nutritif oléophile formé d'un nutriment l'urée soluble dans un hydrocarbure très biodégradable qui est l'acide oléique .

Cet apport simultané d'hydrocarbure biodégradable va favoriser le phénomène de co-oxydation, c'est à dire il va permettre d'amorcer la croissance de la population microbienne qui va leur permettre la dégradation de tous les hydrocarbures.

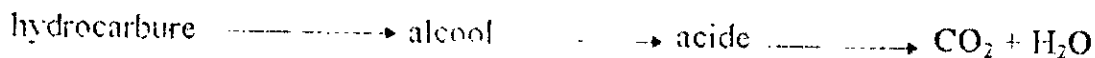
Ainsi actuellement ce produit à base d'acide oléique et d'urée qu'on appelle **inipol EAP 22** est très utilisé dans le monde grâce à ce produit le taux de disparition au bout d'une à deux semaines est d'environ 75% (8).

Le processus de biodégradation se résume à:



Cette réaction aérobie peut devenir anaérobie en présence d'accepteurs d'hydrogène comme les nitrates et les sulfates. De nombreux travaux sur le métabolisme des hydrocarbures permettent de croire que toutes les molécules présentes dans un pétrole brut, sont attaquables par les enzymes de la microflore. La question essentielle porte donc, non pas sur le caractère biodégradable des fractions pétrolières, mais surtout sur la vitesse à laquelle elles sont décomposées.

Dans les conditions naturelles, la biodégradation est un processus lent et complexe dans le mécanisme général se résume à:



Chaque étape est sous le contrôle d'une enzyme spécifique. D'après Balléviori et Al en **1963** (5) il semble que le développement d'une microflore adaptée à la dégradation des hydrocarbures nécessite une dose suffisante de produit à dégrader et un temps relativement long.

Pour assurer ce processus, il faut donc fournir aux micro-organismes des conditions favorables à une épuration totale dans des délais raisonnables (5).

Les hydrocarbures aliphatiques qui sont les n- alcanes et les n- alcènes sont dégradés par des levures et des champignons faisant partie des mucorales mais aussi par les bactéries des genres *Bacillus*, *Micrococcus*, *Corynebactérium*, *Mycobactérium*, *Nocardia* et même certaines entérobactéries.

Les hydrocarbures aliphatiques à chaîne courte sont oxydés par les *pseudomonas*, les *Flavobactérium*, les *Nocardia* alors que pour ceux à chaîne longue on trouve des *Pseudomonas*, les *Nocardias*, les *Micrococcus* et les *Corynebactérium*.

En général, les *Pseudomonas* oxydent complètement les hydrocarbures aliphatiques alors que les microcoques et les *Nocardias* provoquent une oxydation incomplète avec accumulation de produits intermédiaires, d'où généralement l'action combinée des micro-organismes dans la nature pour dégrader complètement les hydrocarbures.

Les genres Pseudomonas, Vibrio, Spirillum, Flavobacterium, Achromobacter, Bacillus, Nocardia agissent sur les molécules aromatiques.

Les espèces de Pseudomonas sont capables du clivage du protocatechuate en ortho pour : P. Pseudomalli, P. cepacia, P. gladioli, P. piketti, P. caryophilli et P. Solanacearum.

D'autres sont capables du clivage du protocatechuate en méta comme P. acidovorans, P. testosteroni, P. flava, P. pseudoflava, P. facilis et P. saccharophila.

Une des caractéristiques physiques des hydrocarbures est leur faible solubilité dans l'eau. celle-ci pose le problème du transport du substrat du milieu dans la cellule à la fois sous forme dissoute et sous forme de gouttelettes dispersées après émulsification.

Certains micro-organismes s'adaptent à ces substrats en produisant des structures membranaires et des enzymes spécifiques.

En effet, les enzymes intervenant au début de l'oxydation seraient localisées sur la partie externe de la membrane cytoplasmique (11).

SUBSTRATS	ESPECES	PRODUITS
<ul style="list-style-type: none"> <li>- n - alcanes</li> <li>- n - alcanes</li> <li>- naphthalène</li> <li>- 1-2, propanédiol</li> <li>- Hydrocarbures</li> <li>- n - alcanes</li> <li>- Toluène</li> <li>- p- cymère</li> <li>- p- xylène</li> <li>- éthyl - cyclo Héxane</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Corynbactérium Hydrocarboclatus</u></li> <li>- <u>Mycobactérium smegmatis</u></li> <li>- <u>Pseudomonas aeruginosa</u></li> <li>- <u>Arthrobacter oxydans</u></li> <li>- <u>Bactérium Sp</u></li> <li>- <u>Corynbactérium</u></li> <li>- <u>Pseudomonas multivorans</u></li> <li>- <u>Pseudomonas desmolytica</u></li> <li>- <u>Pseudomonas aeruginosa</u></li> <li>- <u>Alcaligenes faecalis</u></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acide L - Glutamique</li> <li>- Caroténoïdes</li> <li>- Acide salicylique</li> <li>- Acide Lactique</li> <li>- L- tryptophane</li> <li>- L - citrulline</li> <li>- Pyrolnitrine</li> <li>- Acide cumique</li> <li>- Acide - p - toluïque</li> <li>- trans - 4 - éthylcyclohexanol</li> </ul>

**Tableau n° 2 :** Produits dérivés de la dégradation d'hydrocarbures obtenues par croissance en continu de divers micro-organismes (11)

Tableau n°3 : oxydation microbienne d'aromatiques méthyl et alkyl substitués (12):

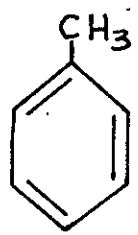
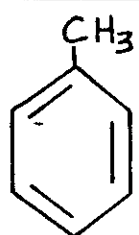
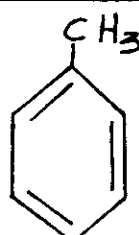
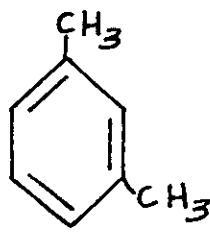
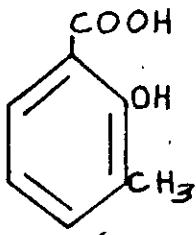
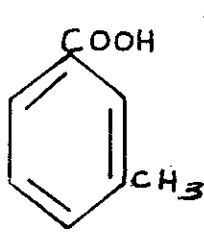
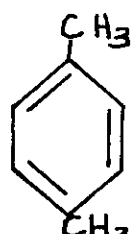
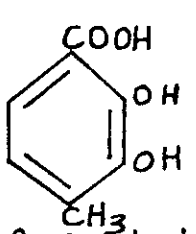
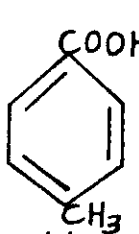
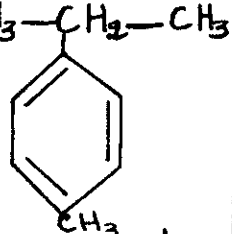
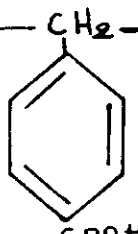


Hydrocarbure	Produits d'oxydation		Microorganisme
 <p>toluène</p>	 <p>n-crésol</p>	 <p>p-crésol</p>	<p><u>Pseudomonas Sp</u></p>
 <p>m-xylène</p>	 <p>acide 3-méthyl salicylique</p>	 <p>acide m-toluïque</p>	<p><u>PS aëruginosa</u></p>
 <p>p-xylène</p>	 <p>acide 2,3 dihydroxy-p-toluïque</p>	 <p>acide p-toluïque</p>	<p><u>Nocardia</u> <u>Salmonicolor</u></p>
 <p>n-isopropyl-toluène</p>	 <p>acide p-isopropyl benzoïque</p>		<p><u>Pseudomonas Sp</u></p>
 <p>n-dodécyl benzène</p>	 <p>acide phényl acétique</p>		<p><u>Nocardia Sp</u></p>

Tableau n° 4: Biotransformation d'hydrocarbures par cooxydation (12)

Substrats de croissance	Substrat cooxydé	Produits	Microorganismes
Extrait de levure ou peptone	n-hexadécane	2,3,4- hexadécanone 2,3 -hexadécanol	<u>Arthrobacter Sp</u>
Glucose	n- hexadécane et autres alcanes	Glycolipides	<u>Torulopsis apicola</u>
Glucose	isoalcane	Glycolipides	<u>Torulopsis gropenglesseri</u>
2-méthyl butane	méthylcyclo-pentane	3-méthylcyclo-pentanone	<u>Pseudomonas Sp</u>
2-méthyl butane	cyclo hexane	cyclo hexanone	<u>Pseudomonas Sp</u>
n- Octadécane	éthyl benzène	acide phenyl-acétique	<u>Nocardia Sp</u>
n-Octadécane	n-propyl-benzène	acide phenyl-acrylique	<u>Nocardia Sp</u>
n-hexadécane	p-xylène	acide 2,3-hydroxy-picolique	<u>N-salmonicolor</u> <u>N-corallina</u>
n-hexadécane	p-xylène	acide diméthyl cis,cis muconique	<u>N.corallina</u>
n-hexadécane	1,2,4- triméthyl benzène	acide 3,4-diméthyl benzoïque acide 2,3-hydroxy-4,6-diméthyl benzoïque	<u>N.corallina</u>

## A) MECANISMES DE BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES

Si le phénomène de biodégradation est bien connu, les mécanismes précis qui le gouvernent ne sont pas encore maîtrisés.

D'après André Sirvins et Bernard Tramier en 1985(8), ces mécanismes mettent en jeu des processus d'oxydation très complexes qui aboutissent des hydrocarbures plus légères appelés bioconversions, mais aussi à la formation de CO<sub>2</sub>, d'eau et de biomasse.

Les réactions chimiques sont catalysées par les enzymes bactériennes. leurs vitesses dépendent des conditions physico-chimiques du milieu, de la nature du nutriment et de la souche utilisée.

### 1- ASSIMILATION DES N- ALCANES:

D'après Paul I. Bishop en 1983 les alcanes sont les plus utilisés surtout ceux entre C10 et C25.

#### Voie métabolique:

La voie majeure de l'attaque enzymatique des n- paraffines se localise à l'extrémité de la chaîne pour donner un alcool, éventuellement un aldéhyde et enfin un acide gras au même nombre d'atomes de carbone. Ce dernier peut alors être scindé en métabolites assimilables par des réactions d'oxydation,

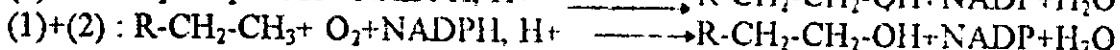
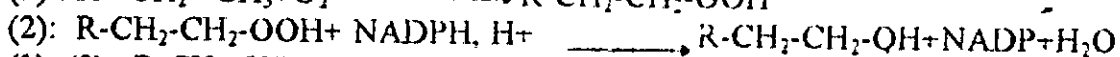
B-oxydation ou W-oxydation, ou recombinaison avec l'alcool pour donner un ester. Des métabolites intermédiaires tels les acides dicarboxyliques, les diols, les méthyl-cétones et des alcools secondaires montrent qu'il existe d'autres voies métaboliques.

En anaérobiose on peut noter l'apparition d'un alcène comme métabolite intermédiaire qui réintègre la voie précédente au niveau de l'alcool (12), voir planche N° 3.

La ou les étapes précédant la formation d'alcool primaire reste encore méconnues. Les voies les plus probables sont la réaction d'hydroxylation qui met en oeuvre une w-hydroxylase NADP dépendante, en présence d'oxygène moléculaire dont un atome est incorporé à l'alcane et l'autre réagit pour donner H<sub>2</sub>O; l'autre voie c'est la réaction d'hydroperoxydation qui met en jeu une dioxigénase qui donne un hydroperoxyde -n-alcoyle qui en retour se réduit en alcool primaire.



La distinction entre ces deux mécanismes n'a pas été résolue, d'où les deux réactions (11).



## 2)- ASSIMILATION DES ALCANES RAMIFIÉS:

L'utilisation des alcanes ramifiés comme substrats carbonés est plus lente que celle des n-alcanes à même nombre de carbone.

La position, la taille et le nombre de substitués alkylés ont un effet sur la biodégradabilité de la paraffine.

Malgré cela, le métabolisme n'est pas différent de celui des n-alcanes bien que l'accumulation de produits intra-cellulaires soit constatée (12).

## 3) - ASSIMILATION DES ALCÈNES :

Les alcènes de C<sub>10</sub> à C<sub>18</sub> sont plus difficilement biodégradables que les alcanes à même nombre d'atomes de carbone.

Les alcènes à nombre pair d'atomes de carbone subissent une attaque ditériminale et donnent un acide gras saturé à (2n - 1) atomes de carbone.

Les alcènes à nombre impair d'atomes de carbone se transforment en acide W-insaturé à même nombre d'atomes de carbone.

## 4)- ASSIMILATION DES CYCLO-ALCANES:

Les cyclo-alcanes sont toxiques et résistants à la dégradation mais plusieurs espèces bactériennes ont montré un développement sur des alcanes cycliques. De plus, plusieurs cyclo-alcanes non attaqués lorsqu'ils constituent l'unique source de carbone, peuvent être oxydés quand d'autres hydrocarbures sont utilisés comme substrats de croissance : c'est le phénomène de cooxydation défini par Foster en 1962 (12).

Jones et Edington en 1968 (11) ont montré par la suite que des espèces bactériennes des genres : Corynebacterium, Pseudomonas, Mycobacterium, Micrococcus, Nocardia, Sarcina et même que la moisissure Penicillium pouvaient se développer sur le cyclohexane comme seul substrat de carbone. Le mécanisme de la dégradation pour une souche de Pseudomonas proposé par Stirling et Al en 1971 (11) fut le suivant:

L'hydroxylation du cyclohexane est catalysée par une cyclohexane-hydrolase, une enzyme qui nécessite comme cofacteur du NADH<sub>2</sub> et de l'oxygène.

#### 5- ASSIMILATION DES HYDROCARBURES AROMATIQUES:

Les hydrocarbures aromatiques ont une polarité élevée. La vitesse de dégradation des aromatiques est fonction du poids moléculaire, de la configuration, du cycle et du nombre de cycles.

##### Voies métaboliques:

Le noyau aromatique des hydrocarbures s'oxyde par double hydroxylation qui est suivie par la rupture du cycle, soit entre les deux atomes porteurs des groupements hydroxylés, soit entre un de ces carbones et celui adjacent.

De ce fait, il a été observé que le principal produit de dégradation du Benzène est le catechol( 8).

La dégradation par co-oxydation des aromatiques permet l'attaque d'un grand nombre de composés (12) voir tableau N° 4.

Selon Paul I. Bishop en 1983 (10) pour un hydrocarbure aromatique alkylisé, l'attaque initiale est souvent sur le bout de la chaîne avant la fission du noyau. L'attaque microbienne des hydrocarbures polynucléaires aromatiques ( H P A ) suit les mêmes mécanismes que les hydrocarbures monoaromatiques.

#### 6- Assimilation des asphaltiques :

Les asphaltiques sont des composés à poids moléculaire élevé contenant des hétéroatomes tels que l'oxygène, l'azote, le soufre et parfois même des métaux lourds.

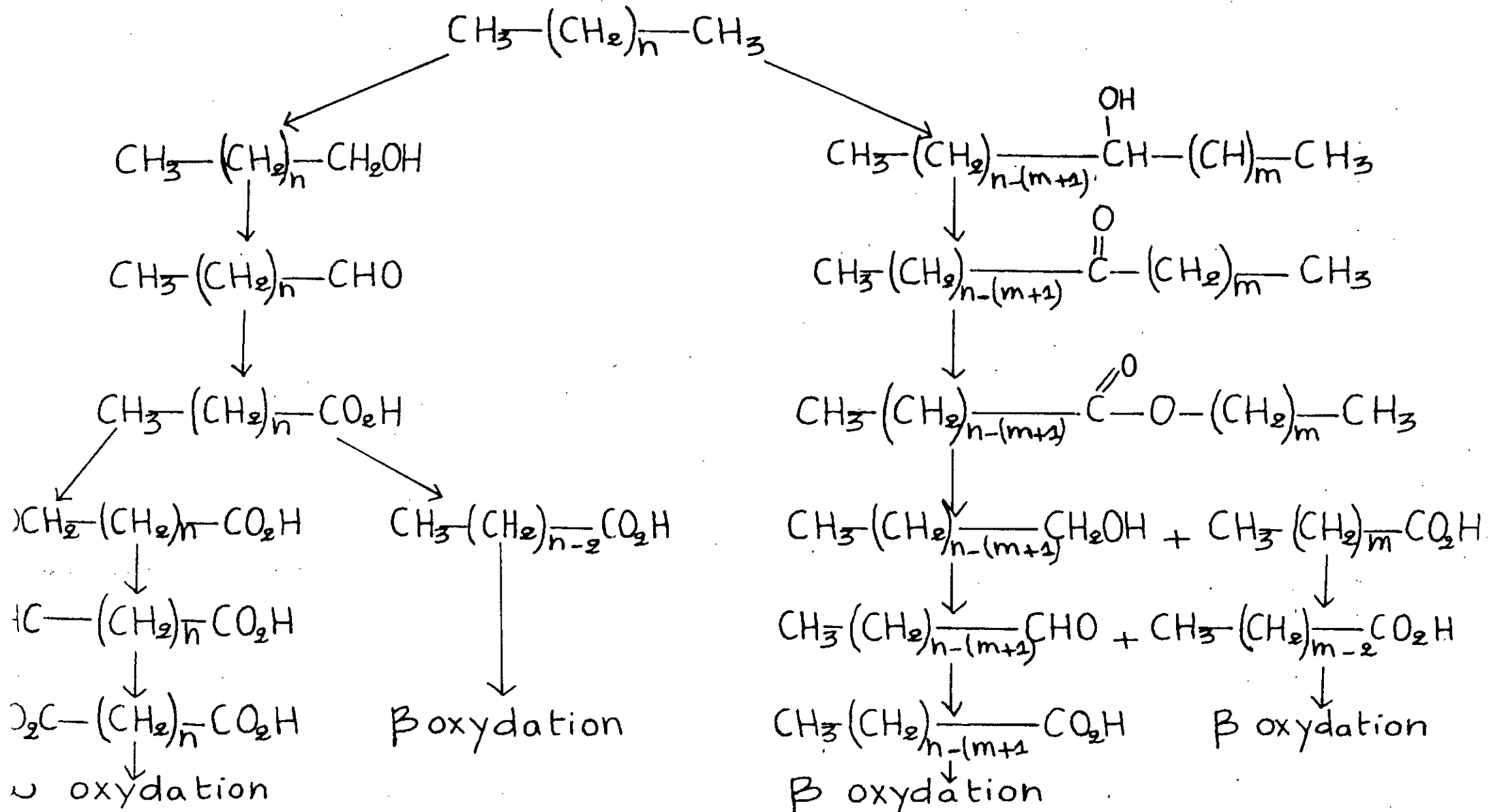
Les composés oxygénés sont des acides gras, des phénols et des acides naphthéniques dont la dégradation a déjà été décrite.

Les composés azotés peu nombreux dans un pétrole sont des bases alkyl dérivées de la quinoleine et de la pyridine.

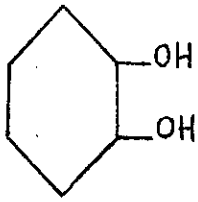
Les asphaltes contiennent de nombreux cycles aromatiques ainsi qu'une faible proportion de paraffine à nombre d'atomes de carbone élevé (13).

# Mécanisme général du processus de biodégradation des hydrocarbures aliphatiques

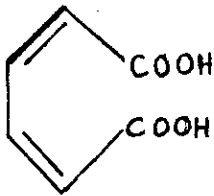
PL n° 1



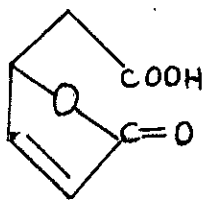
Dégradation du catéchol et du protocatéchuat  
par orthoclivage selon Armand et Girard (1984) (11):



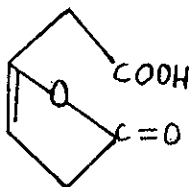
Catéchol



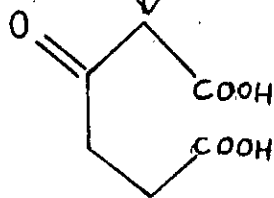
cis-cis-muconate



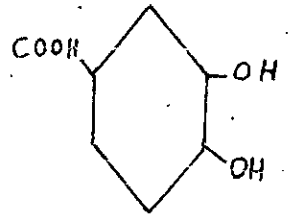
Muconolactone



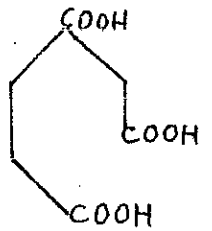
4-céto adipate - énoL - Lactone



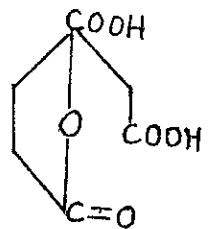
$\beta$ -céto-adipate



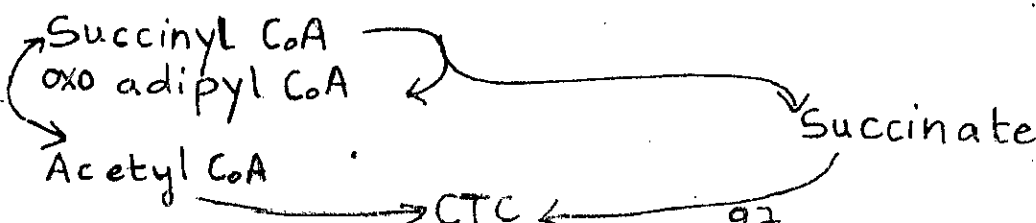
Protocatéchuat



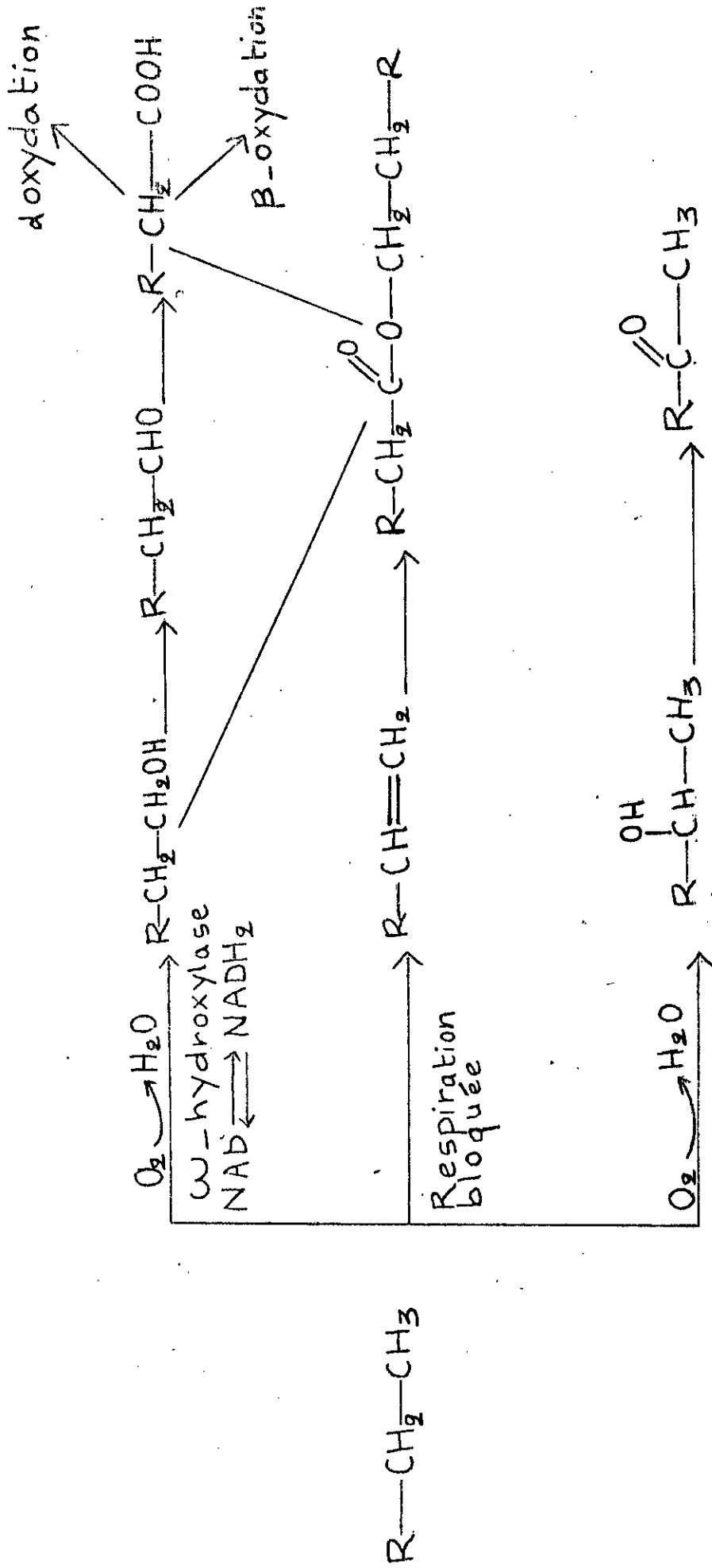
$\beta$ -carboxy-cis-cis muconate



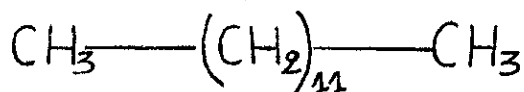
$\beta$ -carboxy-muconolactone



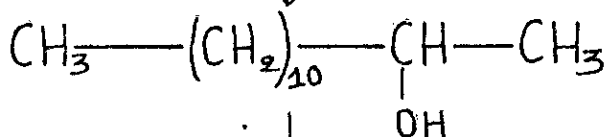
PL n°3: Dégradation microbienne des n-alcanes (12):



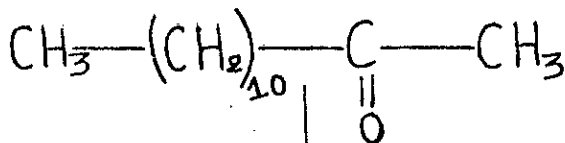
PLn<sup>o</sup>4: Biodégradation du n-tridécane selon Klug et Markovetz (1971) (11):



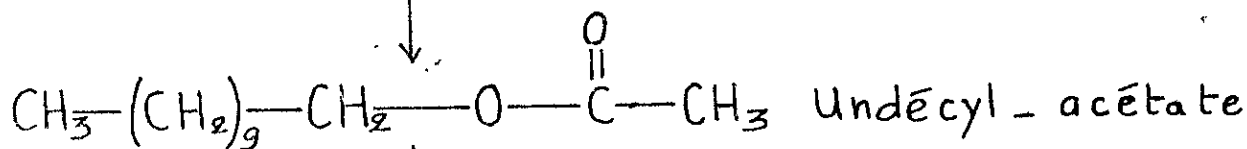
Tridécane



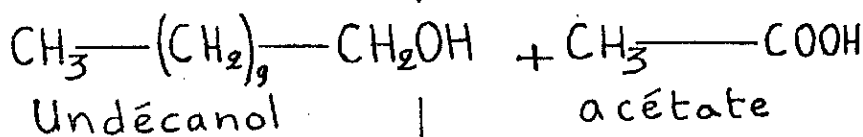
Tridécane-2-ol



Tridécane-2-one

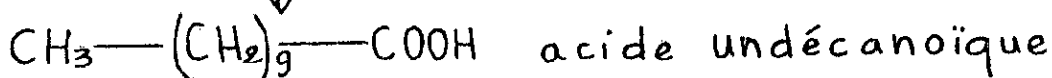


Undécyl-acétate



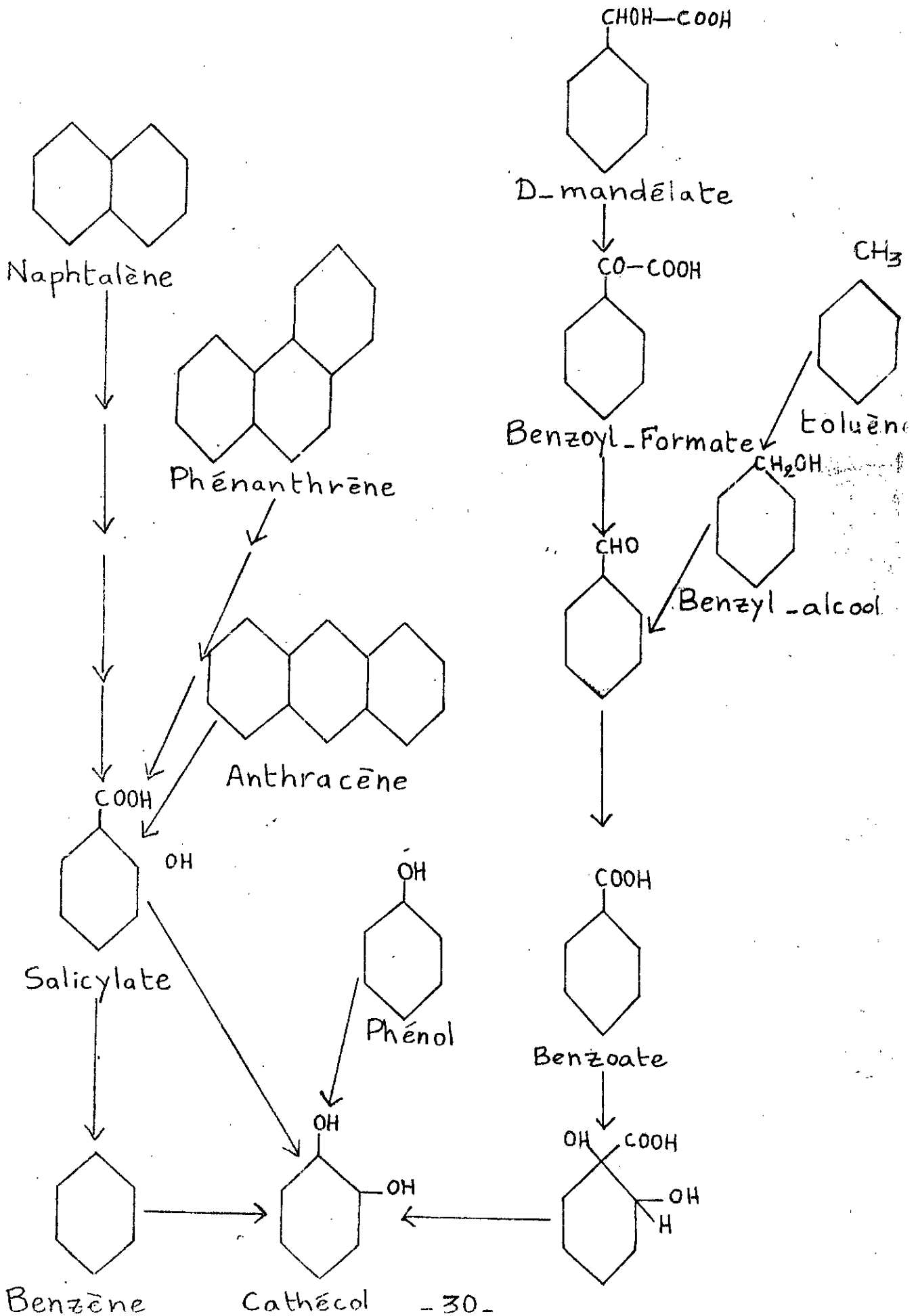
Undécanol

acétate

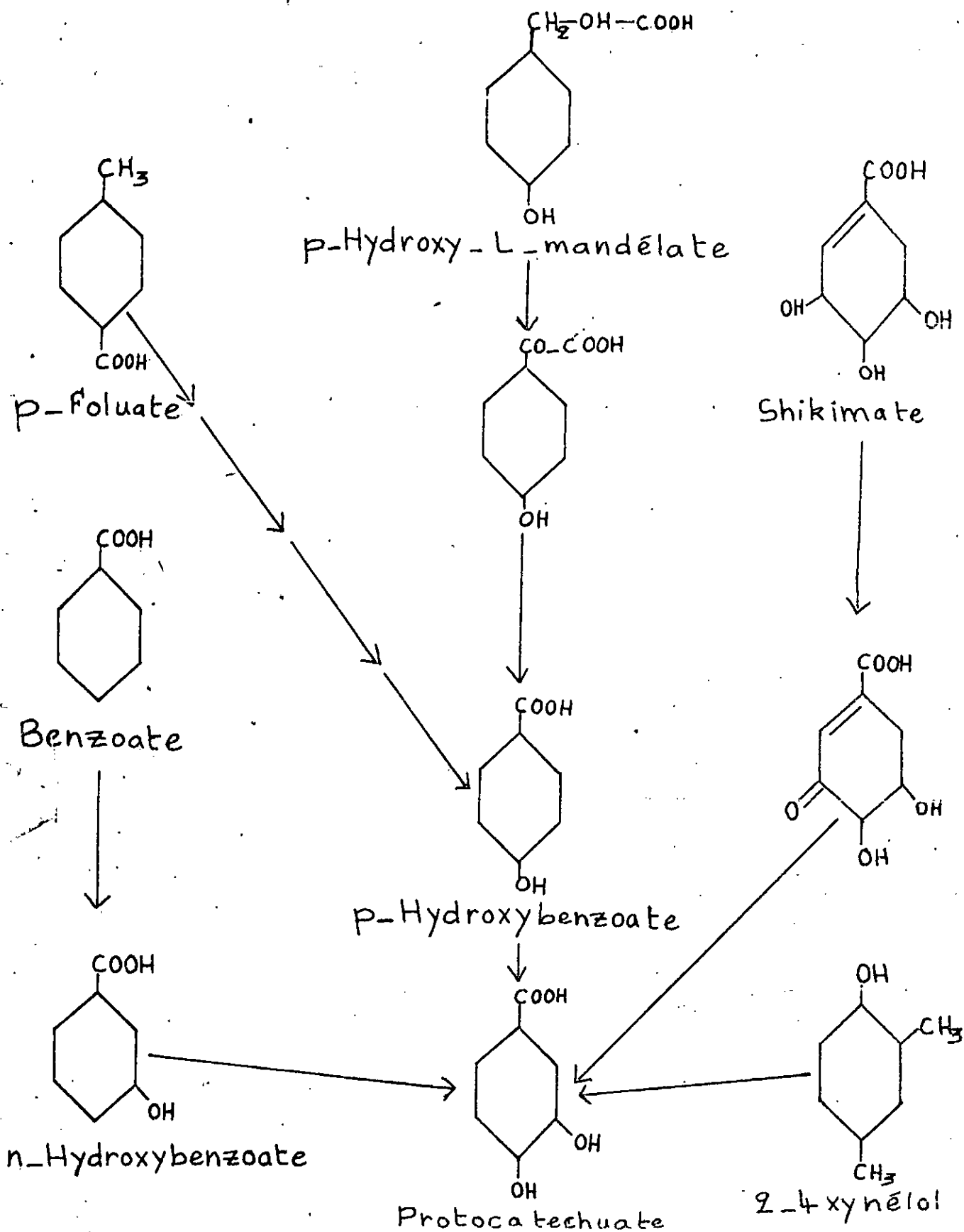


acide undécanoïque

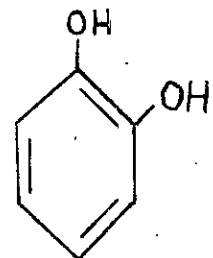
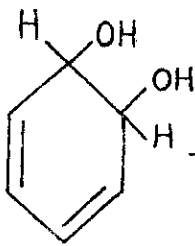
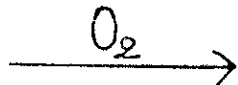
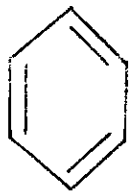
Voies du catabolisme des composés aromatiques aboutissant au catéchol selon Arnaud et Girand (1984) (11) :



PLn<sup>o</sup>6: Voies de dégradation des composés aromatiques aboutissant au protocatéchuate selon Arnaud et Giraud (1984) (11):

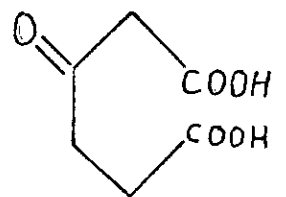
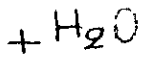
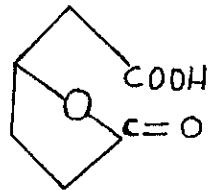
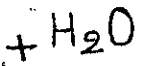
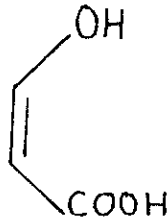
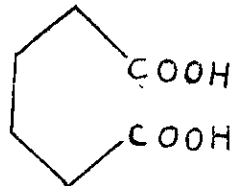
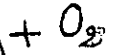
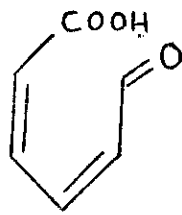






Benzène

Cathécol



$CH_3COOH$   
acide acétique  
(acétyl-CoA)

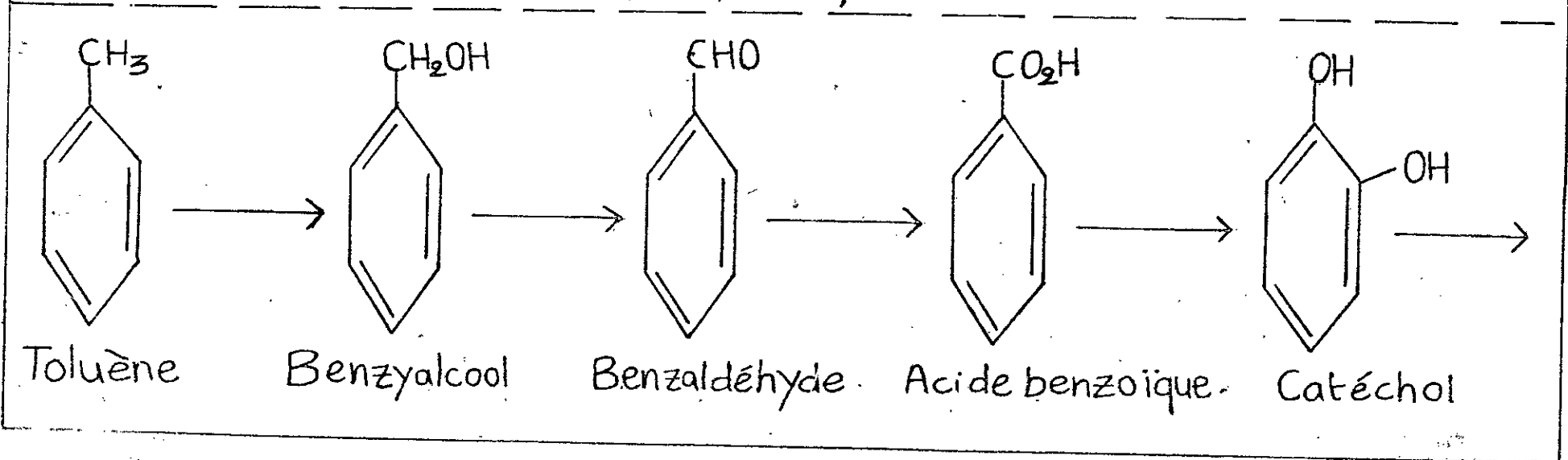
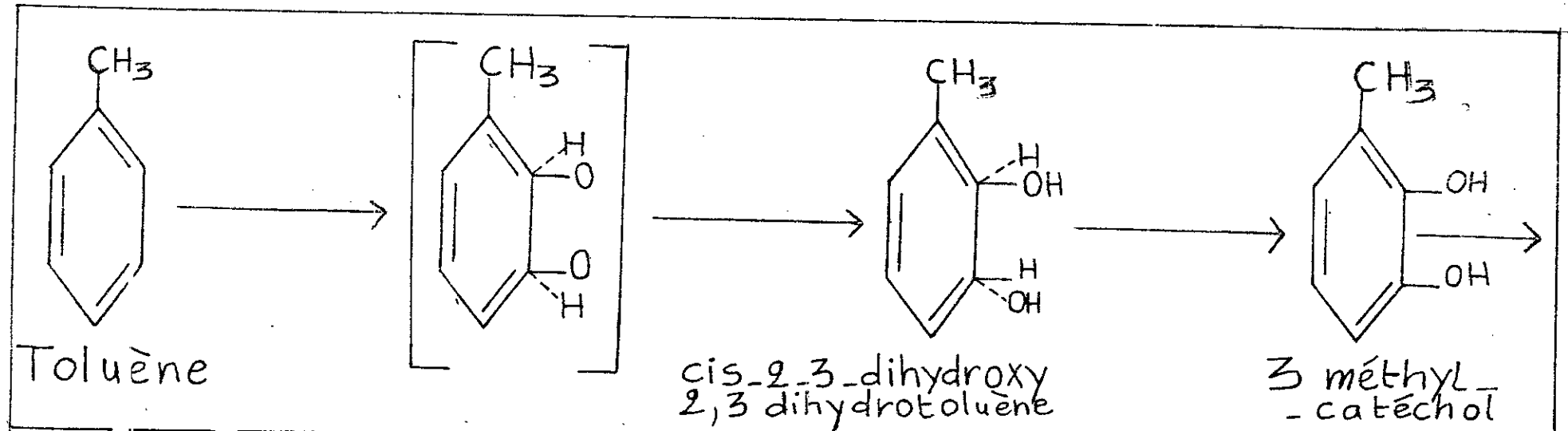
$+ CH_2-COOH$   
 $|$   
 $CH_2-COOH$   
acide succinique

Cycle de KREB:

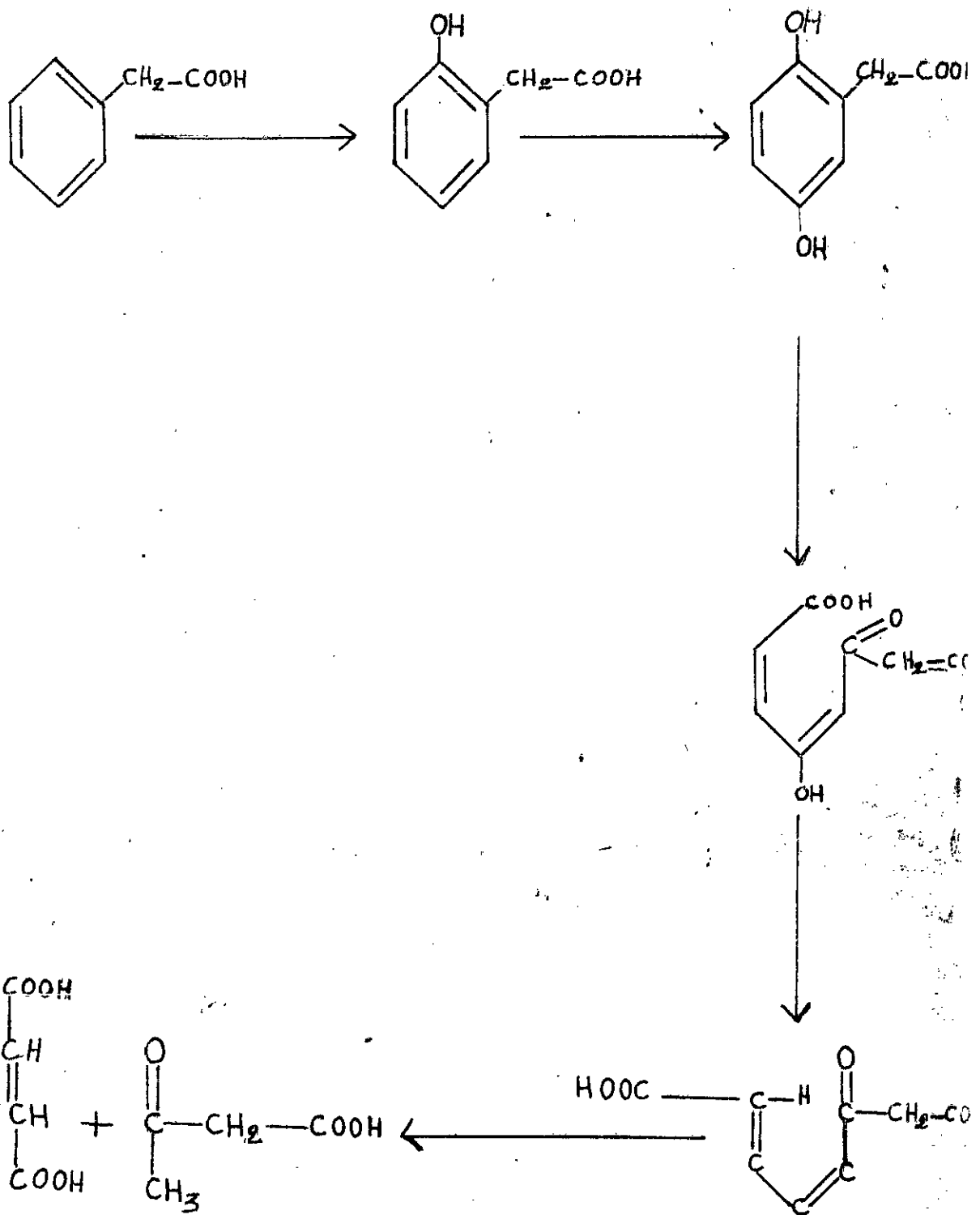
7: Voies métaboliques probables

dégradation du Benzène (10).

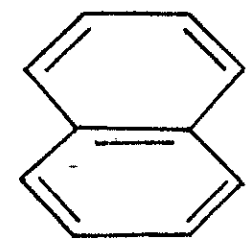
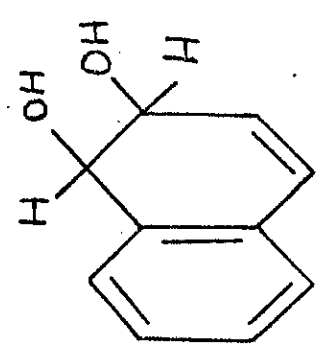
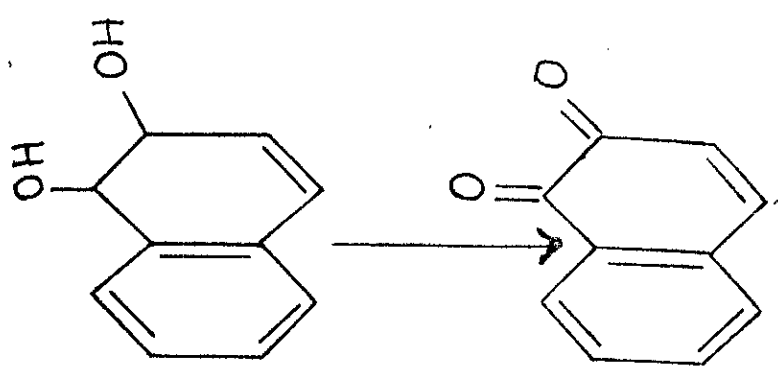
PLn°8: Mécanisme général du processus de biodegradation  
d'un hydrocarbure aromatique (Toluène):



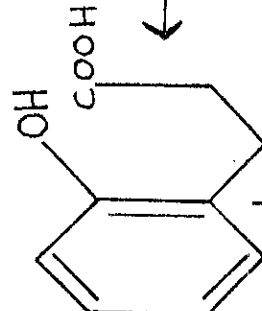
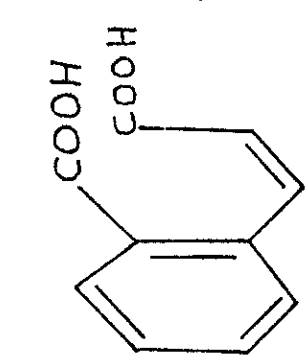
-33-



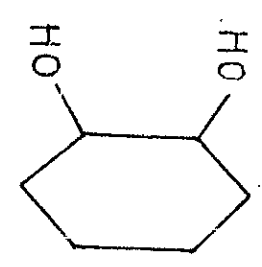
PL n°9 : Mécanismes de biodégradation d'un aromatique alkylé (8)



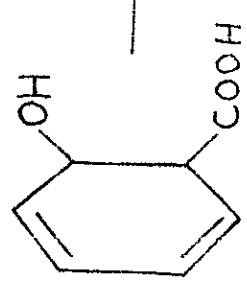
Naphtalène



PL n°10: Voies métabolique  
probables de la  
biodegradation du  
Naphtalène (10).

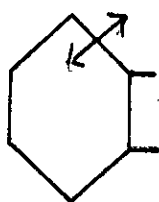


Catéchol

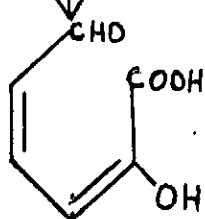


acide salicylique

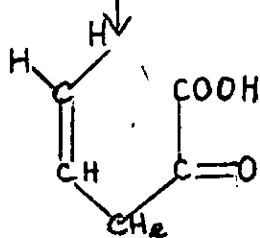
PLn<sup>o</sup> 11 : Dégradation du catéchol et du protocatéchuate  
par métaclivage, selon Arnaud et Girand (1984) (11) :



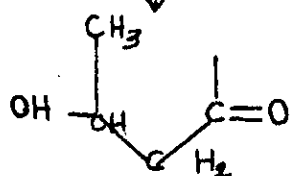
Cathécol



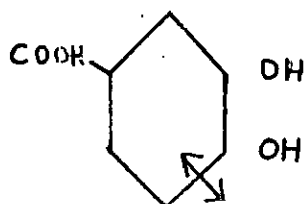
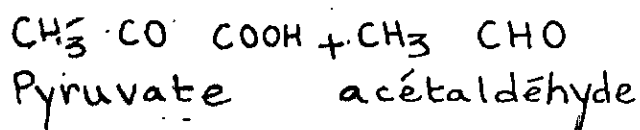
Semi-aldehyde 2-hydroxy-mu-  
-sonique



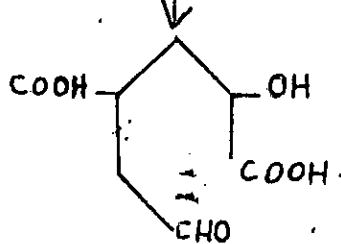
2-oxopent-4-énoate



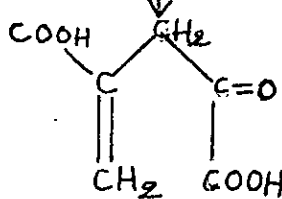
4-Hydroxy-2-oxovalérate



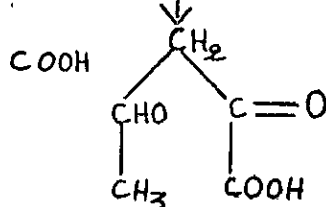
Protocatéchuate



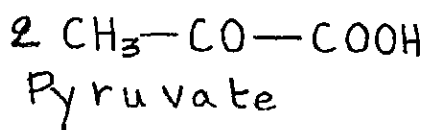
Semi-aldéhyde-2 Hydroxy  
-4-carboxymuconique



2-oxo-4-carboxypent-4-énoate



4-Hydroxy-4-carboxy-2-  
oxovalérate



## B) MICROORGANISMES UTILISES:

### 1- Le genre Pseudomonas

#### a) Taxonomie :

Ce genre appartient à la famille des Pseudomonaceae. Les Pseudomonas sont des bacilles à gram négatif, généralement droits, mobiles par un ou plusieurs cils polaires : ils ne forment pas de spores.

Leurs métabolismes est nécessairement respiratoire, donc sont aérobie strictes. Ces bactéries sont chimioorganotrophe.

Les Pseudomonas se développent facilement en aérobiose sur les milieux nutritifs habituels, à température de 30° C.

Certaines espèces, comme Pseudomonas aeruginosa sont capables de croître à 42C° (14).

Elles sont capables d'utiliser une variété impressionnante de substrats comme source de carbone et d'énergie.

Ceux-ci comprennent non seulement les composés biochimiques bien connus tels que glucides, lipides, acides aminés, acides organiques mais aussi un grand nombre de corps aromatiques Benzéniques, Terpéniques, de Stéroïdes etc.....

Certaines espèces sont aussi capables de respirer les nitrates en anaérobiose ce qui tend à leur conférer un avantage écologique notable et à leur faire jouer un rôle important dans les processus de dénitrification (15)

#### b) Ecologie

Ces microorganismes sont présents dans l'eau de mer, l'eau douce et le sol. Certains sont pathogènes vis à vis de l'homme, d'animaux ou de plantes (14)

### 2- LE GENRE BACILLUS:

#### a- Taxonomie

Le genre Bacillus appartient à la famille des Bacillaceae.

Les cellules peuvent être isolées ou associées par paires ou en chaînes.

Elles sont à gram positif, sporulées, mobiles ou immobiles, aérobies strictes ou facultatifs et chimioorganotrophes.

Elles se multiplient en général sur milieux usuels à pH voisin de la neutralité.

Sur gélose, on obtient généralement des colonies larges, plates, opaques à bord irréguliers.

Les Bacillus produisent une spore résistante à de nombreux agents physiques et chimiques : chaleur, radiation, désinfectants, antiseptiques et agents oxydants.

Possédant une forte potentialité catabolique, ils peuvent produire une gamme diversifiée d'exoenzymes capables de dégrader les macromolécules.

L'existence de nombreux plasmides est aussi à noter ainsi que de fréquents phénomènes de conjugaison et de transduction (17).

#### b)- Ecologie :

Les Bacillus sont présents dans le sol, l'eau marine et douce : quelques unes sont pathogènes.

Représentant un faible pourcentage de la flore microbienne permanente du milieu marin (1, 2% à 16 %) la majorité des Bacilles gram positifs se compose du genre Bacillus (17).

L'existence de ce dernier dans l'eau de mer est connue depuis longtemps puisque en 1891 Russel (17) isolait de ce milieu des bactéries sporulées.

#### C) Courbe de croissance:

##### 1°) Définition:

La présentation graphique de la croissance s'effectue en coordonnées semi logarithmique avec la concentration bactérienne en logarithmes népérien ( $\log X$ ) sur l'axe des ordonnées, le temps en nombre arithmétique sur l'axe des abscisses. La pente de la courbe exprime le taux de croissance de la pollution indépendamment de la concentration cellulaire.

En effet, en milieu non renouvelé, la croissance des bactéries est limitée et suit différentes phases. voir figure suivante :

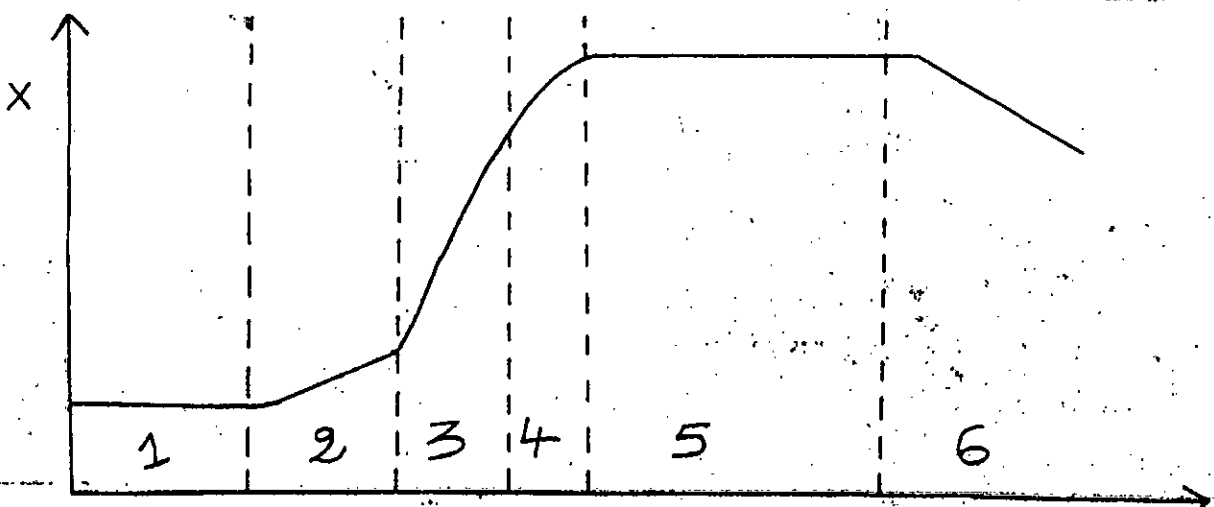


figure N° 1 : Représentation schématique de la croissance

### 1- Phase de latence:

Suit immédiatement l'ensemencement du milieu de culture. Il s'agit d'une période d'adaptation au cours de laquelle la cellule synthétise les enzymes nécessaires pour métaboliser le substrat.

La vitesse de croissance est nulle

$$\Rightarrow \mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = 0$$

### 2- Phase d'accélération :

Représente le début de la croissance microbienne, la concentration cellulaire augmente et la vitesse spécifique de croissance augmente aussi.

$$\Rightarrow \mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} > 0 \quad \mu \uparrow$$

### 3- Phase exponentielle:

Correspond au maximum de la croissance microbienne.

La vitesse spécifique de croissance augmente et atteint son maximum.

$$\Rightarrow \mu_{max} = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} > 0 \quad \mu \text{ constant et maximal}$$

### 4- Phase de ralentissement:

Montre la diminution de la croissance microbienne la vitesse spécifique de croissance diminue.

$$\Rightarrow \mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} > 0 \text{ mais } \mu < \mu_{max} \quad \mu \downarrow$$

### 5- Phase stationnaire

La croissance microbienne s'arrête X devient constant

$$\Rightarrow \mu = 0.$$

### 6- Phase de déclin :

Le nombre de cellules viables diminue du fait de la mortalité dont le taux va progressivement augmenter (18)

$$\Rightarrow \mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} < 0$$



La croissance bactérienne dans les conditions idéales de culture peut être définie par deux constantes :

-le temps de génération  $G$  : c'est l'intervalle de temps entre deux divisions successives, ou le temps nécessaire au doublement de la population. Il est donné par la formule suivante :

$$G = \frac{T}{n}$$

$T$  : temps

$n$  : nombre de divisions

Il n'est pas le même pour toutes les bactéries, et peut varier en fonction des conditions de culture et du type de souche.

Le taux de croissance : c'est le nombre de divisions par unité de temps.

$\mu$  est obtenu lors de la phase exponentielle en représentation semi-logarithmique.

Le taux de croissance dépend du substrat, limitant et de sa concentration qui est présent dans le milieu tel que l'a démontré Monod :

avec  $\mu_{max}$  : taux de croissance microbienne maximal

$K_s$  : constante de demi saturation

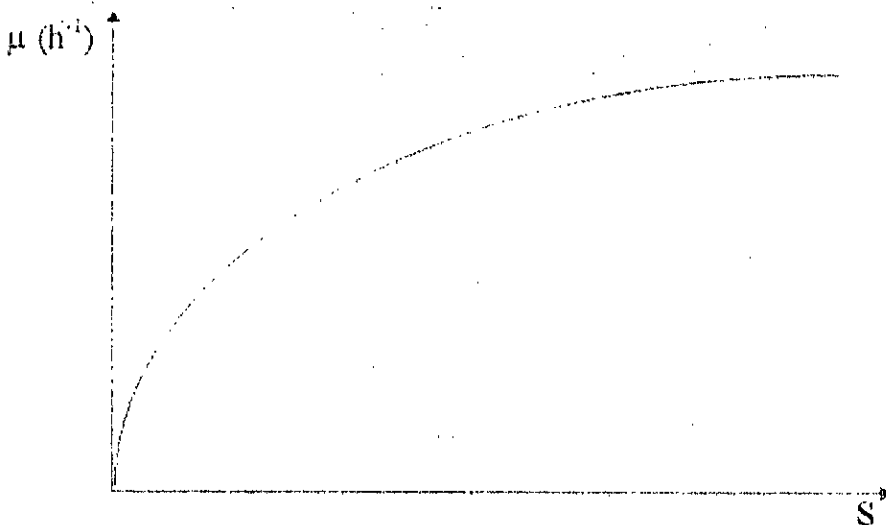


figure n° 2 : Evolution du taux de croissance ( $\mu$ ) en fonction du substrat ( $S$ ).

Si l'on part d'une population bactérienne de concentration initiale  $X_0$ , son accroissement se fait selon une progression géométrique:

$$N = 2^n X_0 = 2^{\mu t} X_0$$

On a  $\mu = \frac{n}{t} \Rightarrow n = \mu t$ .

d'où  $N = 2^{\mu t} X_0$

qui s'écrit aussi :  $\log N = \mu t \log 2 + \log X_0$

d'où  $\mu = \frac{\log N - \log X_0}{t \log 2}$

## 2) Facteurs influençant la croissance bactérienne sur les hydrocarbures :

Il est unanimement reconnu que la biodégradation des hydrocarbures en mer reste un processus lent de l'ordre de 2 à 9 mois, voire plus, ce qui s'explique par de nombreux facteurs limitants :

### -la faible concentration en microorganismes:

Il y a une faible concentration en micro-organismes capables de métaboliser les hydrocarbures d'origine pétrolière puisque les teneurs en pétrole sont très faibles dans le milieu marin .

### -la température:

La température a une influence significative sur les vitesses de biodégradation, une augmentation en température augmente la volatilité de beaucoup des composés toxiques et diminuera la viscosité du pétrole donc augmentera la chance d'émulsification et accélèrera les vitesses de la biodégradation.

Toutefois, il faut retenir que la biodégradation peut se dérouler dans la plupart des mers du globe même dans les régions froides (8).

### - l'aération :

L'aération est indispensable puisque les micro-organismes ont besoin d'oxygène libre pour oxyder les fractions pétrolières et les convertir d'une part en une biomasse de composition globale  $C_7 H_{11} NO_3$  et d'autre part en  $CO_2$  et  $H_2O$ .

Dans l'eau de mer, la teneur en oxygène varie de 0 à 15 mg/ litre suivant la température, la profondeur et l'existence d'autres processus biologiques favorables comme la photosynthèse ou consommateurs d'oxygène comme le développement des organismes marins.

### -La dispersion:

La dispersion de l'hydrocarbures assure aux microorganismes responsables une condition indispensable à un métabolisme rapide.

Il s'agit de mettre au point des composés tensio-actifs non toxiques qui assurent une dispersion rapide et stable des hydrocarbures (13).

- L'effet du pH :

Tout microorganisme possède une zone de pH dans laquelle sa vitesse de croissance est optimale. En dessous et au dessus de cette zone, la croissance peut diminuer considérablement, voire inhibée.

Les bactéries sont neutrophiles et présentent un bon développement à pH neutre .

- Les éléments nutritifs:

Comme tous les êtres vivants , les micro-organismes responsables de l'épuration biologique ont besoin d'éléments minéraux indispensables à leur croissance , en particulier d'azote et du phosphore dont les teneurs sont très faibles dans l'océan : respectivement 500 et 70 mg .cm<sup>3</sup> (19).

Des oligo éléments sont également nécessaires.

L'apport d'un engrais minéral détermine une augmentation du nombre de bactéries capables de métaboliser le pétrole, ainsi que la biomasse phytoplanctonique qui constitue un apport important de matières organiques et elle est à l'origine d'un enrichissement en oxygène indispensable à la biodégradation du pétrole (20).

En milieu marin l'accélération de la biodégradation est en fonction de la concentration en nutriments (21).

*Partie Expérimentale*

Partie expérimentale:

IV) EXPERIMENTATION

A) INTRODUCTION.

B) MATERIELS ET METHODES.

1- MATERIELS

2- METHODES

C) RESULTATS ET INTERPRETATIONS.

1) MISE AU POINT DES CONDITIONS DE CULTURE.

a) CHOIX DES VITESSES D'AGITATION.

b) VERIFICATION DE L'EVAPORATION DES  
HYDROCARBURES.

c) ETUDE DU POUVOIR D'ASSIMILATION DES  
SUBSTRATS CARBONES.

c<sub>1</sub>)- POUR LE GENRE PSEUDOMONAS.

c<sub>2</sub>)- POUR LE GENRE BACILLUS.

2) ETUDE DE LA CROISSANCE SUR LE BENZENE ET SUR LE TOLUENE.

a) ETUDE DES CONCENTRATIONS TESTEES ET  
DETERMINATIONS DES SEUILS DE TOXICITE.

a1)- POUR LE GENRE PSEUDOMONAS.

a2)- POUR LE GENRE BACILLUS.

b) DETERMINATION DES CONCENTRATIONS OPTIMALES  
DES HYDROCARBURES.

b<sub>1</sub>)- POUR LE GENRE PSEUDOMONAS.

b<sub>2</sub>)- POUR LE GENRE BACILLUS

3) ETUDE DE LA BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES PAR  
CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.

a) APPAREILLAGE D'ANALYSE ET CONDITIONS  
OPERATOIRES GENERALES.

b) MODE OPERATOIRE.

c) DETERMINATION DES COURBES D'ETALONNAGE POUR  
LE BENZENE ET LE TOLUENE.

d) ETUDE DE LA CROISSANCE BACTERIENNE SUR LE  
BENZENE ET SUR LE TOLUENE PAR CHROMATOGRAPHIE  
EN PHASE GAZEUSE.

e) INTERPRETATION DES RESULTATS DE L'ANALYSE PAR  
CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.

4) COMPARAISON DES RESULTATS ENTRE LES SOUCHES.

a) COMPARAISON DES RESULTATS ENTRE LES DEUX  
SOUCHES DE PSEUDOMONAS.

b) COMPARAISON DES RESULTATS ENTRE LE GENRE  
PSEUDOMONAS ET LE GENRE BACILLUS.

v) CONCLUSION.

## A) INTRODUCTION :

Dans notre étude , nous nous sommes intéressés à la biodégradation du Benzène et du Toluène qui sont des monoaromatiques très toxiques .

Pour cela nous avons utilisé deux souches de pseudomonas; Pseudomonas facilis et Pseudomonas saccharophila qui sont isolées des réservoirs de NAPHTAL de Dar El Beida et une souche de Bacillus circulans isolée de Oued El Harrach.

Nous distinguons deux étapes importantes dans notre travail :

- Etude de la croissance bactérienne sur différents substrats par spectrophotomètre qui nous donne les densités optiques représentant la biomasse et sa variation en fonction du temps ; cela nous permet de tracer les courbes de croissance et de les étudier .
- Analyse par chromatographie en phase gazeuse qui nous permet de déterminer le pourcentage de dégradation d'un hydrocarbure et de suivre sa disparition en fonction du temps jusqu'à l'arrêt de la croissance bactérienne .



B) Matériel et méthodes:

1) Matériel:

a) Matériel biologique:

Souches	Espèces	Origine
B3	<u>Pseudomonas facilis</u>	isolées de réservoir de Naphtal de Dar-El-Beida
B7	<u>Pseudomonas Sacchrophila</u>	
	<u>Bacillus circulans</u>	isolée de Oued El Harrach

tab N° 5 : les souches utilisées

b) Appareillage et Matériel:

- Cellule de Thoma
- Spectrophotomètre
- Erlenmeyers 100 ml.
- Agitateur
- Barreaux magnétiques
- Etuve à 30°.

c) Milieus de culture et substrats carbonés:

c-1) Milieus de culture : (voir annexe):

c-2) Les substrats carbonés:

Il s'agit de deux hydrocarbures aromatiques:

le Benzène et le Toluène :

Ces deux hydrocarbures sont filtrés à travers une membrane de filtration de 0.45 microns grâce à un appareil de filtration .

Non chimique	Poids moléculaire	Formule chimique
Benzène	78g	$C_6H_6$
Toluène	92g	$C_7H_8$

tab N° 6 : les hydrocarbures utilisées

## 2) Méthodes:

### a) Vérification du pouvoir d'assimilation des substrats carbonés:

Dans des erlenmeyers contenant 20 ml du milieu minimum, nous avonsensemencé les milieux sans source de carbone et avec source decarbone qui est le glucose à la concentration de 1g/100 ml (1%); l'incubation a été faite à 30 ° C pendant 24 heures sous agitation continue, à la vitesse de 130 tours /minute pour le geure Bacillus et 200 t /mn avec bareaux magnétiques pour le genre Pseudomonas l'observation est faite après 24 heures.

Après les deux souches de Pseudomonas et la souche de Bacillus circulans ont étéensemencés sur milieux minimums additionnés du Benzène et du Toluène comme source de carbone à raison de 2% pour le genre Pseudomonas (2ml de l'hydrocarbure par 100 ml du milieu minimum) et de 0.5% pour le genre Bacillus.

Les cultures sont incubées à 30° C pendant 48 heures avec observation après 24 heures.

### b) Estimation de la croissance par turbidimétrie:

#### b-1) Principe :

Le spectrophotomètre est un appareil permettant la mesure de la densité optique (DO) d'une solution ou d'une suspension.

Le principe de fonctionnement est le suivant:

Un faisceau lumineux  $I$  issu d'une lampe à tungstène est dirigé sur un monochromateur à sélectionner les longueurs d'onde; ce faisceau traverse une cuve contenant la suspension; la lumière transmise  $I$  est reçue par une cellule photoélectrique qui après amplification est mesuré par un enregistreur directement gradué en DO ou en pourcentage de transmission.

L'absorption ou densité optique est donnée par la loi de Beer -Lambert:

$$DO = \log \frac{I}{I_0} = \epsilon . C . l$$

$I_0$ : lumière incidente

$I$ : lumière transmise

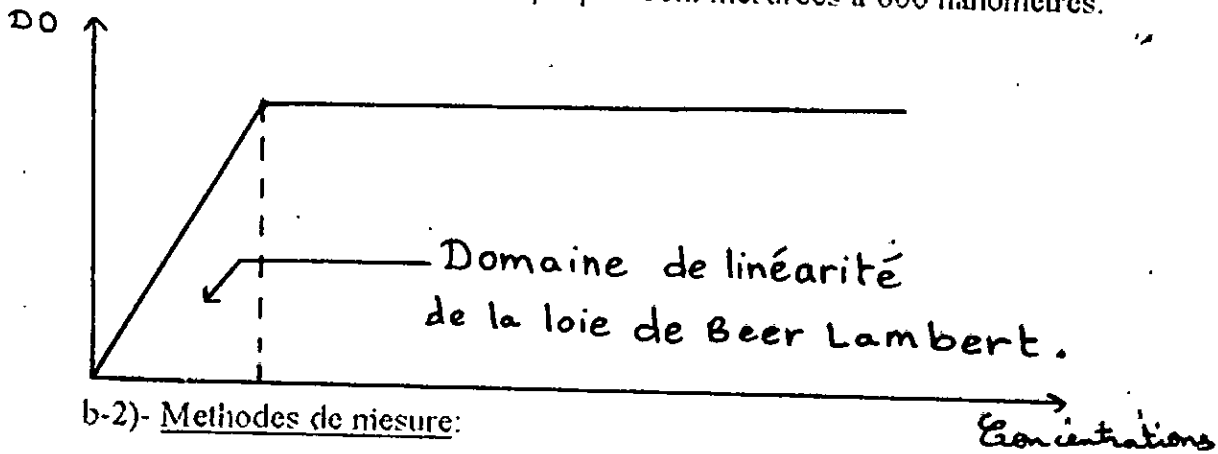
$C$ : concentration bactérienne en cellules /ml.

$l$ : longueur de la cuve = 1 cm.

$\epsilon$ : coefficient ( fonction de la longueur d'onde, bacterie )

Pour des solutions très diluées, on remarque qu'il ya proportionnalité entre la densité optique (DO et concentration, il faut donc diluer les solutions trop denses avant d'effectuer les mesures.

Dans notre étude, les densité optique sont mesurées à 600 nanomètres.



#### b-2)- Méthodes de mesure:

##### b-2-1) - Préculture:

Les erlenmeyers de 100 ml bouchés au coton, contenant 20ml du milieu minimum de culture et la source de carbone à éprouver à raison de 2% pour le genre *Pseudomonas* et 0.5% pour le genre *Bacillus* à tester sontensemencés avec les souches cultivées sur gélose nutritive.

L'incubation est faite à 30° C pendant 24 heures de façon à être en phase exponentielle de la croissance avec une agitation de 130 T/mn pour les souche du genre *Bacillus* et 200 T/mn pour les souches du genre *Pseudomonas*.

Cette préculture permet d'éliminer la phase de latence dans la culture elle même sur le même milieu et dans les mêmes conditions.

##### b-2-2)- Culture en erlenmeyers:

Les souches sont testées pour plusieurs concentrations choisies du substrats, pour cela des erlenmeyers de 100 ml contenant 20ml de milieu minimum et le substrat carboné à tester, sont inoculés avec la préculture qui représentera 5% du volume du milieu de culture, l'incubation est faite à 30 ° C, à des vitesses d'agitation identiques à celles des précultures.

##### b-2-3)- Prélevements:

Des prélèvements de 3 ml ont été effectués toutes les 2 heures pour dresser la courbe de croissance.

##### b-3) Courbe étalon:

La correspondance entre les différentes valeurs de la densité optique (DO) et les concentrations microbiennes est faite par établissement d'une courbe étalon.

A partir d'une culture on fait des dilution au  $\frac{1}{2}$ ;  $\frac{1}{3}$ ;  $\frac{1}{4}$ ; et  $\frac{1}{5}$  dont les DO seront mesurées en même temps que le comptage direct des cellules par la cellule de Thoma au microscope optique se fait; on trace ensuite la droite

$$DO = f(x).$$

x étant le nombre de cellule/ml.

b-4)- Numération par comptage direct au microscope optique : (voir schéma de la lame de Thoma) :

Le comptage des microorganismes est réalisé à l'aide d'une cellule de Thoma : c'est une lame porte -objet quadrillée dont une des faces est creusée d'un volume connu.

Une goutte de la suspension microbienne est placée dans la cuve de la lame puis recouverte d'une lamelle : des volumes précis sont ainsi délimités au niveau du quadrillage de la lame, soit le volume de  $2,5 \cdot 10^{-4} \mu\text{l}$  par petit carreau, sachant que la côte du carré mesure 0,05 et hauteur 0,1mm, les cellules sont comptées au grossissement 45. le nombre de cellule/ml « x » est estimé ainsi :

$$\frac{N \cdot 10^3}{16 \cdot 2,5 \cdot 10^{-4} \cdot D} = \frac{N}{D} \cdot 2,5 \cdot 10^5$$

N : Nombre moyen de cellules par grand carré de la lame

D : Facteur de dilution

$$\frac{N \cdot 10^3}{16 \cdot 2,5 \cdot 10^{-4} \cdot D} \leftarrow \text{pour convertir du } \mu\text{l au ml (1ml} = 10^3 \mu\text{l)}$$

volume des 16 grands carrés en  $\mu\text{l}$

on sait que :  $1\text{mm}^3 = 10^{-3} \text{cm}^3$  et  $1 \text{cm}^3 = 1\text{ml} = 10^3 \mu\text{l}$ .

On a : l'air d'un petit carré du grand carré de la lame c'est :

$$0,05 \cdot 0,05 = 25 \cdot 10^{-4} \text{mm}^2$$

$$\begin{aligned} \text{et donc le volume : } 25 \cdot 10^{-4} \cdot 0,1 &= 25 \cdot 10^{-5} \text{mm}^3 \\ &= 25 \cdot 10^{-5} \cdot 10^{-3} \text{cm}^3 \\ &= 25 \cdot 10^{-8} \text{ml} \\ &= 25 \cdot 10^{-5} \mu\text{l} \\ &= 2,5 \cdot 10^{-4} \mu\text{l} \end{aligned}$$

### C) RESULTATS ET INTERPRETATIONS:

#### 1) Mise au points des conditions de culture:

##### a) Choix des vitesses d'agitation:

Des essais ont été réalisés avec le Benzène à une concentration de 2% pour différentes vitesses d'agitation et en cas des deux espèces (*Pseudomonas facilis* et *Pseudomonas Saccharophila*).

L'utilisation des barreaux magnétiques permet l'aération des bactéries et la dispersion de l'hydrocarbure dans le milieu minimum.

Après une incubation de 24 heures et en fonction de la croissance obtenue, il a été retenu une vitesse d'agitation de 200 tours /minute pour les souches de *Pseudomonas*.

GENRE	Vitesse (T/mn)	150	200	300	400	500	600	800
		Espèce						
Pseudomonas	<i>Pseudomonas facilis</i>	+	++	+	+	+	+	+
	<i>Pseudomonas saccharophila</i>	+	++	+	+	+	+	+

++ : la croissance bactérienne est importante notée par un trouble blanchâtre assez dense.

± : la croissance bactérienne est moins importante marquée par un trouble léger.

tableau N° 6 : Etude des vitesses d'agitation utilisées pour les souches de *Pseudomonas* (24 heures, pH = 7).

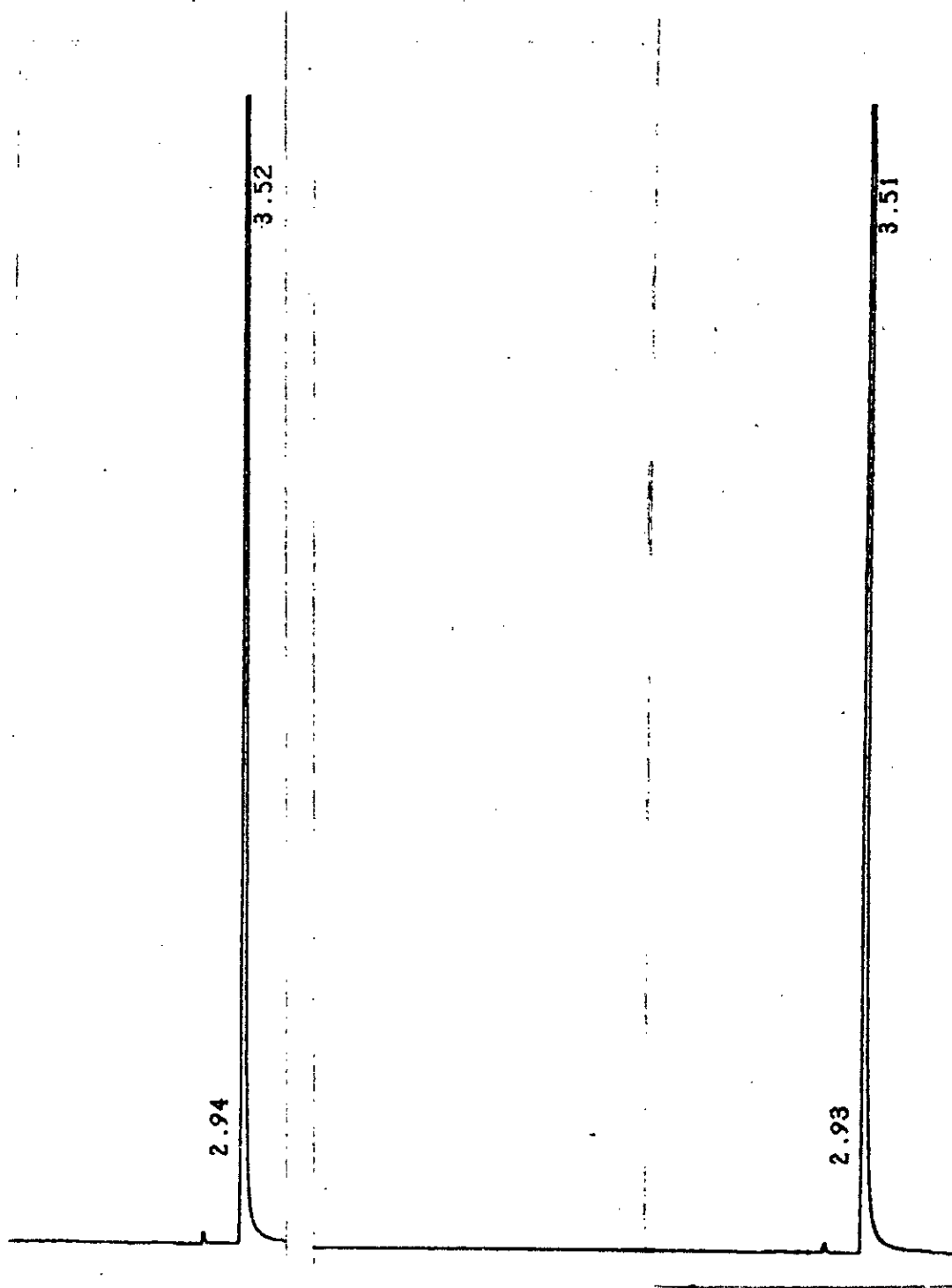
Pour les souches de bacillus la vitesse d'agitation est connue, elle est de 130 T/mn (11).

b) Vérification de l'évaporation des hydrocarbures:

L'évaporation des produits utilisés a été vérifiée par analyse chromatographique sur un milieu inactif à 30 ° C pendant 24 heures sans ensemencement par rapport au temps t.

Voir chromatogrames n° 1,2 correspondant aux concentrations consécutives de 2% et 3% pour le Benzène et chromatogramme n°3 pour la concentration de 3% pour le toluène .

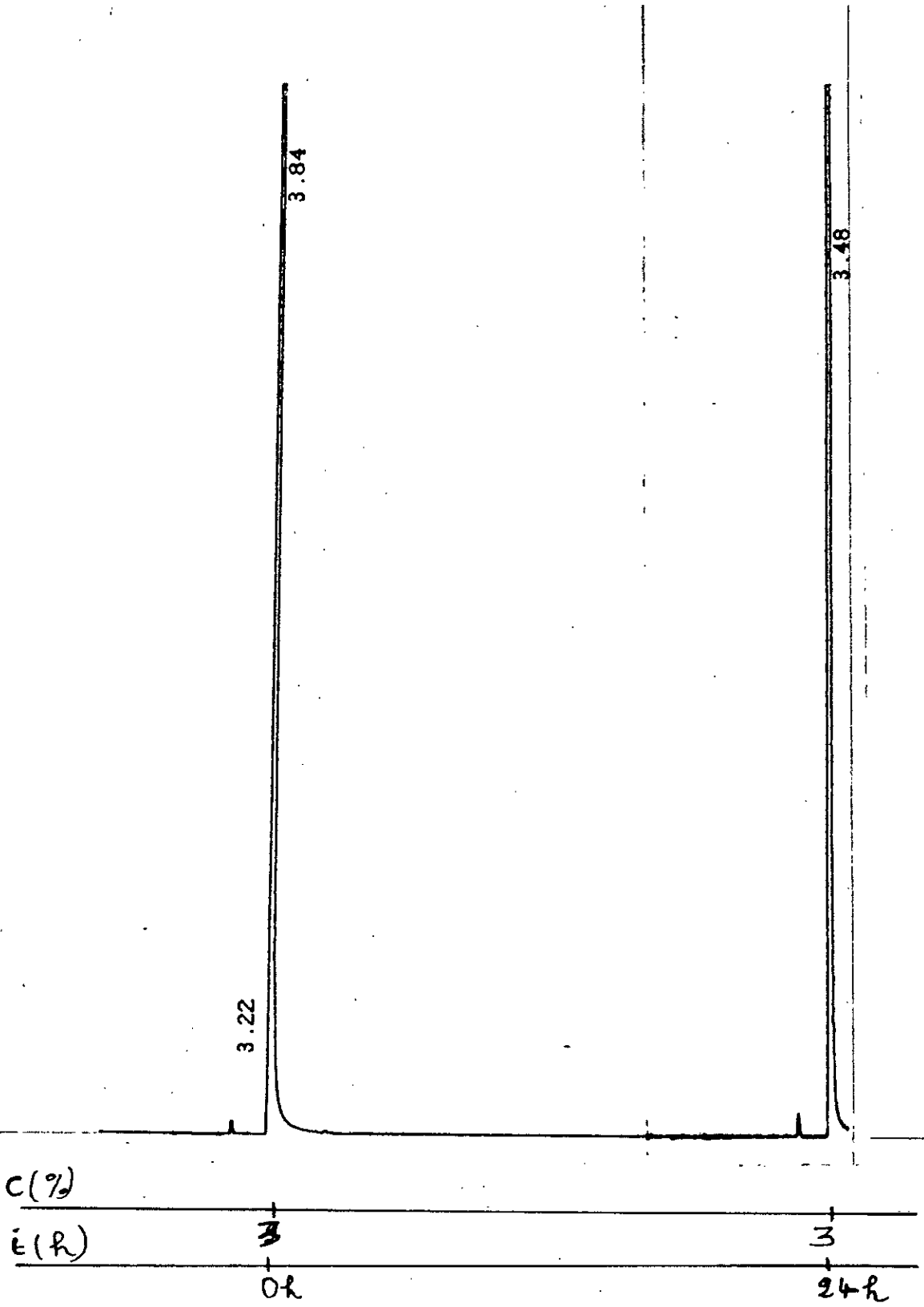
On observe d'après les chromatogrammes qu'il n'y a pas de différence d'aire entre le pic correspondant à la concentration initiale et celui correspondant à la concentration finale pour chaque cas.



(%)

h) 2% 0h 2% 24h

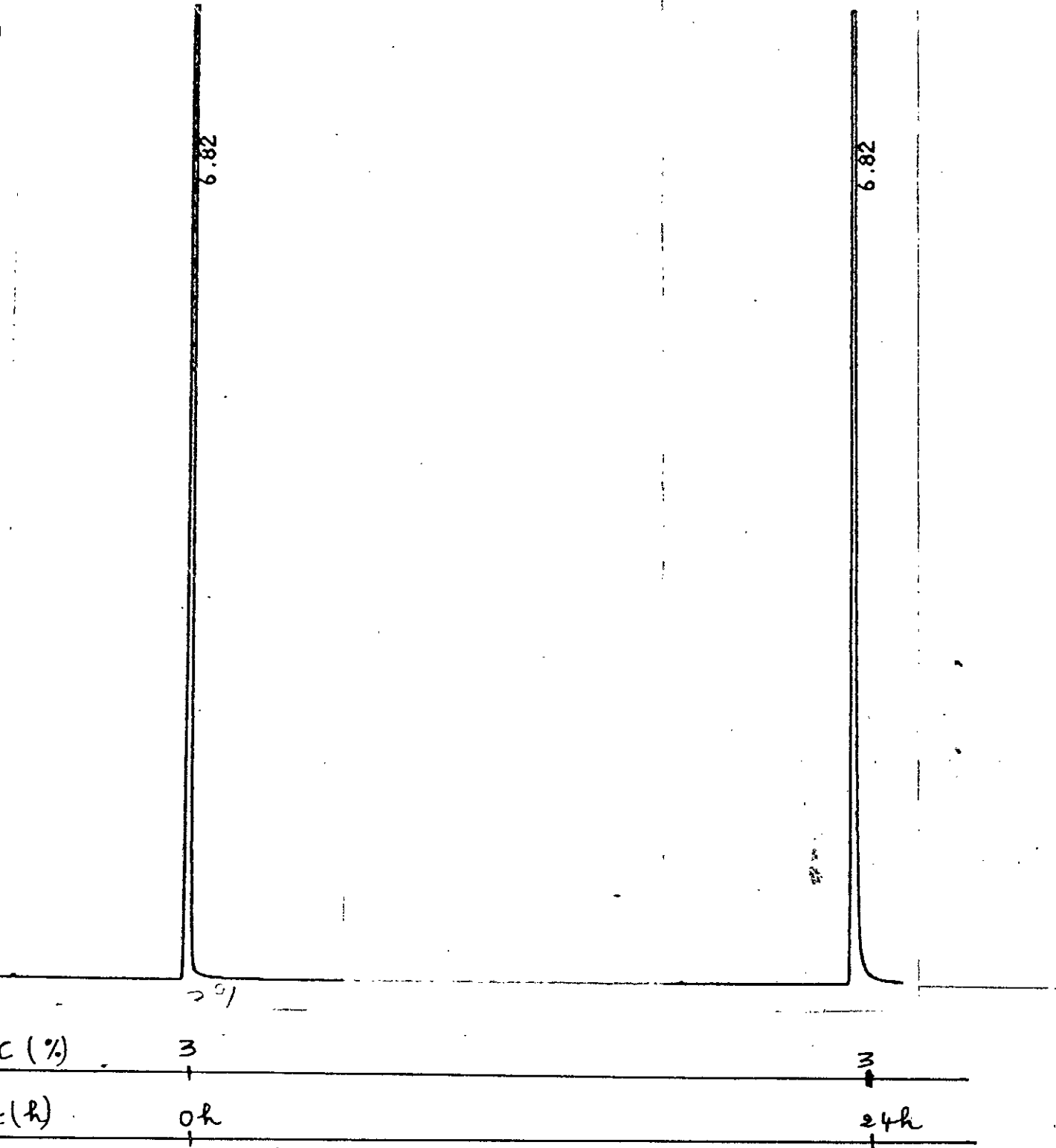
Chromatogramme n°1 : Vérification de la concentration du Benzène par chromatographie à 2% . après 24 heures .



chromatogramme n° 2 : Vérification du Benzène  
à 3%.



030



Chromatogramme n° 3 : Vérification de l'évaporation du Toluène à 3%.

c) Étude du pouvoir d'assimilation des substrats carbonnés:

c<sub>1</sub>) Pour les souches de Pseudomonas:

Comme le montre le tableau n° 8a pour les souches de Pseudomonas sous agitation continue à 200T /mn et une incubation de 24 heures à 30°C, le milieu minimum avec le glucose comme seule source de carbone a donné une très bonne croissance : le milieu témoin sans aucune source de carbone n'a donné aucune croissance. Les milieux minimums additionnés de 0,3%, 0,5%, 0,8%, 2%, 4%, 6% du Benzène ou du toluène a permis une croissance notable pour les concentrations entre 2% et 6% alors que pour les concentrations allant de 0,3% à 0,8% la croissance s'annule rapidement .

Donc pour l'étude de la courbe de croissance , on choisira des concentrations supérieures à 2%.

c<sub>2</sub>) Pour la souche de Bacillus:

Comme le montre le tableau n° 8b pour la souche de Bacillus circulans sous agitation continue à 130 l/mn , après une incubation de 48 heures à 30° C, le milieu minimum additionné avec le glucose comme seule source de carbone a donné une très bonne croissance : le milieu minimum ( témoin) sans aucune source de carbone n'a donné aucune croissance : les milieux minimums additionnés du Benzène ou du toluène ont permis une croissance notable pour les concentrations allant de 0,3 % à 0,8% alors que pour les concentrations supérieures à 2% la croissance est très limitée.

Substrat % Espèces	0.3		0.5		0.8		2		4		6		1% du Glucose	temoin
	B	T	B	T	B	T	B	T	B	T	B	T		
<u>Pseudomonas</u> <u>facilis</u>	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++	+++	-
<u>Pseudomonas</u> <u>saccharophila</u>	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++	+++	-

B: Benzène.

T: Toluène

Tableau N° 8a: Etude qualitative du pouvoir d'assimilation du Benzène et du Toluène par les souches de Pseudomonas ( 200 T / ml , 30° C, pH = 7, 24 heure)

Substrat % Espèce	0.3		0.5		0.8		2		4		1% du glucose	Temoin
	B	T	B	T	B	T	B	T	B	T		
<u>Bacillus</u> <u>circulans</u>	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+++	-

Tableau N° 8b: Etude qualitative du pouvoir d'assimilation du Benzène et du Toluène par la souches de Bacillus ( 130 T / ml , 30° , pH = 7 , 48 heure).

2) Etude de la croissance sur le Benzène et sur le Toluène.

a) Etude des concentrations testées et détermination des seuils de toxicité:

a1) Les souches de Pseudomonas en croissance sur le Benzène et sur le Toluène:

Le seuil de toxicité d'une souche bactérienne sur un substrat est la concentration de ce substrat à laquelle il n'y a aucune croissance bactérienne; les bactéries ne supportent pas une telle concentration qui vont finir par mourir car elle rend le milieu toxique pour les bactéries.

Tel que l'on peut le voir, sur les tableaux N°9 a et N°9 b résumant les différentes concentrations utilisées et les seuils de toxicité il apparaît donc clairement que les deux souches peuvent supporter de fortes concentrations en Benzène et en Toluène.

Pour Pseudomonas saccharophila, les seuils supportables sur le Benzène et sur le Toluène sont les mêmes et peuvent aller jusqu'à 11 %; le seuil de toxicité est atteint à 12 %.

Pour les Pseudomonas facilis les seuils supportables sur le Benzène vont jusqu'à 12%, le seuil de toxicité est atteint à 13 % alors que sur le Toluène le seuil est atteint à 12 %.

Benzène(%)	2	4	6	8	10	11	12	13
Espèce								
<u>Pseudomonas facilis</u>	+	+	+	+	+	+	+	-
<u>Pseudomonas saccharophila</u>	+	+	+	+	+	+	-	-

tableau N° 9 a

Toluène (%)	2	4	6	8	10	11	12	13
Espèce								
<u>Pseudomonas facilis</u>	+	-	+	+	+	+	-	-
<u>Pseudomonas saccharophila</u>	+	+	+	+	+	+	-	-

tableau N°9 b

Tableau N°9 : Etude de l'assimilation des hydrocarbures aromatiques retenues aux concentrations utilisées et aux seuils de toxicité pour les souches de Pseudomonas ( 30 °C, pH = 7,200 T/mn, 24 h ).

a<sub>2</sub>)- La souche de Bacillus circulans en croissance sur le Toluène:

Le tableau N° 10 nous indique que la souche de Bacillus circulans supportent des concentrations plus faibles que celles supportées par les souches de Pseudomonas.

La souche de Bacillus circulans peut supporter des concentrations allant jusqu'à 4 % : le seuil de toxicité est atteint à la concentration de 5 %.

Espèce \ Toluène (%)	0,3	0,5	0,7	0,9	2	4	5
<u>Bacillus circulans</u>	+	+	+	+	+	+	-

Tableau N° 10 : Etude de l'assimilation du Toluène aux concentrations utilisées et aux seuils de toxicité pour la souche de Bacillus circulans.

b) Détermination des concentrations optimales des sources de carbone :

b<sub>1</sub>)- Cas des souches de Pseudomonas:

Les taux de croissances maximums sont déterminés graphiquement d'après les courbes de croissance N° 8 , N° 9 , N° 10 et N° 11

Espèce \ Benzène(%)	2	3	4	5	6	7	8
<u>Pseudomonas facilis</u>	1,40	1,50	1,66	1,53	1,52	1,30	1,25
<u>Pseudomonas saccharophila</u>	1,38	1,46	1,63	1,50	1,46	1,24	1,03

tableau N° 11 a

Toluène (‰)	2	3	4	5	6	7	8
<u>Pseudomonas facilis</u>	1,36	1,48	1,52	1,52	1,35	1,31	1,20
<u>Pseudomonas saccharophila</u>	1,19	1,22	1,50	1,47	1,24	1,16	1,12

tableau N° 11b

Tableau N° 11 : Evaluation des taux de croissance maximums en  $h^{-1}$  pour les différentes concentrations sur milieu minimum ( 30 ° C. pH = 7, 200 T/mn, 24 heures ) pour les souches de Pseudomonas .

A l'examen des tableaux N° 11a et N° 11 b pour les souches de Pseudomonas en croissance sur les hydrocarbures aromatiques on peut remarquer :

- que le taux de croissance maximum augmente en général de la concentration de 2 % jusqu'à la concentration de 5 % et à partir de 6 % il commence à diminuer.
- La concentration optimale pour chaque étude de la croissance des souches de Pseudomonas sur chaque hydrocarbure est la même et elle est de 4 % qui correspond aux taux de croissance les plus élevés.

On peut remarquer aussi d'après les tableaux N° 11a et N° 11b que les taux de croissance maximum correspondant à la croissance des souches de Pseudomonas sur le Benzène pour les concentrations étudiées sont supérieurs à ceux correspondant à la croissance bactérienne sur les mêmes concentrations du Toluène.

Exemple : d'après les tableaux N° 11a et N° 11b pour la souche de Pseudomonas facilis sur 6 ‰ du Benzène on a  $\mu_{max} = 1,52 h^{-1}$ ; et sur 6 ‰ de Toluène .  $\mu_{max} = 1,35 h^{-1}$  .

Donc les souches de Pseudomonas sont plus performantes sur le Benzène que sur le Toluène: cela peut être dû à la structure moléculaire du Benzène qui est un peu plus simple et plus légère que celle du Toluène, donc plus facile à assimiler par les bactéries.

On peut remarquer aussi que les taux de croissance correspondant à la croissance de la souche Pseudomonas facilis sur les différentes concentration utilisées sont plus élevées que ceux correspondant à la croissance de la souche de Pseudomonas saccharophila.

Donc on peut dire que la souche de Pseudomonas facilis est plus performante dans la dégradation de ces deux hydrocarbures que la souche de Pseudomonas saccharophila .

Paramètre \ Espèce	<u>Pseudomonas</u> <u>facilis</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>saccharophila</u>
Concentration optimale(%)	4	4
$\mu_{max}(h^{-1})$	1,66	1,63
Biomasse cellulaire (bact/ml)	$11,2 \cdot 10^7$	$10,7 \cdot 10^7$

tableau N°12a: le Benzène

Paramètre \ Espèce	<u>Pseudomonas</u> <u>facilis</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>saccharophila</u>
Concentration optimale(%)	4-5	4
$\mu_{max}(h^{-1})$	1,52	1,50
Biomasse cellulaire (bact/ml)	$10,75 \cdot 10^7$	$9,425 \cdot 10^7$

tableau N°12b : pour le Toluène

Tableau N° 12: Evaluation des paramètres de croissance des souches de Pseudomonas aux concentrations optimales de croissance sur les hydrocarbures aromatiques.

b<sub>2</sub>)- Pour la souche de Bacillus circulans:

Pour trois différentes concentrations du toluène on a déterminé les courbes de croissance de la souche de Bacillus circulans voir figure n° 4

Les taux de croissance maximums sont calculés d'après la figure n° 6

Espèce \ Toluène (%)	0.3	0.4	0.5
<u>Bacillus</u> <u>circulans</u>	0.345	0.260	0.200

tableau N° 13: Evaluation des taux de croissance maximum ( $h^{-1}$ ) pour les différentes concentration en toluène (en %) sur milieu minimum pour la souche de Bacillus circulans (30° C, pH= 7,130T/mn, 24 h).

D'après le tableau N°13 on remarque que la plus grande valeur du taux de croissance maximum ( $\mu_{max} = 0.345 h^{-1}$ ) correspond à la concentration de 0,3 % donc la concentration de 0.3 % est la concentration optimale de croissance de la souche de Bacillus circulans sur le Toluène.

paramètre \ l'espèce	Bacillus circulans
Concentration optimale(%)	0.3
$\mu_{max}(h^{-1})$	0,345
Biomasse cellulaire(bact/ml)	$1,89 \cdot 10^7$

Tableau N° 14 : Evaluation des paramètres de croissance de la souche de Bacillus circulans sur milieu minimum à 30 ° C sous agitation continue et à la concentration optimale du Toluène.

D'après les expériences on a remarqué qu'à l'arrêt de la croissance de la souche de Bacillus sur le Toluène la biodégradation n'est pas accomplie pour toutes les concentrations utilisées. le Toluène existe toujours à certaines doses non négligeables pas comme le cas des souches de Pseudomonas.

Donc on peut dire qu'en cas de la souche de Bacillus circulans, la croissance est limitée. Cela s'explique par le phénomène de sporulation des Bacillus à une certaine phase de la croissance, à cause de l'accumulation des produits du métabolisme qui sont toxiques dans le milieu. le substrat de départ ne peut être incriminé puisque la croissance a eu lieu.

Sur la figure N° 7 on peut bien remarquer cette croissance limitée où on observe que plus la concentration du Toluène augmente de la concentration de 0,3 % vers la concentration de 0,5 % et plus le taux de croissance diminue et plus les valeurs de Biomasse finale diminuent de  $1,89 \cdot 10^7$  bactéries /ml jusqu'à  $1,56 \cdot 10^7$  bactéries/ml.



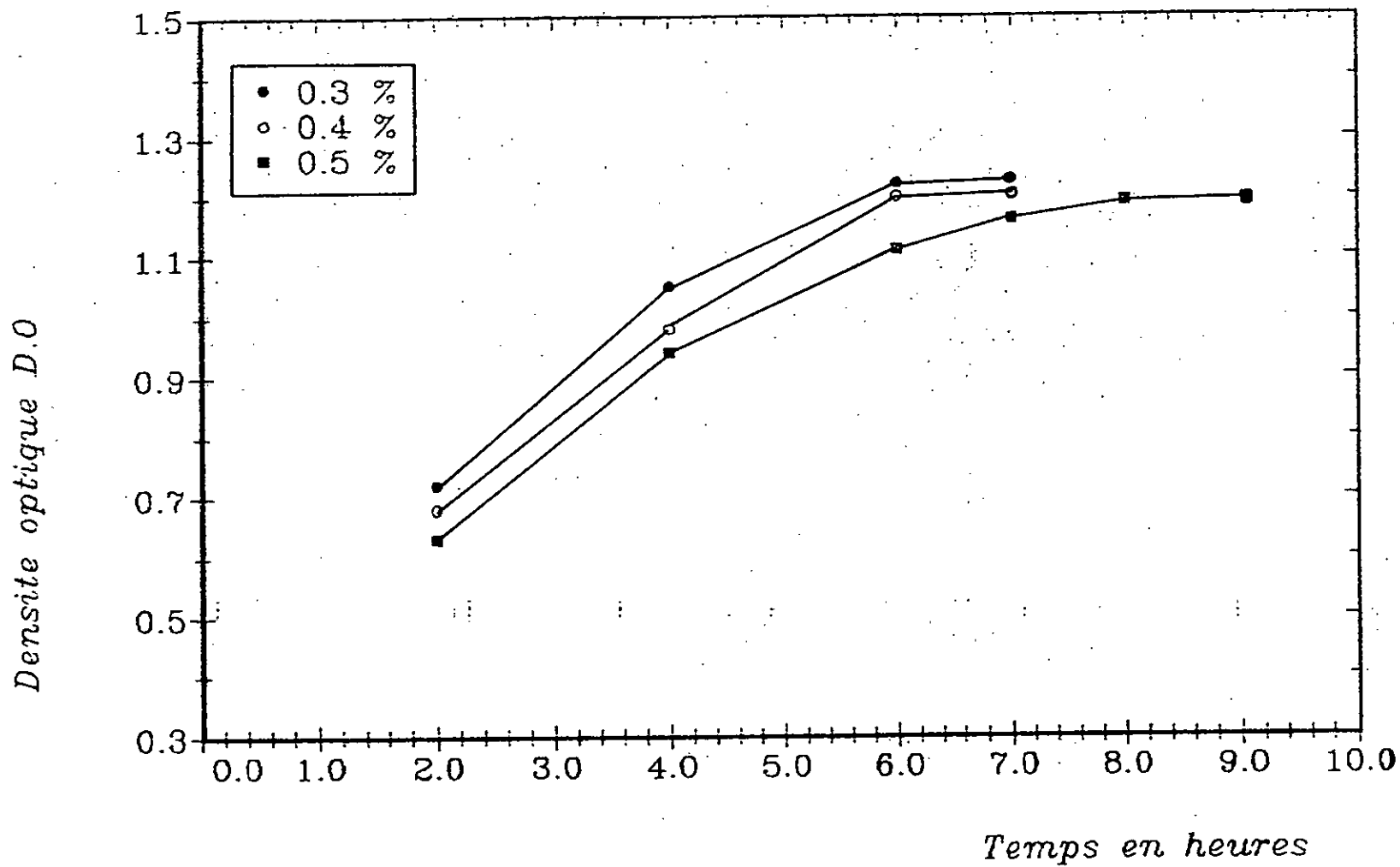


Figure N 06

Determination des taux de croissance maximums en cas de croissance de la souche *Bacillus circulans* sur différentes concentrations en toluène

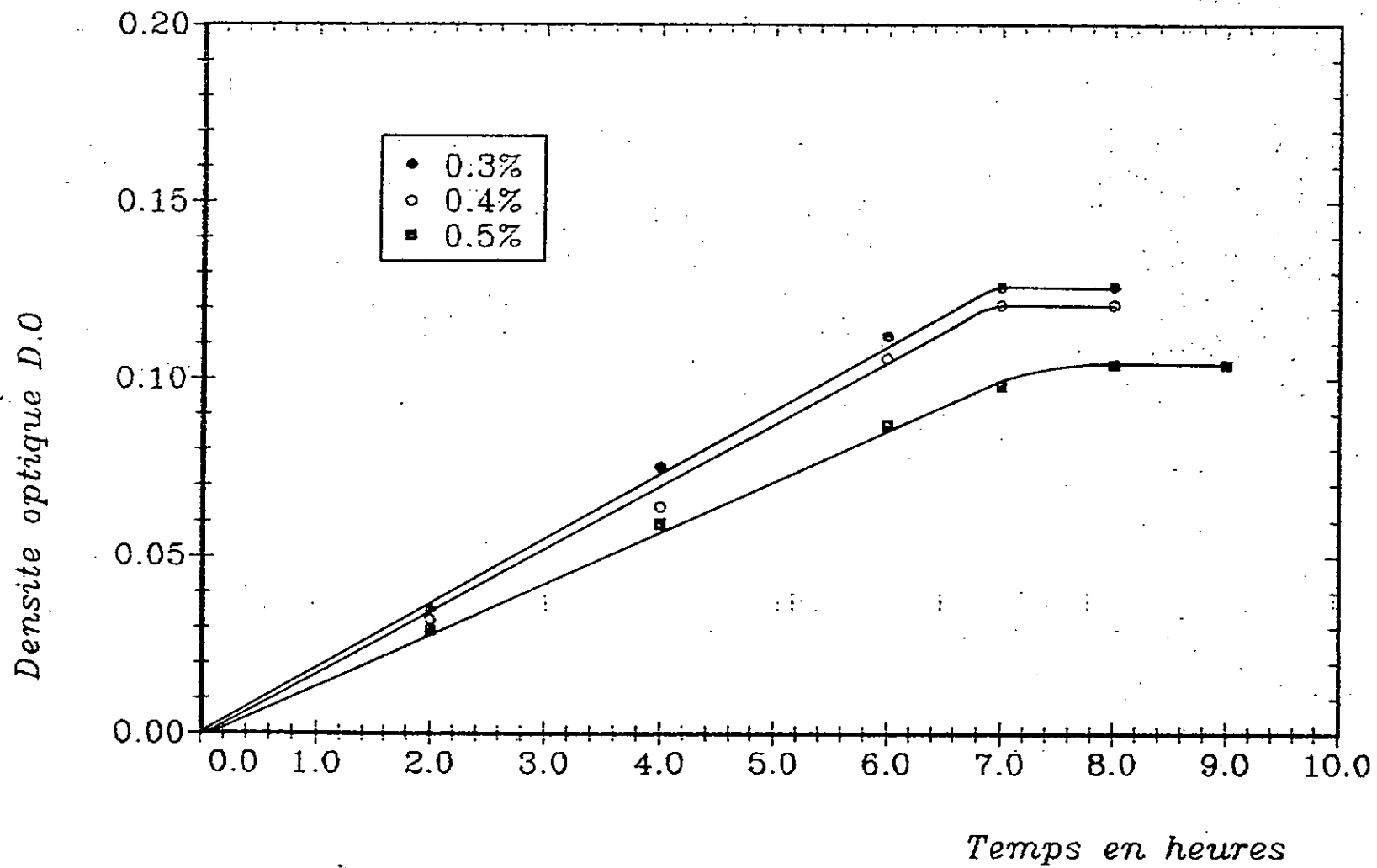


Figure N 07

Courbes de croissance de Bacillus Circulans sur différentes concentrations en toluene.

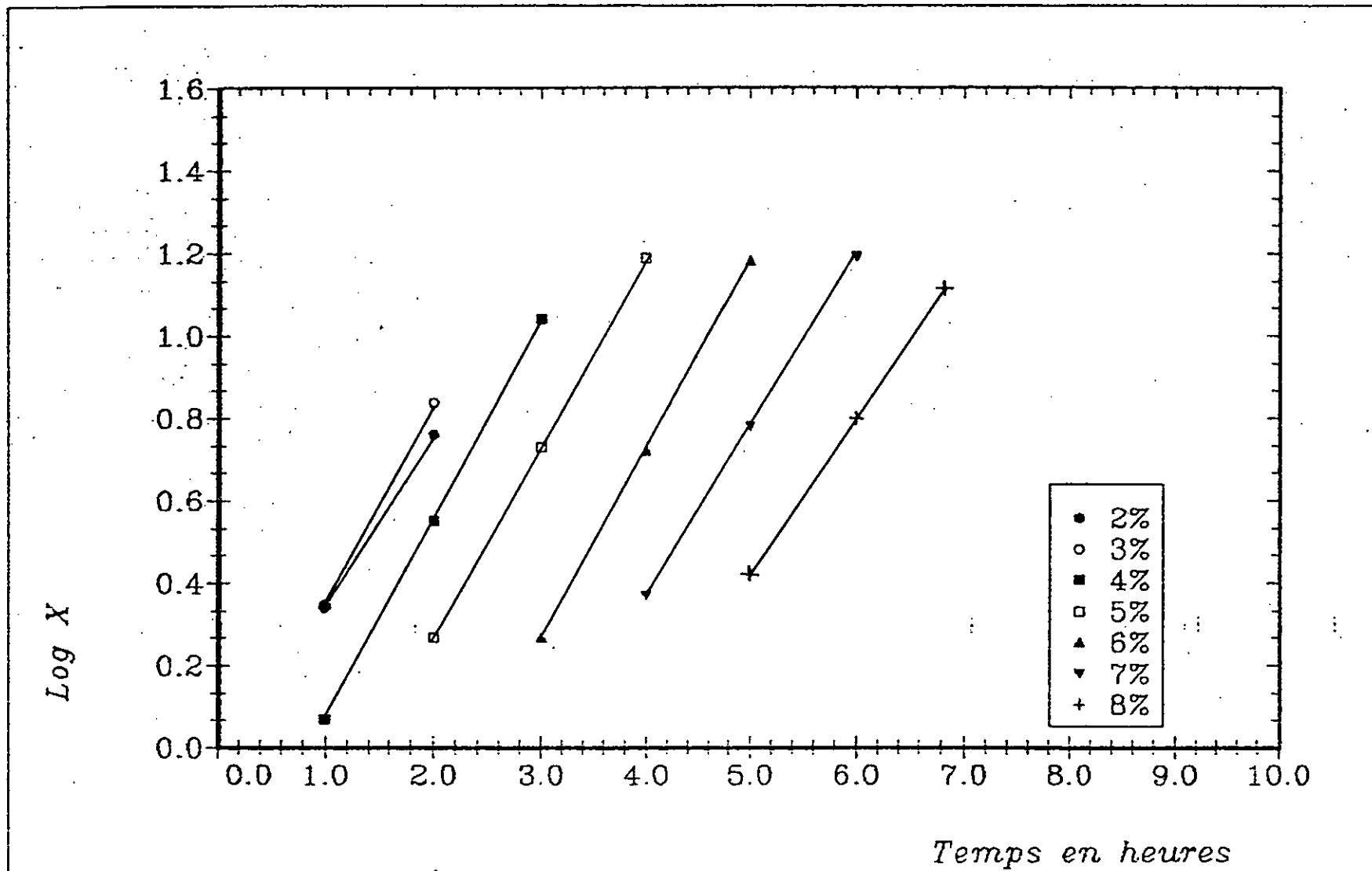


Figure N 8 Détermination des taux de croissance maximaux en cas de croissance de *Pseudomonas facilis* sur le Benzene

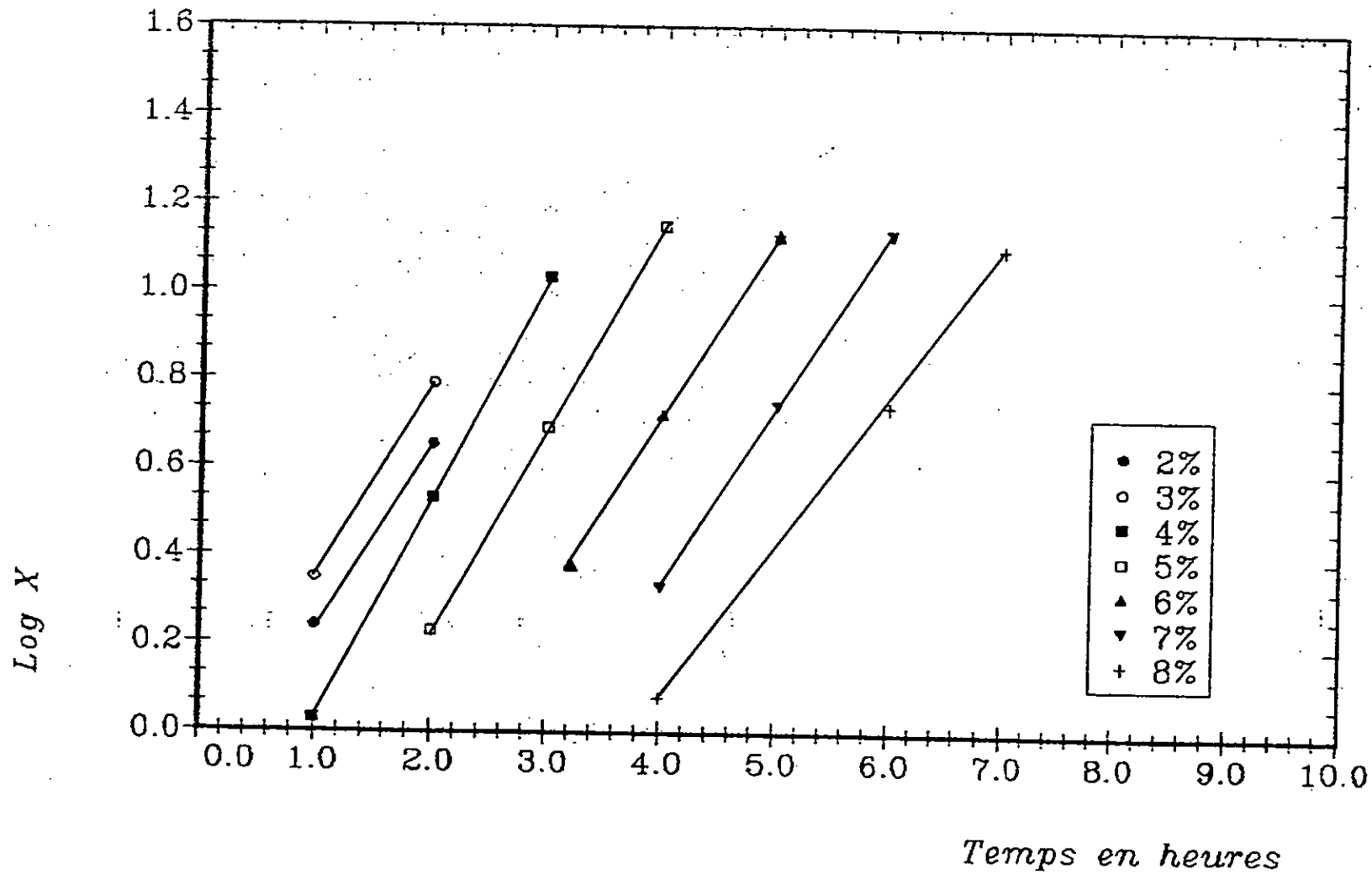


Figure N 9 Determination des taux de croissance maximaux en cas de croissance de Pseudomonas facilis sur le toluene

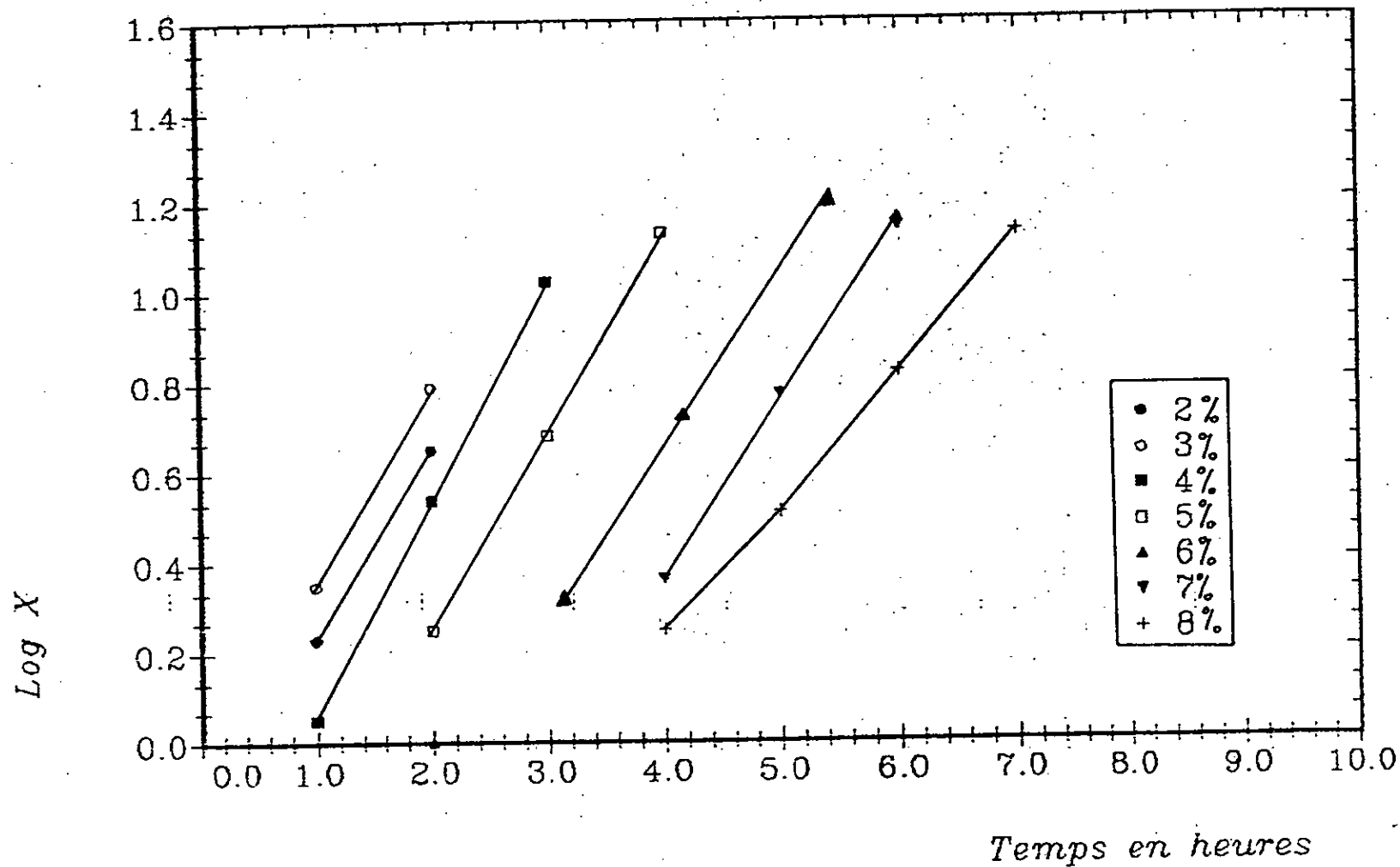


Figure N 10 Determination des taux de croissance maximaux en cas de croissance de Pseudomonas saccharophila sur le benzene

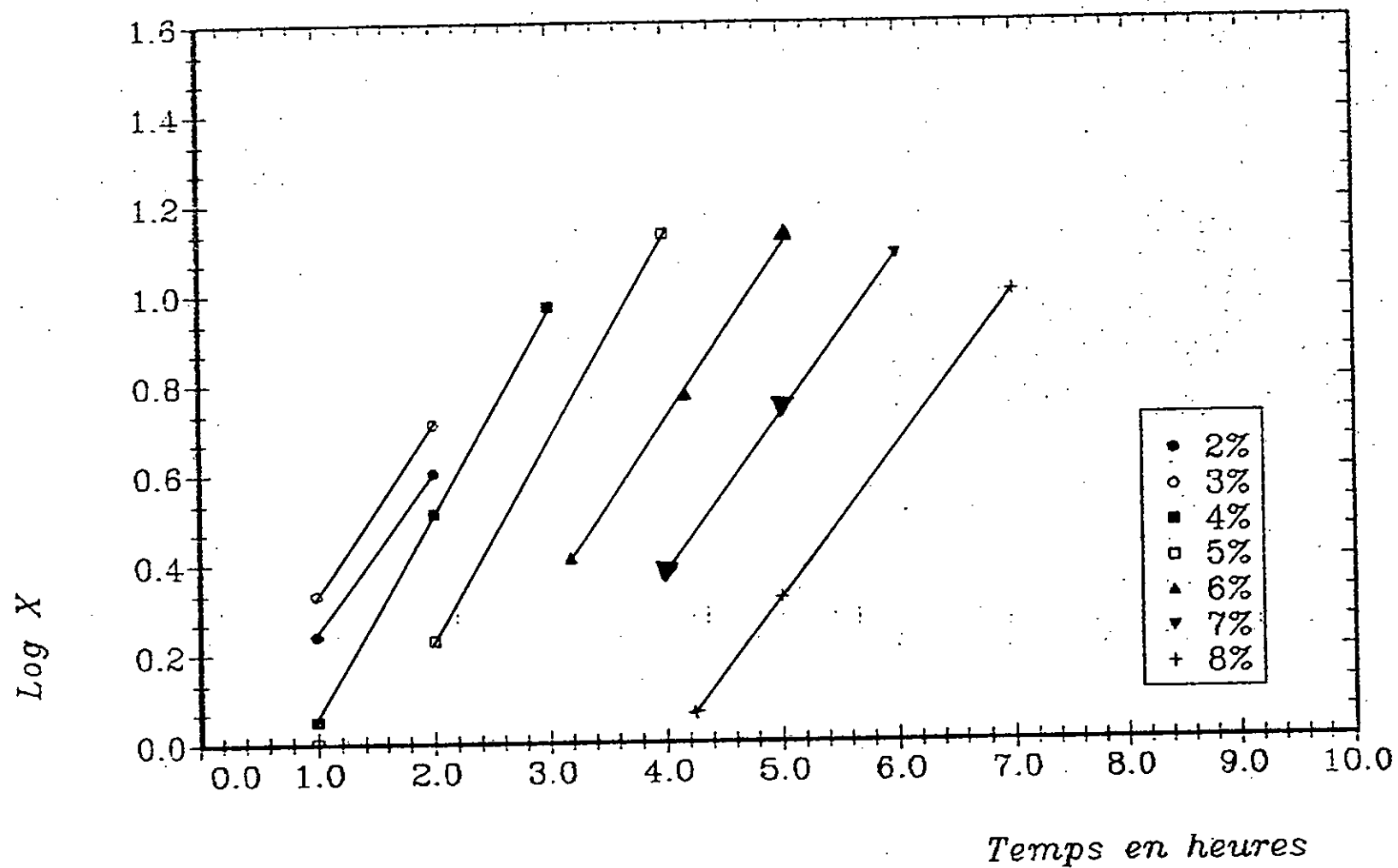


Figure N 11 Determination des taux de croissance maximaux en cas de croissance de Pseudomonas saccharophila sur le toluene

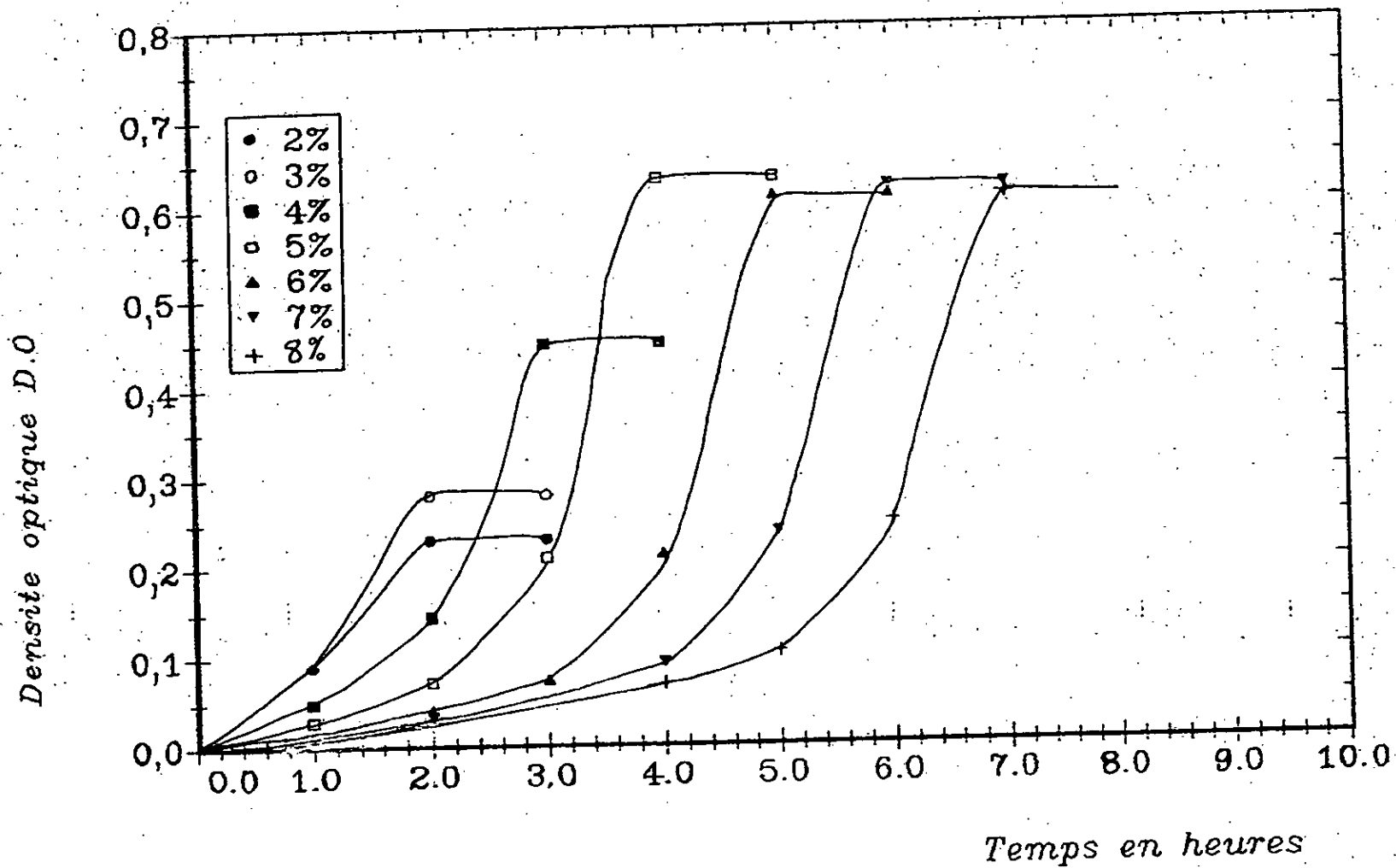


Figure N 12 Courbes de croissance de *Pseudomonas facilis*  
 Sur différentes concentrations en benzene

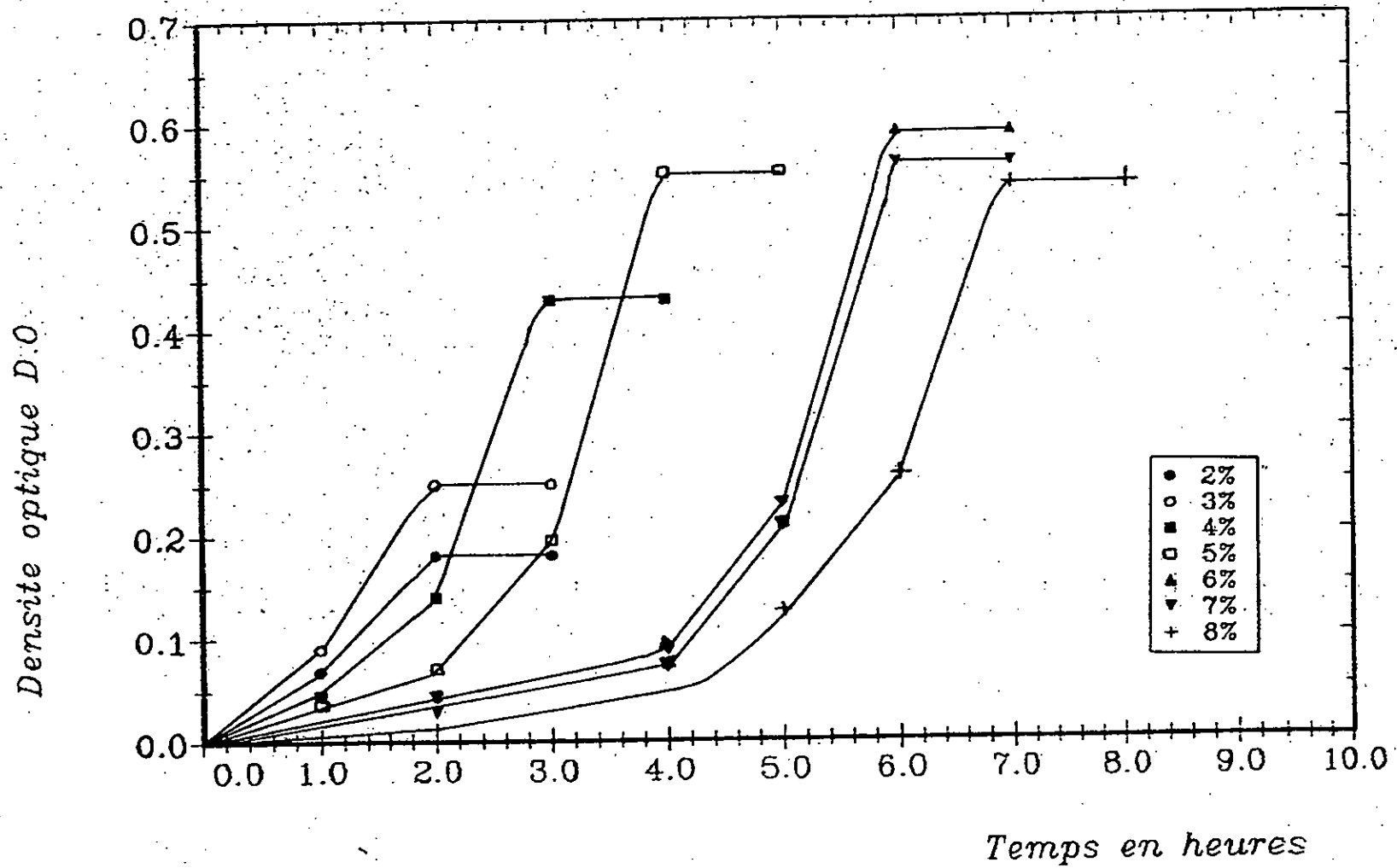


Figure N 13 Courbes de croissance de Pseudomonas saccharophila Sur différentes concentrations en benzene



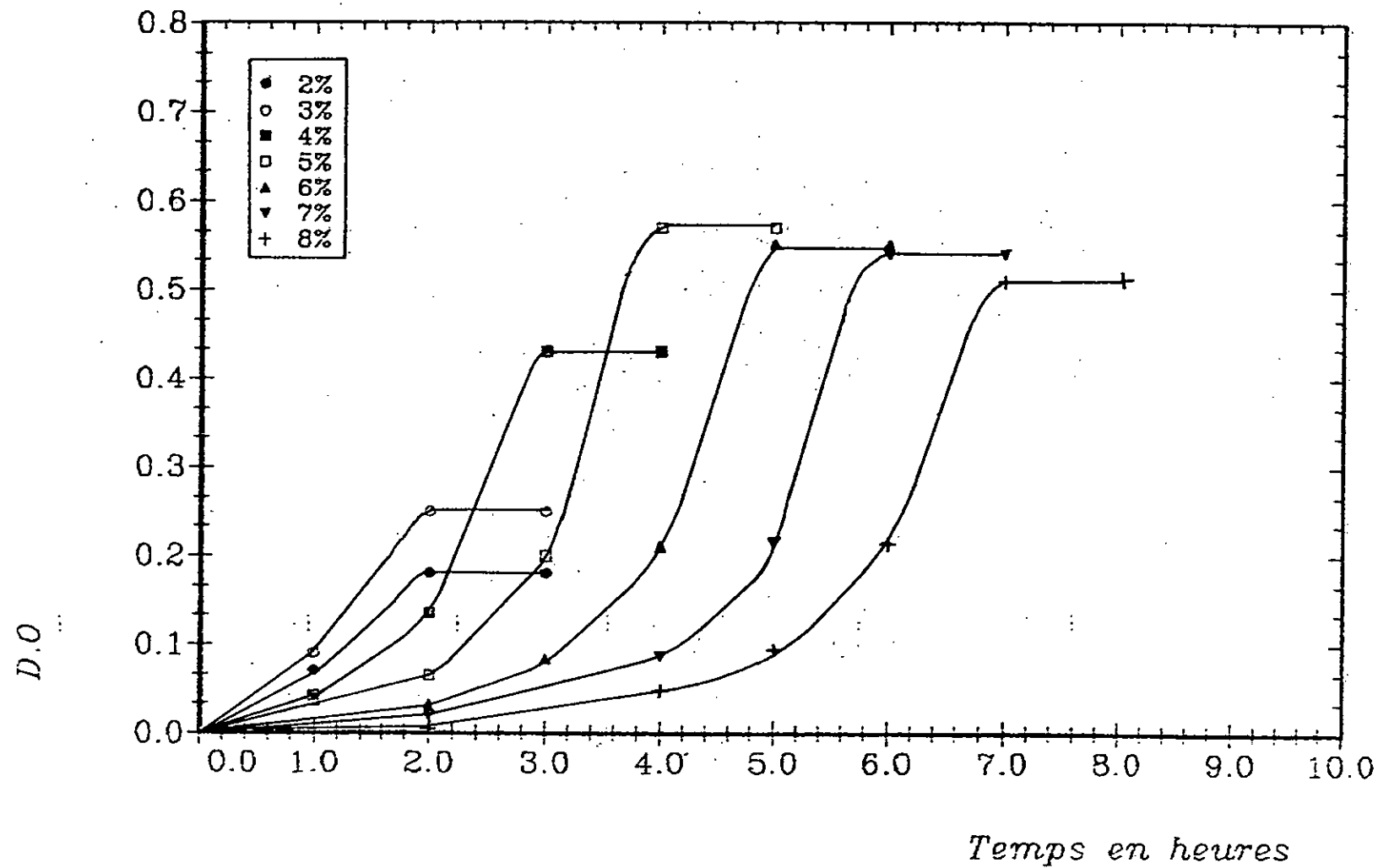


Figure N 14 Courbes de croissance de *Pseudomonas facilis* sur différentes concentrations du toluene

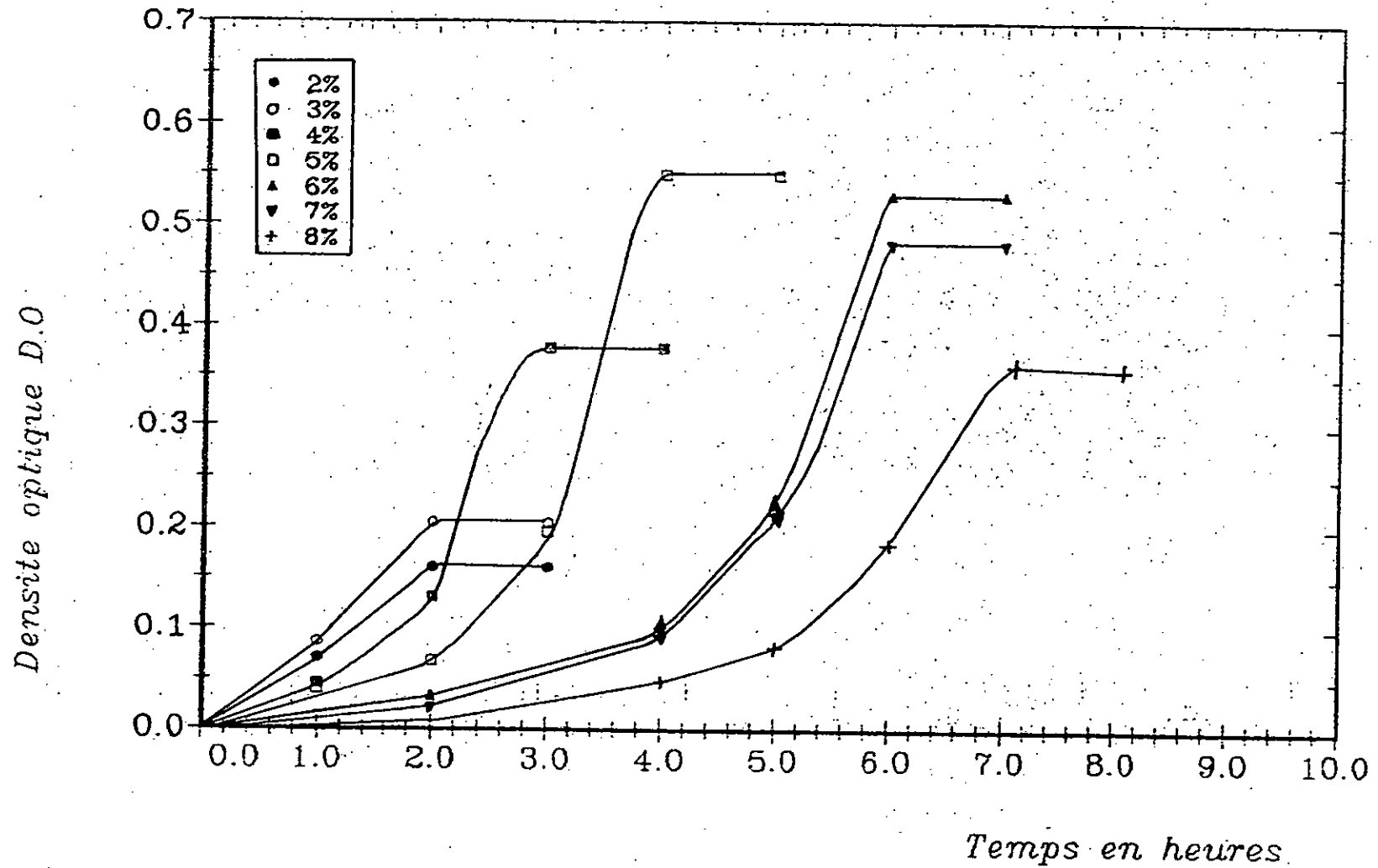


Figure N 15 Courbes de croissance de Pseudomonas saccharophila Sur différentes concentrations en toluene

### 3) ETUDE DE LA BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE ( C P G ):

Nous avons procédé par une méthode simple et rapide pour l'analyse du Benzène et du Toluène par chromatographie en phase gazeuse ; il s'agit de la technique de « Head Space » qui consiste à prélever une fraction de la phase gazeuse qui se trouve en équilibre avec l'échantillon aqueux dans un flacon hermétique à la température constante de 60 °C puis on injecte cette fraction gazeuse dans le chromatographe.

L'analyse quantitative par chromatographie en phase gazeuse nous permet de suivre la variation de la concentrations de l'hydrocarbure dans un échantillon donné par la détermination de l'évolution des pics correspondants au cours du déroulement de biodégradation.

Tableau n°15 Quelques caractéristiques physiques du Benzène et du Toluène

hydrocarbure	solubilité dans l'eau(%)	Points d'ébullition (°C)	densité d(20°C)	indice de réfraction n 20°C	Points d'inflammation (°C)	CMA	
						ppm	mg/m <sup>3</sup>
Benzène	0.070	80	0.879	1.501	-10	H,A	
Toluène	0.047	111	0.867	1.496	+4	200	750

H= risque de résorption cutanée

A= substance indubitablement cancérigène; aucune CMA n'est indiqué pour le Benzène

CMA : concentration maximale admise

#### a) Appareillage d'analyse et conditions opératoires générales:

Nous avons choisi les conditions opératoires générales d'analyse suivantes:

- Appareil de l'espace de tête

-Chromatographe PU 4500

- Colonne :

capillaire BP 5

longueur = 25 m

-DéTECTEUR : F I D

-Intégrateur : P U 4815

-Température : Deteceur = 150°C

Injecteur = 150° C

Colonne = Isotherme

(température initiale = 60° C; température finale = 60° C)

- Pression : •Gazvecteur( argon) = 0.4 Kg/cm<sup>2</sup>CMA : concentration maximale admise

- L'air = 0.3Kg/cm<sup>2</sup>

- L'hydrogène = 0.5 Kg/ cm<sup>2</sup>

Quantité injectée : 50 µl pour Benzène et 100 µl pour toluène

b) MODE OPERATOIRE:

Pour chaque hydrocarbure, je prends de l'erlenmeyer où se déroule la biodégradation un volume de 100 µl que je verse dans un flacon de 30 ml où j'ajoute de l'eau distillée pour compléter à un volume de 10 ml ; puis j'acidifie l'échantillon à l'aide de l'acide Chlorhydrique à pH = 4 pour inhiber la biodégradation, et enfin je ferme le flacon avec un bouchon hermétique spéciale que je conserve à l'abri de la lumière, dans un frigidaire à la température de 4°C.

Ainsi, je répète cette opération à des temps différents durant le déroulement de la biodégradation.

A la fin de l'expérience je mets les flacons hermétiques dans l'appareil de Head Space à la température isotherme de 60°C pendant une demi-heure.

Ainsi après une demi-heure, il s'établit un équilibre entre la phase gazeuse et la phase aqueuse à l'intérieur du flacon ; je prends alors à l'aide d'une seringue un volume de 50 µl de la phase gazeuse pour le Benzène et un volume de 100 µl pour le Toluène.

c) Détermination des courbes d'étalonnage pour le Benzène et le Toluène :

Voir figures n°16 et n°17.

Pour des concentrations différentes allant de 0,1% jusqu'à 1% et pour chaque hydrocarbure, on a déterminé les aires correspondants d'après le chromatographe, puis on a tracé les courbes d'étalonnages :

$C(g/l) = \text{fonction (air)}$

Remarque :

Les concentrations données en pourcentage volumique exemple 0,1% veut dire 0,1ml d'un hydrocarbure par 100ml du milieu minimum de culture sont convertis en concentration massique : c'est à dire la masse d'un certain volume d'hydrocarbure divisé par le volume total (volume d'hydrocarbure + volume du milieu minimum).

Voir annexe : Tableaux N°

d) étude de la croissance bactérienne sur Benzène et le Toluène par chromatographie en phase gazeuse :

Voir chromatogrammes n° 4,5,6,7,8,9 et 10 pour le Benzène et le chromatogramme n°11,12 pour le Toluène.

la croissance des souches de *Pseudomonas* sur les hydrocarbures dont la disparition en fonction du temps a été suivie par chromatographie en phase gazeuse à la concentration de 2% pour le Benzène et le Toluène, aux concentrations de 3%, 4%, 6%, 8% pour le Benzène

Ainsi d'après les courbes d'étalonnage, on a déterminé les concentrations massiques correspondant à chaque aire d'un pic, on a rassemblé ces concentrations dans les tableaux

Voir Tableau n° 16 et n°17

Par la suite on a tracé les graphes correspondant :

Voir figure N°18, N°19 et N°20

t (h)	0	1	1H30	1H45	2
C (g/l)	17,25	7,70	2,91	0,87	0,00
C (%)	2	0,893	0,337	0,100	0,00

tab N°16 *Pseudomonas saccharophila* en culture avec 2% du Benzène

t (h)	0	1	1H30	1H45	2
C (g/l)	17,25	6,52	1,81	0,40	0,00
C (%)	2	0,756	0,209	0,046	0,00

tab N°16 *Pseudomonas facilis* en culture avec 2% de Benzène.

t (h)	0	1	2	2H30	2H45	3
C (g/l)	25,63	18,19	7,80	3,00	1,51	0,00
C (%)	3	2,11	0,904	0,348	0,175	0,00

tab N°16 *Pseudomonas facilis* en culture avec 3% du Benzène

t (h)	0	1	2	2H30	2H45	3
C (g/l)	25,63	20,00	11,17	5,19	2,10	0,00
C (%)	3	2,32	1,29	0,602	0,243	0,00

tab N°16 *Pseudomonas saccharophila* en culture avec 3% du Benzène

(h)	0	1	1H30	2
C (g/l)	17,00	9,00	4,00	1,00
C(%)	2	1,050	0,470	0,117

tab N°16e Pseudomonas saccharophila en culture avec 2% du Toluène

t (h)	0	1	1H30	2
C (g/l)	17,00	7,30	2,60	0,485
C(%)	2	0,973	0,305	0,057

tab N°16f Pseudomonas facilis en culture avec 2% du Toluène

**TABLEAUX N° 16** : Les concentrations des hydrocarbures (C %) dans le raffina données par le chromatogramme à différents temps des expériences

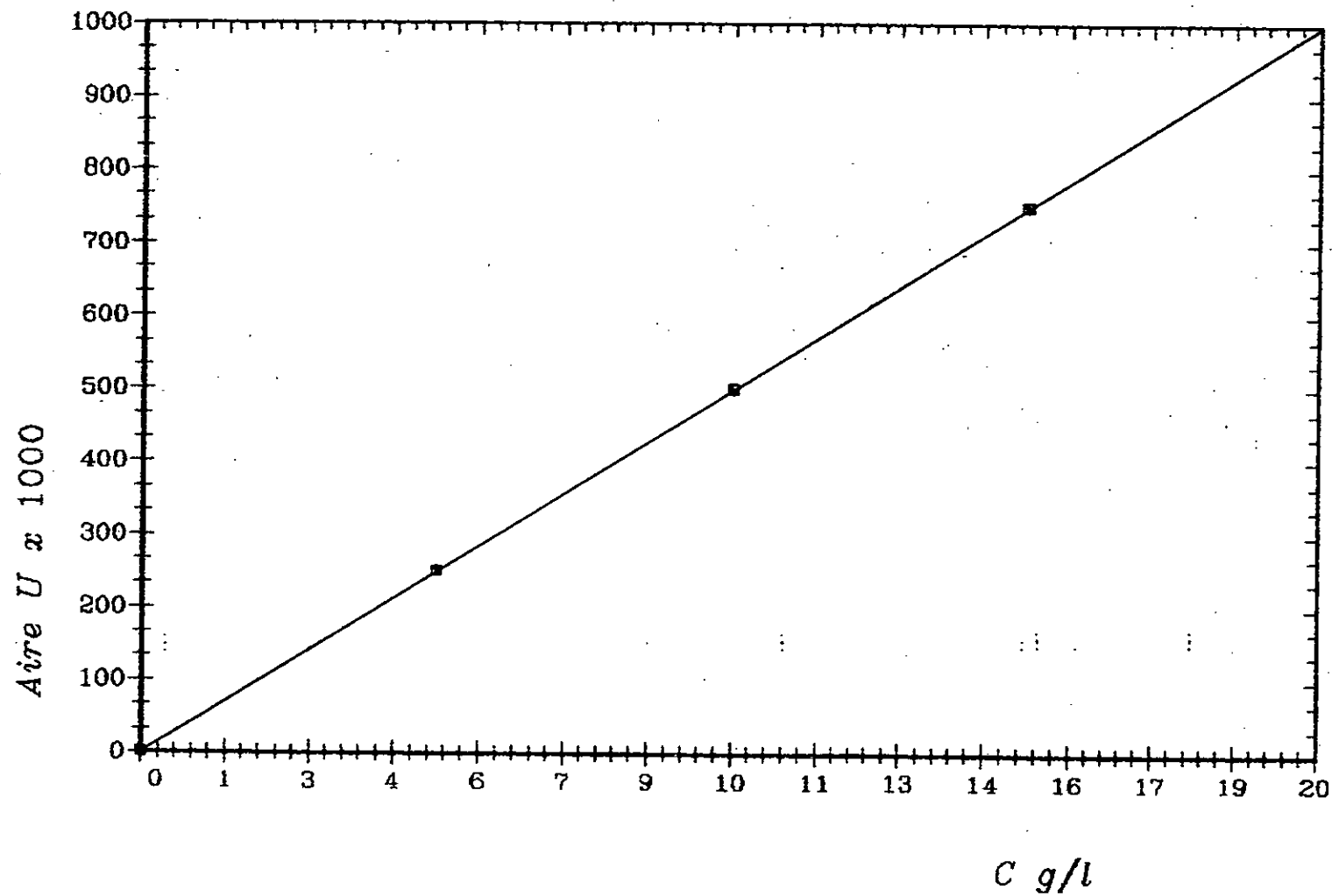


Figure N 16 : Courbe d'etalonnage du Benzene

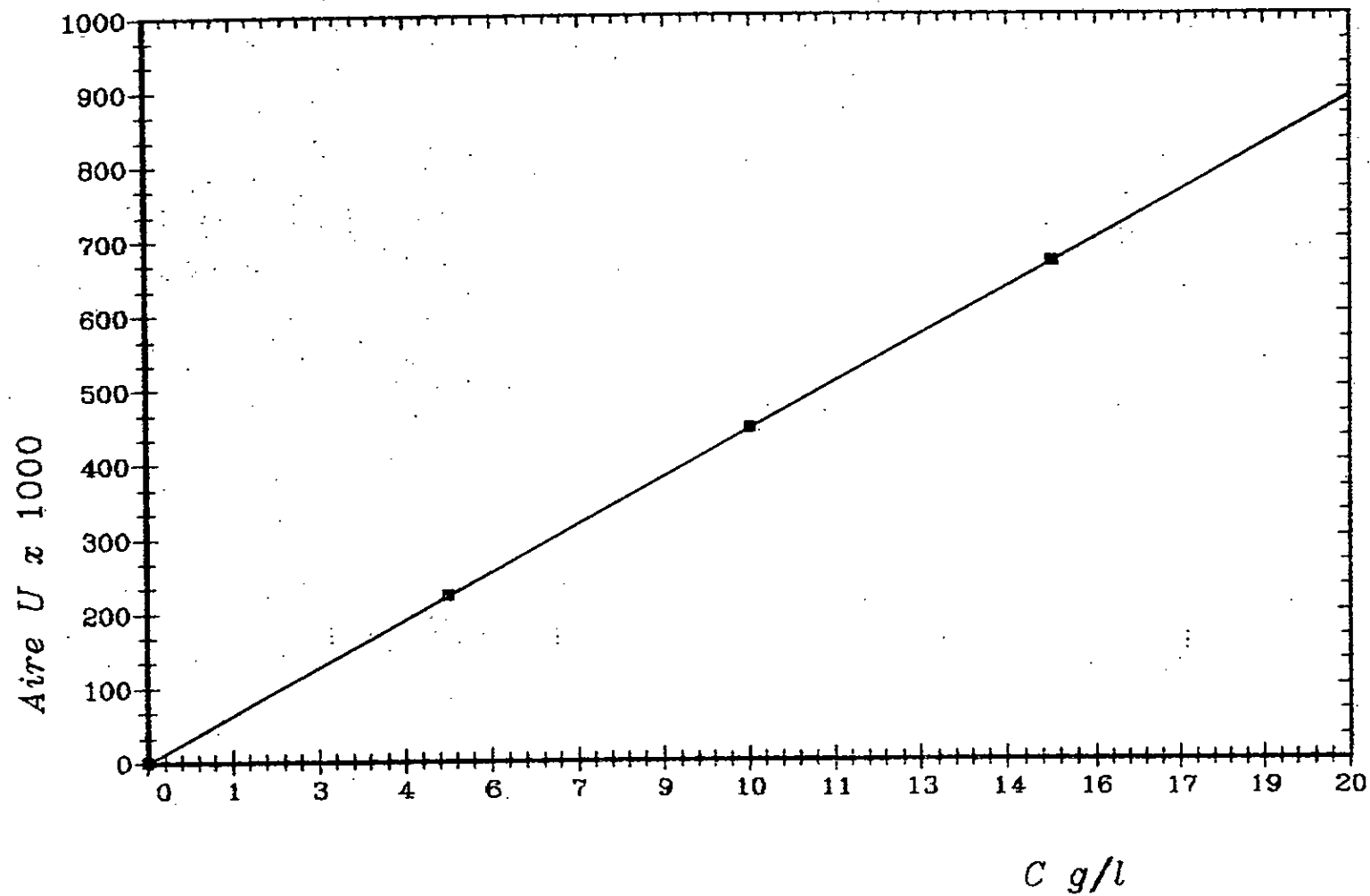


Figure N 17 : Courbe d'etalonnage du toluene



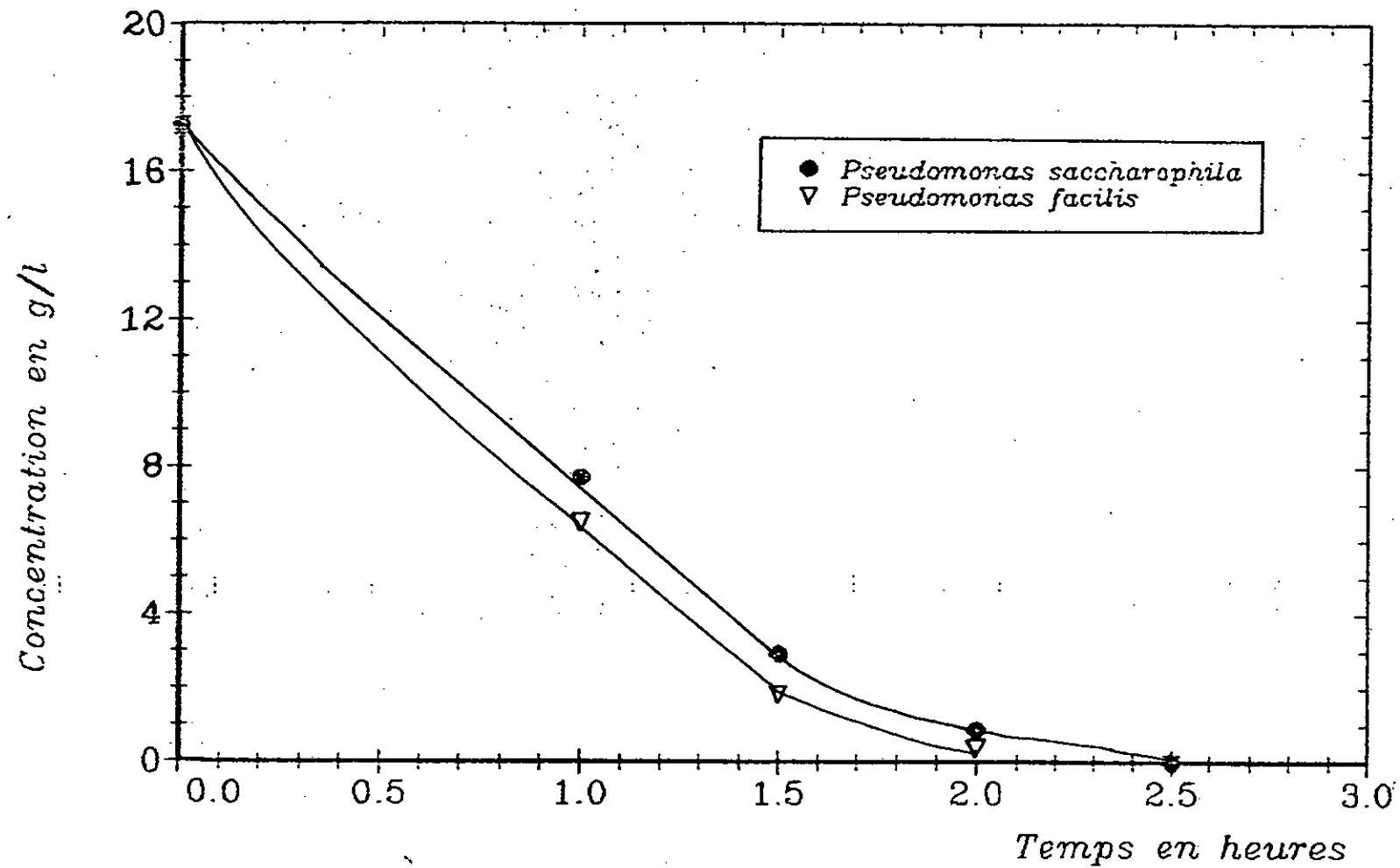


Figure N 18 Biodegradation du benzene par les souches de pseudomonas à la concentration de 2 %

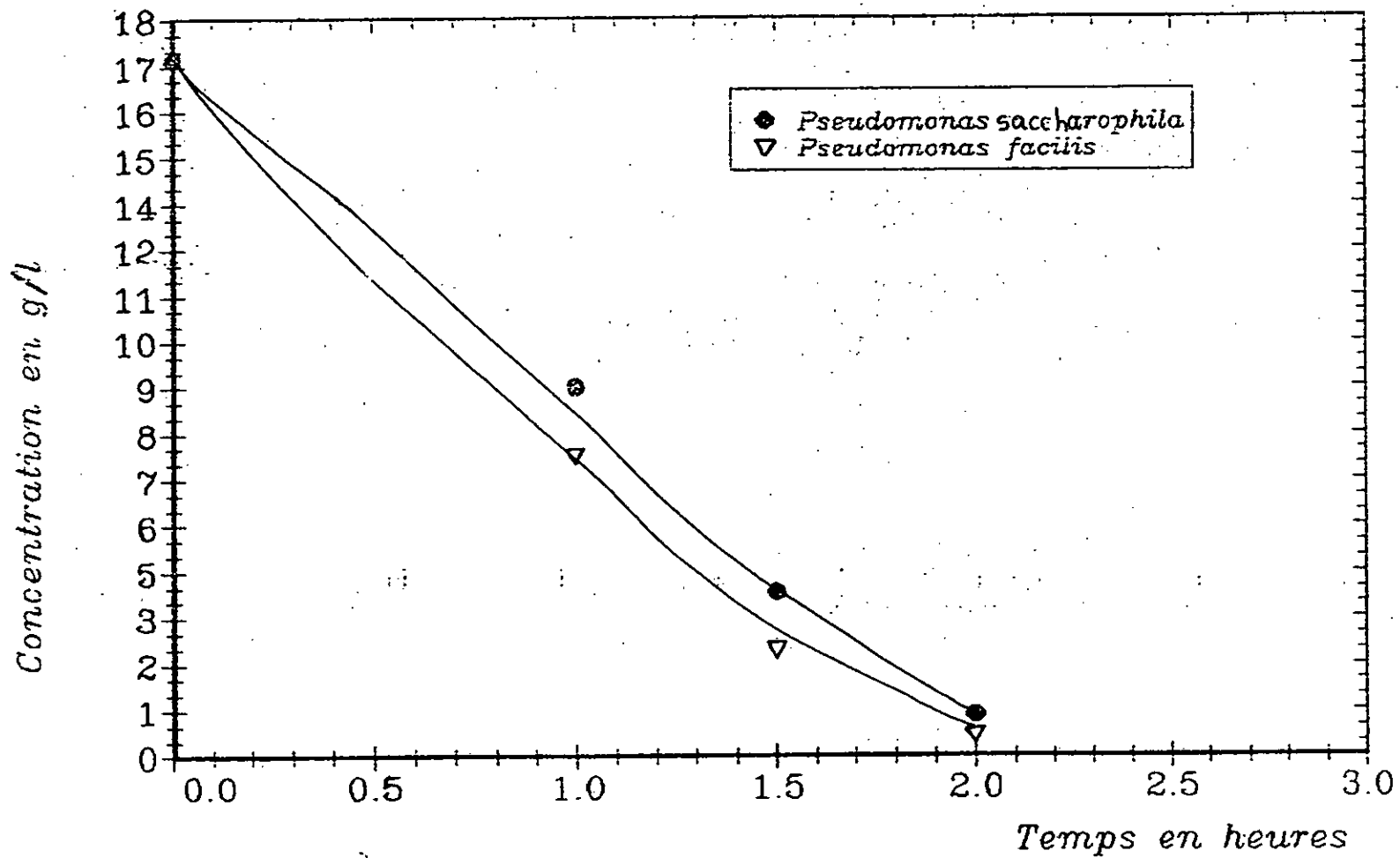


Figure N 19 Biodegradation du toluene à la concentration de 2%

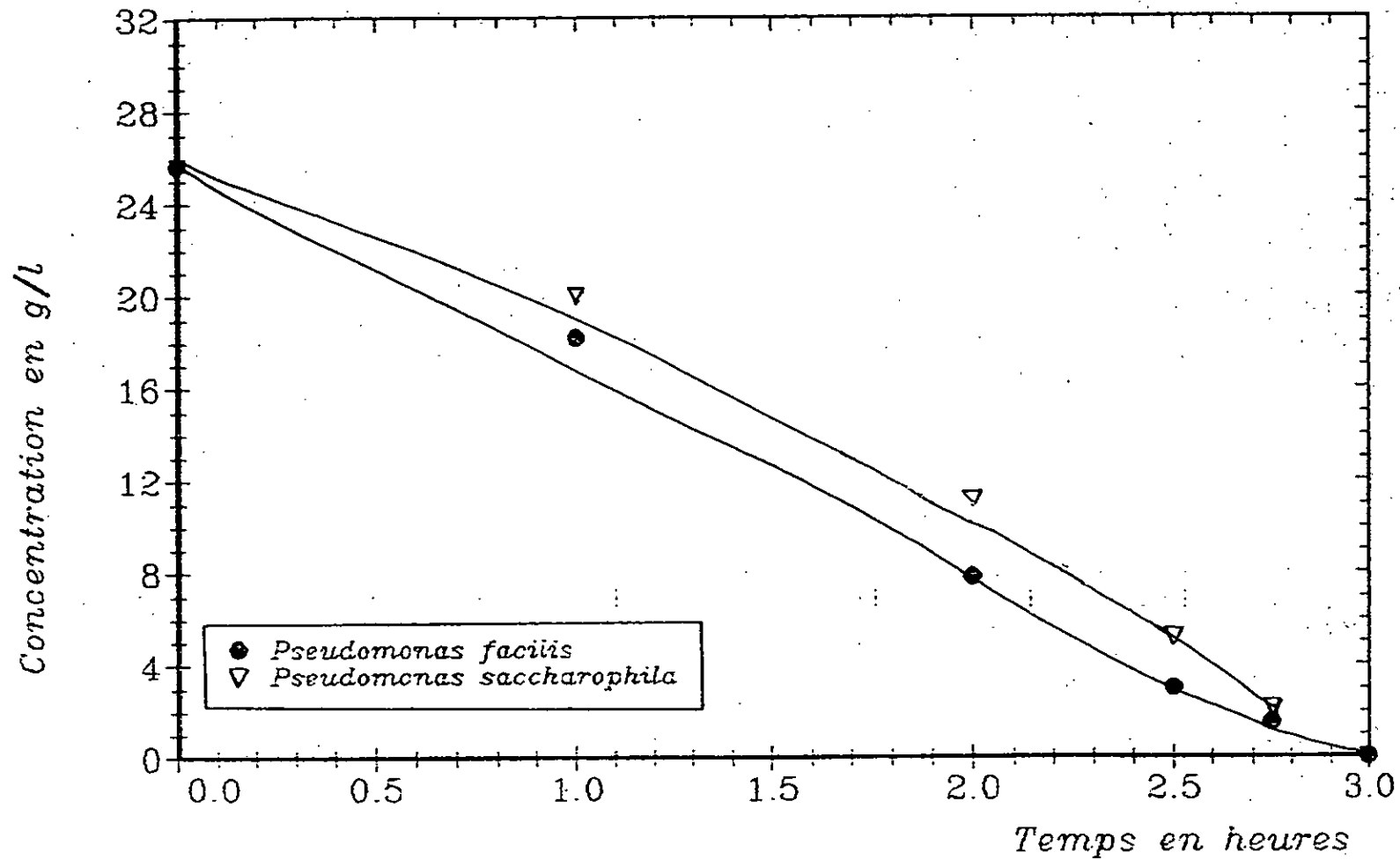


Figure N 20 Biodegradation du benzene à la concentration de 3 %

Hydrocarbures	concentration initiale		concentration finale		Pourcentage massique de L' Hydrocarbure dégradé
	g/l	% volumique	g/l	%volumique	
Toluène par <u>Pseudomonas</u> <u>saccharophila</u>	17	2	1	0.117	94.12
toluène par <u>Pseudomonas</u> <u>facilis</u>	17	2	0.485	0.057	97.15
Benzène par <u>Pseudomonas</u> <u>facilis</u>	34.48	4	0.370	0.042	98.93
Benzène par <u>Pseudomonas</u> <u>facilis</u>	51.72	6	0.663	0.077	98.71
Benzène par <u>Pseudomonas</u> <u>facilis</u>	68.96	8	2	0.32	97.10

Tableau N° 17: Les pourcentage de dégradation de certaines concentration des s hydrocarbures par les souches de Pseudomonas

e)- Interprétation des résultats de l'analyse par Chromatographie en phase gazeuse.

On observant les graphes et les tableaux correspondant aux chromatogrammes pour l'étude de la croissance bactérienne par CPG à la concentration de 2 % pour le benzène, le toluène et à la concentration de 3 % pour le benzène; et en les comparant avec les chromatogrammes des concentrations des Témoins, nous constatons que le pic correspondant à l'hydrocarbure diminue rapidement pour disparaître pratiquement au bout de deux heures pour la concentration de 2 % et au bout de trois heures pour la concentration de 3 % (4 %, 6 % et 8 %) du benzène, on observe une diminution notable entre les deux dernières heures qui correspondent à la phase exponentielle où la croissance bactérienne est maximale; donc la biodégradation d'un hydrocarbure se produit en fonction du développement de la croissance bactérienne.

On observe aussi d'après les courbes (voir figures n°18, 19 et 20) que la souche de Pseudomonas facilis est plus performante que la souche Pseudomonas saccharophila car pour chaque prélèvement à un temps donné pour chacun des hydrocarbures, la concentration résiduelle de l'hydrocarbure en cas de la souche de Pseudomonas facilis est plus faible qu'en cas de la souche Pseudomonas saccharophila ( voir tableau n° ).

L'analyse des chromatogrammes serait donc intéressante car elle nous permettrait de savoir si les modalités de biodégradation selon les souches et les substrats considérés sont les mêmes ou pas et leur degré de toxicité en fonction de l'évolution bactérienne .

4) Comparaison des résultats entre les souches :

a) Comparaison des résultats pour les deux souches de Pseudomonas:

Genre paramètre de croissance	Pseudomonas facilis	Pseudomonas saccharophila
vitesse d'agitation (l/mn)	200	200
temps d'obtention de la biomasse maximale(h)	4	5
taux de biomasse maximale (bactéries /ml)atteint	$5,75 \cdot 10^7 - 15,8 \cdot 10^7$	$4,5 \cdot 10^7 - 14,75 \cdot 10^7$
seuils de toxicité maximale (en % de Benzène)	13	12
concentration optimales (en% de Benzène)	4	4

Tableau N°18 a: Tableau récapitulatif des principales différences de croissance entre les deux souches de Pseudomonas.

Genre paramètre de croissance	Pseudomonas facilis	Pseudomonas saccharophila
vitesse d'agitation (l/mn)	200	200
temps d'obtention de la biomasse maximale(h)	4	4
taux de biomasse maximale (bactéries /ml)atteint	$4,5 \cdot 10^7 - 14,25 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^7 - 13,75 \cdot 10^7$
seuils de toxicité maximale (en % de Benzène)	12	12
concentration optimales (en% de Benzène)	4-5	4

tableau N°18 b : tableau récapitulatif des principales différences de croissance entre les deux souches de Pseudomonas sur le Toluène.

D'après les tableaux N°12 et N°13 les concentrations les plus optimales pour les souches de *Pseudomonas* sur les hydrocarbures aromatiques varient généralement entre 4% et 5%.

D'après les figures N°12 à N°15 on observe qu'au delà et au deçà de ces concentrations optimales notées, la croissance est possible mais la biomasse cellulaire produite est moins importante.

Comme on peut le voir aussi sur ces courbes de croissance obtenues par des concentrations croissantes de l'hydrocarbure aromatique que malgré la tolérance de concentrations élevées par ces deux souches de *Pseudomonas*, plus celle-ci s'élève, plus la phase de latence augmente et plus la courbe de croissance s'infléchit révélant une diminution du taux de croissance maximum et de la biomasse.

Donc malgré une durée plus longue de croissance en présence de concentrations plus élevées, les niveaux de biomasses finales obtenues diminuent progressivement.

Cette croissance relativement limitée est due au phénomène d'inhibition par le substrat qui se trouve à de fortes concentrations et peut être aussi due à l'accumulation de composés toxiques produits du métabolisme qui seront inhibiteurs d'enzymes intervenant dans des étapes ultérieures de la chaîne du catabolisme des substrats; dans notre cas il y a accumulation des acides, cela est constaté par une légère diminution du pH jusqu'à pH = 6.2 surtout à l'arrêt de la croissance.

Malgré cela la dégradation pour toutes les concentrations est presque complète, puisque la quantité de l'hydrocarbure qui disparaît est en général de l'ordre de 90% ce qui est bien affirmé par analyse chromatographique.

b) Comparaison des résultats entre le genre Pseudomonas et le genre Bacillus:

Genre paramètre de croissance	Pseudomonas	Bacillus
vitesse d'agitation (t/mn)	200	130
temps d'obtention de la biomasse maximale(h)	4-5	7-8
taux de biomasse maxima atteint(bacteries /ml)	$4.7 \cdot 10^7 - 15.8 \cdot 10^7$	$1.56 \cdot 10^7 - 1.89 \cdot 10^7$
seuils de toxicité maximal (en % del'hydrocarbure)	12-13	5
concentrations optimales (en% de l'hydrocarbure)	4-5	0,3

tableau N° 19 : tableau récapitulatif des principales différences de croissance entre les deux genres de bactéries.

D'après le tableau précédent on peut bien dire que les souches de Pseudomonas sont plus performantes sur les hydrocarbures aromatiques que la souche de Bacillus .

Les concentrations optimales présentées par les souches de Pseudomonas sont assez élevées , elles sont de l'ordre de 4% et 5% , en les comparant à celle de la souche de Bacillus circulans qui est de 0.3%.

Les seuils de toxicité atteints par les souches de Pseudomonas sont beaucoup plus importants (12% et 13% ) que celui atteint par la souche de Bacillus circulans.

le taux de biomasse finale produit par les souches de Pseudomonas varie de  $4,7 \cdot 10^7$  bactéries /ml à  $15,8 \cdot 10^7$  bacterie /ml , très important par rapport à celui atteint par la souche de Bacillus circlans qui varie  $1,56 \cdot 10^7$  bacterie /ml et  $1,89 \cdot 10^7$  bacteries /ml .

Donc on peut dire que le taux de biomasse maximal atteint par le genre Pseudomonas ( $15,8 \cdot 10^7$  bacterie /ml )est d'environ 8 fois plus élevé que celui atteint par la souche de Bacillus circulans ( $1,89 \cdot 10^7$  bacterie /ml).

Pour le genre Bacillus circulans on peut dire que sa croissance sur les hydrocarbures aromatiques est très limitée par rapport à celle du genre Pseudomonas cela est du au phénomène de sporulation des Bacillus en cas de conditions défavorables.



## V) CONCLUSION:

Nous avons suivi la croissance sur des substrats aromatiques tels que le toluène et le Benzène de trois (3) espèces : Pseudomonas facilis, Pseudomonas saccharophila et Bacillus circulans et nous avons comparé leur pouvoir de dégradation.

Il ressort de cette étude que:

- les souches appartenant au genre Pseudomonas sont plus performantes avec des taux de croissance allant de  $1.03 \text{ h}^{-1}$  à  $1.66 \text{ h}^{-1}$  comparés à ceux de la souche de Bacillus circulans qui varient entre  $0.200 \text{ h}^{-1}$  et  $0.345 \text{ h}^{-1}$ .
- au sein même de ce genre de Pseudomonas les deux espèces se comportent différemment car Pseudomonas facilis semble plus performante que Pseudomonas saccharophila, en effet les taux de croissance pour Pseudomonas facilis varient entre  $1.20 \text{ h}^{-1}$  et  $1.66 \text{ h}^{-1}$  alors que ceux des Pseudomonas saccharophila varient entre  $1.03 \text{ h}^{-1}$  et  $1.50 \text{ h}^{-1}$ .

Aussi ces souches de Pseudomonas sont plus performantes sur le Benzène que sur le toluène car pour chaque concentration étudiée dans le cas des deux aromatiques, le taux de croissance maximum obtenu sur le Benzène est supérieur à celui obtenu sur la même concentration du Toluène.

En général, pour une souche pure la croissance peut être limitée à cause de l'accumulation de produits du métabolisme qui sont des inhibiteurs d'enzymes intervenant dans la biodégradation. En plus dans la nature, les hydrocarbures se trouvent sous forme d'un mélange par exemple le pétrole brut, d'où la nécessité d'utiliser des cultures mixtes.

Enfin, on peut conclure qu'en terme de dépollution de l'environnement, la biodégradation est devenue un outil nécessaire surtout en milieu marin en cas de marées noires, d'où l'obligation de la compléter par des études d'optimisation en présence de culture mixte : elle peut aussi avoir un intérêt pour la biodégradation des produits toxiques.

ANNEXES

Etude de la croissance de *Pseudomonas facilis* sur le Benzène.

t (h)	1	2
DO	0.100	0.280
X (bact./ml)	$2,5 \cdot 10^7$	$7 \cdot 10^7$
log X	7,39	7,84

tab 20 a: Benzène à 3 %

t (h)	1	2
DO	0.089	0.230
X (bact./ml)	$2,225 \cdot 10^7$	$5,750 \cdot 10^8$
log X	7,34	7,76

tab 20 b: Benzène à 2 %

t(h)	1	2	3
DO	0,048	0,144	0,448
x(bact/ml)	$1,2 \cdot 10^7$	$3,6 \cdot 10^7$	$11,2 \cdot 10^7$
log X	7,07	7,55	8,04

tab 20 c: Benzène à 4%

t(h)	1	2	3	4
DO	0,028	0,072	0,210	0,632
X (bact/ml)	$0,7 \cdot 10^7$	$1,824 \cdot 10^7$	$5,264 \cdot 10^7$	$15,8 \cdot 10^7$
log X	6,84	7,27	7,73	8,19

tab 20 d: Benzène à 5%

t (h)	2	3	4	5
DO	0,040	0,073	0,212	0,610
x (bact/ml)	1.107	1,827.10 <sup>7</sup>	5,3.10 <sup>7</sup>	15,25.10 <sup>7</sup>
log X	7	7,27	7,72	8,18

tab 20e: Benzène à 6%

t (h)	2	4	5	6
DO	0,032	0,091	0,236	0,620
x (bact/ml)	0,8.10 <sup>7</sup>	2,299.10 <sup>7</sup>	5,905.10 <sup>7</sup>	15,5.10 <sup>7</sup>
log X	6,90	7,37	7,78	8,19

tab 20f: Benzène à 7%

t (h)	2	4	5	6	7
DO	0,024	0,068	0,103	0,247	0,610
x (bact/ml)	0,6.10 <sup>7</sup>	1,7.10 <sup>7</sup>	2,58.10 <sup>7</sup>	6,183.10 <sup>7</sup>	15,25.10 <sup>7</sup>
log X	6,77	7,23	7,42	7,80	8,18

tab 20g: Benzène à 8%

ETUDE DE LA CROISSANCE DE PSEUDOMONAS SACCHAROPHILA SUR LE BENZENE:

t (h)	1	2
DO	0,068	0,180
X (bact/ml)	$1,7 \cdot 10^7$	$4,5 \cdot 10^7$
log X	7,23	7,65

tab 21a: Benzène à 2%

t (h)	1	2
DO	0,090	0,250
X (bact/ml)	$2,25 \cdot 10^7$	$6,25 \cdot 10^7$
log X	7,35	7,79

tab 21b: Benzène à 3%

t(h)	1	2	3
DO	0,044	0,140	0,428
X (bact/ml)	$1,10 \cdot 10^7$	$3,5 \cdot 10^7$	$10,7 \cdot 10^7$
log X	7,05	7,54	8,02

tab 21c: Benzène à 4%

t(h)	1	2	3	4
DO	0,036	0,071	0,195	0,552
x(bact/ml)	$0,9 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^7$	$4,875 \cdot 10^7$	$13,8 \cdot 10^7$
log X	6,95	7,25	7,68	8,13

tab 21d: Benzène à 5%

t(h)	1	2	4	5	6
DO	0,044	0,074	0,210	0,590	
X (bact/ml)	$1 \cdot 10^7$	$1,869 \cdot 10^7$	$5,25 \cdot 10^7$	$14,75 \cdot 10^7$	
log X	7	7,28	7,72	8,16	

tab 21e: Benzène à 6%

t(h)	2	4	5	6
DO	0,028	0,089	0,230	0,560
x(bact/ml)	$0,7 \cdot 10^7$	$2,247 \cdot 10^7$	$5,771 \cdot 10^7$	$14 \cdot 10^7$
log X	6,85	7,36	7,77	7,14

tab 21f: Benzène à 7%

t(h)	1	2	4	5	6	7
DO	0,012	0,072	0,126	0,258	0,540	
X (bact/ml)	$0,3 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^7$	$3,173 \cdot 10^7$	$6,474 \cdot 10^7$	$13,5 \cdot 10^7$	
log X	6,47	7,25	7,51	7,82	8,13	

tab 21g: Benzène à 8%

## ETUDE DE LA CROISSANCE DE PSEUDOMONAS FACILIS SUR LE TOLUENE

t (h)	1	2
DO	0,070	0,180
X (bact/ml)	$1,75 \cdot 10^7$	$4,5 \cdot 10^7$
log X	7,24	7,65

tab 22a: toluène à 2%

t (h)	1	2
DO	0,090	0,250
X (bact/ml)	$2,25 \cdot 10^7$	$6,25 \cdot 10^7$
log X	7,35	7,79

tab 22b: toluène à 3%

t (h)	1	2	3
DO	0,042	0,136	0,130
X (bact/ml)	$1,052 \cdot 10^7$	$3,4 \cdot 10^7$	$10,75 \cdot 10^7$
log X	7,03	7,53	8,03

tab 22c: toluène à 4%

t (h)	1	2	3	4
DO	0,036	0,066	0,200	0,570
x(bact/ml)	$0,9 \cdot 10^7$	$1,666 \cdot 10^7$	$11,2 \cdot 10^7$	$11,25 \cdot 10^7$
log X	6,95	7,23	7,69	8,15

tab 22d: toluène à 5%

t (h)	1	2	3	4	5
DO	0,032	0,083	0,210	0,550	0,550
X (bact/ml)	$0,8 \cdot 10^7$	$2,097 \cdot 10^7$	$5,25 \cdot 10^7$	$13,75 \cdot 10^7$	$13,75 \cdot 10^7$
log X	6,90	7,33	7,72	8,13	8,13

tab 22e: toluène à 6%

t (h)	2	4	5	6
DO	0,019	0,087	0,215	0,540
x(bact/ml)	$0,475 \cdot 10^7$	$2,175 \cdot 10^7$	$5,386 \cdot 10^7$	$13,5 \cdot 10^7$
log X	6,67	7,33	7,74	8,13

tab 22f: toluène à 7%

t (h)	2	4	5	6	7
DO	0,004	0,048	0,094	0,215	0,510
X (bact/ml)	$0,1 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^7$	$2,353 \cdot 10^7$	$5,375 \cdot 10^7$	$12,75 \cdot 10^7$
log X	6	7,08	7,38	7,74	8,10

tab 22g: toluène à 8%

ETUDE DE LA CROISSANCE DE PSEUDOMONAS SACCHAROPHILA SUR LE TOLUENE:

t (h)	1	2
DO	0,070	0,160
X (bact/ml)	$1,751 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^7$
log X	7,24	7,60

tab 23a : toluène à 2%

t (h)	1	2
DO	0,087	0,205
X (bact/ml)	$2,175 \cdot 10^7$	$5,125 \cdot 10^7$
log X	7,33	7,710

tab 23b : toluène à 3%

t(h)	1	2	3
DO	0,044	0,130	0,377
X (bact/ml)	$1,10 \cdot 10^7$	$3,25 \cdot 10^7$	$9,425 \cdot 10^7$
log X	7,05	7,51	7,97

tab 23c : toluène à 4%

t(h)	1	2	3	4
DO	0,040	0,068	0,195	0,550
x(bact/ml)	$1 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^7$	$4,875 \cdot 10^7$	$13,75 \cdot 10^7$
log X	7	7,23	7,68	8,13

tab 23d : toluène à 5%

t(h)	1	2	4	5	6
DO	0,032	0,096	0,220	0,530	0,530
X (bact/ml)	$0,8 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$	$5,511 \cdot 10^7$	$13,25 \cdot 10^7$	$13,25 \cdot 10^7$
log X	6,90	7,38	7,75	8,12	8,12

tab 23e : toluène à 6%

t(h)	2	4	5	6
DO	0,020	0,096	0,215	0,480
x(bact/ml)	$0,5 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$	$5,375 \cdot 10^7$	$12 \cdot 10^7$
log X	6,69	7,38	7,73	8,08

tab 23f : toluène à 7%

t(h)	1	2	4	5	6	7
DO	0,008	0,048	0,082	0,185	0,400	0,400
X (bact/ml)	$0,2 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^7$	$2,05 \cdot 10^7$	$4,625 \cdot 10^7$	$10 \cdot 10^7$	$10 \cdot 10^7$
log X	6,30	7,08	7,32	7,66	8,00	8,00

tab 23g : toluène à 8%

ETUDE DE LA CROISSANCE DE L'ESPECE BACILLUS CIRCULANS SUR LE TOLUENE:

t (h)	2	4	6	7	8
DO	0,035	0,075	0,112	0,126	0,126
x (bact/ml)	$05.25.10^7$	$1.125.10^7$	$1.68.10^7$	$1.89.10^7$	$1.89.10^7$
log X	6,72	7,05	7,22	7,27	7,27

tab 24a: toluène à 0.3%

t (h)	2	4	6	7	8
DO	0,032	0,064	0,106	0,121	0,121
x (bact/ml)	$0,48.10^7$	$0,96.10^7$	$1,59.10^7$	$1,815.10^7$	$1,815.10^7$
log X	0,68	6,98	7,20	7,26	7,26

tab 24b: toluène à 0.4%

t (h)	2	4	6	7	8	9
DO	0,029	0,059	0,087	0,098	0,104	0,104
x (bact/ml)	$0,435.10^7$	$0,885.10^7$	$1,305.10^7$	$1,47.10^7$	$1,56.10^7$	$1,56.10^7$
log X	6,63	6,94	7,11	7,16	7,19	7,19

tab 24c: toluène à 0.5%

TABLEAU N° : CONVERTISSANT LES CONCENTRATIONS DE POURCENTAGE VOLUMIQUES A DES  
 CPNCENTRATIONS MASSIQUES  
 (GRAMMES / LITRE).

Substrat \ %	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	2
Benzène	0.879	1.756	2.632	3.506	4.378	5.248	6.117	6.984	7.849	8.712	17.25
Toluène	0.866	1.730	2.593	3.454	4.313	5.170	6.026	6.880	7.733	8.589	17.000

Tableau n° : 25a

-16-

Substrat \ %	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Benzène	25,63	33,846	41,904	49,811	57,570	65,185	72,660	80,000	87,207	94,285	101,230
Toluène	25,252	33,346	41,285	49,075	56,719	64,222	71,587	78,818	85,918	92,892	99,743

Tableau n° : 25b



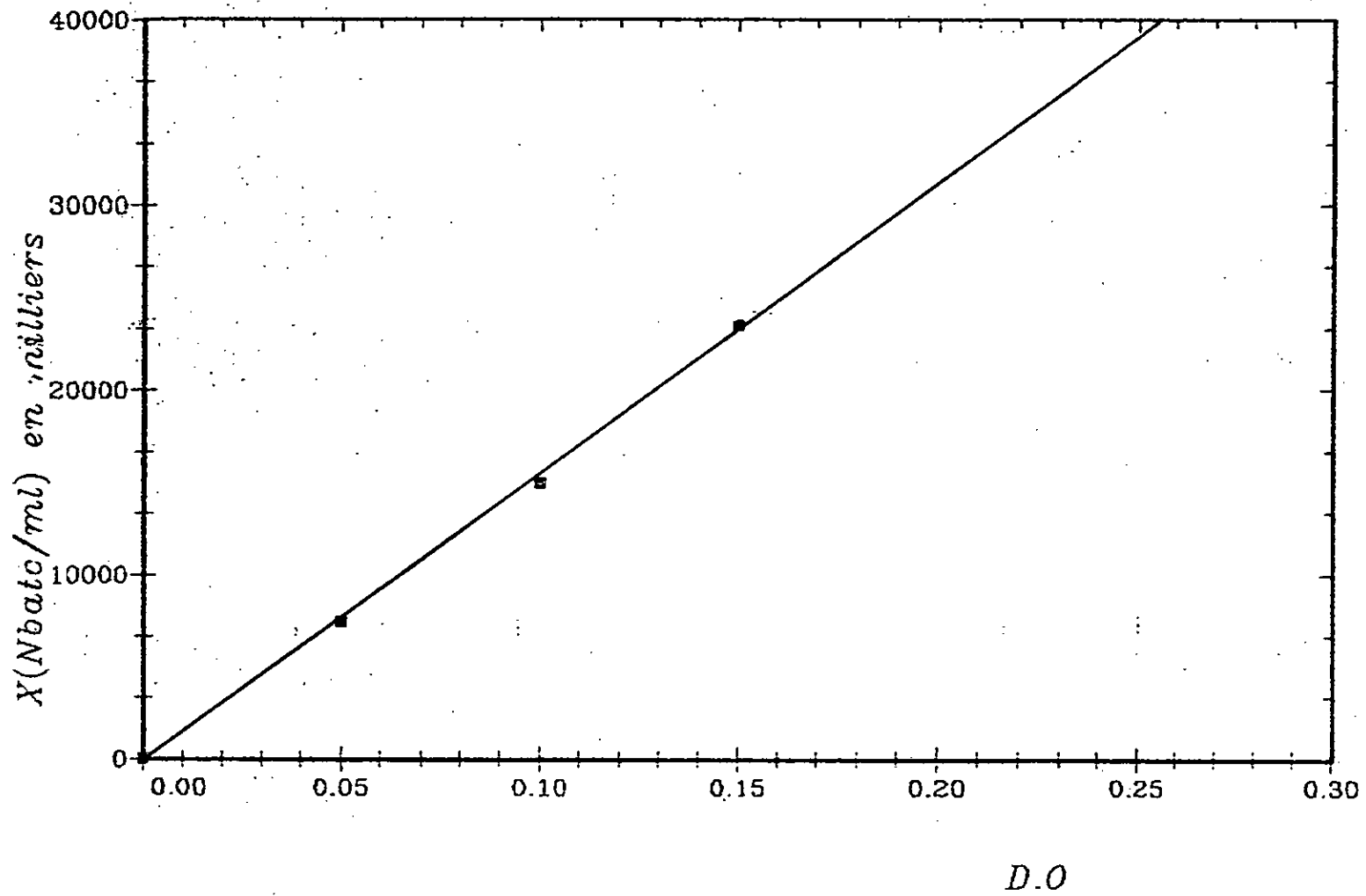


Figure N 04 : Courbe d'etalonnage de la souche Bacillus circulans sur le toluene

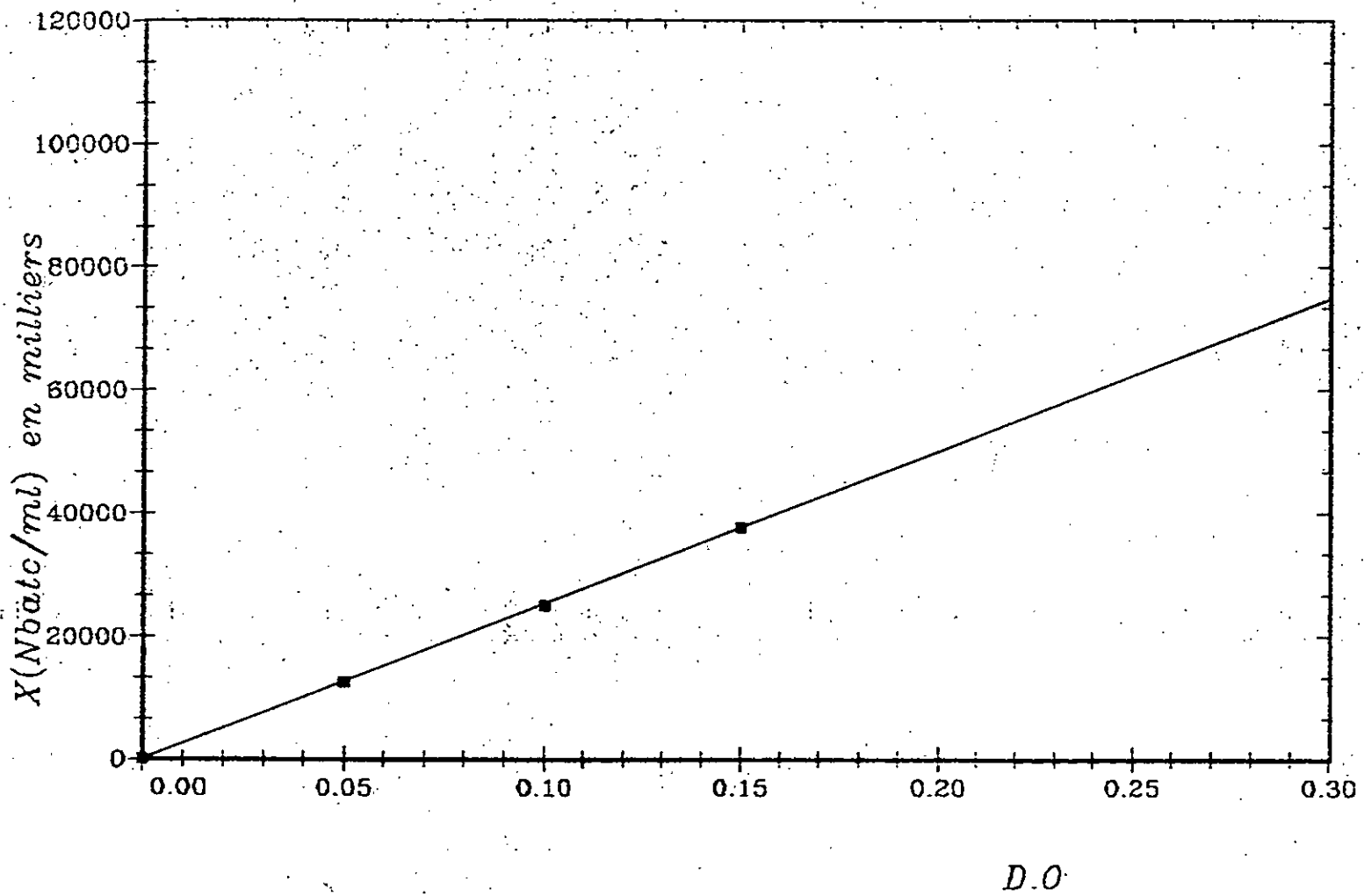


Figure N 05 : Courbe d'etalonnage du genre *Pseudomonas* sur le benzene et sur le toluene

Milieux de culture :

1- Milieu de culture pour le genre Pseudomonas :

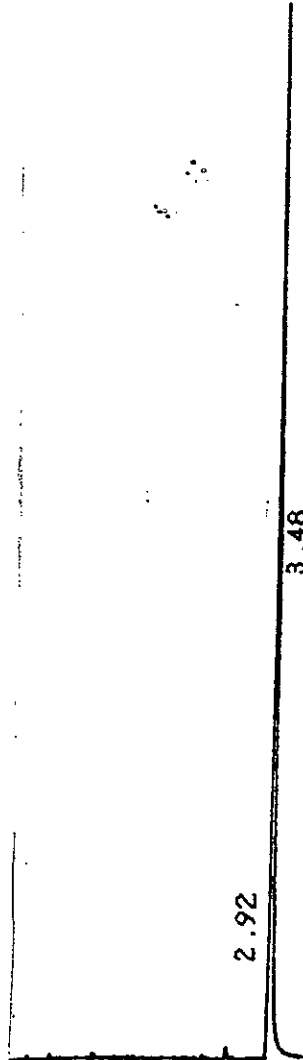
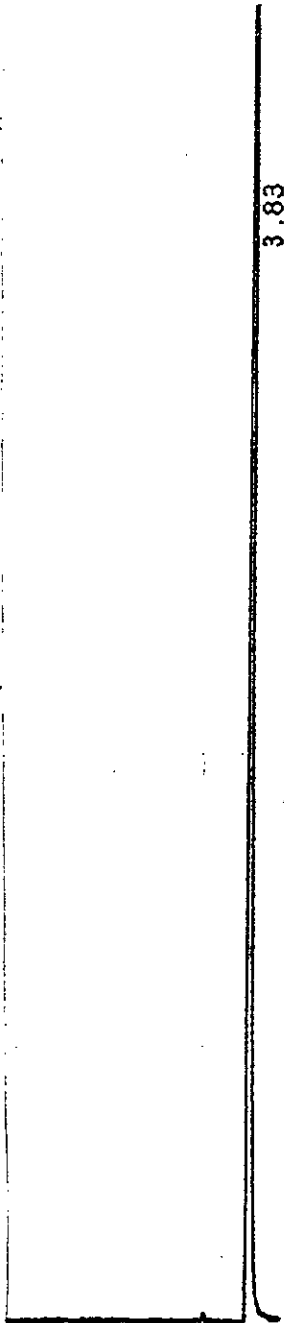
C'est le milieu de Palleroni Doudoroff (1972) :

- Solution tampon 0,33 molaire Na -K pH = 6,8 :
  - 0,33 molaire de  $\text{Na}_2 \text{HPO}_4 + 0,33 \text{M}$  molaire de  $\text{KH}_2 \text{PO}_4$ .
  - $\text{NH}_4 \text{Cl} = 2 \text{g}$
  - $\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2 \text{O} = 0,5 \text{g}$
  - $\text{Ca Cl}_2 : 0,05$
  - Hé  $\text{O}_2 : 1000 \text{ml}$
- pH ajusté à 7

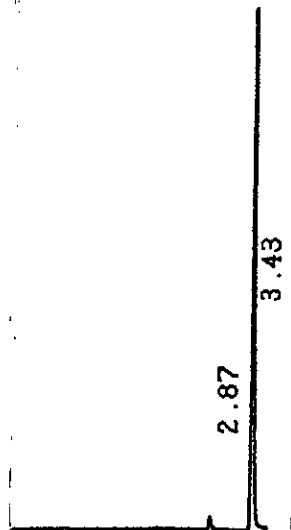
2- Milieu de culture pour le genre Bacillus:

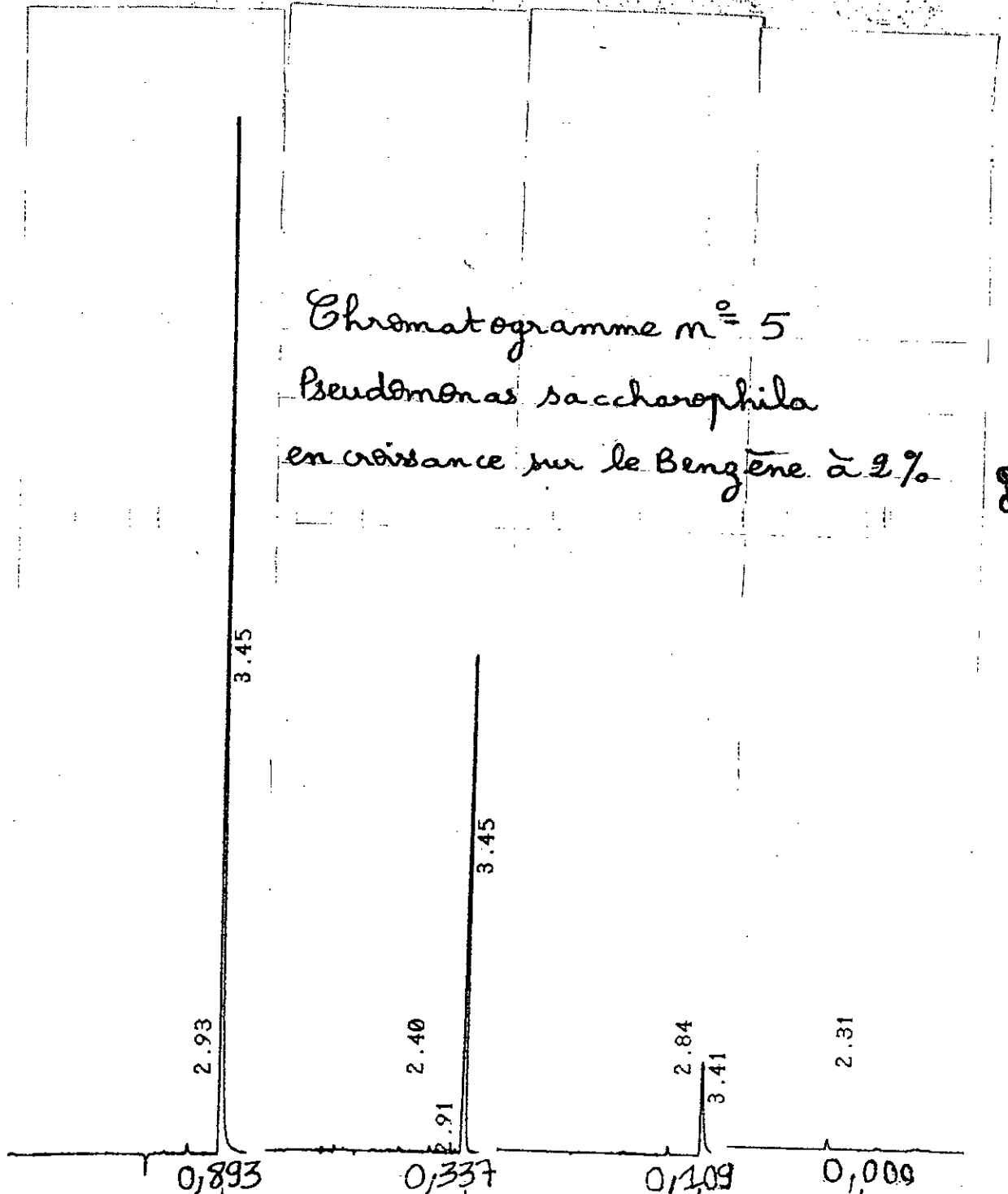
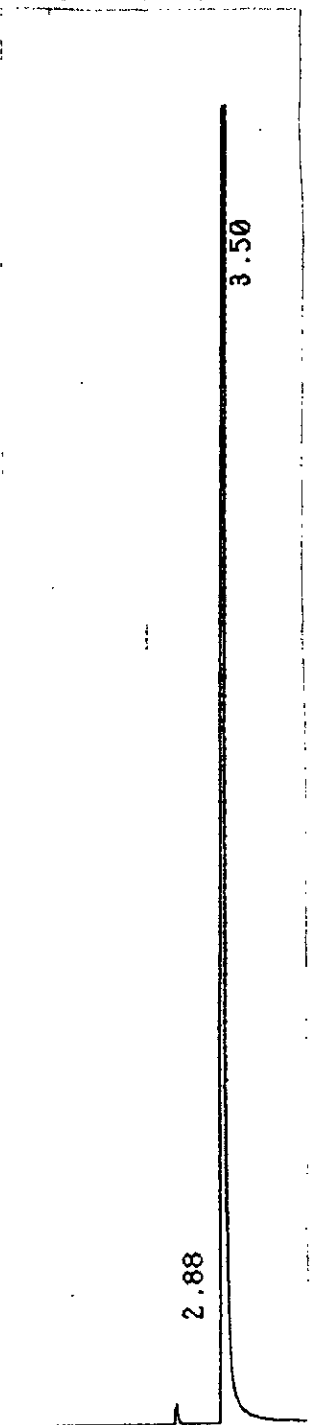
- $\text{KH}_2 \text{PO}_4 : 0,25 \text{g}$
  - $\text{K}_2 \text{H PO}_4 : 1 \text{g}$
  - Extrait de levure : 1g
  - $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4 : 2 \text{g}$
  - Nacl à 10% .....0,05 ml dans 100 ml du milieu
  - $\text{CaCl}_2$  à 10% .....0,05 ml dans 100 ml du milieu
  - $\text{MgSO}_4$  à 10%.....0,5ml dans 100 ml du milieu
  - $(\text{H}_2\text{O})\text{D} = 1000 \text{ ml}$
- pH ajusté à 7

Les milieux sont stérilisés dans un autoclave à  $120^\circ\text{C}$  pendant 20 minutes, les sels stérilisés séparément pour éviter les réactions de brunissement et de précipitation et sont ajoutés aux milieux stérilement de manière à préparer un litre d'un milieu spécifique pour la croissance d'un genre de microorganisme.



Chromatogramme n° 4  
Pseudomonas facilis en croissance  
sur le Benzène à 2%





c (%)

2

0,893

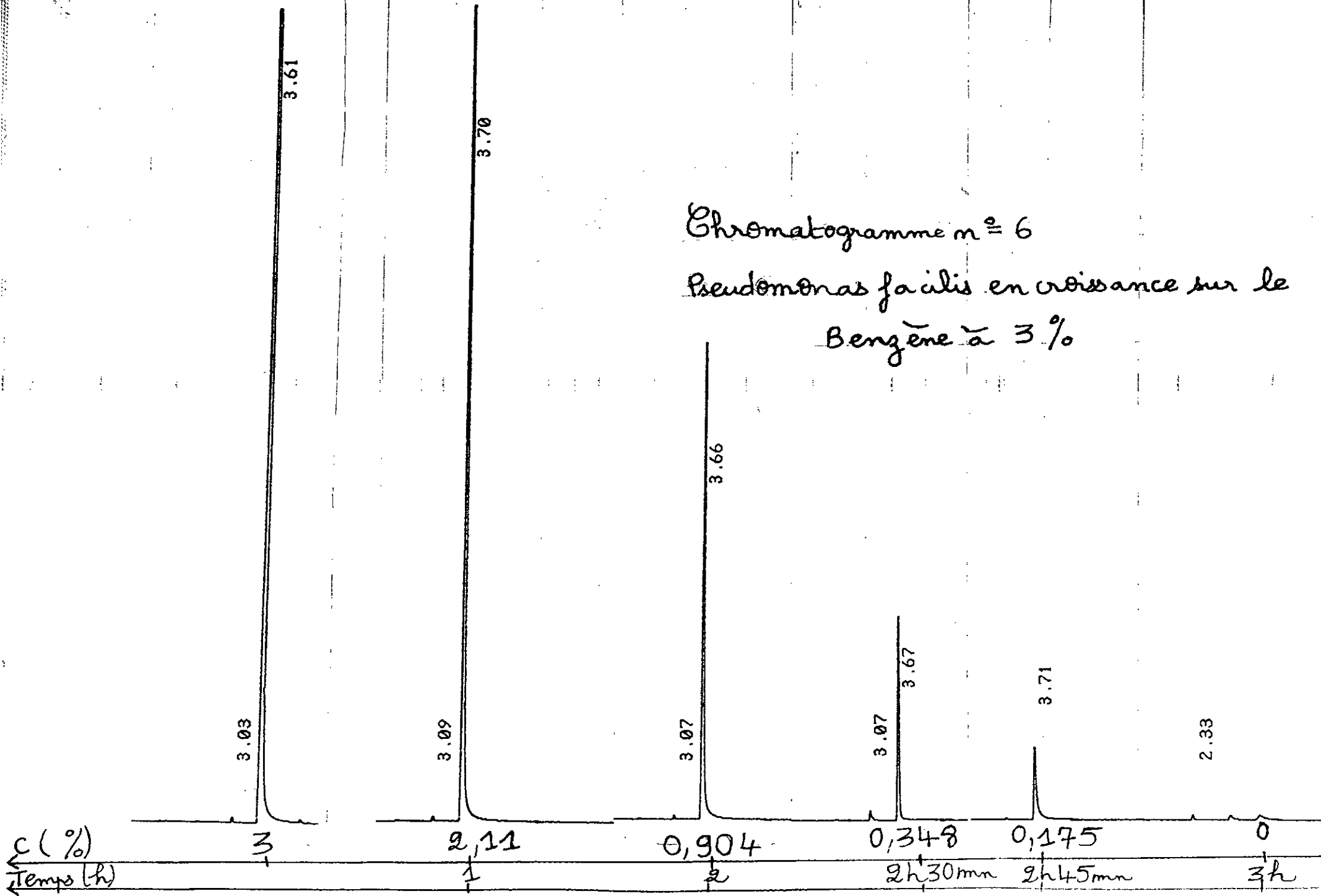
0,337

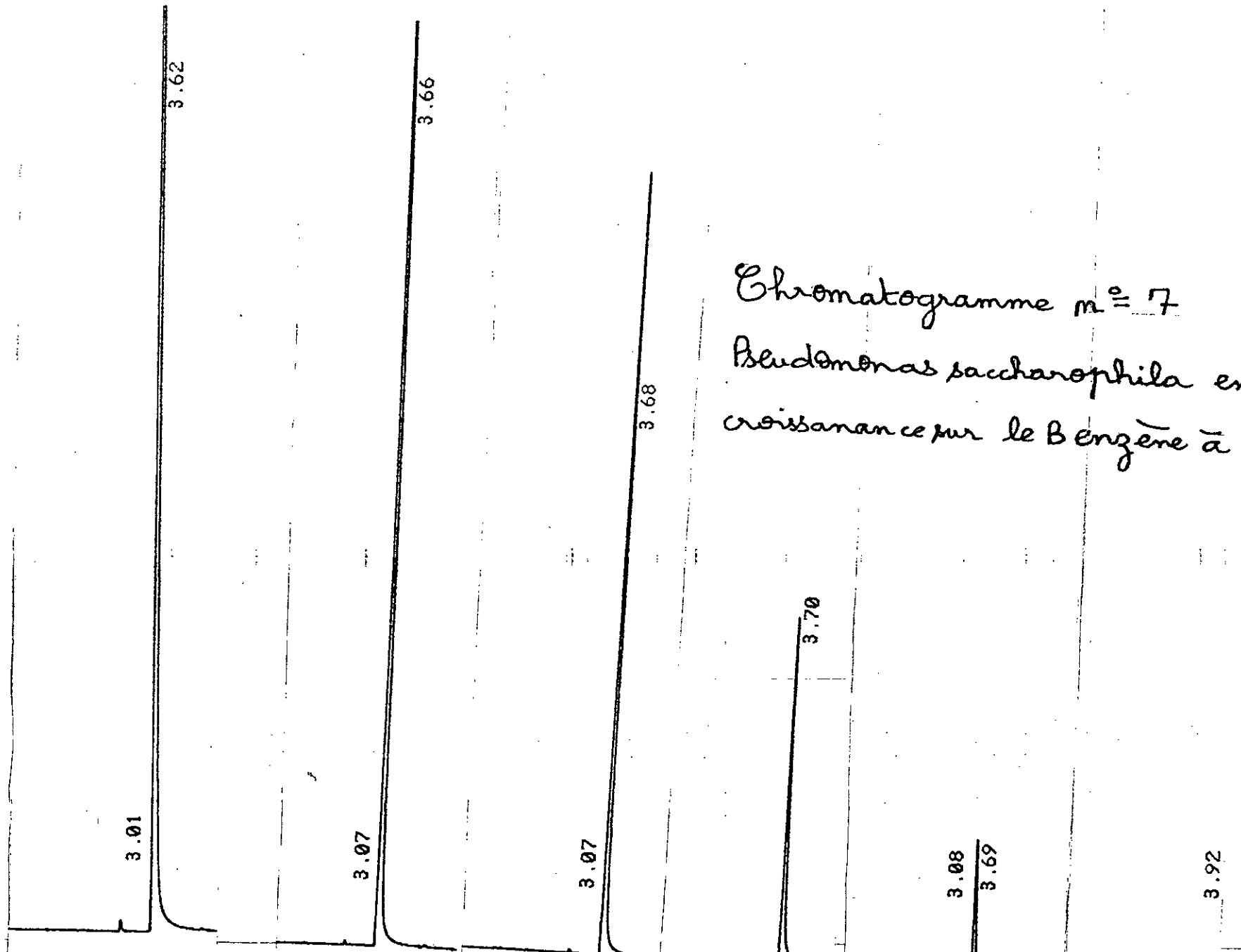
0,109

0,000

Chromatogramme n° 6

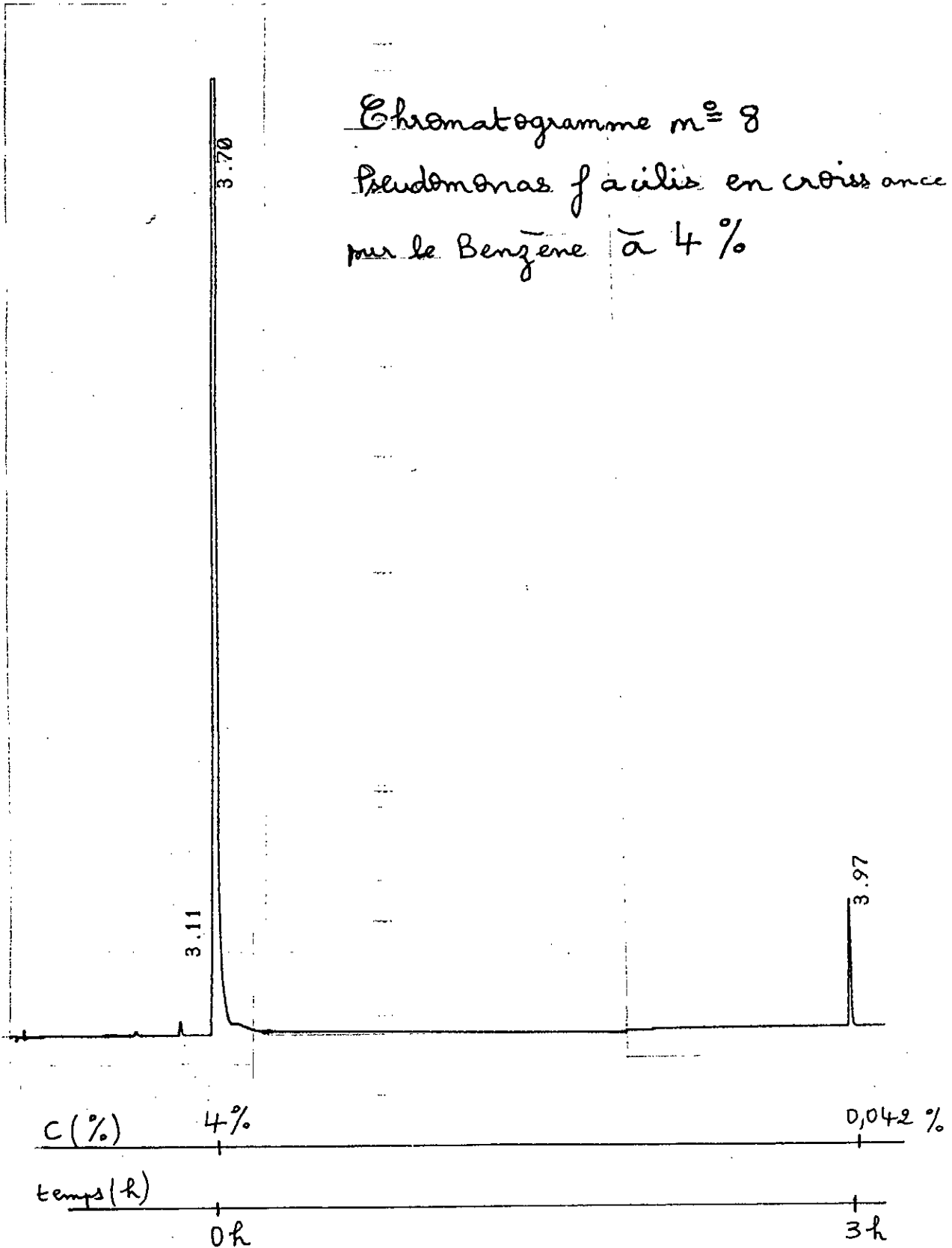
*Pseudomonas facilis* en croissance sur le  
Benzène à 3%





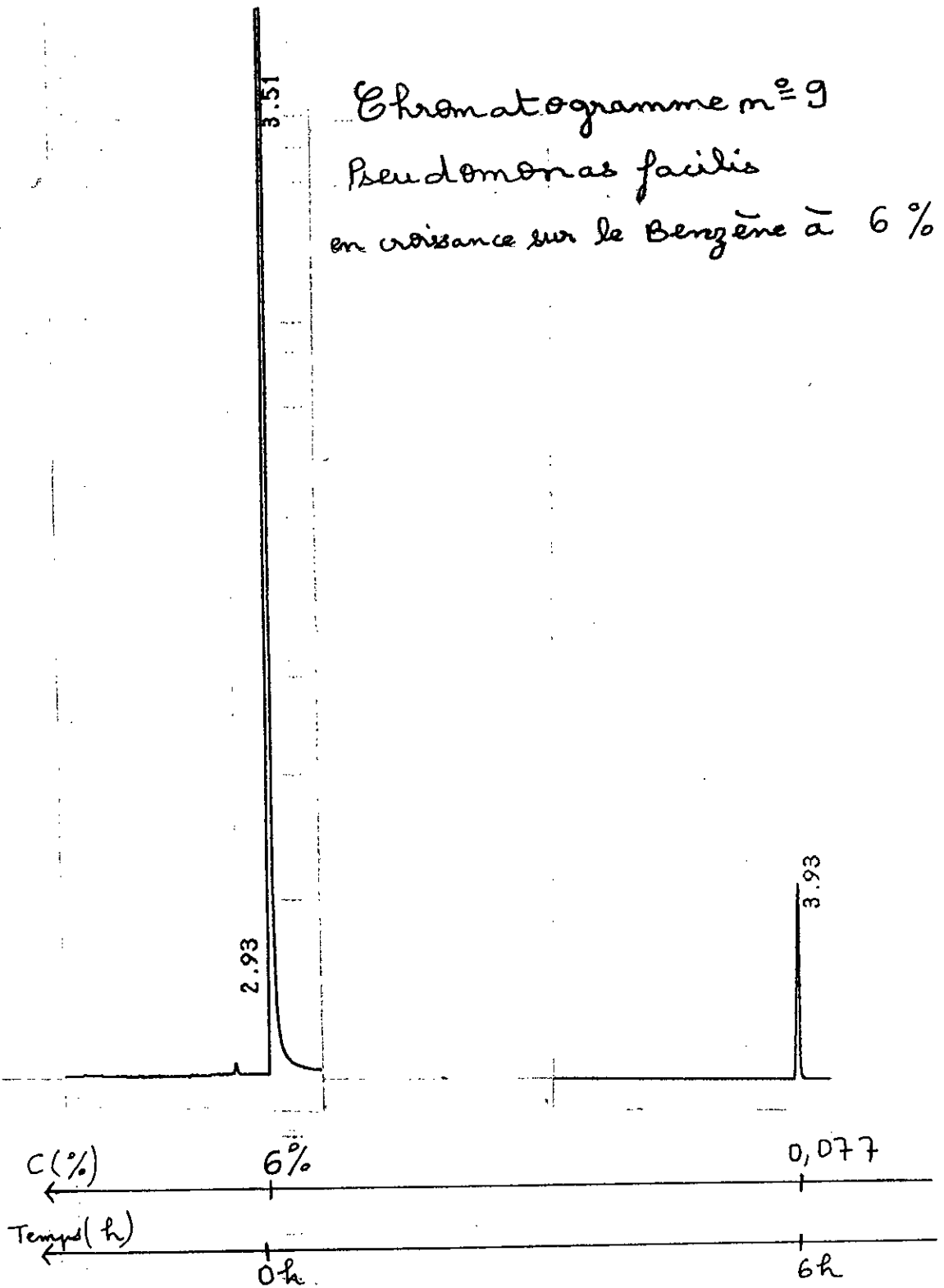
Chromatogramme n° 7  
*Pseudomonas saccharophila* en  
croissance sur le Benzène à 3%

Chromatogramme n° 8  
*Pseudomonas facilis* en croissance  
sur le Benzène à 4 %

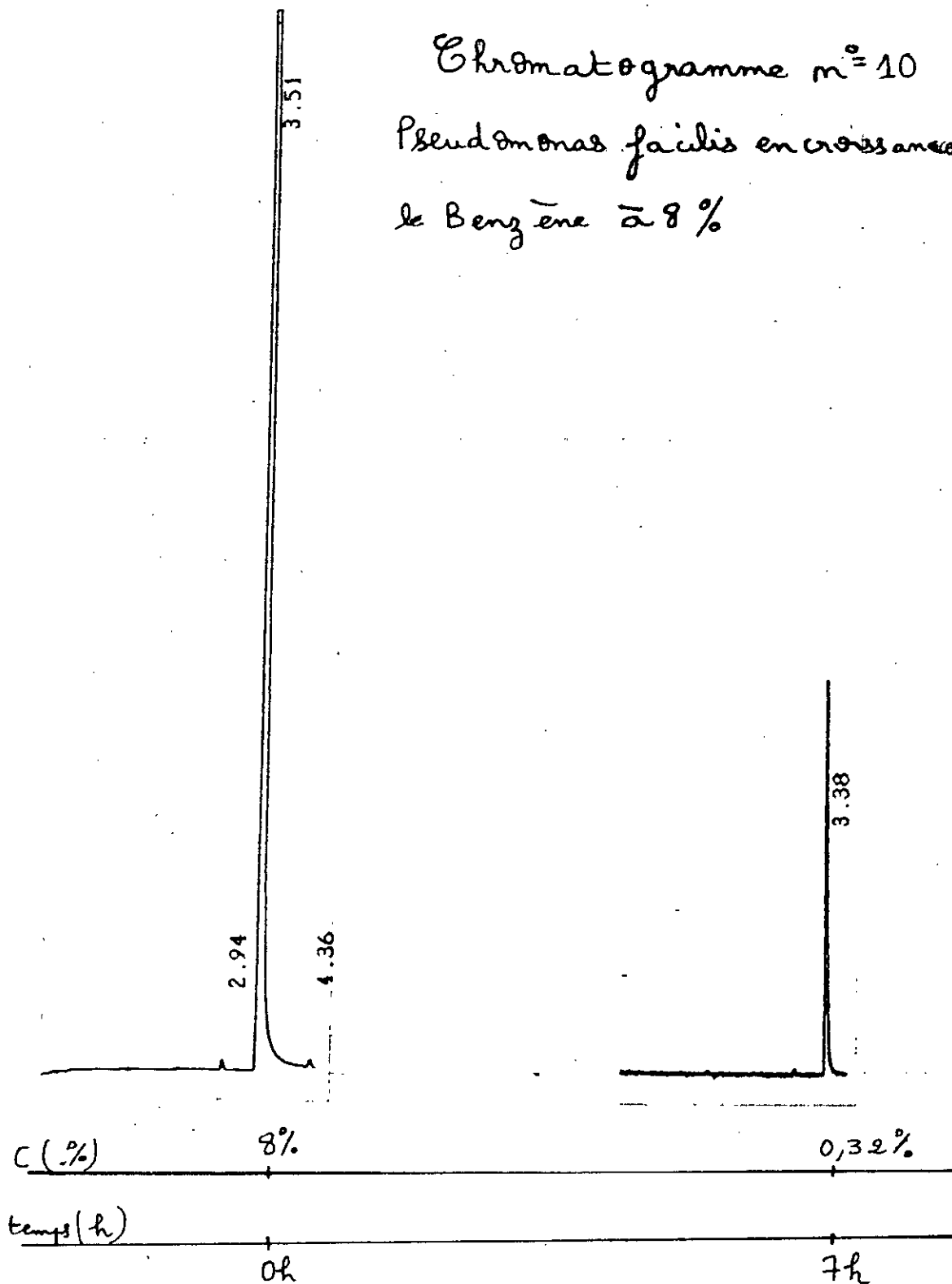




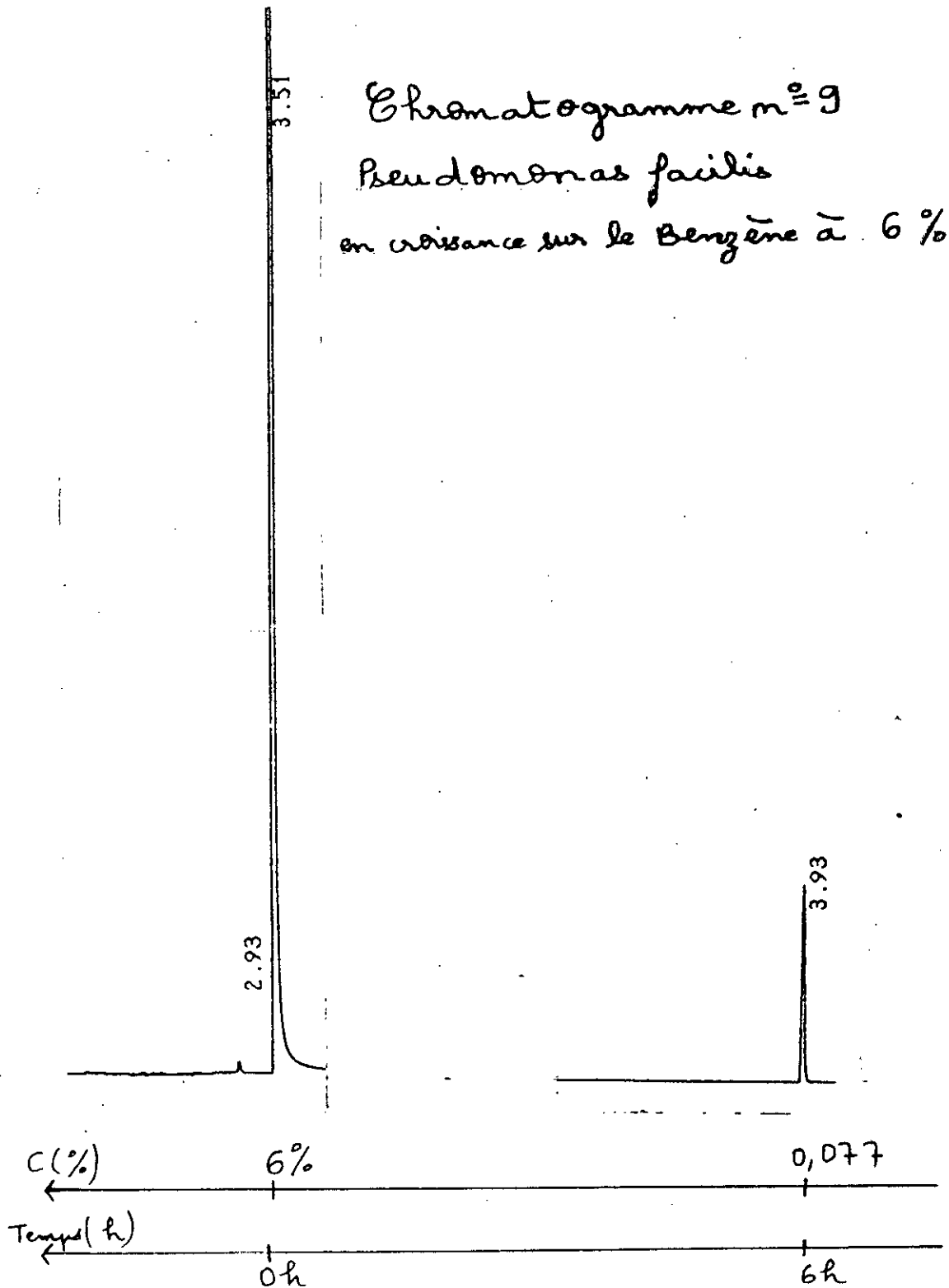
Chromatogramme n° 9  
*Pseudomonas facilis*  
en croissance sur le Benzène à 6%



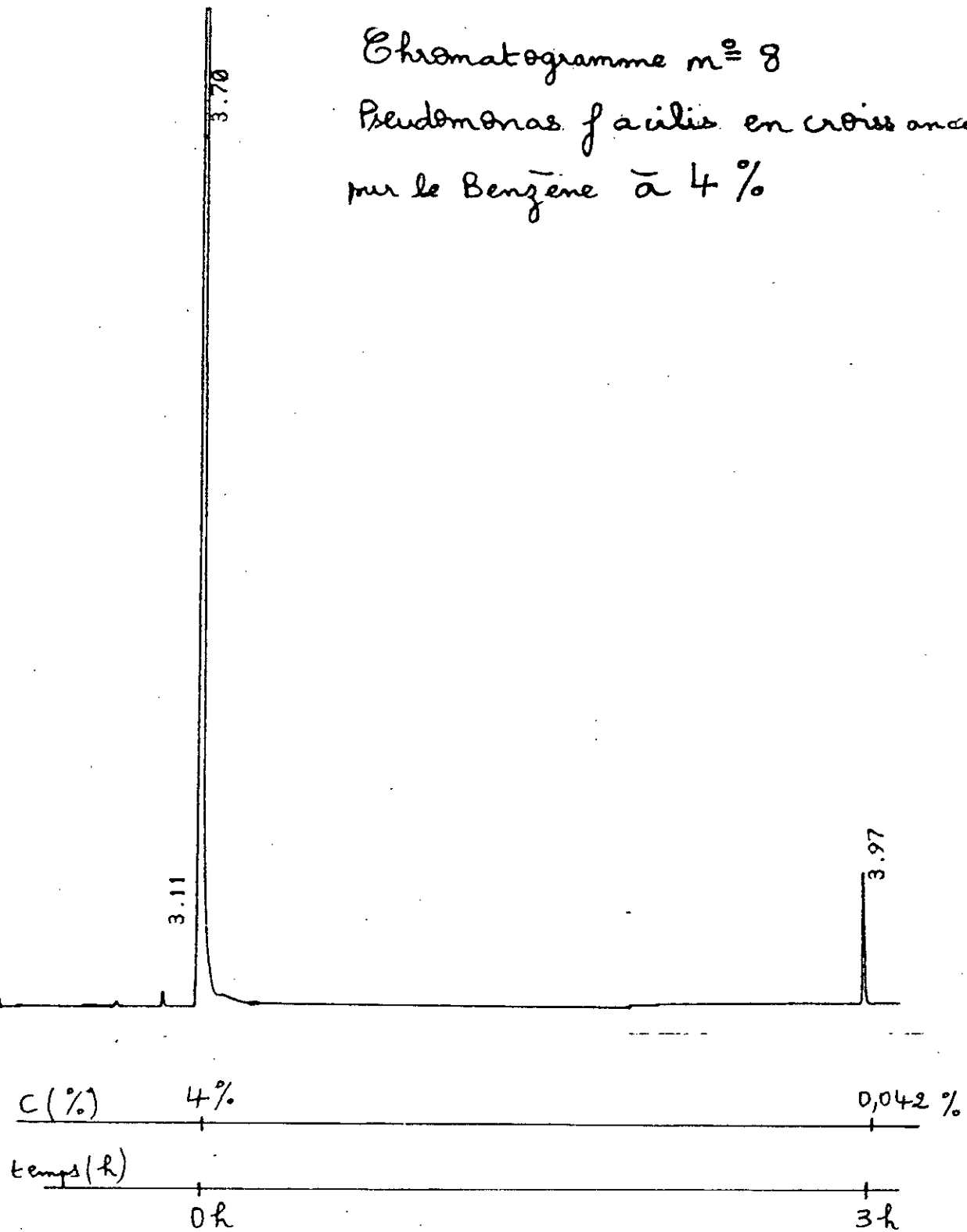
Chromatogramme n° 10  
Pseudomonas facilis en croissance sur  
le Benzène à 8%



Chromatogramme n° 9  
Pseudomonas facilis  
en croissance sur le Benzène à 6 %



Chromatogramme n° 8  
Pseudomonas. fauiliis en croissance  
sur le Benzène à 4 %



## BIBLIOGRAPHIE

- 1- G. MILLE, P. GARRIGUES, J. C. BERTRAND, 1992.  
« Les hydrocarbures en milieu marin : origine, devenir et analyse ».  
Analisys  
Magazine. Volume 20. N°6.
- 2- S. TAGGER, A. BRIANCHI, M. JULLIARD, J. LE PETIT et  
B. ROUX, 1981.  
« Traitement biologique de nappes d'hydrocarbures en mer et influence  
de facteurs abiotiques ».  
Deuxième colloque de microbiologie marine, Marseille 1981.  
Publication CNEXO. N°13 pp 143 - 150. 1981
- 3- BOUDRIES NADIA, 1993  
« Analyse des hydrocarbures dans l'eau du port d'Alger ».  
Mémoire Ingénieur, Génie de l'environnement, ENP.
- 4- LATROUS, 1992.  
« Analyse des hydrocarbures dans l'eau du port d'Alger ».  
Mémoire Ingénieur, Génie de l'environnement, ENP.
- 5- GOUGAM NAISSINA, 1990.  
« Contribution à l'étude de la pollution des eaux souterraines par les  
hydrocarbures Essai de traitement biologique.  
Thèse de Magister, ICI, USTHB
- 6- KEDDAM MALIKA, 1991.  
« Contribution à l'analyse quantitative par chromatographie en phase  
gazeuse des hydrocarbures totaux dissous dans l'eau ».  
Mémoire Ingénieur, Génie de l'environnement, ENP.
- 7- AXEL JOHNSON et E. COLAS, 1988.  
« Environnement et pollution ». Chimie Magazine, N° 62, Mars 1988.
- 8- ANDRE SIRVINS et BERNARD TRAMIER, 1985.  
« La biodégradation des hydrocarbures »  
La recherche N° 171, 1985.
- 9- J.R. VAILLANT, 1973.  
« Protection de la qualité des eaux et maîtrise de la pollution ». Edition  
Eyrolles.
- 10- PAUL L. BISHOP, 1983.  
« Marine pollution and its control ».  
New York : Mac Graw-Hill, 357 p

- 11- Merzougui Oumeya, 1993.  
« Etude physiologique des souches des genres *Pseudomonas* et *Bacillus* en croissance sur hydrocarbures et composés aromatiques ».  
Mémoire Ingénierat , ISN , USTHB.
- 12- BENABDELMOUMENE.F, SALHIM, 1991.  
« Essai de traitement biologique d'une eau polluée par le gas-oil avec l'utilisation de deux souches appartenent aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas* ».  
Mémoire Ingénierat , ICI , USTHB.
- 13-A.R.V BERTRAND , J.BRIAN, 1973  
« Prévention et lutte contre la pollution au cours des opérations de forage et de production en mer » Edition Techniques, Paris
- 14-P.SINGLETON ,D .SAINSBURY ,1984.  
« Bactériologie » .Edition Masson.
- 15- H .LECLERC, R. BUTIAUX ,1977 .  
« Microbiologie appliquée » .Edition Doin
- 16- H. LECLERC ,1983  
« Microbiologie générale » .Edition Doin,Paris.
- 17- M.F. WILLEMSE , COLLINET , J.L.CARSIN ,1981  
« Contribution du genre *Bacillus* à la Dégradation Bactérienne des Hydrocarbures »  
Deuxième Colloque de Microbiologie Marine , Marseille 24-25 Juin ,1981.  
Publication CNEOX (ACTES COLLOQUE) , N° 13, pp 111-117, 1984.
- 18-R .SCRIBAN .1984  
« les biotechnologies » .Edition Science et Techniques .
- 19- J.LE PETIT et M.H. N'GUEYEN ,1976  
« Besoins en phosphore des bactéries métabolisant les hydrocarbures en mer »  
Canadian journal of Microbiology .Volume 22, pp 1364-1373.
- 20- J.LE PETIT , J.GUTOT, Y.MARTIN et S.TAGGER ,1984.  
« Biodégradation du pétrole en mer .Influence de l'apport d'azote et du phosphore sous forme minérale ».  
Deuxième Colloque International du Bactériologie marine - CNRS , BREST, 1-5 Octobre 1984.  
Actes de Colloque , N° 3 , 1984, pp 639 -646.

21- E. AZOULAY, M. COLIN, H. DOU et G. MILLE, 1981.  
« Evolution des hydrocarbures et activité Bactérienne dans les sédiments  
cotiers Méditerranéens ».  
Deuxième Colloque de Microbiologie Marine Marseille 24-25 Juin  
1981.  
Publication CNEXO (ACTES COLLOQ) N°13, 1981 pp 119-142.